

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg

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

**Genetische Aberrationen auf Chromosom 7
bei gastralen diffus großzelligen
B-Zell-Lymphomen**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nils Lazer

geboren in Herdecke

Würzburg, August 2006

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

Koreferent: Priv. Doz. Dr. med. A. Zettl

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung : 26.02.2008

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Gastrale diffus großzellige B-Zell-Lymphome	1
1.2	Genetische Aberrationen von Chromosom 7	7
1.3	Mikrosatellitenanalyse	8

2. Material und Methoden

2.1	Material	9
2.2	Untersuchungsmethoden	
2.2.1	DNA-Extraktion	12
2.2.2	Mikrosatellitenanalyse	
2.2.2.1	Mikrosatellitenauswahl	14
2.2.2.2	PCR	16
2.2.2.3	Gelelektrophorese	18

3. Ergebnisse

23

4. Diskussion

27

5. Zusammenfassung

32

6. Anhang

6.1.	Abkürzungen	34
6.2	Literaturverzeichnis	36

1. Einleitung

1.1 Gastrale diffus großzellige B-Zell-Lymphome

Neben der klassischen Lokalisation lymphatischen Gewebes im Lymphknoten, der Milz oder im Knochenmark teilt man lymphatische Strukturen, die der Schleimhautbarriere oder den drüsigen Strukturen der lokalen Abwehr zuzuordnen sind, in primäres und sekundäres Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT) ein.

Das sekundäre MALT entsteht erst aufgrund chronischer Entzündungsprozesse an Lokalisationen, an denen primär keine lymphatischen Strukturen ausgebildet sind. Zum sekundären MALT zählen insbesondere Lokalisationen im Magen und Duodenum, Haut, Speicheldrüsen, Thymus, Schilddrüse und Lunge ¹. Im Magen entsteht sekundäres MALT vor allem aufgrund chronischer Gastritis, häufig verursacht durch *Helicobacter pylori* ².

Wegweisend für die Erkennung der extranodalen Marginalzonenlymphome (EMZL) als eigene Lymphomgruppe war das von Isaacson ³ beschriebene „MALT-Konzept“ für lymphatische Infiltrate im Gastrointestinaltrakt. Es ließ sich erkennen, dass diese Lymphome nach klinischen Gesichtspunkten eine enge Beziehung zum lymphatischen Gewebe (MALT) besitzen. Vor allem permeable Schleimhäute wie die des Gastrointestinaltraktes, die in direktem Kontakt zur Umwelt stehen, brauchen zum Schutz gegen mögliche krankheitserregende Einflüsse ein spezialisiertes Gewebe. Das in verschiedenen Organen angesiedelte MALT bildet offenbar eine immunologische Funktionseinheit im Bereich der Schleimhäute. Im Unterschied zum Lymphknoten befindet sich das MALT jedoch in Nachbarschaft epithelialer Strukturen in Form von Drüsen und/oder Oberflächenepithel.

Aus diesem lymphatischen Gewebe kann dann wie aus jedem anderen lymphatischen Gewebe eine Entartung als Folge klonaler Dysregulation der zellulären Proliferation und/oder Änderung der Überlebensfähigkeit der Zellen stattfinden. Durch Dysregulation der zellulären Proliferation kann es zur klonalen Expansion der aus den Marginalzonen-B-Zellen der Lymphfollikel entstandenen

neoplastischen Zellen kommen. Diese Marginalzonen-B-Zell-Lymphome (MZBCL), eine Gruppe von B-Zell-Lymphomen mit Ursprung in Marginalzellen der Sekundärfollikel, die zu den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) zählen, kommen an verschiedenen Lokalisationen vor: am häufigsten in der Mukosa- bzw. epithelassozierten Form als extranodale Marginalzonenlymphome (EMZL) vom MALT-Typ, seltener als nodale MZBCL oder als splenische MZBCL. In der neusten WHO-Klassifikation ⁴ aus dem Jahre 2001 stellen diese drei Typen jeweils eine eigene Entität dar. Ursächlich für die Entstehung der extranodalen MZBCL vom MALT-Typ findet man oft eine Beteiligung von chronisch endogenen oder exogenen Entzündungen, häufig im Rahmen einer Autoimmunerkrankung. Im Magen spielt die *Helicobacter pylori* (H.p.)-Infektion eine große Rolle ^{5,6}, in der Schilddrüse die Hashimoto-Thyreoiditis ⁷ und in der Speicheldrüse das Sjögrens Syndrom ⁸. In einer Studie von Bouzourene et al. ⁹ wurde festgestellt, dass bei einer Besiedlung mit H.p. bei niedrigmalignen Lymphomen von 63% und bei hochmalignen Lymphomen von 38% die H.p.-Infektion signifikant mit dem Grad und der Invasionstiefe korreliert. Aus diesen Ergebnissen folgerte man, dass die MALT-Lymphome nicht direkt abhängig von der H.p.-Infektion sind, letztere aber ein möglicher Promotor in der Lymphomentstehung sein kann. Über eine Antigen-abhängige Phase kommt es zur multifokalen B-Zell-Klon-Stimulation, die von einer Antigen-unabhängigen Phase abgelöst wird, in der es über T-Zell-abhängiges Wachstum ¹⁰ zu einer autonomen Klon-Proliferation kommt ¹¹. Die pathogenetische Rolle der Infektion zeigt sich auch zum Teil in der vollständigen Remission gastraler MZBCL vom MALT-Typ (low grade) nach H.p.-Eradikation in einer relativ frühen Phase (in Stadium E I oder E II) ^{12,13,14}.

Ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Lymphome sind genetische Aberrationen. Vieles ist für die MZBCL-Pathogenese noch unklar, der endgültige Mechanismus noch Objekt vieler Untersuchungen. Es hat sich aber gezeigt, dass mehrere zytogenetische Alterationen häufig ¹⁵ in MALT-Lymphomen vorkommen. Dazu zählen die Translokationen t(1;14)(p22;q32), t(11;18)(q21;q21) und t(14;18)(q32;q21). Von diesen hat sich die Translokation t(11;18) als häufigste bei den niedrig malignen MZBCL von MALT-Typ ^{16,17}

erwiesen, je nach Untersuchung bei 21% - 60%. Aufgrund dieser Translokation kommt es zu einer Fusion der beiden Gene *API2* und *M(A)LT1*. Das Gen *API2* wurde ursprünglich identifiziert als ein Protein, welches an den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor bindet^{18,19}, der Familie der „inhibitor of apoptosis (IAP)“ angehört²⁰ und so verschiedene Apoptose-Wege verhindert^{21,22}. Die genaue Funktion von *M(A)LT1* ist noch unbekannt. Es wurde die Hypothese aufgestellt^{23,24,25}, dass dieses Fusionsprotein auch die Apoptose verhindert und so den MALT-Lymphomen einen Überlebensvorteil gibt, welcher eine antigen-unabhängige Proliferation erlaubt. Verschiedene Autoren^{15,16} berichten von einer Häufigkeit dieser Translokation bei von ihnen untersuchten MALT-Lymphomen von 33% bis 53%. Rosenwald et al.²⁶ stellten fest, dass t(11;18) fast ausschließlich nur bei MZBCL vom MALT-Typ vorkommt.

Die Translokation t(14;18)(q32;q21) fusioniert die beiden Gene *IGH* und *MALTI* bei MZBCL. Auf Chromosom 14 ist die Genregion der schweren Ketten (JH) der Immunglobuline (Ig), kurz *IGH*, und auf Chromosom 18 das schon oben beschriebene Gen *M(A)LT1* beteiligt. Durch die Fusion *IGH/M(A)LT1* kommt es zu einer monozytoiden Morphologie der B-Zellen.

Aus der Translokation t(1;14) resultiert ebenfalls eine Überexpression des Gens *BCL10*. Dieses neue Gen gehört in die Reihe der apoptosesignalisierenden Gene. Der Effekt des durch t(1;14) veränderten *BCL10* wird auf zwei unterschiedlichen Wegen deutlich: zum einen erhalten die B-Zellen einen Überlebensvorteil durch den Verlust der Apoptose-Induktion²⁷, zum anderen werden durch eine NF-kappaB-Aktivierung einige antiapoptotische sowie proliferative Signale ausgeschüttet²⁸.

Diffus großzellige B-Zell-Lymphome (**DLBCL**) bilden in der neuesten WHO-Klassifikation⁴ eine eigene Entität. Sie sind eine der häufigsten Gruppen der NHL (30-40%), charakterisiert durch einen aggressiven klinischen Verlauf, zu 40% extranodal und zu 60% nodal lokalisiert. Das **DLBCL des Magens** gilt heute als Subtyp dieser Lymphomgruppe. Diese Lymphome entstehen (meist) de novo und werden deshalb als primär bezeichnet. Oder sie entstehen sekundär im Verlauf eines weniger aggressiven Lymphoms, z.B. eines MZBCL des MALT-Typs. So kann es auf dem Boden des chronischen Entzündungsprozesses (im Magen H.p.-

Gastritis) und der daraus über Antigen-Stimulus resultierenden B-Zell-Klon-Proliferation zu einer schrittweise fortschreitenden Akkumulation der genetischen Abnormalitäten kommen. Während bei den niedrig malignen MZBCL vom MALT-Typ knapp die Hälfte ²⁹ schon sehr früh die Translokation t(11;18)(q21;q21) vorweisen kann, konnte diese Translokation bei den DLBCL nur sehr selten nachgewiesen werden ¹⁶. Dagegen lässt sich bei den DLBCL häufiger die *BCL2*-Protein-Überexpression und die Mutation im Tumorsuppressor-Gen *p53* ³⁰ finden. Diese Mutation scheint einer der Auslöser der Transformation von niedrig zu hoch malignen Lymphomen zu sein ³¹.

Die extranodalen Lymphome kommen am häufigsten im Magen- und Darmtrakt vor, die Inzidenz variiert in verschiedenen internationalen Studien zwischen 24% (NCI-Studie von 1467 Fällen aus 100 repräsentativen Kliniken ³²) bis zu 48% ³³. Neueren Literaturangaben zufolge ^{3,34} machen die extranodalen Lymphome in West- und Mitteleuropa einen Anteil von bis zu 49% aller malignen Lymphome aus.

Neben den schon erwähnten Genen werden auch immer Beteiligungen von bekannten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (TSG) gezeigt. Zusätzlich zu den durch Translokationen verändert abzulesenden Genen *BCL2*, *BCL10* und dem neuen Fusionsgen *API2-M(A)LT1* werden unter anderem noch an der Entstehung der DLBCL beteiligten Gene bezeichnet: *BCL6*, *MYC*, *p53* und *p73*.

Während *BCL6* und *MYC* zu den Onkogenen gezählt werden, fallen *p53* und *p73* in die Reihe der Tumorsuppressorgene. Während *p53*-Inaktivierung einer der häufigsten Ereignisse von humanen Malignitäten ist, ist *p73* noch nicht so intensiv untersucht. In einer Studie von Stoffel et al. ³⁵ zeigten 27% mittels FISH untersuchten DLBCL eine Deletion auf der Chromosomenregion 1p36. Hier ist das Gen *p73* - ein mögliches TSG - lokalisiert, welches durch die Deletion inaktiviert werden könnte. Schon früh wurde die generelle Rolle der Inaktivierung des TSG *p53* erkannt. Zunehmend in den letzten Jahren häufen sich die Untersuchungen von *p53*-Veränderungen bei speziellen Tumoren. Auch bei DLBCL wurde *p53*-Genmutationen detektiert, sogar in solch einem Ausmaß, dass Patienten mit niedrig-malignen DLBCL mit einer *p53*-Mutation eine schlechtere Überlebensrate haben als solche ohne eine entsprechende Mutation ³⁶.

In einer anderen Studie unseres Institutes aus dem Jahr 2000³⁷ wurde eine hohe Anzahl von „loss of heterozygosity“ (LOH) auf dem langen Arm von Chromosom 6 gefunden. Hier liegt vielleicht ein neues TSG, welches bis jetzt noch nicht bekannt ist und noch weiter untersucht werden muß.

Neben den TSG spielen aber auch die Onkogene eine entscheidende Rolle in der Tumorentwicklung der Lymphome. Über *BCL6* gibt es viele Studien. Das Gen *BCL6* kodiert für ein Zinkfingerprotein und wirkt als ein Transkriptionsrepressor³⁸. Schon in den frühen neunziger Jahren wurde mehrfach seine enge Beziehung zu den DLBCL nachgewiesen^{39,40}. Wegen der vielen Translokationspartner gilt es als sicher, dass *BCL6* über die Fusion bei der Translokation über den neuen Mechanismus als Promotor für den Fusionspartner wirkt, wobei sich bis jetzt noch kein Fusionspartner zahlenmäßig hervorhebt. Dagegen wurden Rearrangements mit *BCL6* in bis zu 35% der Fälle bei DLBCL gefunden⁴¹. Aufgrund dieses hohen Prozentanteils wurden bereits Studien über die klinische Relevanz⁴³ von *BCL6*-Rearrangements sowie als prognostischer Marker für Patienten mit *BCL6*-Translokation vorgeschlagen^{42,43}.

Ein weiteres relativ häufig betroffenes Gen ist der Transkriptionsfaktor *MYC*. Lokalisiert in dem Locus 8q24 wird durch die Translokation t(8;14)(q24;q32) diese Region in die Nähe des IgH-Lokus auf Chromosom 14 transferiert. Diese Mutation führt zu einer Deregulation und Überexpression des Transkriptionsfaktors *MYC*⁴⁴. Diese Translokation t(8;14) kommt in fast allen Fällen von Burkitt-Lymphomen und in bis zu 15% bei DLBCL vor^{43,45}.

Neben diesen oben beschriebenen Veränderungen wird in der Literatur auch noch von unterschiedlichen Trisomien bei DLBCL berichtet^{46,47,48}. Die molekulare Entwicklung sowie die klinische und tumorpathogenetische Relevanz dieser Veränderungen sind bis heute noch unklar und scheinbar spielen sie keine große Rolle.

Andere genomische Aberrationen bei DLBCL wie Amplifikation oder ähnliches wurden bis jetzt schon untersucht. Durch vergleichende genomische Hybridizationsarrays wurden neben vielen anderen auch Aberrationen auf

Chromosom 7⁴⁹ entdeckt. Es zeigte sich allerdings, dass bis jetzt nur potentielle Kandidatengene herausgearbeitet wurden.

Die Überlebensrate von Patienten mit DLBCL nach Chemotherapie ist u.a. abhängig von der Molekulargenetik des Tumors selbst. Durch Genexpressionsanalysen mit cDNA-Chips fand man 3 unterschiedliche Subgruppen in der heterogenen Gruppe der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome: den „Keimzentrums-B-Zelltyp“ (im Englischen als „germinal center B-cell-like (GCB) DLBCL“ bezeichnet), den „aktivierten B-Zelltyp“ (als „activated B-cell-like (ABC) DLBCL“ bezeichnet) und einen dritten Typ, im Englischen nur kurz „type 3“ genannt⁵⁰. Alle 3 Subtypen weisen eine unterschiedliche Pathogenese auf: GCB wird charakterisiert durch die Genexpression von normalen GCB-Zellen, ABC durch die Genexpression von aktivierten peripheren Blut-B-Zellen, währenddessen „type 3“ weder die eine noch die andere dieser Genexpressionen vorweist. In retrospektiven Studien wurden Gensignaturen definiert, die zum Zeitpunkt der Diagnose eine Aussage über den klinischen Verlauf der Erkrankung erlauben. So haben Patienten mit DLBCL vom GCB-Typ eine höhere Überlebensrate als Patienten mit dem ABC-Typ oder „type 3“^{51,52}.

1.2 Genetische Aberrationen auf Chromosom 7

Bis heute wurden genetische Abnormalitäten des Chromosoms 7 bei NHL in zahlreichen unterschiedlichen Studien beschrieben. Man verwendete für diese Untersuchungen Techniken wie die klassische Zytogenetik, die fluoreszierende *in situ* Hybridization (FISH) oder die vergleichende Genom-Hybridization (CGH)^{39,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65}. Das durchschnittliche Vorkommen von dem Verlust des langen Armes von Chromosom 7, del(7q), ist relativ niedrig in der Gruppe der NHL als Gesamtheit, so z.B. in 24 von 558 Fällen (4,3%)⁵⁸. Erstaunlicherweise aber ist es dagegen bei einigen Subtypen der Lymphome deutlich erhöht, so z.B. bei den splenischen Lymphomen mit villösen Lymphozyten (SLVL). 26% dieser Lymphom-Untergruppe zeigt unterschiedliche genetische Veränderungen wie del(7)(q22-32) oder t(7q22)⁶⁰. Die Häufigkeit von Aberrationen auf Chromosom 7 bei splenischen MZBCL, einem Subtypen der extranodalen MZBCL, liegt sogar bei bis zu 40%⁶¹. Mittels CGH wurde bei follikulären Lymphomen genomische Aberrationen in bis zu 80% der untersuchten Fälle entdeckt, 18% der Fälle betrafen davon das Chromosom 7⁶². Der Verlust des langen Armes vom Chromosom 7, del(7q) und dem damit verbundenen Verlust von Tumorsuppressorgenen ist möglicherweise eine frühere Veränderung in der Karzinogenese vieler Tumore⁶³. Im Gegensatz dazu wurde der Verlust von 7p, dem kurzen Arm des Chromosoms, bis jetzt in nur einem einzigen Fall bei MALT-Lymphomen beschrieben⁶⁴. Bei anderen Krebsarten wie z.B. dem Wilms-Tumor^{65,66} scheint er dagegen häufiger aufzutreten.

1.3 Mikrosatellitenanalyse

Genomische Instabilität (ein inhärentes Charakteristikum der DLBCL) manifestiert sich im menschlichen Genom als Mikrosatelliteninstabilität und als chromosomale Instabilität.

Mikrosatelliten sind Arrays repetitiver Sequenzen, die häufig sowohl in Exons als auch in Introns vorkommen. Diese Arrays bestehen größtenteils aus Tandem-Wiederholungen von 1, 2 oder 3 Nukleotiden, wobei Dinukleotide am häufigsten sind. Sie besitzen eine variable Anzahl von Wiederholungen, die charakteristisch für jedes einzelne Individuum ist. Die Anzahl der Wiederholungen bleibt in der Mitose und Meiose konstant und die konstanten Mikrosatelliten werden auf die nächste Generation weitervererbt.

Mutationen in diesen Mikrosatelliten, verursacht durch einen defekten DNA-Reparier-Prozess, zeigen sich als Veränderung der Länge der Arrays, d.h. der Anzahl der Wiederholungen der Mikrosatelliten. Dieses Phänomen wird heute allgemein als **Mikrosatelliten-Instabilität (MSI)** bezeichnet. Ein bekanntes Beispiel dafür ist das hereditäre nicht-polypöse Kolon-Karzinom. Hier wurde ein Defekt in DNA-Reparier-Genen festgestellt, der es den Zellen nicht erlaubt, ihre Nukleotid-Fehler während der Replikation zu reparieren.

Die chromosomale Instabilität kann sich in der Mikrosatellitenanalyse entweder als Verlust eines Allels, also des Verlustes der Heterozygotie („**loss of heterozygosity**“ = **LOH**) oder als Amplifikation des Allels äußern. Nach der Knudson-Hypothese⁶⁶ kommt es bei TSG nach einer Mutation im 1. Allel durch Deletion im 2. Allel eines Gens zu dem Verlust der Heterozygotie.

Die genspezifischen Veränderungen können auch durch eine Mikrosatelliten-Analyse detektiert werden, weil die Mikrosatelliten in der Nähe oder in der Coding-Sequenz von bestimmten Genen liegen. Kommt es zu Veränderungen in diesen Genen, kommen auch Veränderungen in den Mikrosatelliten vor, welche durch die Mikrosatelliten-Analyse nachgewiesen werden können. Von den Verlusten der Heterozygotie von Mikrosatelliten kann man auf eine solche Veränderung in den Genen schließen. Solche Gene können z.B. eine Tumorsuppressorfunktion haben und diese durch die Veränderung verlieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Bei den untersuchten 31 Tumoren handelte es sich um diffus großzellige B-Zell-Lymphome des Magens (DLBCL). In allen Fällen wurde die Diagnose entsprechend der Kriterien der REAL-Klassifikation ⁶⁷ bzw. der WHO-Klassifikation ⁴ gestellt. Das Material stammte ausschließlich aus dem Referenzzentrum für Lymphknotenpathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg. Die Patienten waren alle an einem diffus großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) des Magens erkrankt, in 6 Fällen zeigte sich sogar eine begleitende niedrigmaligne MALT-Komponente. Anhand der Musshoff-Klassifikation ⁶⁸ befanden sich die Patienten in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung: 4 Patienten waren im Stadium E I1, 13 in E I2, 9 Tumore zeigten das Stadium E II1, weitere 4 das Stadium E II2 und ein Patient das Stadium E III. Zum Zeitpunkt der Tumorentnahme zeigten alle 31 Patienten noch keinen klinischen Hinweis auf eine generalisierte Erkrankung. Die Population hatte eine Altersspanne von 31 bis 79 Jahre, der Durchschnitt lag bei 58 Jahren. Das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug 2.44; in dieser Studie gab es 22 Männer und 9 Frauen.

Bei allen Proben handelte es sich um tiefgefrorenes Frischmaterial. Als Kontrollmaterial wurde lymphomfreies Gewebe verwendet, zumeist aus Lymphknotenmaterial, manchmal aber auch aus Darm-, Leber-, Milzgewebe oder aus peripherem Blut. Zuvor wurde mit einer PCR-Analyse der schweren Ketten-Gene überprüft, ob das Material lymphomfrei war ⁶⁹. Mittels eines Mikrotoms wurden von den Gewebeblöcken des Tumorgewebes wie des Normalgewebes je nach Größe des zu untersuchenden Gewebes zwischen 10 und 20 ca. 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Um das Gewebe besser unter dem Mikroskop erkennen zu können, wurden der erste und der letzte Schnitt jeder einzelnen Serie mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die restlichen Schnitte blieben ungefärbt. Unter dem Mikroskop wurde das zu gewinnende Gewebe gekennzeichnet und mit Hilfe einer Rasierklinge von den ungefärbten Schnitten abgekratzt und in ein steriles 1,5

ml Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen. So wurden jeweils für jeden Patienten in einem eigenen Reaktionsgefäß die Gewebeausschnitte mit hohem Tumoranteil bzw. mit dem tumorfreien Kontrollmaterial gesammelt.

Tabelle 1: Patientendaten

Patienten Nummer	Geschlecht	Alter bei Diagnosestellung	Tumorstadium nach Musshoff	H.p.-Status
1	m	72	E II2	unbek.
2	m	58	E III1	pos
3	w	35	E I1	pos
4	m	74	E II2	pos
5	m	75	unbek.	unbek.
6	m	67	E II2	unbek.
7	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	m	74	E I1	neg
9	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	m	71	E II2	neg
11	w	66	E I2	pos
12	m	31	E I2	neg
13	m	66	E I1	pos
14	unbek.	64	E III	neg
15	m	63	unbek.	neg
16	w	71	E I1	neg
17	w	55	E I1	neg
18	w	67	E III1	pos
19	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	m	42	E III1	neg
21	unbek.	unbek.	E I1	neg
22	w	66	E I1	neg
23	m	33	E I2	unbek.
24	m	67	E I2	neg
25	m	38	E I2	unbek.
26	m	36	E I2	unbek.
27	m	35	E III1	neg
28	m	75	E II2	unbek.
29	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	w	49	E III1	neg
31	m	33	E II2	unbek.

2.2 Untersuchungsmethoden

2.2.1 DNA-Extraktion

Das abgekratzte tiefgefrorene Frischmaterial wurde in Reagenzgefäße übertragen, mit 300 µl Digestionspuffer versetzt und nach kurzem Schütteln bei 50°C für 12 Stunden inkubiert.

Digestionspuffer:

100 mM NaCl

10 mM TrisCl (pH 8)

25 mM Ethylendiamintetratessigsäure (EDTA) (pH 8)

0,5% Sodiumdodecylsulfat (SDS)

1,5 mg Proteinase K (20 µl von 20 mg/ml-Verdünnung)

War wenig DNA zu erwarten, inkubierte man das tiefgefrorene Frischmaterial mit dem Digestionspuffer nach Higuchi und Proteinase K.

Digestionspuffer nach Higuchi

50 mM KCl

10 mM Tris HCl (pH 8,3)

2,5 mM MgCl₂

0,1 mg/ml Gelatine

0,45% Nonidet P40

0,45% Tween 20

Proteinase K (10 µl von 20 mg/ml-Verdünnung)

Nach der Inkubation, wenn alles vollständig verdaut war, wurde zur Extraktion 600 µl Phenolchloroform (Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol - 25:24:1) hinzugefügt, danach das Gefäß geschüttelt und die Flüssigkeit für 5 Minuten mit

hoher Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde als Überstand in ein neues Gefäß umgefüllt und der oben beschriebene Vorgang zweimal wiederholt. In der anschließenden Extraktion wurde anstelle von 600 µl Phenolchloroform dann 500 µl Chloroform zu der gewonnenen Flüssigkeit hinzugefügt und die Gewinnung wie oben zweimal mit Schütteln und Zentrifugieren durchgeführt, jeweils unter Verwendung der oberen wässrigen Phase. Auch dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss an diese Vorgehensweise gab man für die Fällung der DNA 10% des Extraktion-Volumens an 3 M Natriumazetat hinzu (meistens ca. 30-35 µl), schüttelte wiederum kurz und gab 1ml -20°C -kalten 100%igen Ethanol dazu, schüttelte erneut kurz und inkubierte die Proben bei -20°C für mindestens 2 Stunden, vorzugsweise jedoch über Nacht. Nach dieser Inkubationszeit schüttelte man zunächst die Proben für 5 min bei hoher Geschwindigkeit und entfernte den Ethanol, indem man den Überstand verwarf. Anschließend wurde -20°C -kalter 70%iger Ethanol zugegeben, das Gefäß kurz geschwenkt und wieder 5 min mit hoher Geschwindigkeit geschüttelt. Man entfernte den Ethanol erneut, wiederholte eventuell die Prozedur mit dem 70%igen Ethanol und inkubierte die Proben mit offenem Gefäß bei 37°C für ca. 30 min, damit eventuell noch vorhandene Ethanolreste verdunsten konnten. Zu dem getrockneten DNA-Pellet wurden 200 µl destilliertes Wasser hinzugegeben und nach Auflösen des Pellets die DNA-Konzentration mittels eines Spektrometers bei 260 nm gemessen. Anschließend wurde abhängig von der gemessenen DNA-Konzentration diese DNA-Lösung auf 10 ng/µl mit destilliertem Wasser verdünnt, meist auf ein Volumen von 200 µl.

2.2.2 Mikrosatellitenanalyse

2.2.2.1 Mikrosatellitenauswahl

Für die PCR wurden anhand einer Übersicht der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) Primer der Mikrosatellitenmarker ausgesucht, die das gesamte Chromosom 7 in mehr oder weniger gleichgroßen Schritten abdeckten. Um einige der Hot-Spots noch genauer zu lokalisieren, verwendete man später weitere Primer, die dem jeweiligen Hot-Spot in Telomer- und Zentromer-Richtung am nächsten benachbart waren. Diese sind wie alle anderen Primer in der auf der nächsten Seite aufgeführten Liste mit Name, Annealing-Temperatur, Produktgröße, Lokalisation, Markierung und Menge für die PCR aufgelistet.

Die Primer wurden von Applied Biosystems selbst oder von der Firma MWG-Biotech (München) hergestellt. Jeweils ein Primer des Primer-Paars wurde am 5'-Ende für die spätere Detektion mit einem der fluoreszierenden Phosphoramide FAM, HEX, NED oder ROX gekoppelt.

Tabelle 2: Daten der verwendeten Mikrosatellitenmarker (anhand „Chromosome 7 Annotation Project“)

Marker	Lokus auf Chromosom 7	Annealing-Temperatur (in °C)	Produktgröße (in bp)	Fluoreszenz Markierung	Primermenge pro Reaktion (in µl)
D7S641	7p22.1	55	84-100	Fam	0,5
D7S2464	7p21.3	55	170-206	Fam	0,35
D7S664	7p21.3	55	203-215	Ned	0,35
D7S507	7p21.2	58	148-168	Fam	0,5
D7S488	7p21.2	58	135-156	Fam	0,5
D7S654	7p21.2	58	207-227	Fam	0,5
D7S493	7p21.1	55	194-224	Hex	0,5
D7S529	7p15.3	58	218-226	Hex	0,5
D7S2252	7p15.1	55	248-260	Fam	0,35
D7S510	7p14.1	55	252-264	Ned	0,5
D7S478	7p13	55	118-130	Hex	0,5
D7S2427	7p13	55	222-254	Hex	0,3
D7S506	7p12.1	55	117-143	Ned	0,3
D7S2476	7q11.23	55	128-160	Hex	0,5
D7S669	7q11.23	55	123-139	Hex	0,5
D7S630	7q21.2	55	198-222	Hex	0,5
D7S657	7q21.2	55	245-264	Ned	0,5
D7S515	7q22.1	55	128-190	Fam	0,5
D7S501	7q22.3	56	163-179	Hex	0,5
D7S496	7q31.1	58	129-141	Fam	0,2
D7S2459	7q31.1	55	140-152	Fam	0,25
D7S523	7q31.2	55	223-240	Hex	0,5
D7S486	7q31.31	60	114-146	Hex	0,24
D7S522	7q31.31	55	217-229	Hex	0,5
D7S530	7q32.3	55	106-118	Hex	0,25
D7S2560	7q34	55	149-195	Ned	0,25
D7S2513	7q34	55	157-181	Hex	0,25
D7S483	7q36.2	55	166-188	Ned	0,5
D7S2423	7q36.3	55	205-259	Ned	0,5

2.2.2.2 PCR

Zur Amplifikation der Mikrosatelliten aus der extrahierten DNA wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den oben erwähnten Primer-Paaren verwendet.

Zuerst wurden die gesamten PCR-Utensilien bis auf die strahlensensible DNA mit ultraviolettem Licht bestrahlt. Danach wurde die PCR getrennt für Tumor- und Kontrollgewebe gemixt. Dabei wurden in ein PCR-Gefäß 20 µl des folgenden Ansatzes gegeben:

5 µl Patienten-DNA (aus 10 ng/µl Gebrauchslösung)

plus

15 µl „Mastermix“.

Der *Mastermix* ist zusammengesetzt aus:

2,00 µl 10x PCR-Puffer II (100 mM Tris HCl pH 8,3, 500 mM KCl),

2,50 µl MgCl₂ (25 mM),

3,60 µl dNTPs (10 mM),

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

X µl Primer (3´ und 5´-Primer, individuelle Menge, siehe Tabelle S. 16)

und zu 15 µl Gesamtvolumen autoklaviertes destilliertes Wasser.

Die PCR-Proben wurden nun bei ihrer entsprechenden Annealingtemperatur einzeln oder in Form einer Multiplexreaktion (d.h. die Verwendung von mehr als einem Primer-Paar in einem Reaktionsgefäß bei derselben Annealingtemperatur) nach folgendem Schema in einem „PE2400 Thermozykler“ (Applied Biosystems, Foster City, USA) amplifiziert:

Hotstart: 15:00 min bei 95°C
10 Zyklen: 00:30 min bei 95°C Denaturierung
01:00 min bei variabel Annealing
01:00 min bei 72°C Elongation
20 Zyklen: 00:30 min bei 92°C Denaturierung
01:00 min bei variabel Annealing
01:00 min bei 72°C Elongation
anschließend: 10:00 min bei 72°C Terminale Elongation
Abschließend Herunterkühlen bis auf 4°C.

Die Annealing-Temperaturen sind unterschiedlich und wurden für jeden Primer bzw. für jede einzelne Multiplex-Reaktion einzeln festgelegt.

2.2.2.3 Gelelektrophorese

Nach der PCR wurden die Proben zur Auftrennung auf ein Gel aufgetragen.

Man verwendete dazu ein 6%iges Polyacrylamid-Gel und den 377A-DNA-Sequenzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Das Gel bestand aus:

18 g Harnstoff,

20 ml Aqua destillata,

10 ml Laufpuffer 5xTBE (540 mg Tris, 275 mg Borat, 41,4 mg EDTA plus zu

10 ml autoklaviertes destilliertes Wasser) und

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

Zur Polymerisierung des Gels gab man direkt vor dem Gießen folgendes hinzu:

30 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin) und

250 µl 1% APS (Ammoniumpersulfat).

Zur besseren Auftrennung der Proben im Gel konnte man bei Bedarf folgendes 5%iges Polyacrylamidgel mit 31% Formamid verwenden ⁷⁰:

13,44 g Harnstoff,

8 ml Laufpuffer 5x TBE,

12,8 ml Formamid,

5 ml Acrylamidlösung (40% - 1:29) und

zu 40 ml Gesamtvolumen autoklaviertes destilliertes Wasser.

Auch hier gab man direkt vor dem Gießen folgendes hinzu:

30 µl TEMED und
300 µl 10% APS.

Das Gel musste nun in beiden Fällen für mindestens 45 min polymerisieren. In der Zwischenzeit bereitete man die PCR-Proben für den Lauf vor; man mischte 2,5 µl PCR-Probe mit 3 µl Laufpufferlösung. Diese bestand aus

2,3 µl Formamid,
0,2 µl Größenstandard „ROX 350“ und
0,5 µl Blue Dextran Puffer.

Danach wurden die Proben für 7-8 Minuten bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und jeweils nur 1,1 µl des Probenmixes in die Geltaschen injiziert.

Der Gellauf dauerte bei 51°C, 3000 Volt, 60 mA und 200 Watt je nach Größe der aufzutrennenden Produkte zwischen zwei und drei Stunden.

Analyse der Elektrophorese

Der Gellauf erfolgte im 377A-DNA-Sequenzierer und wurde mittels der Computerprogramme ABI GeneScan® und ABI Genotyper® (Applied Biosystems, Foster City, USA) und manuell analysiert.

Die Proben wandern auf dem Gel im elektrischen Feld als negativ-geladene Teilchen von der Kathode zur Anode und werden dabei entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Kleinere PCR-Fragmente bewegen sich aufgrund ihrer Größe schneller als größere Fragmente in Richtung der Anode und passieren dabei einen Laserscanner, welcher mit Wellenlängen im λ -Bereich zwischen 488 und 514,5 nm während des Laufes an immer derselben Linie orthogonal zur Laufrichtung scannt. Passiert nun ein PCR-Produkt diese Stelle im Gel, trifft der Laser auf den Fluoreszenzmarker des Produktes, welcher ein Licht

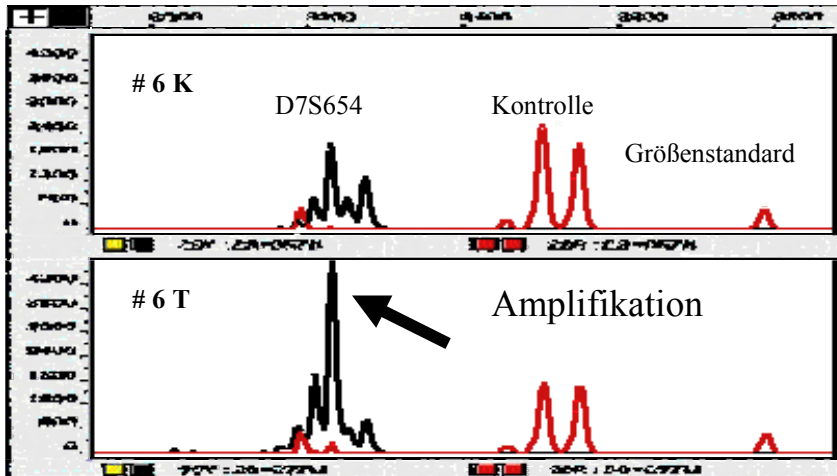
seiner bestimmten Wellenlänge emittiert. Dieses Licht wird mit einer CCD-Kamera in elektrische Impulse umgewandelt und diese über den angeschlossenen Computer registriert. Um die Elektropherogramme zu erhalten, muss man die Spuren auf dem gescannten Gelbild im Computer festlegen. Auf der x-Achse dieser Elektropherogramme ist die Produktgröße in Basenpaaren (bp) aufgetragen, durch den in jeder Spur mitlaufenden Größenstandard in „ROX 350“ definiert; auf der y-Achse ist die Signal-Intensität der Produkte in Fluoreszenzeinheiten in Fluoreszenz-Units (FU) aufgetragen, welche ein Maßstab für die Menge des amplifizierten Primers ist. Je mehr Produkt amplifiziert wurde, umso stärker ist dieses Signal. Zur Analyse wurden nun die Höhe des Peaks und das Integral unter der Kurve des jeweiligen Allels bestimmt und damit das Tumor- und das Kontrollgewebe semiquantitativ miteinander verglichen.

Bei der Untersuchung nach MSI wurde jeder einzelne amplifizierte Marker analysiert, unabhängig davon, ob das Produkt homozygot oder heterozygot war, denn laut Definition ⁷¹ ist eine Mikrosatelliteninstabilität jedes Vorkommen eines zusätzlichen Allels im Tumorgewebe.

Bei der Untersuchung nach LOH oder Amplifikation wurden nur die rein heterozygoten Allele untersucht, da man weder beim Homozygoten noch beim MSI ein LOH oder eine Amplifikation feststellen kann. Bei Auffälligkeiten untersuchte man die Verhältnisse der Integrale von Tumorgewebe zu Kontrollgewebe. Bei einer Differenz von mehr als 30% zwischen diesen beiden Integralen wurde eine genetische Aberration in Erwägung gezogen. Um zwischen LOH und Amplifikation unterscheiden zu können, wiederholte man die gesamte Reaktion in einer PCR-Multiplex-Reaktion, bei der man mindestens einen oder besser zwei Standardmarker hinzugefügt hatte und verglich die Auffälligkeit der Integrale mit den heterozygoten Standardmarkern. Die genetische Aberration wurde dadurch erkannt, dass sich ihr Quotient deutlich von den anderen unterschied. Eine Vergrößerung eines Tumorallels im Vergleich zu seinem Kontrollallel von mehr als 40% wurde als Amplifikation, eine Verkleinerung um mehr als 40% als LOH bezeichnet.

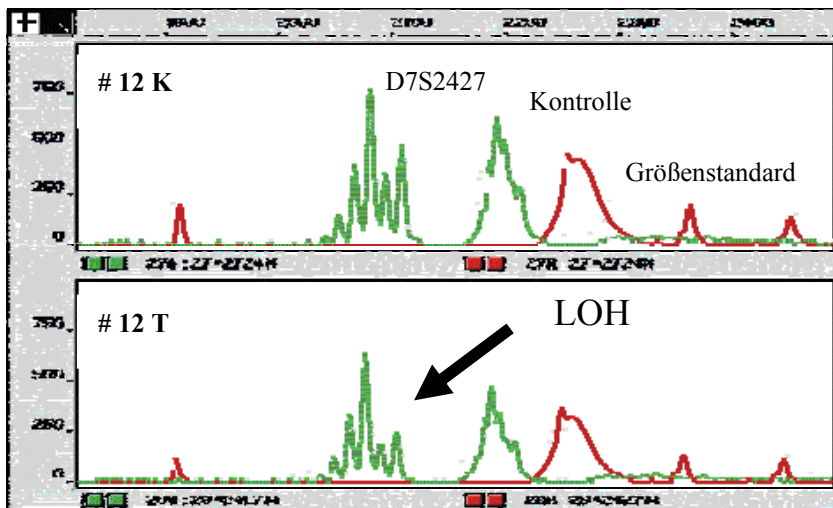
Um als gesichertes Ergebnis in diese Untersuchung aufgenommen zu werden, wurden solche auffälligen Marker mindestens zweimal wiederholt.

Grafik 1: Amplifikation des Mikrosatelliten D7S654 bei 7p21.1 bei Patient #6



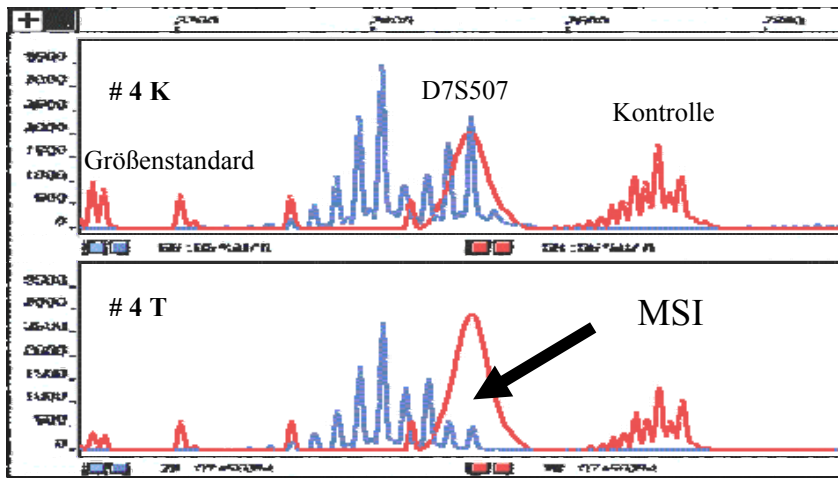
Normal- und Tumorgewebe des Patienten #6 wurden zusammen mit dem Marker D7S654 und einem Kontrollmarker (welcher im Tumorgewebe keine Veränderung zeigt) in einer PCR amplifiziert und in unterschiedlichen Spuren des Gels zusammen mit dem Größenstandard ROX350 aufgetragen. Diese Amplifikationen zeigen, dass das mit dem Allel assoziierte Signal des Tumorgewebes (# 6 T) im Vergleich zu dem Normalgewebe (# 6 K) größer ist. Es handelt sich somit um eine genomische Amplifikation.

Grafik 2: LOH in der Region 7p13, detektiert durch die PCR mit D7S2427 bei dem Patienten #12



Hier werden die Amplifikationen aus der PCR des Normal- und des Tumorgewebes des Patienten #12 mit dem Marker D7S2427 und einem Kontrollmarker (zeigt im Tumorgewebe keine Veränderung) zusammen mit dem Größenstandard ROX350 dargestellt. Das Signal des Tumorgewebes an der Stelle des Allels an der Chromosomen-Lokalisation des Markers D7S2427 ist verkleinert in Reaktion # 12 T (Tumorgewebe) im Vergleich zu # 12 K (Kontrollgewebe). Es handelt sich also um eine LOH.

Grafik 3: Mikrosatelliteninstabilität bei D7S507 bei Lokus 7p21.2 des Patienten #4



Diese Elektrophorese zeigt die PCR-Produkte der DNA-Proben von Tumor- und Kontrollgewebe des Patienten #4 mit dem Marker D7S507 und einem Kontrollmarker (welcher im Tumorgewebe keine Veränderung zeigt) zusammen mit dem Größenstandard ROX350. Im Vergleich mit dem oberen Abschnitt, welches das Kontrollgewebe darstellt (# 4 K), zeigt das Signal des Tumorgewebes (# 4 T) im unteren Abschnitt ein um 4 Basenpaare verkürztes Allel (ca. 2 Repeats).

3. Ergebnisse

In dieser Studie wurden 29 Mikrosatelliten-Marker zur Untersuchung von 31 diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen auf Deletion oder Amplifikation von chromosomalem Material verwendet. Wir entnahmen einige Marker dem ABI PRISM® Linkage Mapping Set LMS-MD10 und kombinierten diese mit anderen Loci, um das gesamte Chromosom 7 abzudecken. Außerdem wurden in Regionen von sogenannten Hot-Spots weitere Marker zur Untersuchung hinzugezogen, um diese Stellen noch näher zu untersuchen und anhand der ersten Screening-Ergebnisse durch zusätzliche Marker die Regionen mit Aberrationen noch besser einzugrenzen. Diese Analyse ergab insgesamt 899 Genotypen, die untersucht wurden. Von diesen 899 Genotypen waren 21 (2,3%) MSI-positiv. Zur Untersuchung von chromosomalen Instabilitäten wie LOH oder Amplifikationen konnten nur diejenigen Genotypen, die nicht homozygot oder MSI positiv waren, verwendet werden, insgesamt 617 (68,6 %). Im weiteren Verlauf dieser Analyse werden sie als informative Genotypen bezeichnet. Aus dieser Gruppe zeigten 56 (9.1%) eine Aberration, eine allelische Imbalance. LOH war dabei häufiger (6,8%) anzutreffen als eine genomische DNA-Amplifikation (2,3%).

LOH-Hot-Spots auf dem kurzen Arm von Chromosom 7

Die Analyse von chromosomalen Instabilitäten auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 ergab folgende Resultate: 9 Patienten zeigten ein LOH auf 7p, das entspricht 31% des Patientenkollektivs. Der auffälligste von uns entdeckte Hot-Spot von LOH auf 7p (siehe Tabelle 4) lag zwischen den Markern D7S654 und D7S493, anhand der „Chromosome 7 Annotation Project map“ (<http://www.chr7.org>) wurde diese Region zwischen 20,034 Mbp und 21,856 Mbp lokalisiert. Diese Hot-Spot-Zone lag im zytogenetischen Band 7p21.1 und war ca. 1,8 Mbp lang. Um eine LOH von einer genomischen Amplifikation zu unterscheiden, wurde zusätzlich eine PCR-Multiplex-Reaktion mit mindestens einem weiteren Marker und dem Marker des zu analysierenden Locus durchgeführt (siehe Grafik 2). Ein weiterer kleiner Hot-Spot zeigte sich bei 3 Lymphomen (10%), er wurde flankiert von den Markern D7S2427 und D7S506 in einem Abstand von 7,9 Mbp und war auf dem Chromosom bei 7p12.1-13

lokalisiert. Zwischen den Hot-Spots von LOH und Amplifikationen zwischen 7p und 7q fanden sich noch einige weitere genomische Aberrationen. Diese waren allerdings nicht so häufig, als dass sie zu einem Hot-Spot hinzugezählt werden konnten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es auf Chromosom 7p wichtige Hot-Spots von Aberrationen gibt und zwar bei 7p21.1 und 7p12.1-13.

LOH und Amplifikation auf dem langen Arm von Chromosom 7

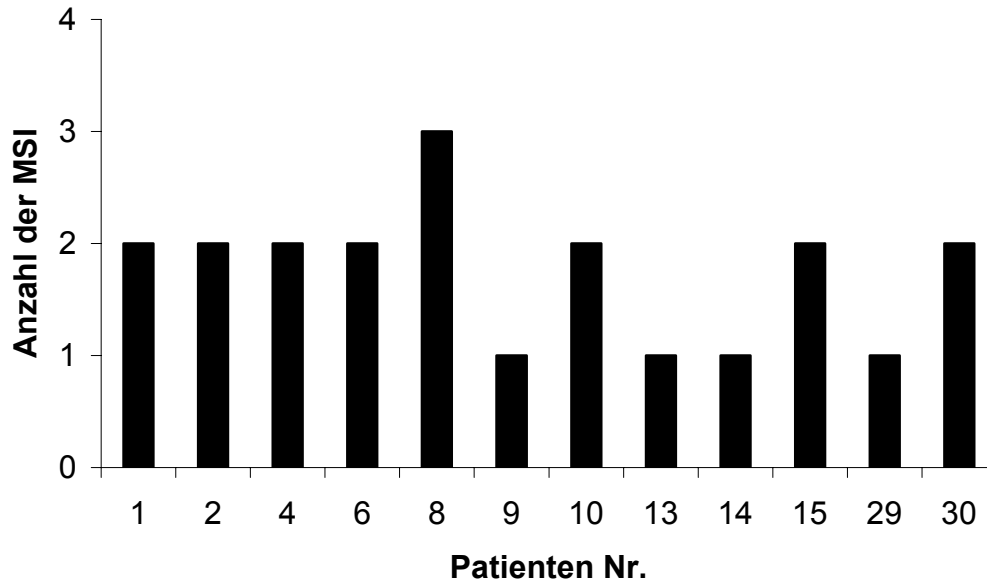
Die Suche nach genomischen Aberrationen auf dem langen Arm von Chromosom 7 ergab einen wichtigen Hot-Spot von Amplifikationen in der Bande 7q22.3-31.1 zwischen den Markern D7S501 und D7S496 (Abstand von 0,7 Mbp). Vier Lymphome (12,9%) zeigten diese Amplifikationen.

Eine weitere wichtige Region von genomischen Instabilitäten war die Region von 7q31.1 bis zum Telomer von Chromosom 7. Hier gab es einige große Deletionen. Allerdings verteilten sich diese nur auf 4 Patienten (12,9%). Damit wurde eine genaue Zuweisung dieser genomischen Aberrationen zu Hot-Spots nur schwer möglich. Die Interpretation dieses Sachverhaltes erlaubte jedoch das Hervorheben von zwei Regionen, in denen häufig Deletionen in Form von LOH vorkamen: die Erste lag im zytogenetischen Band 7q31.2-32.3 und wurde von den Markern D7S523 und D7S530 umrahmt. Der Abstand zwischen diesen beiden Markern betrug 17,5 Mbp. Der zweite Locus war eine 16,1 Mbp große Region zwischen den Markern D7S2513 und D7S2423. Auf dem Chromosom war dieser Hot-Spot auf dem Band 7q34-36.3 lokalisiert.

Mikrosatelliteninstabilität

Zwölf (38,7%) der untersuchten Lymphome zeigten MSI-positive Genotypen. Diese MSI-positiven Ergebnisse waren ungleichmäßig über alle Patienten verteilt. 4 Tumore hatten nur einen MSI-positiven Genotypen, 7 Lymphome zeigten 2 MSI Events und ein Tumor sogar 3 MSI-positive Genotypen. 16 der Marker (55,1%) waren MSI-positiv in höchstens einem Tumor, 5 in zwei Lymphomen. Diese MSI-Events waren weder mit schon bekannten Mikrosatelliten-Loki noch mit einem bestimmten Lymphom verbunden.

Tabelle 3: Anzahl der MSI pro Patient



Die folgende Tabelle 4 zeigt die Genotypen der Patienten, die positiv für eine Aberration waren. Dazu werden der Mikrosatellitenmarker-Name, seine Größe und seine Lokalisation auf dem Chromosom 7 anhand der Notation im Chromosom 7 Annotation Project genannt. Die fettumrandeten Marker gehören immer zu einem Hot-Spot, diese sind nicht nummeriert. Die Schraffierung zeigt den Status jedes einzelnen Genotypen: Heterozygotie (diagonale Streifen von rechts nach links), nicht informativ (diagonale Streifen von links nach rechts), genomische DNA-Amplifikation (schwarz), LOH (weiß) und MSI (vertikale Streifen).

Tabelle 4: Ergebnisse der Mikrosatelliten-Untersuchung

Repeat	Cytogenetic location	Chr. 7 Annot. Prjct. location (Mbp)	1	2	3	4	5	6	8	9	10	12	13	14	15	16	17	18	19	20	24	25	29	30	31
D7S641	7p22.1	8,762																							
D7S2464	7p21.3	10,129																							
D7S664	7p21.3	13,741																							
D7S507	7p21.2	17,658																							
D7S488	7p21.2	18,442																							
D7S654	7p21.1	20,034																							
D7S493	7p21.1	21,856																							
D7S529	7p15.3	25,437																							
D7S2252	7p15.1	32,122																							
D7S510	7p14.1	39,227																							
D7S478	7p13	44,972																							
D7S2427	7p13	45,004																							
D7S506	7p12.1	52,890																							
D7S2476	7q11.23	72,348																							
D7S669	7q11.23	77,204																							
D7S630	7q21.2	87,774																							
D7S657	7q21.2	92,135																							
D7S515	7q22.1	101,062																							
D7S501	7q22.3	105,801																							
D7S496	7q31.1	106,515																							
D7S2459	7q31.1	106,692																							
D7S523	7q31.2	111,070																							
D7S486	7q31.31	115,290																							
D7S522	7q31.31	115,467																							
D7S530	7q32.3	128,586																							
D7S2560	7q34	137,538																							
D7S2513	7q34	140,745																							
D7S483	7q36.2	151,289																							
D7S2423	7q36.3	156,824																							

Legende: siehe Text oberhalb der Tabelle

4. Diskussion

Diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) stellen eine der häufigsten Gruppen der Non-Hodgkin-Lymphome dar, charakterisiert durch einen aggressiven klinischen Verlauf. Unterscheiden kann man nodale (60%) von extranodalen Lymphomen (40%). Zu letzter Gruppe zählt auch das gastrale DLBCL. Über die Lymphogenese der DLBCL liegen bis heute noch keine umfassenden Erkenntnisse vor. Als gesichert gilt, dass *BCL-2* Protein-Überexpression oder die Mutation im TSG-Gen *p53* häufig auftreten. Über Translokationen, wie sie beispielsweise schon früh die niedrig malignen Marginalzonen-B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ in Form der Translokation t(11;18)(q21;q21) vorweisen, ist hingegen nur sehr wenig bekannt. Dies erstaunt sehr, da Translokationen in den meisten hämatologischen Tumoren (Lymphomen oder Leukämien) als primäre genetische Veränderung vorkommen. Allgemein gilt allerdings, dass weniger die primären als vielmehr die sekundären Veränderungen für die weitere Progression solcher Tumore ausschlaggebend sind. Im Gegensatz zu den primären Veränderungen, die typischerweise bei allen Fällen einer bestimmten Erkrankung gleich sind, tragen die sekundären Veränderungen weitere prognostische Merkmale, die eine Identifikation der Fälle mit gleicher Erkrankung bei unterschiedlicher Prognose ermöglicht. Bis jetzt konnten - wie gesagt - noch keine primären Veränderungen bei den DLBCL identifiziert werden. Dagegen kam es schon zum Nachweis einiger wahrscheinlich sekundären Aberrationen wie Amplifikation und Deletion von Regionen verschiedener Chromosome. Ziel dieser Untersuchung war es, genetische Aberrationen bei extranodalen gastralen diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) auf Chromosom 7 zu charakterisieren. Zu diesem Zweck führten wir eine Mikrosatellitenanalyse des Chromosoms 7 mit einem Panel von 29 Marker durch, welches das gesamte Chromosom abdeckte. Hierbei entdeckten wir verschiedene Hot-Spots von genomischen Aberrationen, möglicherweise die Lokalisation von Genen, die wichtig für die Lymphogenese, bis jetzt aber noch unbekannt sind.

Die häufigste genetische Aberration auf Chromosom 7 befindet sich in der zytogenetischen Bande 7p21.1, einer 1,8 Mbp großen Region. Sie wird seitlich durch die Marker D7S654 und D7S493 begrenzt. In unserer Studie fanden wir in dieser Region bei 6 Patienten (20,7% der Fälle) „loss of heterozygosity“ (LOH). Bis heute sind genetische Instabilitäten dieser Chromosomregion bei lymphoproliferativen Erkrankungen noch nicht beschrieben. Bei anderen Erkrankungen wie malignen peripheren Nervenscheiden-Tumoren, chronisch-myeloischer Leukämie und Lebertumoren wurde jedoch von genomischen Veränderungen in dieser Region berichtet^{72,73,74}.

Eine solche Häufigkeit von genetischen Aberrationen bei den unterschiedlichsten Tumortypen lässt den Schluss zu, dass es in dieser Region mögliche neue Tumorsuppressorgene gibt, die noch identifiziert werden müssen. Von den schon bekannten Genen liegen z.B. der *SP4*-Transkriptionsfaktor und das *Integrin-beta-8*-Gen in dieser Bande, beide sind allerdings keine geeigneten Kandidaten für TSG. Neben diesen gibt es an dieser Stelle noch zahlreiche Gene mit unbekannter Funktion.

Ein weiterer Hot-Spot, ebenfalls noch auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 gelegen, wurde von uns bei 7p12.1-13 lokalisiert. Es ist eine 7,9 Mbp große Region zwischen den Mikrosatelliten-Markern D7S2427 und D7S506. Interessanterweise ist bei 7p12 in dieser betroffenen Region der Genlocus für das Zinkfingerprotein *Ikaros*, auch *ZNFN1A1/Ikaros* genannt, gelegen. *Ikaros* ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der normalen Lymphozytenentwicklung. Durch Interaktion mit ähnlichen Faktoren ist es für die korrekte Regulation von Differenzierung und Zellproliferation in den beiden T- und B-Zell-Linien zuständig. Durch eine fehlende oder fehlerhafte *Ikaros*-Expression kann es - hypothetischer Weise - zu einer pathologischen Differenzierung der Lymphozyten kommen, aus denen dann Tumorzellen entstehen können. Dieses wurde mit folgenden Leukämien in Zusammenhang gebracht: mit kindlicher akuter lymphatischer Leukämie⁷⁵, mit akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie⁷⁶ und mit einer z.T. lymphoiden Blastenkrise bei chronisch myeloischer Leukämie⁷⁷. Bei diesen Leukämie-Erkrankungen wurden entweder durch eine Überexpression der

dominant negativen Isoform Ik-6 oder durch Mutationen (v.a. verschiedene Insertionen und Deletionen in der Nähe der C-terminalen Domäne) ein verringerter Level an Ikarosaktivität beobachtet. Aufgrund der letzteren Beobachtung wurde vermutet, dass *Ikaros*, ähnlich wie im Tiermodell, die Funktion eines TSG in menschlichen hämatopoetischen Zellen hat.

In der Literatur wird auch ein Rearrangement des *Ikaros*-Gens beschrieben ⁷⁸. Durch die Translokation t(3;7)(q27;p12) bei 2 Patienten mit DLBCL kommt es zu einer Fusion des *Ikaros*-Gens von 7p12 mit dem *BCL6*-Gen bei 3q27. Dadurch kommt es zum Austausch des Promotors und infolge dessen eventuell zu einer dysregulierten Expression des *BCL6*-Gens in der B-Zell-Differenzierung.

Möglicherweise spielt das *Ikaros*-Gen in seiner Funktion als Regulator der Lymphozyten-Differenzierung auch eine Rolle in der Lymphomgenese der DLBCL, in dem es hier ebenfalls über eine fehlende oder fehlerhafte *Ikaros*-Expression zur Entwicklung von pathologischen Lymphozyten kommt. Solch eine Hypothese ist bis heute noch nicht in der Literatur beschrieben worden, aufgrund der Ergebnisse aber in unserer Studie mit der vermehrten Deletion in dem Chromosomenband des *Ikaros*-Gens könnte dies in Betracht gezogen werden.

Ein dritter LOH-Hot-Spot wurde auf dem langen Arm von Chromosom 7 in 4 (12,9%) der untersuchten Tumore gefunden. Aufgrund der Größe dieses Areal und der kleinen Anzahl der betroffenen Lymphome war es nicht möglich, diese Region näher zu untersuchen und die genaue Lage dieser Aberrationen zu bestimmen. Die Interpretation der Ergebnisse ließ allerdings den Schluss zu, dass hier zwei Hot-Spots liegen: der eine in der Region von 7q31.1-32.3 zwischen den Markern D7S523 und D7S530. Diese beiden Mikrosatelliten-Marker liegen 17,5 Mbp voneinander entfernt. Der zweite Hot-Spot ist eine 16,1 Mbp große Region auf der Bande 7q34-36.3 und wird von den Markern D7S2513 und D7S2423 begrenzt. Für die erste Region wurde schon bei anderen Tumoren das Vorkommen von Tumorsuppressorgen vorgeschlagen wie z.B. beim Prostatakarzinom ⁷⁹, beim Ovarialkarzinom ^{80,81}, bei Schilddrüsentumoren ⁸² und beim Nierenzellkarzinom ⁸³, da bei diesen Karzinomen eine erhöhte Anzahl von LOH gefunden wurde. Ebenso wurde bei 7q31.1 *FRA7G* (common fragil site 7) lokalisiert, welches in die Gruppe der aphidicolin-induzierten „ge-/zerbrechlichen

Chromosomen-Stücke“, im Englischen „common fragile site“, gehört. Es gibt sie auf den unterschiedlichsten Chromosomen und sie prädisponieren zu spezifischen Chromosomenbrüchen/-veränderungen, assoziiert mit Deletionen, Amplifikationen und/oder Translokationen bei bestimmten Karzinomarten. Sie sind eventuell nicht nur für eine DNA-Instabilität, sondern auch in Kombination mit anderen Genen für eine Beschleunigung des neoplastischen Prozesses verantwortlich. Die *FRA7G*-Region enthält außerdem noch die Tumorsuppressorgene *CAV1* (caveolin 1), *CAV2* (caveolin 2) und *TESTIN*. Es wurde gezeigt⁸⁴, dass diese TSG mit dem Onkogen *MET* verbunden sind. Andere Analysen aus dem Jahre 1998 zeigten, dass es eine häufige Deletion von dieser Region in menschlichen Tumoren⁸⁵ bzw. eine gewisse Instabilität des 7q-Armes in Prostatakarzinomen⁷⁹ gibt. Über das *ST7* Gen (suppressor of tumorigenicity 7), welches auch in der Bande 7q31 lokalisiert ist, und seine Funktion gibt es unterschiedliche Studienergebnisse: Zum einen spricht Zenklusen⁸⁶ in seiner 2001 veröffentlichten Arbeit von einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit, dass aufgrund seiner Ergebnisse *ST7* eine wichtige Rolle in der Entwicklung von einigen Karzinomen spielt. Zum anderen ist *ST7* wohl nicht der Auslöser in der Karzinogenese von Ösophaguskarzinomen⁸⁷. Ebenso wird seine Funktion als TSG in kolorektalen Tumoren stark bezweifelt⁸⁸. In der hier zweiten auffälligen Hot-Spot-Zone 7q34-36.3 sind bis jetzt noch keine TSG bekannt.

Für Amplifikationen ließ sich nur ein Hot-Spot finden und zwar bei 7q22.3-31.1. Dieser Locus wird durch die beiden Marker *D7S501* und *D7S49* begrenzt, die etwa 0,7 Mbp voneinander entfernt liegen. Hier zeigten 4 unserer 29 Patienten (12,9%) eine Amplifikation. An bekannten Genen waren hier vor allem folgende Gene lokalisiert: *CYP51* und *CUTL1*. Durch Aberrationen scheinen diese beiden Gene als zwei unter vielen an der Transformation von follikulären Lymphomen zu DLBCL⁴⁹ beteiligt zu sein. *CUTL1* (CCAAT displacement protein, *cux/CDP*) reguliert die normale B-Zell-Lymphopoese und die Alteration dieses Gens korreliert mit lymphoiden Abnormalitäten in Mäusen. Über *CYP51* (cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1) ist dagegen weniger bekannt. Es ist

Teil der Cytochrom P450-Familie und Protein in der Cholesterolsynthese. Von Rozman et al.⁸⁹ wurde es 1996 als „housekeeping gene“ bezeichnet. Daneben gibt es noch eine Anzahl von möglichen, bis jetzt noch nicht identifizierten Genen in dieser Region. *PRKAR2B* (protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta) and *HBPI* (HMG-box containing protein 1) sind sehr gute Kandidaten für Onkogene. *PRKAR2B* kann eventuell die Transkriptionsaktivität von T-Zellen unterdrücken und so für die potentielle funktionale Signifikanz für Aberrationen der nukleären *PRKAR2B* in T-Zellen von systemischem Lupus erythematosus Zellen sorgen⁹⁰. Der genaue Wirkmechanismus bei B-Zellen ist jedoch noch nicht genau untersucht. *HBPI* wurde isoliert als Inhibitor des Zellzyklus⁹¹ und als HMG-Box Transkriptionsrepressor und Suppressor des Wnt-Signalweges⁹².

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wurde vornehmlich in kolorektalem Karzinom detailliert untersucht und ist ein wichtiges Charakteristikum in der Pathogenese dieser Tumore. In unserer Untersuchung zeigten insgesamt 38,7% der DLBCL MSI-positive Genotypen. Diese waren allerdings ungleichmäßig sowohl über alle Patienten als auch über das Genom des Chromosoms 7 verteilt, so dass sich aus dem Verteilungsmuster kein Hot-Spot oder sonstige Auffälligkeiten ablesen ließen. Ebenso zeigte der Vergleich mit schon bekannten Mikrosatelliten-Loci oder anderen bekannten genomischen Instabilitäten keine Übereinstimmungen. Ob und wie weit MSI allerdings eine Rolle in der Entwicklung von diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen spielt, ist bis jetzt noch unbekannt und lässt sich mit unseren Daten nicht beantworten.

5. Zusammenfassung

In der Entstehung von Lymphomen einschließlich DLBCL sind noch viele genetische Faktoren, die in der Lymphomgenese eine wichtige Rolle spielen, unbekannt. Häufige chromosomale Aberrationen weisen darauf hin, welche Gene die besten Kandidaten für „Lymphom-Gene“ sind. Mit Methoden wie der Mikrosatelliten-Analyse, die sich schon in vielen früheren Studien als sensitive Screeningmethode bewährt hat, kann man solche Kandidatengene aufspüren.

In vorangegangenen Studien an extranodalen diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen des Magens, im Englischen als „gastric diffuse large B-cell lymphoma“ bezeichnet (DLBCL), hat unsere Studiengruppe einige genomische Aberrationen entdeckt. Eine dieser Aberrationen - „loss of heterozygosity“ (LOH) - befand sich auf dem langen Arm des Chromosoms 7. Um diese auffällige Region und das gesamte Chromosom 7 noch näher auf Aberrationen zu untersuchen, haben wir eine Analyse mit 29 Mikrosatellitenmarker durchgeführt und eine genaue Chromosomenkarte der genetischen Aberrationen auf Chromosom 7 erstellt. In dieser Studie fanden sich 5 sogenannte Hot-Spots von Aberrationen. Diese sind Regionen auf dem Chromosom, in denen sich bei den untersuchten Patienten vermehrt allelische Imbalancen zeigten. Insgesamt fanden wir bei 42% der 31 untersuchten DLBCL eine solche Aberration.

Die häufigste genetische Aberration auf Chromosom 7 (20,7% der Fälle) war der Verlust einer 1,8 Mbp großen Region in der zytogenetischen Bande 7p21.1. Sie wird seitlich durch die Marker D7S654 und D7S493 begrenzt. Ein weiterer LOH-Hot-Spot auf 7p wurde in 3 (10%) Lymphomen bei 7p12.1-13 identifiziert, flankiert durch die Marker D7S2427 und D7S506 (7,9 Mbp von einander entfernt). In diesem Hot-Spot liegt der Gen-Lokus für das *Ikaros*-Gen. Der lange Arm von Chromosom 7 wies mehrere Aberrationen auf: erstens in der Bande 7q31.1-32.2, flankiert durch die Marker D7S523 und D7S530 (17,5 Mbp von einander entfernt), zweitens zwischen den Mikrosatellitenmarkern D7S2513 und

D7S2423 auf 7q34-36.3 (eine 16,1 Mbp große Region). Zusätzlich identifizierten wir einen Hot-Spot von Amplifikationen auf dem langen Arm; er war in der Bande 7q22.3-31.1 lokalisiert und lag zwischen den Markern D7S501 und D7S496 (auf einer Distanz von 0,7 Mbp).

Das Vorkommen genetischer Aberrationen auf Chromosom 7 bei DLBCL ist deutlich höher als anfänglich erwartet. Solch häufige genetische Auffälligkeiten sprechen dafür, dass mögliche neue Tumorsuppressorgene und Onkogene in den oben näher bezeichneten Regionen lokalisiert sind, deren genaue Lage und Funktion in Zukunft noch näher identifiziert werden muss.

6. Anhang

6.1 Abkürzungen

ABC	Activated B-cell-like DLBCL = aktivierter B-Zelltyp der DLBCL
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basepairs = Basenpaare
CCD-Kamera	Charge-coupled device Kamera
CGH	Comparative genomic hybridization
cM	centi-Morgan
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma = diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonucleic acid = Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMZL	Extranodal marginal zone B-cell lymphoma = extranodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
FISH	Fluorescence in situ-hybridization
FU	Fluorescence-units = Fluoreszenz-Einheiten
GCB	Germinal center B-cell-like DLBCL = Keimzentrum-B-Zelltyp der DLBCL
HE	Hämatoxylin-Eosin
H.p.	Helicobacter pylori
IgH	Immunglobulin heavy chain = schwere Kette der Immunglobuline
LOH	Loss of heterozygosity = Verlust der Heterozygotie
m	männlich
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue = Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
Mbp	Mega basepairs = 1000000 Basenpaare

min	Minute
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MZBCL	Marginal zone B-cell lymphoma = Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
n.u.	nicht untersucht
neg	negativ
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
pos	positiv
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SLVL	Splenisches Lymphom mit villösen Lymphozyten
TBE	Tris, Borat und EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TSG	Tumorsuppressorgen
unbek.	unbekannt
w	weiblich
WHO	World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation

6. 2 Literaturverzeichnis

- ¹ Greiner A, Müller-Hermelink HK. Recent advances in gastric extranodal B-cell lymphoma. *Cur Diagn Pathol.* 1996;3:91-98.
- ² Isaacson PG. Pathogenesis and early lesions in extranodal lymphoma. *Toxicol Lett.* 1993;67:237-247.
- ³ Isaacson PG. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Semin Hematol.* 1999;36:139-147.
- ⁴ Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IRAC Press, Lyon 2001.
- ⁵ Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet.* 1991;338:1175-1176.
- ⁶ Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelman JH, Friedman GD. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med.* 1994;330:1267-1271.
- ⁷ Hyjek E, Isaacson PG. Primary B cell lymphoma of the thyroid and its relationship to Hashimoto's thyroiditis. *Hum Pathol.* 1988;19:1315-1326.
- ⁸ Hyjek E, Smith WJ, Isaacson PG. Primary B-cell lymphoma of salivary glands and its relationship to myoepithelial sialadenitis. *Hum Pathol.* 1988;19:766-776.
- ⁹ Bouzourene H, Haefliger T, Delacretaz F, Saraga E. The role of Helicobacter pylori in primary gastric MALT lymphoma. *Histopathology.* 1999; 34:118-123.
- ¹⁰ Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J. Helicobacter pylori-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J Pathol.* 1996;178:122-127.
- ¹¹ Du M, Diss TC, Xu C, Peng H, Isaacson PG, Pan L. Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leukemia.* 1996;10:1190-1197.

- ¹² Bayerdörffer E, Neubauer A, Rudolph B, Thiede C, Lehn N, Eidt S, Stolte M, for MALT Lymphoma Study Group. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Lancet*. 1995;345:1591-1594.
- ¹³ 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.
- ¹⁴ Falco Jover G, Martinez Egea A, Sanchez Cuenca J, Onrubia Pintado J, Garcia Lafuente N, Ruiz Gomez F, Coronas Planas M. Regression of primary gastric B-cell mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Enferm Dig*. 1999;91:541-548.
- ¹⁵ Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of mucosal-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003;44 Suppl 3:S13-20.
- 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 Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, Ott MM, Müller-Hermelink HK. The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Res*. 1997;57:3944-3948.
- ¹⁸ Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV: The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*. 1995;83:1243-1252.
- ¹⁹ Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:4974-4978.
- ²⁰ LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*. 1998;17:3247-3259.

- ²¹ Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 1997;16:6914-6925.
- ²² Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998;17:2215-2223.
- ²³ Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A, Van den Berghe H, Marynen P. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(21;21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood.* 1999;93:3601-3609.
- ²⁴ Akagi T, Motegi M, Tamura A, Suzuki R, Hosokawa Y, Suzuki H, Ota H, Nakamura S, Morishima Y, Tanawaki M, Seto M. A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18)(q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene.* 1999;18:5785-5794.
- ²⁵ Remstein ED, James CD, Kurtin PJ. Incidence and subtype specificity of API2-MALT1 fusion translocations in extranodal, nodal, and splenic marginal zone lymphomas. *Am J Pathol.* 2000;156:1183-1188.
- ²⁶ Rosenwald A, Ott G, Stilgenbauer S, Kalla J, Bredt M, Katzenberger T, Greiner A, Ott MM, Gawin B, Döhner H, Müller-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.
- ²⁷ Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG, Dyer MJS. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell.* 1999;96:35-45.
- ²⁸ Zhang Q, Siebert R, Yan M, Hinzmann B, Cui X, Xue L, Rakestraw KM, Naeve CW, Beckmann G, Weisenburger DD, Sanger WG, Nowotny H, Vesely M, Callet-Bauchu E, Salles G, Dixit VM, Rosenthal A, Schlegelberger B, Morris SW. Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment

domain-containing gene, in MALT-lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet.* 1999;22:63-68.

²⁹ 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.

³⁰ Gaidano G, Volpe G, Pastore C, Chiarle R, Capello D, Gloghini A, Perissinotto E, Savinelli F, Bosco M, Mazza U, Pileri S, Palestro G, Carbone A, Saglio G. Detection of BCL-6 rearrangements and p53 mutations in Malt-lymphomas. *Am J Hematol.* 1997;56:206-213.

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 Freeman C, Berg JW, Cutler SJ. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer.* 1972;29:252-260.

³³ Banfi A, Bonadonna G, Carnevali G, Oldini C, Salvini E. Preferential sites of involvement and spread in malignant lymphomas. *Eur J Cancer.* 1968;4:319-324.

³⁴ Isaacson PG, Norton AJ. *Extranodal lymphomas.* Churchill Livingstone, Edinburgh London Madrid Melbourne New York Tokyo (1994).

³⁵ Stoffel A, Filippa D, Rao PH. The p73 locus is commonly deleted in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res.* 2004;28:1341-1345.

³⁶ Leroy K, Haioun C, Lepage E, Le Metayer N, Berger F, Labouyrie E, Meignin V, Petit B, Bastard C, Salles G, Gisselbrecht C, Reyes F, Gaulard P, Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. p53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol.* 2002;13:1108-1115.

³⁷ Starostik P, Greiner A, Schultz A, Zettl A, Peters K, Rosenwald A, Kolve M, Müller-Hermelink HK. Genetic aberrations common in gastric high-grade large B-cell lymphoma. *Blood.* 2000;95:1180-1187.

³⁸ Chang CC, Ye BH, Chaganti RS, Dalla-Favera R: BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:6947-6952.

- ³⁹ Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecoq G, Bastard C: LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nat Genet.* 1993;5:66-70.
- ⁴⁰ Lo Coco F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, Knowles DM, Chaganti RSK, Dalla-Favera R: Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1994;83:1757-1759.
- ⁴¹ Kramer MHH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JHJM, de Jong D, Maartense E, Schuurin E, Kluin PM: Clinical relevance of BCL2, BCL6 and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998;92:3152-3162.
- ⁴² Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, Ye BH, Lista F, Filippa DA, Rosenbaum A et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 1994;331:74-80.
- ⁴³ Akasaka T, Ueda C, Kurata M, Akasaka H, Yamabe H, Uchiyama T, Ohno H. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. *Blood.* 2000;96:2907-2909.
- ⁴⁴ Akasaka T, Akasaka H, Ueda C, Yonetani N, Maesako Y, Shimizu A, Yamabe H, Fukuhara S, Uchiyama T, Ohno H. Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with the c-MYC/Immunoglobulin Heavy-chain fusion gene. *J Clin Oncol.* 2000;18:510-518.
- ⁴⁵ Chevenix-Trench G, Behm FG, Westin EH. Somatic rearrangement of the c-myc oncogene in primary human diffuse large-cell lymphoma. *Int J Cancer.* 1986;38:513-516.
- ⁴⁶ Hoeve MA, Gisbertz IA, Schouten HC, Schuurin E, Bot FJ, Hermans J, Hopman A, Kluin PM, Arends JW, van Krieken JH. Gastric low-grade MALT lymphoma, high-grade MALT lymphoma and diffuse large B cell lymphoma show different frequencies of trisomy. *Leukemia.* 1999;13:799-807.
- ⁴⁷ Skacel M, Paris PL, Pettay JD, Tsiftsakis EK, Tubbs RR, Casey G, Hsi ED. Diffuse large B-cell lymphomas of the stomach: assessment of microsatellite instability, allelic imbalance, and trisomy of chromosomes 3,12, and 18. *Diagn Mol Pathol.* 2002;11:75-82.

- ⁴⁸ 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, Weisenburger DD, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Grogan TM, Braziel R, Fisher RI, Smeland EB, Kvaloy S, Delabie J, Simon R, Wilson WH, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Campo E, Rosenwald A, Timothy GC, Harald H, John P. 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.
- ⁴⁹ Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Seagraves R, Blesa D, Rubio-Moscardo F, Albertson DG, Garcia-Conde J, Dyer MJS, Levy R, Pinkel D, Lossos IS. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogenous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood*. 2003;101:3109-3117.
- ⁵⁰ Bai M, Skyras A, Agnangtis NJ, Kamina S, Papoudou-Bai A, Kitsoulis P, Kanavaros P. B-cell differentiation, apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. *Anticancer Res*. 2005;25:347-362.
- ⁵¹ Rosenwald A, Staudt LM. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003;44 Suppl 3:41-47.
- ⁵² Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell-lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346:1937-1947.
- ⁵³ Peters K, Zettl A, Starostik P, Greiner A, Rosenwald A, Katzenberger T, Ott G, Müller-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.

- ⁵⁴ Sole F, Woessner S, Florensa L, Espinet B, Mollejo M, Martin P, Piris MA. Frequent involvement of chromosomes 1, 3, 7 and 8 in splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 1997;98:446-449.
- ⁵⁵ Dierlamm J, Pittaluga S, Wlodarska I, Stul M, Thomas J, Boogaerts M, Michaux L, Driessen A, Mecucci C, Cassiman JJ, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe H. Marginal zone B-cell lymphomas of different sites share similar cytogenetic and morphologic features. *Blood.* 1996;87:299-307.
- ⁵⁶ Sole F, Woessner S, Florensa L, Montero S, Asensio A, Besses C, Sans-Sabrafen J. A new chromosomal anomaly associated with mature B-cell chronic lymphoproliferative disorders: del(7)(q32). *Cancer Genet Cytogenet.* 1993;65:170-172.
- ⁵⁷ Offit K, Louie DC, Parsa NZ, Noy A, Chaganti RSK. Del (7)(q32) is associated with a subset of small lymphocytic lymphoma with plasmacytoid features. *Blood.* 1995;86:2365-2370.
- ⁵⁸ Dascalescu CM, Peoc'h M, Callanan M, Jakob MC, Sotto MF, Gressin R, Sotto JJ, Leroux D. Deletion 7q in B-cell low-grade lymphoid malignancies: a cytogenetic/fluorescence in situ hybridization and immunopathologic study. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999;109:21-28.
- ⁵⁹ Oscier DG, Gardiner A, Mould S. Structural abnormalities of chromosome 7q in chronic lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996;92:24-27.
- ⁶⁰ Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, Algara P, Sanchez-Beato M, Martinez P, Piris MA. 7q31-32 allelic loss is a frequent finding in splenic marginal zone lymphoma. *Am J Pathol.* 1999;154:1583-1589.
- ⁶¹ Avet-Loiseau H, Vigier M, Moreau A, Mellerin MP, Gaillard F, Harousseau JL, Bataille R, Milpied N: Comparative genomic hybridization detects genomic abnormalities in 80% of follicular lymphomas. *Br J Haematology* 1997; 97: 119-122.
- ⁶² Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res.* 1997;57:2765-2780.

- ⁶³ Katayama Y, Kirizuka K, Nishizaki H, Nakamoto Y, Yamamoto M, Kohriyama K. Deletion 7p in gastric MALT lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;121:86-89.
- ⁶⁴ Miozzo M, Perotti D, Minoletti F, Mondini P, Pilotti S, Luksch R, Fossati-Bellani F, Pierotti MA, Sozzi G, Radice P. Mapping of a putative tumor suppressor locus to proximal 7p in Wilms tumors. *Genomics.* 1996;37:310-315.
- ⁶⁵ Sossey-Alaoui K, Vieira L, David D, Boavida MG, Cowell JK. Molecular characterization of a 7p15-21 homozygous deletion in a Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;36:1-6.
- ⁶⁶ Knudson AG. Mutation and cancer: Stastical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971;68:820-823.
- ⁶⁷ Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Müller-Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, and Warnke RA. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994;84:1361-1392.
- ⁶⁸ Musshoff K. [Clinical staging classification of non-Hodgkin's lymphomas (author's translation)]. *Strahlentherapie.* 1977;153:218-221.
- ⁶⁹ Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood.* 1991;78:192-196.
- ⁷⁰ Litt M, Hauge X, Sharma V. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. *BioTechniques.* 1993;15:280-284.
- ⁷¹ Brentnall TA. Microsatellite instability - Shifting concepts in tumorigenesis. *Am J Pathol.* 1995;147:561-563.
- ⁷² Schmidt H, Wurl P, Taubert H, Meye A, Bache M, Holzhausen HJ, Hinze R. Genomic imbalances of 7p and 17q in malignant peripheral nerve sheath tumors are clinically relevant. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999;25:205-211.
- ⁷³ Wong KF, So CC, Kwong YL. Chronic Myelomonocytic leukemia with t(7;11)(p15;p15) and NUP98/HOXA9 fusion. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999;115:70-72.

- ⁷⁴ Parada LA, Hallen M, Tranberg KG, Hagerstrand I, Bondeson L, Mitelman F, Johansson B. Frequent rearrangements of chromosomes 1, 7, and 8 in primary liver cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;23:26-35.
- ⁷⁵ Sun L, Heerema N, Crotty L, Wu X, Navara C, Vassilev A, Sensel M, Reaman GH, Uckun FM. Expression of dominant-negative and mutant isoforms of the antileukemic transcription factor Ikaros in infant acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:680-685.
- ⁷⁶ Sun L, Crotty ML, Sensel M, Sather H, Navara C, Nachman J, Steinherz PG, Gaynon PS, Seibel N, Mao C, Vassilev A, Reaman GH, Uckun FM. Expression of dominant-negative Ikaros isoforms in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2112-2120.
- ⁷⁷ Nakayama H, Ishimaru F, Avitahl N, Sezaki N, Fujii N, Nakase K, Ninomiya Y, Harashima A, Minowada J, Tsuchiyama J, Imajoh K, Tsubota T, Fukuda S, Sezaki T, Kojima K, Hara M, Takimoto H, Yorimitsu S, Takahashi I, Miyata A, Taniguchi S, Tokunaga Y, Gondo H, Niho Y, Nakao S, Kyo T, Dohy H, Kamada N, Harada M. Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 1999;59:3931-3934.
- ⁷⁸ Hosokawa Y, Maeda Y, Ichinohasama R, Miura I, Taniwaki M, Seto M. The Ikaros gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses to the BCL6 gene as a result of t(3;7)(q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2000;95:2719-2721.
- ⁷⁹ Jenkins RB, Qian J, Lee HK, Huang H, Hirasawa K, Bostwick DG, Proffitt J, Wilber K, Lieber MM, Liu W, Smith DI. A molecular cytogenetic analysis of 7q31 in prostate cancer. *Cancer Res*. 1998;58:759-766.
- ⁸⁰ Huang H, Reed CP, Mordi A, Lomberk G, Wang L, Shridhar V, Hartmann L, Jenkins R, Smith DI. Frequent deletions within FRA7G at 7q31.2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;24:48-55.
- ⁸¹ Zenklusen JC, Weitzel JN, Ball HG, Conti CJ. Allelic loss at 7q31.1 in human primary ovarian carcinomas suggests the existence of a tumor suppressor gene. *Oncogene*. 1995;11:359-363.

- ⁸² Zhang JS, Nelson M, McIver B, Hay ID, Goellner JR, Grant CS, Eberhardt NL, Smith DI. Differential loss of heterozygosity at 7q31.2 in follicular and papillary thyroid tumors. *Oncogene*. 1998;17:789-793.
- ⁸³ Shridar V, Sun QC, Miller OJ, Kalemkerian GP, Petros J, Smith DI. Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. *Oncogene*. 1997;15:2727-2733.
- ⁸⁴ Han SY, Druck T, Huebner K. Candidate tumor suppressor genes at FRA7G are coamplified with MET and do not suppress malignancy in a gastric cancer. *Genomics*. 2003;81:105-107.
- ⁸⁵ Engelmann JA, Zhang XL, Lisanti MP. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett*. 1998;436:403-410.
- ⁸⁶ Zenklusen JC, Conti CJ, Green ED. Mutational and functional analyses reveal that ST7 is a highly conserved tumor-suppressor gene on human chromosome 7q31. *Nat Genet*. 2001;27:392-398.
- ⁸⁷ Wang S, Mori Y, Sato F, Yin J, Xu Y, Zou TT, Oлару A, Kimos MC, Perry K, Selaru FM, Deacu E, Sun M, Shi YC, Shibata D, Abraham JM, Greenwald BD, Meltzer SJ. An LOH and mutational investigation of the ST7 gene locus in human esophageal carcinoma. *Oncogene*. 2003;22:467-470.
- ⁸⁸ Haddad R, Vincent JB, Gryfe R, Kim H, Wen J, Redston M, Scherer SW, Gallinger S. Chromosome 7q31 allelic imbalance and somatic mutations of RAY1/ST7 gene in colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2004;203:87-90.
- ⁸⁹ Rozman D, Stromstedt M, Tsui LC, Scherer SW, Waterman MR. Structure and mapping of the human lanosterol 14- α -demethylase gene (CYP51) encoding the cytochrome P450 involved in cholesterol biosynthesis: comparison of exon/intron organization with other mammalian and fungal CYP genes. *Genomics*. 1996;38:371-381.
- ⁹⁰ Elliott MR, Tolnay M, Tsokos GC, Kammer GM. Protein kinase A regulatory subunit type II β directly interacts with and suppresses CREB transcriptional activity in activated T cells. *J Immunol*. 2003;171:3636-3644.

⁹¹ Tevosian SG, Shih HH, Mendelson KG, Sheppard KA, Paulson KE, Yee AS. HBP1: a HMG box transcriptional repressor that is targeted by the retinoblastoma family. *Genes Dev.* 1997;11:383-396.

⁹² Sampson EM, Haque ZK, Ku M-C, Tevosian SG, Albanese C, Pestell RG, Paulson KE, Yee AS. Negative regulation of the Wnt- β -catenin pathway by the transcriptional repressor HBP1. *EMBO J.* 2001;20:4500-4511.

Danksagung

An dieser Stelle ist es Zeit, all denen zu danken, die mir bei der Fertigstellung geholfen haben. Ich danke zuerst Prof. Dr. med. H.K. Müller-Hermelink für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, am Pathologischen Institut Würzburg zu promovieren. Ebenso möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. med. P. Starostik danken für seine Geduld und Hingabe, mit der er mich während unseres gemeinsamen Weges begleitet hat. Danke auch an viele Mitarbeiter des Pathologischen Institutes. Der größte Dank jedoch gilt meiner Familie.

Nils Lazer

PERSÖNLICHE ANGABEN


Geburtsdatum, -ort 28. November 1975, Herdecke (Deutschland)
Nationalität deutsch
Familienstand ledig

AUSBILDUNG

1995 Abitur am Albrecht-Dürer-Gymnasium Hagen
1995 – 1996 Zivildienst in der Klinik Ambrock, Hagen
1996 – 2003 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1998 Ärztliche Vorprüfung
1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 – 2003 Praktisches Jahr
2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

BERUFLICHE WEITERBILDUNG UND PRAKTIKA

März u. April 1996 Pflegepraktikum in der Klinik Ambrock (Zivildienst)
März 1999 Famulatur in der orthopädischen Station des Sportkrankenhauses Hellersen
Oktober 1999 Famulatur im Pathologischen Institut der Universität Würzburg
September 2000 Famulatur in einer Kinderarztpraxis in Freiburg
März 2001 Famulatur in der pädiatrischen Endokrinologie an der University of Massachusetts, Worcester USA
Juli 2001 Gynäkologisch-geburtshilfliches Praktikum in der Frauenklinik des Evangelischen Krankenhauses Hagen-Haspe
Juli 2003 – Juni 2004 Assistenzarzt Chirurgie, ASANA Spital Menziken, CH
Juli 2004 – Juni 2005 Assistenzarzt Innere Medizin, ASANA Spital Menziken, CH
seit September 2005 Assistenzarzt Pädiatrie, Karolinen-Hospital Arnsberg



Soest, August 2006

