

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

# **Analyse genomischer Aberrationen gastraler Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Jochen Patzner  
aus Bad Mergentheim

Würzburg, Juni 2002

Referent: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink  
Korreferent: Professor Dr. med. K. Wilms  
Dekan: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2003

Der Promovend ist Arzt

# Analyse genomischer Aberrationen gastraler Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	EINORDNUNG UND CHARAKTERISTIKA DER GASTRALEN MARGINALZONEN B-ZELL-LYMPHOME (MZBCL) VOM MALT-TYP .....	1
1.2	PATHOGENESE EXTRANODALER MZBCL VOM MALT-TYP .....	2
1.3	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT .....	4
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>7</b>
2.1	UNTERSUCHUNGSMATERIAL .....	7
2.2	UNTERSUCHUNGSMETHODEN .....	9
2.2.1	<i>Mikrodissektion</i> .....	9
2.2.2	<i>Gewinnung genomischer DNA</i> .....	9
2.2.3	<i>Kontrolle der Klonalität von Tumor- und Kontrollgewebe</i> .....	11
2.2.4	<i>Mikrosatellitenanalyse</i> .....	14
2.2.4.1	Auswahl der Mikrosatellitenmarker .....	14
2.2.4.2	Polymerasekettenreaktion .....	14
2.2.4.3	Polyacrylamidgelelektrophorese .....	16
2.2.4.4	Analyse der Elektrophorese .....	17
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
3.1	GASTRALE MZBCL VOM MALT-TYP ZEIGEN WENIG GENOMISCHE ABERRATIONEN .....	21
3.2	GASTRALE MZBCL VOM MALT-TYP ZEIGEN SELTEN MSI .....	23
3.3	ABERRATIONEN AUF 3q, 6q, 11q UND 18q SIND DIE HÄUFIGSTEN DETEKTIERTEN VERÄNDERUNGEN IN GASTRALEN MZBCL VOM MALT-TYP .....	25
3.4	TRANSLOKATION t(11;18)(q21;q21)-POSITIVE FÄLLE ZEIGEN KEINE ZUSÄTZLICHEN GENOMISCHEN ABERRATIONEN .....	28
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>30</b>
4.1	DER „MUTATOR-PATHWAY“ SPIELT IN DER PATHOGENESE DER GASTRALEN MZBCL VOM MALT-TYP EINE UNTERGEORDNETE ROLLE.....	30
4.2	DIE BEDEUTUNG DER KLONALEN ALLELISCHEN ABERRATIONEN AUF 3q, 11q, 6q UND 18q UND IHRE BEZIEHUNG ZUR TRANSLOKATION t(11;18)(q21;q21) .....	33
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>40</b>
6.1	ABKÜRZUNGEN .....	40
6.2	LITERATURVERZEICHNIS .....	42

# 1 Einleitung

## 1.1 Einordnung und Charakteristika der gastralen

### *Marginalzonen B-Zell-Lymphome (MZBCL) vom MALT-Typ*

Innerhalb der Gruppe der Non-Hodgkin Lymphome (NHL) unterscheidet man seit der Einführung der REAL-Klassifikation (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms) [1] drei Typen von Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen (MZBCL). Hierzu gehören das nodale MZBCL, das splenische MZBCL und das extranodale MZBCL vom MALT-Typ (Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe). Nach der neuen WHO-Klassifikation [2] stellen sie jeweils eigene Entitäten dar. Das extranodale MZBCL vom MALT-Typ ist von diesen die häufigste Form. In einer internationalen Evaluation wurde für das extranodale MZBCL vom MALT-Typ eine Häufigkeit von 7,6% aus 1378 untersuchten NHL gefunden [3]. Der Malignitätsgrad der MZBCL wird als niedrig-maligne eingestuft.

Extranodale MZBCL vom MALT-Typ kommen bevorzugt im Magen [4], aber auch in Speicheldrüse [5], Schilddrüse [6] und in vielen anderen Organen vor [7]. Sie treten vornehmlich im höheren Lebensalter mit einer Häufung in der siebten Lebensdekade auf. Klinisch handelt es sich bei den extranodalen MZBCL vom MALT-Typ des Magens im Vergleich zu anderen NHL um eine Erkrankung mit einer relativ guten Prognose. Die meisten gastralen MZBCL vom MALT-Typ bleiben sehr lange in einem lokalisierten Stadium auf den Magen beschränkt. Nur sehr selten und sehr spät neigen sie zur Disseminierung. Klinisch findet man meist nur unspezifische, dyspeptische Beschwerden, eventuell auch B-Symptome und eine Anämie.

Die Stadieneinteilung der gastralen MZBCL vom MALT-Typ erfolgt nach einer modifizierten Ann-Arbor-Klassifikation nach Musshoff [8] mit den Stadien EI bis EIV, wobei sich die überwiegende Anzahl in den Stadien EI und EII befindet.

Neben chirurgischen, radiologischen und chemotherapeutischen Behandlungsmöglichkeiten wird auch in einer noch frühen Phase, meist nur bis Stadium EII, über eine erfolgreiche Therapie durch die Eradikation von *Helicobacter pylori* (H.p.) berichtet [9,10]. Nach einer Studie von Cogliatti et al. [11] liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei

91% (95% in Stadium EI bzw. 82% in Stadium EII) und die 10-Jahres-Überlebensrate bei 75%.

Makroskopisch findet man beim extranodalen MZBCL vom MALT-Typ im Magen meist multifokale flache infiltrative und auch z.T. ulzerierende Läsionen, die sich am häufigsten im Magen-Antrum befinden. Auch histologisch erkennt man, dass es sich bei den gastralen MZBCL vom MALT-Typ meist um ein multifokales Geschehen handelt. Das Phänomen dieser Multifokalität wird einerseits durch die Kolonisierung der Mukosa mit malignen Zellen des Haupttumors erklärt, die dann zu den beschriebenen weit abseits liegenden „Mikrolymphomen“ führt [12]. Andererseits steht dem durch den Nachweis von klonalen Populationen, die vom Haupttumor unterschiedlich sind, das Konzept des primär multifokalen Geschehens mit Ausbildung eines Haupttumors gegenüber [13]. Ausgehend von der Lamina propria mucosae breiten sich die Lymphome in die Marginalzone von Sekundärfollikeln, in die umgebenden Lymphfollikel (follikuläre Kolonisierung) und in die Lamina epithelialis mucosae der Magendrüsen aus. Dort findet man sogenannte lymphoepitheliale Läsionen (LEL), denen eine hohe Relevanz in der Diagnosestellung zukommt. Zytologisch handelt es sich bei den Tumorzellen um kleine bis mittelgroße chromatindichte Lymphozyten. Immunhistochemisch findet man bei den gastralen MZBCL vom MALT-Typ ein bestimmtes Muster mit der Expression von CD19, CD20, CD22, CD79a und sIg (sIgM häufiger als sIgA und sIgG) und Negativität für CD5, CD10 und CD23 [1]. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, andere niedrig-maligne NHL differentialdiagnostisch abzugrenzen. Gastrale MZBCL vom MALT-Typ zeichnen sich außerdem durch ein monoklonales Rearrangement in den Leicht- und Schwerekettenregionen der Immunglobuline (IgL und IgH) aus [14].

## ***1.2 Pathogenese extranodaler MZBCL vom MALT-Typ***

Extranodale MZBCL vom MALT-Typ sind häufig mit chronischen endogenen oder exogenen Entzündungen assoziiert, wie z.B dem Sjögren-Syndrom [5] oder der Hashimoto-Thyreoiditis [6], sowie Infektionen, wie beispielsweise die H.p.-Gastritis [15,16]. Eine Beteiligung des Epstein-Barr-Virus (EBV) scheint im Gegensatz zu manch ande-

ren Lymphomentitäten in der Pathogenese der MZBCL vom MALT-Typ nicht zu bestehen [17,18].

MZBCL vom MALT-Typ des Magens gehören zu den am besten untersuchten Tumor-Progressions-Modellen und erhielten große Beachtung in den letzten Jahren. Für diese Tumoren existiert ein attraktives Modell, wie sich auf dem Boden einer chronischen Entzündung eine Neoplasie entwickelt. So besteht eine etwa 70 bis über 90%ige Assoziation mit einer gastralen H.p-Infektion [19,20], die im Magen ein sekundäres mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe ausbildet. Das Besondere an MALT im Vergleich zum lymphatischen Gewebe des Lymphknoten ist u.a. seine enge Beziehung zu epithelialen Strukturen und seine besonders breite Marginalzone mit B-Gedächtniszellen. In der weiteren Entwicklung zum gastralen MZBCL vom MALT-Typ findet wahrscheinlich zunächst in einer noch Antigen-abhängigen immunologisch vorangetriebenen Phase eine multifokale poly- oder oligoklonale B-Zell-Expansion statt. Diese geht bei Fortbestehen des Stimulus in eine Antigen-unabhängige Phase über, welche durch eine autonome Proliferation geprägt ist. Die pathogenetische Bedeutung der H.p.-Infektion wird deutlich durch zum Teil vollständige Remissionen gastraler MZBCL vom MALT-Typ nach einer Eradikationstherapie in einer meist noch relativ frühen Phase [9,10].

Während die meisten gastralen MZBCL vom MALT-Typ im weiteren Verlauf niedrig-maligne bleiben, entwickelt sich in einigen Fällen aus diesen ein hoch-malignes MALT-Lymphom [21,22,23], das nach der neuen WHO-Klassifikation [2] als „diffuses groß-zelliges B-Zell Lymphom“ (DLBCL) klassifiziert wird. Die Frage, ob und in welchem Ausmaß die DLBCL als blastäre Transformation gastraler MZBCL vom MALT-Typ zu verstehen sind, ist noch offen [21,22,24,25].

Wie auch bei anderen Neoplasien wird vermutlich die Entwicklung der extranodalen MZBCL vom MALT-Typ durch genomische Aberrationen begleitet. Jedoch welche Aberrationen in welchem Ausmaß und zu welchem Zeitpunkt in der Pathogenese von welcher Bedeutung sind, ist derzeit noch unklar.

Verschiedene genomische Aberrationen wurden bisher beschrieben, wobei die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$  als spezifische rekurrente chromosomale Aberration in mehr als 50% der extranodalen MZBCL vom MALT-Typ nachgewiesen werden kann und

sich in letzter Zeit als die häufigste Veränderung etabliert hat [26,27,28,29,30,31]. Dierlamm et al. [32] zeigten, dass diese Translokation zur Expression eines Transkriptes führt, das die hier rearrangierten Gene API2 und MALT1 fusioniert. An weiteren Translokationen wurde in lediglich 9% (drei von 34) der untersuchten Fälle die Translokation t(3;14)(q27;q32) [33], des weiteren die Translokation t(1;14)(p22;q32) beschrieben [34,35].

Weiterhin konzentrierten sich die Untersuchungen auf Veränderungen in Genen, die häufig auch in anderen Neoplasien auftreten. Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 finden sich nach Du et al. [36] in rund 19%, Allelverluste (Loss of heterozygosity, LOH) in diesem Bereich jedoch nur in rund 7% der untersuchten Fälle. Calvert et al. [37] fanden in zwei von elf (18%) untersuchten Fällen LOH im DCC-Genlocus. Gronbaek et al. [38] beschrieben in drei von fünf (60%), Seeberger et al. [39] sogar in vier von fünf (80%) Fällen Mutationen des Fas/CD95- Rezeptors. An numerischen Aberrationen wird eine Trisomie 3 in 12% bis 85% der Fälle beschrieben [40,41,42], weitere seltener gefundene Trisomien sind die der Chromosomen 12 und 18. Mikrosatelliteninstabilität (MSI), bzw. das früher auch „Replication-Error-positiver Phänotyp“ (RER+) genannte Phänomen, was typischerweise in hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinomen (HNPCC), aber auch in manchen sporadischen Tumoren gefunden wird, wurde in 0% [43] bis 50% [44] der untersuchten MZBCL vom MALT-Typ beschrieben.

### ***1.3 Zielsetzung dieser Arbeit***

Viele Studien, v.a. an nodalen NHL, haben gezeigt, dass Zeichen genomischer Instabilität, wie z.B. Translokationen, numerische Aberrationen, Deletionen und Amplifikationen, in der Tumorphathogenese wesentlich beteiligt sind. Beispiele hierfür sind die Translokation t(8;14) mit der Involvierung des C-MYC-Onkogens beim Burkitt-Lymphom oder die Translokation t(14;18) mit der Beteiligung des BCL-2-Onkogens beim folliculären Lymphom.

Beim extranodalen MZBCL vom MALT-Typ sind solche Zuordnungen noch nicht zu machen. Die Translokation t(11;18)(q21;q21) kann nur in rund der Hälfte der Fälle gefunden werden, auch sind die Folgen dieser Translokation unklar.

Das Ziel dieser Studie war, die Untersuchungen über Veränderungen in den gastralen MZBCL vom MALT-Typ nun durch molekulargenetische Verfahren genauer und ausführlicher weiterzuführen und zu erhellen, welchen konzeptionellen Weg in der Karzinogenese diese Lymphome einschlagen. Ist es der Tumorsuppressorweg, der über die Inaktivierung sogenannter „gatekeeper“, die auch als Kontrolleure der Zellproliferation bezeichnet werden, zur Tumorentstehung führt? Oder spielt vielleicht der „mutator-pathway“ mit dem Funktionsverlust sogenannter „caretaker“ und damit Genen, die als DNA-Mismatch-Repair-Gene der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität dienen, eine wichtige Rolle?

Zur Beantwortung dieser Fragen erfolgte zum einen die Überprüfung auf klonale allelische Aberrationen wie Deletionen und Amplifikationen, über die es bisher nur wenige Aussagen gibt. Daneben interessierte uns auch die Rolle der Mikrosatelliteninstabilität als wichtiges Zeichen des „mutator-pathway“ in der Lymphomentstehung.

Bei der Festlegung der genauen Ausrichtung und Zielsetzung der Untersuchung und damit bei der Auswahl der Mikrosatellitenmarker fanden insbesondere die CGH- und FISH-Studie über die DLBCL des Gastrointestinaltraktes von Barth et al. [45] und die Studie von Starostik et al. [46] über molekulargenetische Veränderungen bei den gastralen DLBCL Berücksichtigung. Die chromosomalen Lokalisationen, die in den erwähnten Untersuchungen Auffälligkeiten aufwiesen, erhielten eine besondere Aufmerksamkeit, in der Annahme, dass die gleichen Veränderungen auch in den gastralen MZBCL vom MALT-Typ vorkommen könnten, um damit Aussagen zur Pathogenese und zur eventuellen Progression in die Hochmalignität zu machen. War man in vielen Studien über gastrale MZBCL vom MALT-Typ zuvor hauptsächlich auf zytogenetische Untersuchungstechniken angewiesen, so stellte die nun hier angewandte molekulargenetische Methode der Fragmentanalyse mit Mikrosatellitenmarkern eine Methode dar, mit deren Hilfe wesentlich sensitiver und spezifischer Aussagen über Veränderungen direkt auf DNA-Ebene gemacht werden konnten. Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Abschnitte meist aus Di-, aber auch aus Mono-, Tri- oder Tetranukleotiden bestehend mit einer Gesamtlänge von wenigen 100 Basenpaaren, die über das gesamte menschliche Genom



verteilt sind. Mikrosatelliten sind hoch polymorph und werden stabil an die Nachkommen weitergegeben.

Auf der einen Seite können Mikrosatelliten als Marker zur Aufdeckung von genomischen Veränderungen wie LOH oder Amplifikationen dienen. Auf der anderen Seite können Mikrosatelliten aber auch zur Untersuchung auf MSI verwendet werden. Beispielsweise zeigen Tumoren von Patienten mit hereditärem nicht-polypösem Kolonkarzinom (HNPCC) Veränderungen in Mikrosatelliten in Form von neuen zusätzlichen Allelen anderer Größe, die durch Fehler des DNA-Reparatursystems verursacht werden. Beschränkten sich vorangegangene Fragmentanalyse-Studien über gastrale MZBCL vom MALT-Typ meist auf weniger als zehn Mikrosatellitenmarker, so wurde mit 39 Markern die Aussagekraft deutlich gesteigert. In dieser Studie wurden 24 gastrale MZBCL vom MALT-Typ untersucht. Sie wurden sowohl aus tiefgefrorenem Frischmaterial als auch aus formalinfixiertem Paraffinmaterial gewonnen und mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Mikrosatellitenmarkern aus Regionen teils bekannter, teils vermuteterer Onko-, Tumorsuppressor- oder sonstiger weiterer Genorte untersucht. Bei über der Hälfte des Untersuchungsmaterials konnten die Ergebnisse mit denen aus zuvor durchgeführten konventionell-zytogenetischen und FISH-Studien [47] über das Vorhandensein der Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$  verglichen werden.

Schließlich stellten sich für die Pathogenese und Progression der gastralen MZBCL vom MALT-Typ wichtige Erkenntnisse heraus, die die Häufigkeit von MSI, Veränderungen auf den Chromosomen 3, 6, 11 und 18 und deren Assoziation mit der Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$  betreffen.

## **2 Material und Methoden**

### ***2.1 Untersuchungsmaterial***

Untersucht wurden 24 Tumoren extranodaler MZBCL vom MALT-Typ ausschließlich des Magens aus Material des Zentrums für Lymphknotenpathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg. Bei Fall Nr.13 handelte es sich um ein gastrales MZBCL vom MALT-Typ, das gleichzeitig Anteile eines DLBCL besaß, bei dem jedoch nur die niedrig-maligne Komponente untersucht wurde. Von 16 dieser Fälle stand tiefgefrorenes Frischmaterial und von den übrigen acht formalinfixiertes Paraffinmaterial zur Verfügung. In allen Fällen wurde die Diagnose entsprechend den Kriterien der REAL-Klassifikation (Revised European-American classification of lymphoid neoplasms) [1] und der WHO-Klassifikation [2] gestellt. Als Referenzgewebe wurde in den meisten Fällen tumorfreies Lymphknotenmaterial, vereinzelt aber auch tumorfreies Darm-, Leber-, Milzgewebe oder peripheres Blut des selben Patienten verwendet.

Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten betrug 2:1 (16 männliche und acht weibliche Patienten). Die Altersverteilung bei Diagnosestellung erstreckte sich von 32 bis 75 Jahre mit einem Durchschnittsalter von etwa 54 Jahren. 13 Fälle wurden zuvor im Rahmen einer anderen Untersuchung über konventionell-zytogenetische und FISH-Studien analysiert [47]. Von diesen 13 waren insgesamt sechs Fälle positiv und sieben negativ für die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ .

Eine Übersicht über die verfügbaren Patientendaten ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

**Tabelle 1: Patientendaten**

Patientennummer	Geschlecht	Alter bei Diagnosestellung	Tumorstadium nach Musshoff	t(11;18)(q21;q21) - Status	Diagnose nach WHO-Klassifikation
1	m	56	EI2	pos	niedrig-malignes MALT-Lymphom
2	m	57	EII1	pos	niedrig-malignes MALT-Lymphom
3	m	59	EI2	pos	niedrig-malignes MALT-Lymphom
4	m	36	EIII	pos	niedrig-malignes MALT-Lymphom
5	m	38	EII2	pos	niedrig-malignes MALT-Lymphom
6	w	32	EI1	pos	niedrig-malignes MALT-Lymphom
7	m	43	EI2	neg	niedrig-malignes MALT-Lymphom
8	w	unbek.	EI1	neg	niedrig-malignes MALT-Lymphom
9	m	60	EI2	neg	niedrig-malignes MALT-Lymphom
10	m	74	EI1	neg	niedrig-malignes MALT-Lymphom
11	m	48	EI1	neg	niedrig-malignes MALT-Lymphom
12	m	52	EI1	neg	niedrig-malignes MALT-Lymphom
13	w	46	EIII1	neg	niedrig-malignes MALT-Lymphom
14	m	50	EII2	n.u.	niedrig-malignes MALT-Lymphom
15	m	75	EII	n.u.	niedrig-malignes MALT-Lymphom
16	m	41	EIII1	n.u.	niedrig-malignes MALT-Lymphom
17	w	65	unbek.	n.u.	niedrig-malignes MALT-Lymphom
18	w	53	unbek.	n.u.	niedrig-malignes MALT-Lymphom
19	m	49	EIII1	n.u.	niedrig-malignes MALT-Lymphom
20	m	unbek.	EI2	n.u.	niedrig-malignes MALT-Lymphom
21	w	54	EIII1	n.u.	niedrig-malignes MALT-Lymphom
22	m	57	unbek.	n.u.	niedrig-malignes MALT-Lymphom
23	w	69	EIII1	n.u.	niedrig-malignes MALT-Lymphom
24	w	67	EIII1	n.u.	niedrig-malignes MALT-Lymphom

## **2.2 Untersuchungsmethoden**

In den folgenden Schritten wurde, routinemäßig durchgeführten molekularbiologischen Protokollen entsprechend [48], genomische DNA aus histologischem Material gewonnen, über die PCR amplifiziert und in einer Elektrophorese aufgetrennt, um sie einer Analyse zugänglich zu machen.

### **2.2.1 Mikrodissektion**

Sowohl für Tumor- als auch für Kontrollgewebe wurden in jedem Fall je nach Größe des jeweiligen Gewebestückes Serien von 10 bis 20 ca. 10 µm dicken Schnitten hergestellt. Jeweils der erste und letzte dieser Schnitte wurde mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbt, um das zu extrahierende Gewebe zu kennzeichnen. Die dazwischenliegenden Schnitte blieben beim Gefriermaterial ungefärbt und nur beim Paraffingewebe wurden diese mit dem „Nuclear Fast Red“-Farbstoff behandelt [49], um die Mikrodissektion zu erleichtern. Mit Hilfe eines Mikroskops wurde aus den Schnitten, die nicht mit H&E gefärbt wurden, mit einer Rasierklinge ein Gewebeausschnitt mit hohem Tumoranteil bzw. mit dem tumorfreien Kontrollgewebe abgekratzt und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen.

### **2.2.2 Gewinnung genomischer DNA**

Das Paraffinmaterial musste zunächst durch die Behandlung mit Xylol entparaffiniert werden. Hierzu wurde das Reaktionsgefäß nach Zugabe von 1 ml Xylol und 1 min Vortexieren 5 min bei 14000 Umdrehungen/min zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml 100%igen Ethanol, und wieder wurde 1 min vortexiert, 5 min zentrifugiert

und der Überstand verworfen. Auch dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Danach schloss sich noch eine 30-minütige Inkubation bei 50°C an.

Die DNA-Extraktion aus beiden Materialien (Gefrier- und Paraffinmaterial) erfolgte unter der Verwendung von Proteinase K und Phenolchloroform:

12 Stunden Inkubation bei 50°C in 300 µl Digestionspuffer:

100 mM NaCl,  
10 mM TrisCl (pH 8),  
25 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (pH 8),  
0,5% Sodiumdodecylsulfat (SDS),  
0,45 mg Proteinase K (20 µl von 20 mg/ml-Verdünnung).

In den Fällen, in denen wenig DNA-Material zu erwarten war, erfolgte stattdessen die Inkubation mit dem Digestionspuffer nach Higuchi plus Proteinase K:

50 mM KCl,  
10 mM Tris HCl (pH 8,3),  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>,  
0,1 mg/ml Gelatine,  
0,45% Nonidet P40, 0,45% Tween 20 und  
0,225 mg Proteinase K (10 µl von 20 mg/ml-Verdünnung).

In diesen Fällen musste anschließend noch die Proteinase K durch eine Inkubation von 7 min bei 95°C inaktiviert werden.

In allen Fällen erfolgte danach die Extraktion mit 600 µl Phenolchloroform (Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol - 25:24:1). Diesmal wurde nach 1 min Vortexieren und 5 min Zentrifugieren nur die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß übertragen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die gleiche Prozedur wurde danach mit nun 500 µl Chloroform noch zweimal wiederholt. Für die Fällung

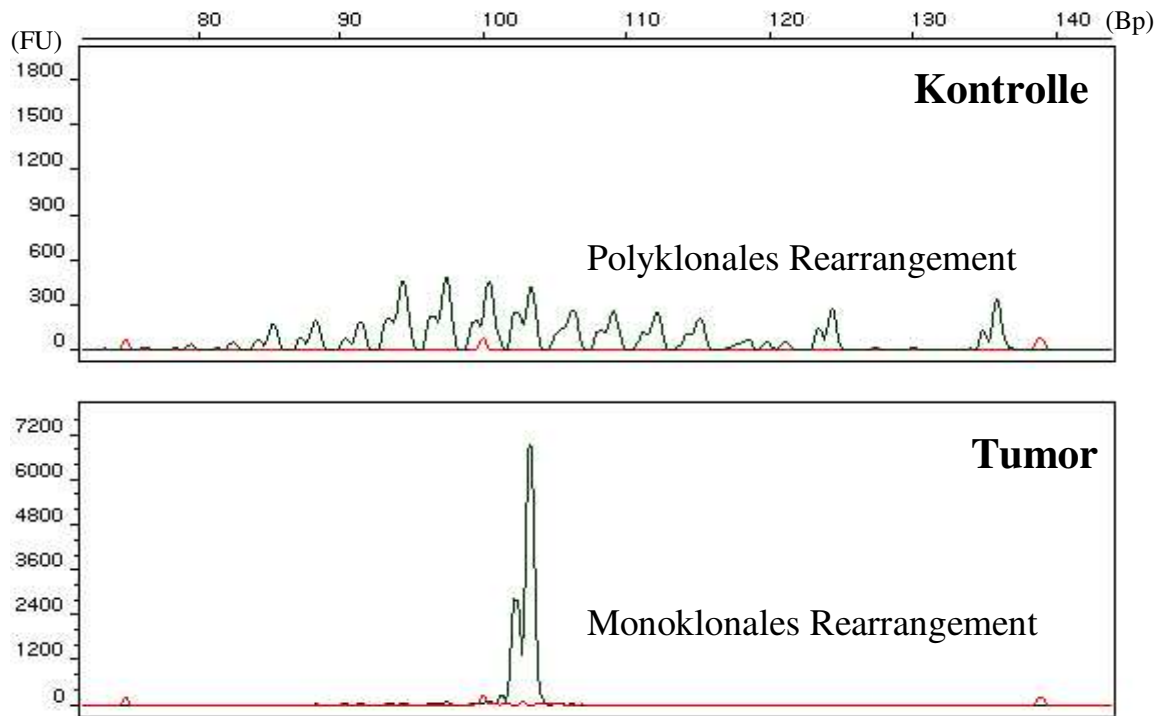
der DNA wurden schließlich entsprechend 10% des erhaltenen Volumens 3M Natriumazetat dazugegeben, vortexiert, dann 1 ml -20°C-kalter 100%iger Ethanol dazugegeben, wieder kurz vortexiert und bei -20°C für mindestens 2 Stunden (meist über Nacht) inkubiert. Nach diesem Vorgang wurde die Probe 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Jetzt erfolgte die Zugabe von 1 ml -20°C-kalten 70%igen Ethanols. Nach kurzem Schwenken des Gefäßes und 5-minütigem Zentrifugieren wurde dann der Ethanol wieder entfernt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Danach musste die Probe bei offenem Gefäß bei 37°C für ca. 30 min inkubiert werden, um eventuell noch vorhandene Etanolreste entweichen zu lassen. Abschließend wurde nach Zugabe von 200 µl sterilem Wasser und Auflösung der DNA spektrometrisch bei 260 nm die DNA-Konzentration bestimmt (Beckmann Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA). Die einzelnen Konzentrationen lagen in Abhängigkeit von Menge und Qualität des Materials meist zwischen 0,5 und 1,5 µg/µl. Somit hatte man bei einer Auflösung in 200 µl Volumen ca. 100-300 µg DNA zur Verfügung.

### **2.2.3 Kontrolle der Klonalität von Tumor- und Kontrollgewebe**

Um einerseits den Tumoranteil in der extrahierten DNA des Tumors, andererseits die Tumorfreiheit in der DNA des Kontrollgewebes zu überprüfen, wurde von jeder gewonnenen DNA eine Analyse der CDR-3 Region des Immunglobulins für schwere Ketten über die PCR nach den entsprechenden Protokollen zur Darstellung des Rearrangements dieser Region durchgeführt [50,51,52]. Erhält man in dem Elektropherogramm eine singuläre, dominante Bande, so wird die Probe als monoklonal bewertet, sieht man hingegen mehrere Banden kleinerer Größe entsprechend der Gaußschen Normalverteilung, so wird die Probe als polyklonal bewertet. Auf diese Weise konnte die Monoklonalität der Tumor-DNA bzw. die Polyklonalität der DNA des Kontrollgewebes untersucht und bestätigt werden.

Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für eine Untersuchung der CDR-3 Region des Immunglobulins für schwere Ketten über die PCR bei Patient Nr.10.

**Abbildung 1:** Beispiel für die Analyse der CDR-3 Region des Immunglobulins für schwere Ketten über die PCR bei Patient Nr.10



**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Mikrosatellitenmarker**

Marker	Annealing-Temperatur (in °C)	Lokus	Produktgröße (in bp)	Fluoreszenzmarkierung	Primermenge pro Reaktion (in pmol)
D1S237*	60	1q32.1	172-192	Fam	7,5
D1S2827*	60	1q32.1	142-152	Hex	12,5
D2S391*	60	2p16-22	125-155	Fam	2,5
D3S4103*	60	3p14.2	115-?	Tamra	20
D3S1300*	60	3p14.2	217-241	Fam	6
D3S1261*	60	3p14.1	185-217	Fam	15
D3S1229*	56	3q26.2-27	109-127	Tamra	10
D3S1530*	62	3q27-qter	250-?	Fam	4,5
D3S1262	58	3q27-qter	90-120	Hex	25
D3S1580*	58	3q27-qter	122-?	Fam	15
D3S1314*	58	3q27-qter	144-170	Tamra	17,5
D3S1311*	58	3q27-qter	134-152	Hex	5
D5S82*	58	5q21	169-179	Tamra	15
D5S346*	56	5q21	96-122	Hex	6
D6S1721*	60	6p23	253-273	Fam	5
D6S447*	58	6q21-22.1	196-212	Fam	2,5
D6S310*	62	6q23.3-25	159-183	Fam	4
D6S441*	60	6q24-25.3	162-186	Hex	12,5
D6S297*	60	6q27	210-224	Fam	10
D7S501*	56	7q31	163-179	Hex	10
D7S486*	60	7q31.1	114-146	Hex	5
D9S2136*	60	9p21	130-150	Fam	10
D11S1339	58	11q21-23.2	120-144	Fam	25
D11S1356*	60	11q23-24	193-213	Fam	3,5
D11S1345*	60	11q23-24	232-240	Hex	25
D12S89*	60	12p12-13	254-288	Hex	12,5
D12S98	60	12p12-13	97-?	Hex	15
D13S153*	60	13q14	212-236	Tamra	20
D17S250*	52	17p12	151-169	Tamra	22,5
TP53CA*	62	17p13.1	103-?	Fam	4
P53p	60	17p13.1	121-141	Hex	25
D18S474*	60	18q21	119-139	Fam	2,5
D18S1099	62	18q21	204-210	Fam	25
D18S484	58	18q21	260-266	Hex	25
D18S1156	58	18q21	264-270	Fam	25
D18S35*	60	18q21	104-124	Hex	25
D18S1127	56	18q21	178-204	Fam	25
D18S1144	56	18q21	159-181	Hex	25
D18S1129	56	18q21	234-258	Ned	25
D15S114	56-62	15q21-22	177-187	Rox	20
D15S231	56-62	15pter-15q14	102-114	Rox	20
FGA	56-62	4q28	256-284	Rox	20



## **2.2.4 Mikrosatellitenanalyse**

### **2.2.4.1 Auswahl der Mikrosatellitenmarker**

Für die anschließend folgenden Polymerasekettenreaktionen wurden die dazu benötigten Primer der Mikrosatellitenmarker herausgesucht. Eine Übersicht über die verwendeten Mikrosatellitenmarker mit Name, Annealing-Temperatur, Lokalisation, Produktgröße, Markierung und Menge für die PCR ist in Tabelle 2 zusammengestellt. Die letzten drei Marker dienten lediglich als Standardmarker zur Unterscheidung zwischen LOH und Amplifikation. Die mit einem Stern (\*) versehenen Marker kennzeichnen die auch von Starostik et al. [46] verwendeten Marker bei der Untersuchung der gastralen DLBCL. Die Primersequenzen für die Amplifikation der Mikrosatelliten wurden der „Genome Database“ (GDB, <http://gdbwww.gdb.org>) entnommen. Die PCR-Primer wurden von MWG-Biotech (München) synthetisiert. Jeweils einer der beiden Primer eines Primerpaares wurde dabei am 5'-Ende mit einem der fluoreszierenden Phosphoramide FAM, HEX, NED, TAMRA oder ROX für die spätere Detektion kovalent gekoppelt.

### **2.2.4.2 Polymerasekettenreaktion**

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden unter Verwendung der ausgewählten Primer die Mikrosatelliten aus der extrahierten DNA amplifiziert.

Nach Bestrahlung der PCR-Utensilien mit ultraviolettem Licht wurden jeweils getrennt für Kontrollgewebe und Tumorgewebe die PCR durchgeführt. In ein PCR-Reaktionsgefäß wurden 20 µl des folgenden Ansatzes gegeben:

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

plus

15 µl „Mastermix“ bestehend aus:

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

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

3,60 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM),

2,50 µl dNTPs (10 mM),

x µl Primer (3' und 5'-Primer, individuelle Menge, siehe Tabelle 2)

und zu 15 µl Gesamtvolumen autoklaviertes destilliertes Wasser.

Die PCR-Proben wurden nun einzeln oder entsprechend ihrer jeweiligen Annealing-Temperaturen als Multiplexreaktionen (= die Verwendung von mehr als einem Primerpaar im selben PCR-Reaktionsgefäß) auf folgende Weise in einem „2400 Thermozykler“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) amplifiziert:

Hotstart:	13 min bei 95°C,
10 Zyklen:	30 sec bei 95°C (Denaturierung),
	30-59 sec bei spezifischer Annealing-Temperatur,
	59 sec bei 72°C (Extension),
20 Zyklen:	30 sec bei 91°C (Denaturierung),
	30-59 sec bei spezifischer Annealing-Temperatur,
	59 sec bei 72°C (Extension),
Ende:	30 min bei 72°C, dann Herunterkühlung bis auf 4°C.

### 2.2.4.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden dann in einem 6%igen Polyacrylamidgel im 377A-DNA-Sequenzier (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) aufgetrennt. Für die Herstellung eines Gels benötigte man folgende Reagenzien:

5,625 ml Acrylamidlösung (40% - 1:29),  
18 g Harnstoff,  
20 ml Aqua dest. und  
10 ml Laufpuffer 5xTBE (540 mg Tris, 275 mg Borat, 41,4 mg EDTA plus  
zu 10 ml autoklaviertes destilliertes Wasser).

Unmittelbar vor dem Gießen des Gels erfolgte die Zugabe von

250 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat) plus  
30 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin).

Alternativ wurde auch bei Bedarf zur noch besseren Auftrennung ein formamidhaltiges (32%) 5%iges Polyacrylamidgel mit der folgenden Zusammensetzung verwendet [53] :

5 ml Acrylamidlösung (40% - 1:29),  
13,44 g Harnstoff,  
8 ml Laufpuffer 5xTBE,  
12,8 ml Formamid und  
zu 40 ml Gesamtvolumen autoklaviertes destilliertes Wasser.

Unmittelbar vor dem Gießen des formamidhaltigen Gels erfolgte die Zugabe von

450 µl 10% APS plus  
30 µl TEMED.

In jedem Falle erfolgte anschließend die Vorbereitung der PCR-Proben für den Gellauf: Nach 5-minütiger Denaturierung bei 95°C und anschließender Abkühlung auf Eis wurden die eventuell miteinander kombinierten PCR-Proben jeweils in die Geltaschen gegeben. Injiziert wurde 1 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.

Der Gellauf dauerte mit dem 377A-DNA-Sequenzier bei 51°C, 3000 Volt, 60 mA und 200 Watt ca. 2,5 Stunden.

#### **2.2.4.4 Analyse der Elektrophorese**

Die Rohdaten der Elektrophorese wurden automatisch gesammelt. Die Analyse der aufgetrennten PCR-Produkte wurde unter Benutzung von ABI GeneScan<sup>®</sup> und von ABI Genotyper<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) den Anleitungen entsprechend durchgeführt.

Die Sammlung und Analyse der Daten funktioniert auf folgende Weise:

Die denaturierten negativ-geladenen PCR-Produkte wandern im elektrischen Feld von der Kathode in Richtung Anode und werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Über einen Argonlaser mit Wellenlängen im Bereich  $\lambda$  zwischen 488 und 514,5 nm wird das Gel während des Laufes in der Nähe vor der Anode entlang einer konstanten Linie orthogonal zur Laufrichtung der PCR-Produkte permanent gescannt. Je kleiner ein PCR-Produkt ist, desto schneller wandert es zur Anode und desto früher passiert es die Scanlinie. Trifft der Laser dabei auf die fluoreszierende Fläche eines PCR-Produkts, so emittiert dieses Licht entsprechender Wellenlänge, welches über ein Spiegelsystem weitergeleitet wird und über einen angeschlossenen Computer registriert werden kann. Die ersten Schritte der Analyse geschehen somit vollautomatisch. Nach manueller Bearbeitung der Rohdaten mit Spurkorrektur und weiteren Schritten erhält man die entsprechenden Elektropherogramme, die anschließend ausgewertet werden können. Die x-Achse der Elektropherogramme gibt die Produktgröße in Basenpaaren (Bp) an, welche durch den in jeder Spur mitgelaufenen Standard „ROX 500“ bzw. „ROX 350“ definiert wurde. Die y-Achse zeigt die Fluoreszenz-Einheiten in Fluoreszenz-Units (FU) und damit die Intensität des Signals an, die zur Menge des amplifizierten Produkts direkt proportional ist. In den darauf folgenden Schritten kann nun die Fläche oder auch die Höhe der Peaks des jeweiligen Allels ermittelt werden, über welche nun Tumor- und Kontrollgewebe semiquantitativ verglichen werden können.

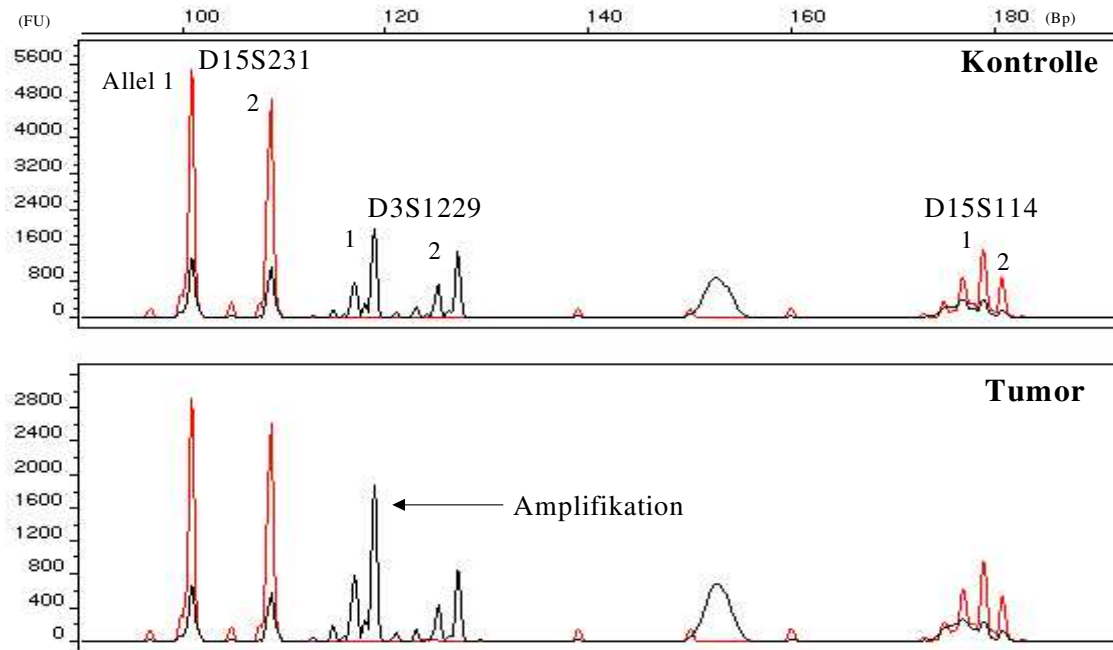
Für die Untersuchung auf MSI war jeder amplifizierte Marker informativ, d.h. es war nicht von Bedeutung, ob das individuelle Produkt heterozygot oder homozygot war. Eine Mikrosatelliteninstabilität ist definiert als das Auftreten zusätzlicher Allele im Tumorgewebe, die sowohl größer als auch kleiner als das ursprüngliche Allel sein können. Man unterscheidet zwei Arten von MSI. Beim Typ 1 findet man multiple neue Allele, was typisch für das HNPCC ist, beim Typ 2 dagegen erscheint lediglich ein neues Allel pro Marker.

Für die Untersuchung auf LOH oder Amplifikation wurden lediglich diejenigen Marker eines Patienten als informativ betrachtet, die heterozygot waren und keine MSI aufwiesen. In diesen Fällen wurden die Verhältnisse der Flächen sowohl der beiden Tumor- als auch der beiden Kontrollallele berechnet. Zeigten diese beiden erhaltenen Verhältnisse Unterschiede von mehr als 20%, so wurde eine genomische Aberration angenommen. Die Unterscheidung zwischen LOH und Amplifikation erfolgte in nachfolgenden Ver-

suchen über den Vergleich in PCR-Multiplexreaktionen mit mindestens einem oder besser zwei Standardmarkern oder anderen Vergleichsmarkern, die selbst keine Veränderungen zwischen Tumor- und Normalgewebe zeigten. Es wurden dazu die Verhältnisse der einzelnen Kontrollallele zu den entsprechenden Tumorallelen berechnet. Die erhaltenen Werte wurden miteinander verglichen. Das amplifizierte oder deletierte Allel des interessierenden Markers konnte dadurch erkannt werden, dass sich dessen Quotient aus Kontrollallel und Tumoralallel deutlich von den anderen Quotienten unterschied. Die Vergrößerung eines Tumorallels im Vergleich zu seinem Kontrollallel um mindestens 40% wurde Amplifikation, die Verkleinerung um mindestens 40% wurde LOH genannt. Wurden Veränderungen jeder der oben genannten Arten in einem Marker bei einem Patienten gefunden, so wurden diese mindestens zweimal bestätigt, bevor sie als solche gewertet wurden.

Abbildung 2 zeigt ein Beispiel eines Elektropherogramms, bei dem die Auswertung auf LOH oder Amplifikation exemplarisch für den Marker D3S1229 bei Patient Nr.15 mit Hilfe der Standardmarker D15S231 und D15S114 veranschaulicht wurde.

**Abbildung 2:** Analyse und Auswertung eines Elektropherogramms exemplarisch dargestellt für den Marker D3S1229 bei Patient Nr.15 mit Hilfe der Standardmarker D15S231 und D15S114.



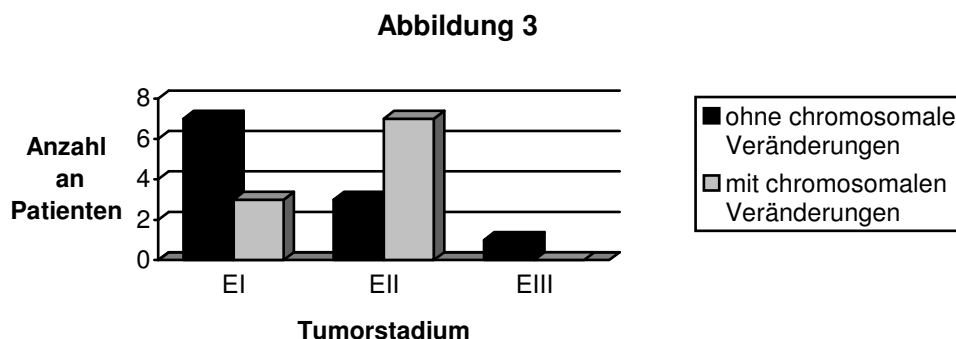
	D15S231		D3S1229		D15S114	
	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
Kontrollgewebe (Fläche in units)	29520	25508	3529	2564	12058	6295
Tumorgewebe (Fläche in units)	15555	13938	3408	1526	7811	3810
Verhältnis Allel 1 zu Allel 2 der Kontrolle	1,16		1,38		1,92	
Verhältnis Allel 1 zu Allel 2 des Tumors	1,12		2,23		2,05	
Differenz zwischen Kontrollallel- und Tumoralallel- verhältnis	3,57%		<b>62,26%</b>		7,03%	
Verhältnis Kontrollallel zu Tumoralallel	1,90	1,83	<b>1,04</b>	1,68	1,54	1,65
Größe des Tumorallels in Relation zum Kontrollallel			<b>162,26%</b>			

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Gastrale MZBCL vom MALT-Typ zeigen wenig genomische Aberrationen

Über die durchgeführte Untersuchung von 24 gastralen MZBCL vom MALT-Typ mit insgesamt 39 Mikrosatellitenmarkern erhielt man 829 Genotypen. In wenigen Fällen, v.a. bei solchen aus Paraffingewebe, bekam man auch nach wiederholten Versuchen kein Amplifikat. Von den 829 Genotypen zeigten 40 (4,83%) genomische Aberrationen. Für die Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse waren alle 829 Genotypen informativ. Unter diesen zeigten nur fünf (0,6%) MSI. Für die Untersuchung auf LOH oder Amplifikationen waren von den 829 nur 642 Genotypen informativ, da hier die homozygoten Genotypen und die mit MSI herausfielen. Unter diesen 642 zeigten 35 (5,45%) LOH oder Amplifikationen.

Eine Korrelation zwischen dem Auftreten von genomischen Aberrationen und dem H.p.-Status konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Beim Vergleich zwischen dem Auftreten von genomischen Aberrationen und dem Tumorstadium konnte festgestellt werden, dass sich die Tumoren, die Veränderungen wie LOH, Amplifikationen oder MSI aufwiesen, in über der Hälfte der Fälle im Stadium EII befanden, wohingegen die Tumoren ohne diese Veränderungen überwiegend in Stadium EI waren (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Beziehung zwischen Tumorstadium und dem Vorhandensein von Veränderungen wie LOH, Amplifikationen oder MSI.



Mehr als einen Trend stellt diese Beobachtung allerdings nicht dar, da das Signifikanzniveau beim Fisher-Yates-Test bei  $p = 0,086109$  lag. Eine Übersicht über alle Genotypen aus der Untersuchung aller Patienten und Marker zeigt Tabelle 3.

**Tabelle 3: Übersicht über alle Genotypen**

Patienten-Nr.	Marker	d1s237	d1s2827	d2s391	d3s4103	d3s1300	d3s1261	d3s1229	d3s1530	d3s1262	d3s1580	d3s1314	d3s1311	d5s82	d5s346	d6s1721	d6s447	d6s310	d6s441	d6s297	d7s501	d7s486	d9s2136	d11s1339	d11s1356	d11s1345	d12s89	d12s98	d13s153	d17s250	tp53ca	P53p	d18s474	d18s1099	d18s484	d18s1156	d18s35	d18s1127	d18s1144	d18s1129	t(1;18)-Status				
1																																													pos
2																																													pos
3																																													pos
4																																													pos
5																																													pos
6																																													pos
7																																													neg
8																		L							L																			neg	
9																																						L					neg		
10																																												neg	
11									A	A	A	1	A										1		L	A							A		A	A	A	A					neg		
12																																													neg
13																			2																									neg	
14								A	A	A		L	L																															n.u.	
15								A	A	A														L																				n.u.	
16																		L	L				L		A												1							n.u.	
17																																													n.u.
18																																													n.u.
19									A																																			n.u.	
20																																													n.u.
21																																													n.u.
22								A		A	A														L												A								n.u.
23									L															A		A																			n.u.
24																																													n.u.

Legende:  heterozygotes Amplifikat  
 homozygotes Amplifikat  
 kein Amplifikat  
 Amplifikation  
 LOH  
 MSI (mit Anzahl zusätzlicher Repeat-Einheiten)

### **3.2 Gastrale MZBCL vom MALT-Typ zeigen selten MSI**

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist definiert als das Auftreten zusätzlicher Allele eines Mikrosatellitenmarkers in einem bestimmten Gewebe im Vergleich zum Referenzgewebe, was durch eine Vermehrung oder Verminderung der Anzahl der Mikrosatelliten-Repeats zu Stande kommt. Für die Interpretation der MSI wurden in dieser Arbeit die Kriterien für die Bestimmung von MSI in kolorektalen Karzinomen nach Boland et al. [54] mit der Einteilung in MSI-H, MSI-L und MSS angewandt. Sofern bei der Untersuchung wie hier geschehen mehr als fünf Marker analysiert werden, ist nach diesen Kriterien MSI-H (große Häufigkeit an MSI) definiert als das Auftreten von MSI in mehr als 30-40% der verwendeten Marker bei einem Patienten. Wenn weniger als 30-40% der Marker MSI aufweisen, spricht man von MSI-L (geringe Häufigkeit an MSI). Wenn bei keinem Marker MSI nachweisbar ist, wird dies MSS (Mikrosatellitenstabilität) genannt. (Bei der Verwendung von nur fünf Markern werden für die Definition von MSI-H mindestens zwei Marker gefordert, die MSI zeigen, was somit in manchen Fällen dem früheren RER+ Phänotypen entspricht. Für MSI-L muss in diesen Fällen ein Marker und für MSS darf kein Marker MSI zeigen.)

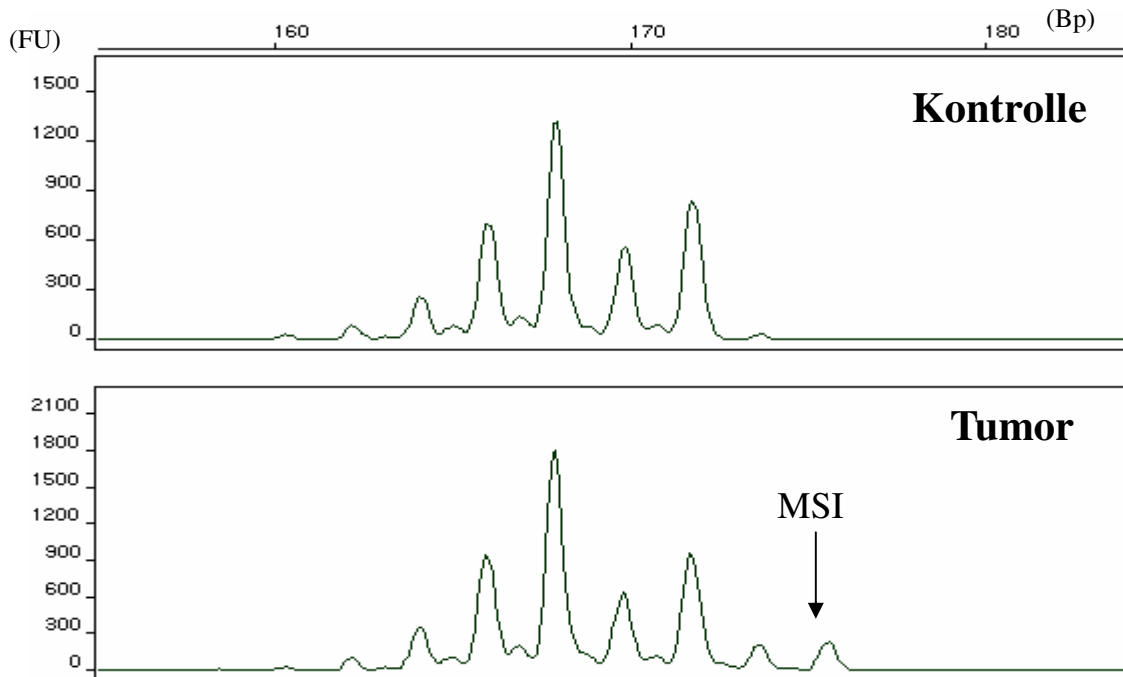
Unter den 829 untersuchten Genotypen fanden sich nur fünf (0,6%) mit MSI, die auf vier (16,6%) Patienten verteilt waren. Jeder der betroffenen Marker zeigte nur einmal MSI. Patient Nr.11 wies in zwei (5,1%) Markern MSI auf, die anderen in jeweils nur einem (2,6%) Marker. Da für die Interpretation MSI-H in dieser Studie mindestens zwölf Marker mit MSI (>30% der 39 Marker) nötig wären, sind alle vier betroffenen Patienten der Kategorie MSI-L zuzuordnen. Die restlichen Patienten (83,3%) gehören in die Kategorie MSS.

Bei der Untersuchung auf MSI verwendeten früher viele Untersucher den Begriff des „RER+ Phänotypen“, wenn sie bei ihren Studien mit meist fünf bis sieben Markern MSI in mindestens zwei Markern bei einem Patienten nachwiesen [55]. Da die Anzahl der Marker dieser Untersuchung um ein vielfaches höher liegt, als die in vielen Studien, die den RER+ Phänotypen verwendeten, sind die RER-Kriterien hier nicht anwendbar. Es müssten bei einer Markeranzahl von 39 für einen RER+ Phänotypen deutlich mehr als zwei Marker mit MSI gefordert werden. Würde man also theoretisch die RER-Kriterien

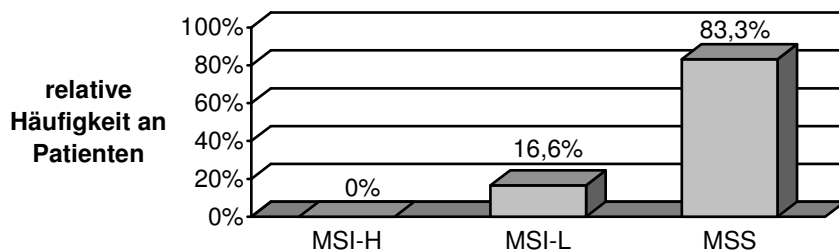
anwenden wollen, so könnte man auch keinem der in dieser Studie untersuchten Fälle einen RER+ Phänotypen zuschreiben.

Zur Veranschaulichung ist die Mikrosatelliteninstabilität bei Patient Nr.13 im Marker D6S441 in Abbildung 4 gezeigt. Abbildung 5 zeigt die Häufigkeitsverteilung zwischen MSI-H, MSI-L und MSS unter den untersuchten Fällen.

**Abbildung 4: Beispiel einer Mikrosatelliteninstabilität bei Patient Nr.13 im Marker D6S441**



**Abbildung 5**

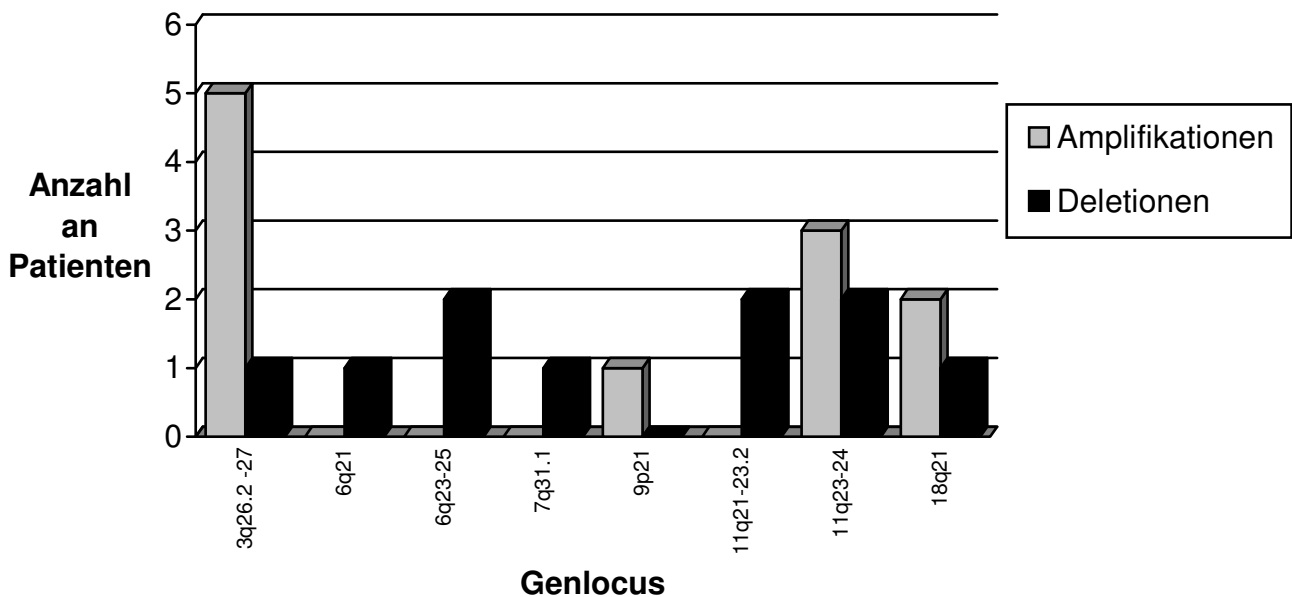


**Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung zwischen MSI-H, MSI-L und MSS unter den untersuchten Fällen.**

### 3.3 Aberrationen auf 3q, 6q, 11q und 18q sind die häufigsten detektierten Veränderungen in gastralen MZBCL vom MALT-Typ

In der Mikrosatellitenanalyse gastraler MZBCL vom MALT-Typ wurden 39 Marker verwendet, um die ausgesuchten Tumoren auf Deletionen und Amplifikationen im chromosomalen Material zu untersuchen. Um Deletionen von Amplifikationen zu unterscheiden, wurden Multiplex-PCR mit dem zu untersuchenden Mikrosatellitenmarker sowie einem oder zwei Standardmarkern (siehe Material und Methoden) durchgeführt. Die häufigsten Veränderungen, die gefunden werden konnten, sind jene auf den Chromosomenarmen 3q, 6q, 11q und 18q. Eine Übersicht über die involvierten chromosomalen Regionen zeigt Abbildung 6:

Abbildung 6

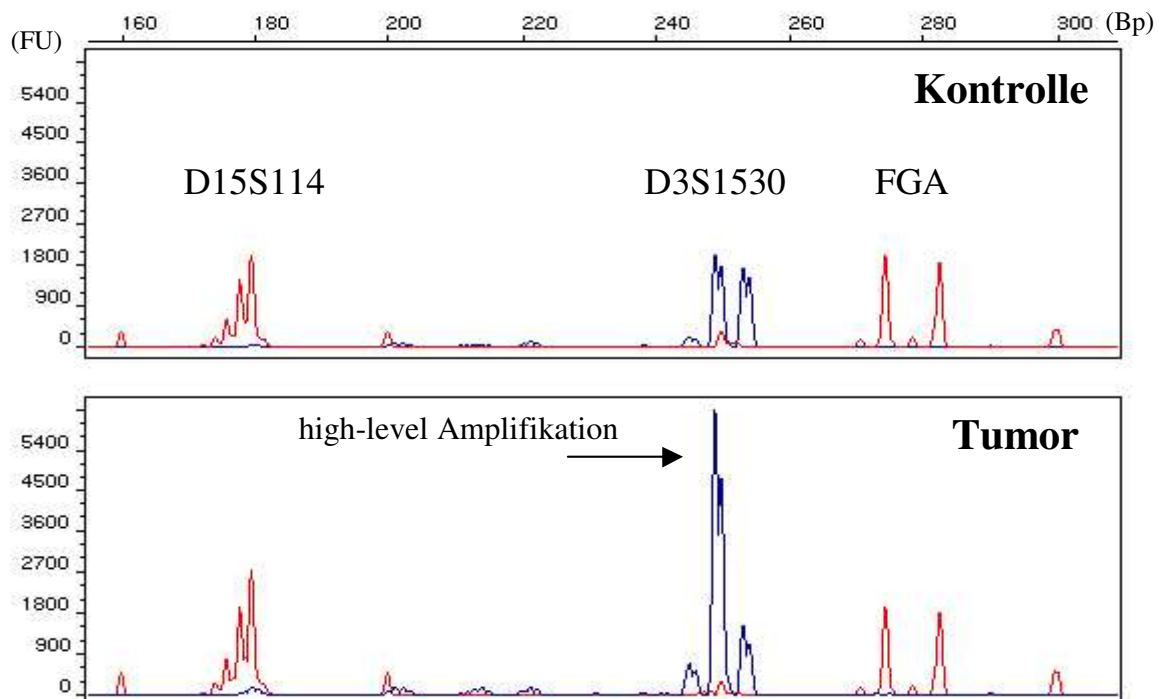


**Abbildung 6:** Anzahl an Patienten, die in den angegebenen chromosomalen Regionen LOH oder Amplifikationen aufwiesen.

Bei insgesamt sechs (25%) Patienten konnten in den Bereichen der Marker D3S1229, D3S1530, D3S1262, D3S1580, D3S1314 und D3S1311 auf dem langen Arm von Chromosom 3 Veränderungen gefunden werden. Fünf (20,8%) Patienten zeigten eine Amplifikation der Region 3q26.2-27, einer davon sogar eine „high-level Amplifikation“. Dieser Hotspot wurde flankiert von den Markern D3S1229 und D3S1262 und ist ungefähr 30 cM groß. In diesem Bereich befindet sich der BCL-6-Genlocus. Ein Patient (Nr.23) zeigte nur eine Deletion und keine Amplifikation im Marker D3S1530. Ein anderer Patient (Nr.14) zeigte neben der Amplifikation der Region 3q26.2-27 zusätzlich Deletionen im Bereich der Marker D3S1314 und D3S1311, die in Abbildung 6 nicht berücksichtigt sind.

Das 250-bp Allel des Markers D3S1530 zeigte bei Patient Nr.11 eine 3,5-fache Amplifikation, die auch als „high-level Amplifikation“ bezeichnet wird und in Abbildung 7 zu sehen ist.

**Abbildung 7: High-level Amplifikation auf Chromosom 3 im Marker D3S1530 bei Patient Nr.11 im Vergleich mit den Standardmarkern D15S114 und FGA.**

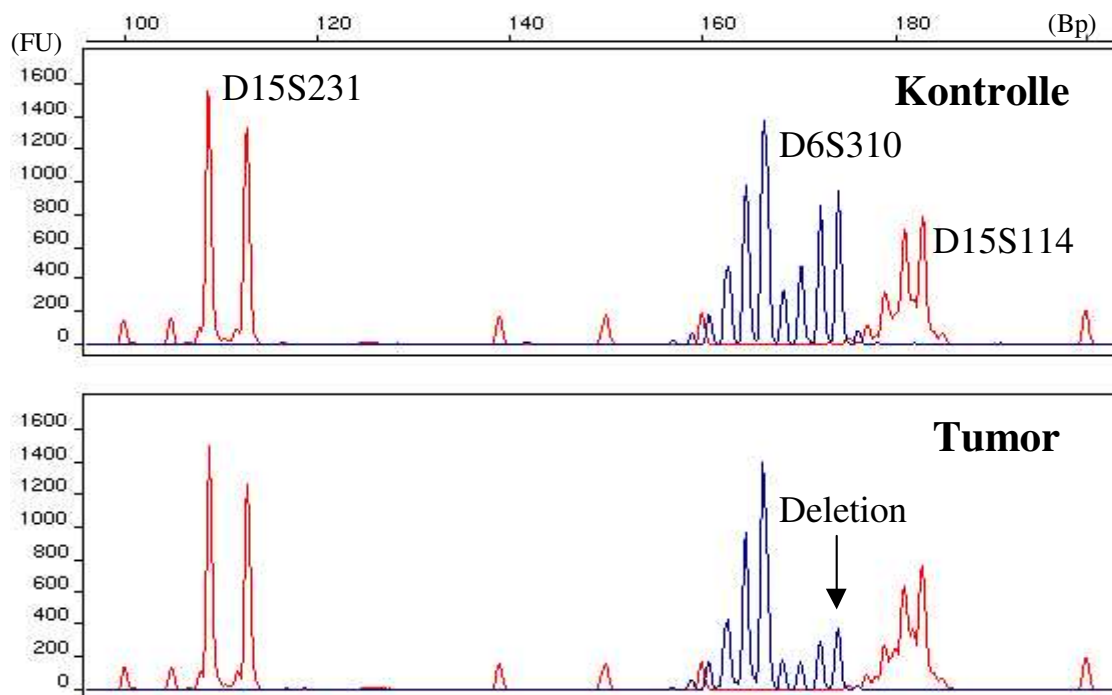


Chromosom 11 wies bei sechs (25%) Patienten Veränderungen auf. Der Marker D11S1356 im Genlocus 11q23-24 zeigte bei zwei (8,3%) Patienten eine Amplifikation und bei zwei (8,3%) anderen jeweils eine Deletion, wobei einer dieser Patienten zusätzlich noch im telomerisch benachbarten Marker D11S1345 eine Amplifikation aufwies. Der Marker D11S1339 im Bereich des Locus 11q21-23.2 zeigte in zwei (11,1%) von nur 18 informativen Fällen eine Deletion.

Auf Chromosom 18q konnten neben der oben schon erwähnten MSI bei noch insgesamt drei (12,5%) Patienten Veränderungen gefunden werden. Dabei handelte es sich bei zwei Patienten (8,3%) um Amplifikationen der Region 18q21. Flankiert wurde diese Region von den Markern D18S474 und D18S484 und ist ungefähr 2 cM groß. Bei dem dritten Patienten handelte es sich bei der Veränderung im Marker D18S35 um eine Deletion. In diesem Bereich befindet sich der Locus für das DCC-Gen.

Auf Chromosom 6q zeigten sich bei zwei (8,3%) Patienten Deletionen im Bereich der Bande 6q23.3-25.3, welche über die Marker D6S310 und D6S441 ermittelt wurden. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 8 für den Patienten Nr.8 dargestellt.

**Abbildung 8:** Deletion auf Chromosom 6 im Marker D6S310 bei Patient Nr.8 im Vergleich mit den Standardmarkern D15S231 und D15S114.



Bei einem dieser beiden Patienten reichte diese Deletion noch weiter bis zum Marker D6S447. Somit erstreckte sich bei diesem die Deletion über die gesamte Region 6q21-25.3. Der andere Patient (Nr.8) war für den Marker D6S447 homozygot und damit nicht informativ.

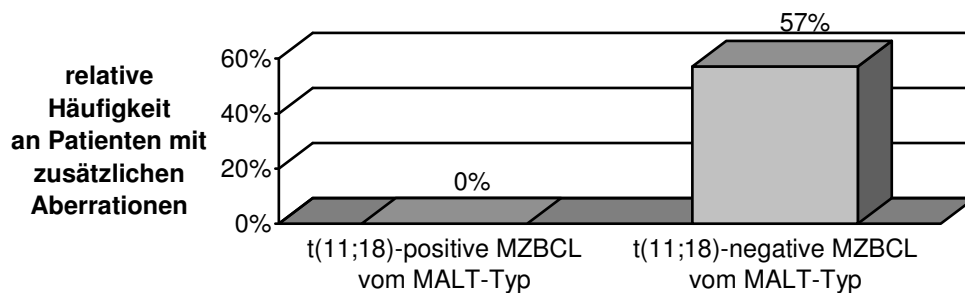
Bei nur einem (4,2%) der Patienten zeigte sich in der Region 7q31 mit dem Marker D7S486 eine Deletion, und ebenfalls nur einer (6,25%) der hier informativen Patienten wies in der Region 9q21 mit dem Marker D9S2136 im Bereich des INK4a/ARF-Genlocus eine Amplifikation auf.

Alle anderen untersuchten Marker blieben im Gegensatz dazu völlig unauffällig, wie z.B. die Regionen 1q32.1 (mit Markern D1S237 und D1S2827) und 2p21-16 (mit Marker D2S391 im Bereich der hMSH2-Genlocus). Auch der FHIT-Genlocus auf 3p14.2 war mit den Markern D3S4103 und D3S1300 unauffällig. Ebenso wiesen die Region 5q21 mit dem APC-Genlocus, die Region 6p23, die Region 12p12-13 mit dem Marker D12S89 bzw. D12S98 im Bereich des TEL-Genlocus und der Retinoblastom-Genlocus 13q14 mit dem Marker D13S153 keine Veränderungen auf.

### ***3.4 Translokation t(11;18)(q21;q21)-positive Fälle zeigen keine zusätzlichen genomischen Aberrationen***

13 Fälle dieser Studie wurden zuvor im Rahmen einer anderen Untersuchung [47] über konventionell-zytogenetische und FISH-Studien analysiert. Von diesen 13 waren insgesamt sechs Fälle positiv und sieben negativ für die Translokation t(11;18)(q21;q21). Unter Berücksichtigung dieser Information fiel auf, dass alle Patienten mit Translokation t(11;18)(q21;q21) keine weiteren Veränderungen bei der Fragmentanalyse aufwiesen (siehe Tabelle 3). Im Gegensatz dazu zeigten vier der sieben (57%) Fälle, die negativ für die Translokation t(11;18)(q21;q21) waren, Veränderungen in Form von Amplifikationen, Deletionen oder MSI. Elf der 24 Fälle wurden nicht auf die Translokation hin untersucht. Abbildung 9 zeigt den Vergleich der relativen Häufigkeiten von Patienten mit Veränderungen wie LOH, Amplifikationen oder MSI in Bezug auf das Vorhandensein der Translokation t(11;18)(q21;q21).

**Abbildung 9**



**Abbildung 9:** Vergleich der relativen Häufigkeiten von Patienten mit Veränderungen wie LOH, Amplifikationen oder MSI in Hinblick auf das Vorhandensein der Translokation t(11;18)(q21;q21).

Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen Translokation t(11;18)(q21;q21)–positiv und –negativ ist statistisch signifikant. Die Translokation t(11;18)(q21;q21)–negativen Fälle weisen signifikant mehr allelische Aberrationen auf als die Translokation t(11;18)(q21;q21)–positiven ( $p = 0,049$ , einseitiger Fisher-Yates-Test).



## 4 Diskussion

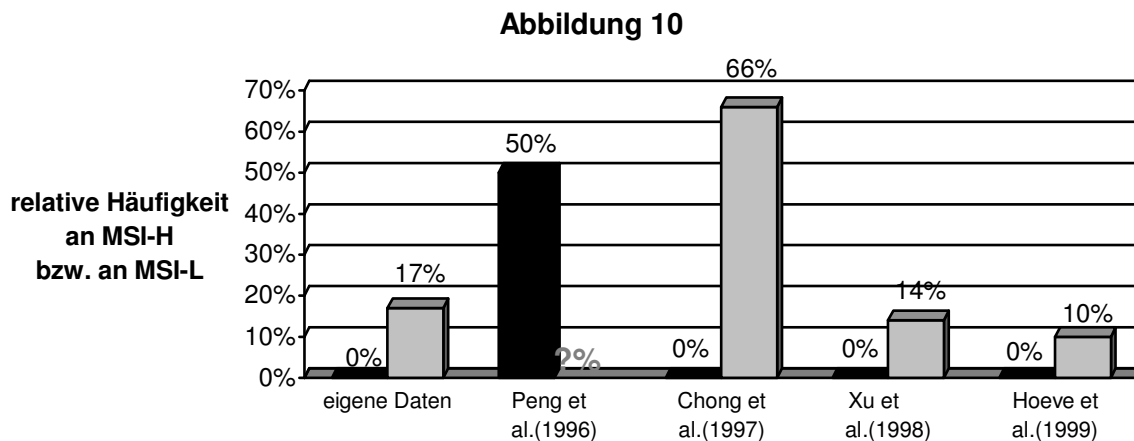
### ***4.1 Der „mutator-pathway“ spielt in der Pathogenese der gastralen MZBCL vom MALT-Typ eine untergeordnete Rolle***

Der „mutator-pathway“ als einer der beiden Hauptwege in der Karzinogenese neben dem Tumorsuppressorweg [56,57] ist gekennzeichnet durch den Funktionsverlust sogenannter „caretaker“, die als DNA-Reperaturgene für die Aufrechterhaltung der genetischen Integrität notwendig sind. Es kommt zu allgemeiner genetischer Instabilität mit dem Auftreten von MSI und im weiteren Verlauf indirekt zum Funktionsverlust auch von u.a. Tumorsuppressorgenen. Diese Art der genetischen Instabilität ist das Kennzeichen in der Pathogenese von einigen Tumoren. Ein klassisches Beispiel für einen Tumor, der diesen Weg einschlägt, ist das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC). Aber auch in manchen sporadischen Tumoren wurde MSI beschrieben [58]. MSI allgemein beschreibt das Auftreten zusätzlicher Allele eines Mikrosatellitenmarkers in einem bestimmten Gewebe im Vergleich zum Referenzgewebe, was durch eine Vermehrung oder Verminderung der Anzahl der Mikrosatelliten-Repeats zu Stande kommt. Als Kriterien für die Interpretation von MSI setzten sich in letzter Zeit diejenigen für die kolorektalen Karzinome nach Boland et al. [54] mit der Einteilung in MSI-H, MSI-L und MSS durch, die auch in dieser Studie verwendet wurden.

Lediglich 0,6% (fünf von 829) der in dieser Studie untersuchten Genotypen zeigten Mikrosatelliteninstabilitäten in fünf unterschiedlichen Mikrosatellitenmarkern, welche sich auf vier (16,6%) Patienten verteilten. MSI-H wurde in keinem Fall gefunden. Die Ergebnisse bei allen vier Patienten sind lediglich als MSI-L zu bewerten, die restlichen Patienten (83,3%) sind der Kategorie MSS zuzuordnen.

Die Untersuchung von MSI in gastralen MZBCL vom MALT-Typ war auch schon Gegenstand zuvor durchgeführter kleinerer Studien, doch es gab bisher keinen Konsens über die Rolle der MSI in der Pathogenese dieser Lymphome. Abbildung 10 zeigt einen

Vergleich unserer Ergebnisse über MSI in MZBCL vom MALT-Typ mit denen aus fünf anderen Studien.



**Abbildung 10:** Vergleich von Ergebnissen über das Vorhandensein von MSI-H (schwarze Balken) bzw. MSI-L (graue Balken) in MZBCL vom MALT-Typ in unterschiedlichen Studien (Literaturangaben siehe nachfolgender Text).

In drei der Studien (Peng et al. [44], Chong et al. [59] und Xu et al. [43]) wurden zur Beurteilung der MSI ursprünglich die Kriterien für den RER+ Phänotyp angewandt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden hier jedoch die Ergebnisse dieser Studien nach den Kriterien für MSI-H, MSI-L und MSS neu definiert. Vereinzelt wurde bedingt durch die strengen Kriterien aus einem ehemals RER+ Tumor ein MSI-L Tumor. Bei allen Studien handelte es sich um gastrale MZBCL vom MALT-Typ, lediglich in der Studie von Peng et al. findet sich kein Hinweis auf eine genaue gewebliche Zuordnung, so dass davon ausgegangen werden muss, dass hier auch nicht-gastrale extranodale MZBCL vom MALT-Typ untersucht wurden. Wie man dieser Graphik entnehmen kann, sind sich die meisten Autoren darüber einig, dass MSI-H in extranodalen MZBCL vom MALT-Typ nicht vorzukommen scheint. Von dieser Aussage weicht lediglich die Studie von Peng et al. [44] ab. Diese beschrieben in zwölf von 24 (50%) Fällen MSI in mindestens zwei Markern. Sie verwendeten bei ihrer Untersuchung genau fünf Mikrosatellitenmarker und erfüllten damit die Kriterien für MSI-H. Auch untersuchten sie die Marker D3S1261 und D3S1262, die in unserer Studie keine MSI zeigten. Wie viele Fälle in genau einem Marker MSI zeigten und damit MSI-L waren, ist der Studie nicht

zu entnehmen. Der Unterschied zu den Ergebnissen von Peng et al. ist gravierend. Lediglich die in unserer Untersuchung deutlich höhere Anzahl an untersuchten Markern könnte diese Differenzen erklären.

Der Level an MSI-L schwankt in den vorliegenden Studien im Bereich zwischen 10% und 66%. Bei Chong et al. [59] gab es von nur sechs gastralen MZBCL vom MALT-Typ vier (66%) Fälle, bei denen von 13 Markern einer (7,7%) oder zwei (15,4%) MSI zeigten. Auch diese Ergebnisse sind mit unseren nur schwer vereinbar. Xu et al. [43] untersuchten sieben gastrale MZBCL vom MALT-Typ mit nur neun Mikrosatellitenmarkern bei ihrer Studie und fanden keinen RER+ Phänotyp und damit auch kein MSI-H. Nur ein Tumor (14%) zeigte in einem Marker (11%) MSI. Hoeve et al. [60] wiesen von allen erwähnten Autoren den niedrigsten Level an MSI nach. Nur einer von allerdings nur zehn (10%) Tumoren zeigte in einem von 18 (6%) Markern MSI.

In einer Studie verglichen Starostik et al. [61] gastrale MZBCL vom MALT-Typ mit gastralen DLBCL über ein identisches Panel von 29 Mikrosatellitenmarkern bezüglich der MSI. Die statistischen Analysen bestätigten den signifikanten Unterschied in der MSI-Häufigkeit zwischen den beiden Lymphomentitäten. Die MSI-Häufigkeit nahm zum einen mit dem Übergang von der niedrig-malignen zur hoch-malignen Lymphomkrankung und zum anderen innerhalb der DLBCL mit dem Alter des Patienten deutlich zu. MSI-H wurde auch bei den DLBCL nicht gefunden.

Die MSI spielt in der Pathogenese gastraler MZBCL vom MALT-Typ nur eine untergeordnete Rolle. Weder hier noch in den gastralen DLBCL erreicht sie die Ausmaße, die für das HNPCC oder andere MSI-H-positive Tumoren, die den „mutator-pathway“ einschlagen, charakteristisch sind und gefordert werden müssen. Die MSI stellt in den gastralen MZBCL vom MALT-Typ keinen initiiierenden Faktor dar, sondern ist eher als spätes Begleitphänomen zu verstehen.

## **4.2 Die Bedeutung der klonalen allelischen Aberrationen auf 3q, 11q, 6q und 18q und ihre Beziehung zur Translokation $t(11;18)(q21;q21)$**

War mit 0,6% MSI-positiven Genotypen ein eher unbedeutender Anteil gefunden worden, darauf hinweisend, dass der „mutator-pathway“ keine entscheidende Rolle in der Pathogenese der gastralen MZBCL vom MALT-Typ zu spielen scheint, so war mit 5,45% Genotypen mit LOH oder Amplifikationen der Anteil zwar absolut gesehen immer noch recht niedrig, doch relativ betrachtet fast um den Faktor zehn und damit doch wesentlich höher. Dies weist deutlich darauf hin, dass hier auf molekulargenetischer Ebene wichtige pathogenetische Ereignisse stattfinden.

Die mit Abstand am häufigsten festgestellte Aberration bei der Untersuchung der gastralen MZBCL vom MALT-Typ ist die Amplifikation der Region 3q26.2-27. Bei rund 21% der Patienten ließ sich diese nachweisen. Die hier kleinste gemeinsame amplifizierte Region wurde von den Markern D3S1229 und D3S1262 begrenzt und ist ungefähr 30 cM groß. In früheren Studien wurde in 12% bis 85% der jeweils untersuchten Fälle über eine Trisomie 3 berichtet [40,41,42], welche aber keineswegs spezifisch für MZBCL vom MALT-Typ zu sein scheint [62]. Was nun eine Amplifikation der Region 3q26.2-27 in Bezug auf die Pathogenese der MZBCL vom MALT-Typ bewirkt, ist nicht bekannt. Ein nachgewiesenes Onkogen existiert nicht. An möglicherweise betroffenen Genen liegt zum einen in diesem chromosomalen Bereich das BCL-6-Gen. Dieses Onkogen spielt als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei der Keimzentrumbildung. 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 [63]. Zum anderen liegt in dieser chromosomalen 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 beim Ovarialkarzinom [64]. Bei einer Analyse mit cDNA-Microarrays [65] wiesen einige nodale DLBCL und alle normalen Keimzentrum-B-Zellen eine Überexpression sowohl von BCL-6 als auch von PIK3CA auf.

Eine andere häufige Aberration bei dieser Untersuchung war die Veränderung auf Chromosom 11 in der Region 11q23-24. Sie fand sich bei rund 17% der Fälle, jedoch zeigten sich sowohl Amplifikationen als auch Deletionen in ungefähr gleichen Anteilen. Über die Marker D11S1356 und D11S1345 war die Region 11q23-24 betroffen, die wiederum den Bereich des MLL-Genlocus 11q23 einschließt und bei den Amplifikationen involviert sein könnte. MLL ist ein Onkogen, das bei den Akuten Leukämien eine Rolle spielt. In der Region 11q22.1-23.1 liegt außerdem das ATM-Gen, ein Tumorsuppressorgen, das wiederum von den Deletionen betroffen sein könnte. Eine Interpretation dieser Region kann jedoch aufgrund der so unterschiedlichen Ergebnisse mit sowohl Amplifikationen als auch LOH nicht gemacht werden.

In einer anderen weiter zentromerisch gelegenen Region auf 11q zeigten zwei Patienten Veränderungen im Marker D11S1339. Dieser Marker liegt in der Region 11q21-23.2 und damit teilweise im Bereich des in die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$  involvierten Gens API2. Da API2 für seine tumorgenetische Wirkung amplifiziert statt deletiert sein müsste, ist die hier beobachtete Deletion wohl nicht auf dieses, sondern auf ein wahrscheinlich eng benachbartes nicht bekanntes Gen zu interpretieren.

Die Region 18q21 ist bei den hier vorliegenden Ergebnissen in zwei (8,3%) Fällen amplifiziert gewesen. Die Amplifikation wurde in einem der Fälle flankiert von den Markern D18S474 und D18S484, ist ca. 2 cM groß und enthält nicht die Loci der Gene MALT1 oder BCL-2. Eine Trisomie 18 ist schon in früheren Studien beschrieben worden [40,41]. Ein hier in Frage kommendes Onkogen ist nicht bekannt. Insbesondere das BCL-2-Gen, das bei der Translokation  $t(14;18)$  des folliculären Lymphoms beteiligt ist, fand im Zusammenhang mit Veränderungen auf Chromosom 18 beim gastralen MZBCL vom MALT-Typ große Beachtung. Bisher weisen jedoch keine Ergebnisse auf eine pathogenetische Beteiligung dieses Gens hin. Der Bruchpunkt auf Chromosom 18 bei der Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$  liegt proximal von BCL-2 [66], und gastrale MZBCL vom MALT-Typ zeigen kein Rearrangement von BCL-2 [67].

Ein Patient wies über den Marker D18S35 auf 18q21 eine Deletion auf. Als eventuell betroffenes Tumorsuppressorgen liegt in diesem Bereich das DCC-Gen, das durch die Beteiligung in der Pathogenese von Kolonkarzinomen bekannt ist. Über die Rolle von DCC in hämatologischen Tumoren und in NHL wird berichtet [68,69].

Weitere zwei (8,3%) Fälle zeigten Deletionen in der Region 6q23.3-25.3, die über die Marker D6S310 und D6S441 untersucht wurden. Dies ist ein Bereich, der von Starostik et al. [46] kürzlich als Hotspot-Deletion in den gastralen DLBCL identifiziert wurde. Welches Gen hier in Funktion eines Tumorsuppressorgens verantwortlich ist, ist noch nicht bekannt. In der Region 6q24-25 befindet sich das ZAC-Gen, ein Tumorsuppressorgen, dessen Verlust in vielen anderen Tumoren gefunden wurde [70,71]. Bei einem dieser beiden Patienten reichte diese Deletion bis zum Marker D6S447 und überspannte damit die gesamte Region 6q21-25.3. Der andere Patient war hier homozygot und damit nicht informativ. Deletionen dieser Region sind ein in vielen Neoplasien und v.a. in NHL häufig beschriebener Befund.

Betrachtet man nur die 13 Fälle, über die der Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ -Status bekannt ist, so fällt auf, dass die sechs  $t(11;18)(q21;q21)$ -positiven Fälle keine weiteren Veränderungen zeigen und vier (57%) der sieben  $t(11;18)(q21;q21)$ -negativen Fälle zusätzlich noch Veränderungen aufweisen. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist statistisch signifikant ( $p = 0,049$  im einseitigen Fisher-Yates-Test).

Die gastralen MZBCL vom MALT-Typ lassen sich folglich in zwei unterschiedliche Gruppen einteilen:

Die erste Gruppe besteht aus den  $t(11;18)(q21;q21)$ -positiven Fällen. Diese zeigen außer dieser Translokation einen sehr niedrigen Level an chromosomalen Veränderungen. Die zweite Gruppe wird durch die  $t(11;18)(q21;q21)$ -negativen Fälle gebildet, die signifikant mehr allelische Aberrationen aufweisen als die  $t(11;18)(q21;q21)$ -positiven Fälle aus der ersten Gruppe.

Bei den  $t(11;18)(q21;q21)$ -positiven Fällen der ersten Gruppe sind wie Dierlamm et al. [32] zeigten auf Chromosom 11 das API2-Gen und auf Chromosom 18 das MALT1-Gen involviert. Bei dem auf 11q21 liegenden API2-Gen handelt es sich um ein Gen aus der Familie der Apoptose-inhibierenden Proteine (IAP), welches über Hemmung bestimmter Caspasen den programmierten Zelltod verhindern kann. Die Funktion des MALT1-Gens auf 18q21 ist dagegen noch nicht bekannt. Das API2-MALT1-Fusionsprotein könnte nun eine Zunahme der Apoptose-Inhibierung und so einen Überlebensvorteil bewirken. Wodurch diese Zunahme genau zu Stande kommt

und was sie in der Folge bewirkt ist jedoch unklar. Der Befund, dass es bei den Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ -positiven Fällen zu keinen weiteren Aberrationen kommt, was normalerweise ein typisches Bild in der Progression niedrig-maligner Tumoren v.a. zu hoch-malignen Formen darstellt, lässt die Frage nach der genauen pathogenetischen Funktion dieser Translokation aufkommen. Die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ -positiven Fälle scheinen außerdem unter den gastralen MZBCL vom MALT-Typ in Bezug auf die Progression zu DLBCL in einer Art „Sackgasse“ zu stecken. Man stellte die vollkommene Abwesenheit dieser Translokation in den gastralen DLBCL, auch in denen mit niedrig-maligner Komponente, fest [47]. Sekundäre gastrale DLBCL scheinen somit ausschließlich aus Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ -negativen gastralen MZBCL vom MALT-Typ zu entstehen, die signifikant mehr und damit wahrscheinlich auch die zur Progression entscheidenden chromosomalen Veränderungen erwerben. Interessant ist noch zu erwähnen, dass dieser Translokation auch eine wichtige klinische Bedeutung zukommen könnte. Liu et al. [72] haben gezeigt, dass die meisten H.p.-positiven gastralen MZBCL vom MALT-Typ, die nicht auf eine Eradikationstherapie mit einer Tumorremission reagierten, Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ -positiv waren.

Es wurde bisher dargestellt, dass genomische Aberrationen in der Tat eindeutig Kennzeichen gastraler MZBCL vom MALT-Typ sind und welche Bedeutungen die einzelnen hier aufgedeckten molekulargenetischen Veränderungen bei der Entstehung und Entwicklung der gastralen MZBCL vom MALT-Typ haben könnten. Möchte man nun diese neuen Erkenntnisse über das pathogenetische Geschehen in einen noch größeren Zusammenhang bringen, so stellt sich die spannende Frage, wie diese Veränderungen im Vergleich mit der vermutlich hoch-malignen Korrelation der gastralen DLBCL zu deuten sind.

Hierzu war es möglich, die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen einer ähnlich angelegten molekulargenetischen Untersuchung über gastrale DLBCL von Starostik et al. [46] zu vergleichen, da hier z.T. die gleichen Marker verwendet wurden, die auch in Tabelle 2 mit einem Stern (\*) gekennzeichnet sind. Es zeigte sich beim Vergleich der Ergebnisse, dass die Aberrationen drei Gruppen bildeten. In der ersten Gruppe sind Veränderungen, die mit ungefähr gleichen Häufigkeiten in beiden Studien zu finden waren, wie die Amplifikationen auf 3q26.2-27, 11q23-24 und 18q21. In der zweiten sind Veränderun-

gen, die ausschließlich in den DLBCL auftraten, wie LOH in den Regionen 5q21, 9p21, 13q14 und 17p13 und LOH oder Amplifikationen auf 2p16-21, 6p23 und 12p12-13. Die dritte Gruppe besteht aus chromosomalen Veränderungen, die zwar in beiden Studien gefunden wurden, die aber wesentlich häufiger in den DLBCL vorkamen. Hierzu gehörten LOH in den Regionen 6q21-22.1, 6q23.3-25 und 7q31.

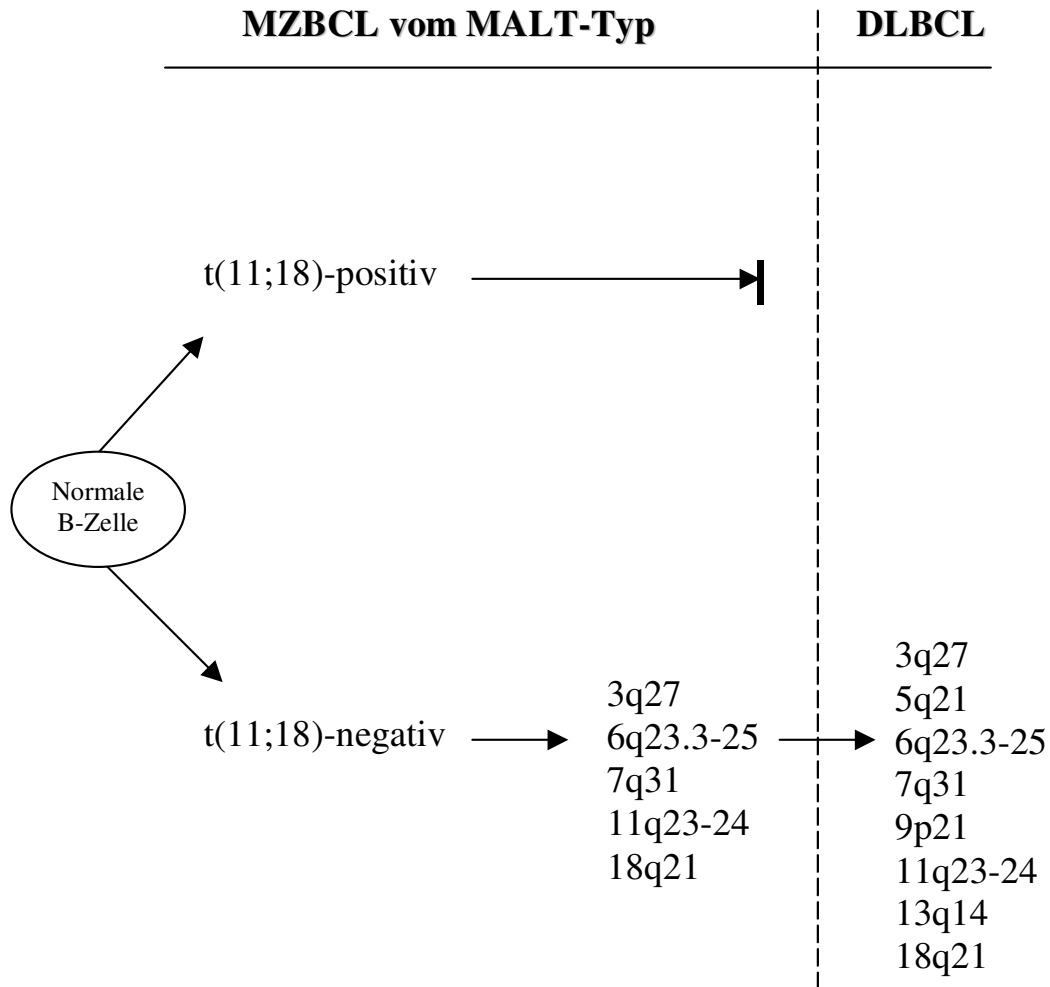
Diese Ergebnisse sprechen nun dafür, dass die Deletionen auf 6q und 7q der dritten Gruppe, die in aufsteigender Häufigkeit sowohl in MZBCL vom MALT-Typ als auch in den DLBCL zu finden waren, in Bezug auf die Tumorprogression möglicherweise von großer Bedeutung sind. Auf dem Weg in die Hochmalignität scheinen diese Deletionen, v.a. die auf 6q23.3-25, die als einzige in mehr als einem Fall gefunden wurde, zeitlich früher aufzutreten als Verluste der Gene p53, INK4a/ARF oder APC auf 17p13.1, 9p21 bzw. 5q21. Insbesondere der Deletion auf 6q23.3-25 könnte damit eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Translokation t(11;18)(q21;q21)-negativen gastralen MZBCL vom MALT-Typ zu sekundären DLBCL zukommen.

Die vorliegende Arbeit stellt ein neues Konzept in der Pathogenese der gastralen MZBCL vom MALT-Typ auf. Danach können diese Lymphome in zwei Gruppen je nach Status der Translokation t(11;18)(q21;q21) eingeteilt werden. Das Vorhandensein dieser Translokation ist nach unseren Ergebnissen assoziiert mit einem niedrigem Level an chromosomalen Veränderungen und mit dem Ausbleiben einer Progression zu gastralen DLBCL. Beim Fehlen dieser Translokation findet man hingegen signifikant häufiger chromosomale Veränderungen in Form von LOH oder Amplifikationen, die sich auf die Regionen 3q27, 6q23.3-25, 11q23-24 und 18q21 konzentrieren. Dieser Gruppe ist vermutlich auch die Progression zu gastralen DLBCL möglich, wobei hier v.a. die Deletionen auf 6q23.3-25 und 7q31 richtungsweisende Frühveränderungen zu sein scheinen.

Abbildung 11 gibt eine zusammenfassende Übersicht über die diskutierten Wege in der Pathogenese der gastralen MZBCL vom MALT-Typ.



**Abbildung 11: Diskutierte Wege in der Pathogenese der MZBCL vom MALT-Typ.**



## 5 Zusammenfassung

Das Ausmaß und die Bedeutung molekulargenetischer Veränderungen in der Pathogenese gastraler MZBCL vom MALT-Typ ist derzeit noch unklar. Ein unbekannter Teil dieser niedrig-malignen Lymphome transformiert zu hoch-malignen gastralen DLBCL, jedoch besitzen diese DLBCL nicht die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ , die sich dagegen in den gastralen MZBCL vom MALT-Typ als die häufigste Translokation mit noch unklarer Konsequenz etablierte. Um die Pathogenese dieser Tumoren genauer zu analysieren, wurden in dieser Studie 24 gastrale MZBCL vom MALT-Typ mit 39 Mikrosatellitenmarkern auf genomische Aberrationen untersucht.

Die gastralen MZBCL vom MALT-Typ können nach unseren Ergebnissen in zwei Gruppen eingeteilt werden, die in ihrer Pathogenese zwei unterschiedliche Wege gehen. Die erste Gruppe beinhaltet die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ -positiven MZBCL vom MALT-Typ. Diese erwerben signifikant weniger genomische Aberrationen als die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ -negativen und transformieren nicht zu DLBCL. Die zweite Gruppe bilden die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ -negativen MZBCL vom MALT-Typ. Diese erlangen im Verlauf ihrer Entwicklung signifikant mehr genomische Aberrationen als die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ -positiven und scheinen ein potenzieller Ursprung für sekundäre hoch-maligne DLBCL zu sein.

Der „mutator-pathway“ mit dem Kennzeichen der MSI spielt nach unseren Erkenntnissen bei den gastralen MZBCL vom MALT-Typ nur eine untergeordnete Rolle, vielmehr ist die chromosomale Instabilität in Form von LOH oder Amplifikationen von Bedeutung. Die mit 20,8% der untersuchten Fälle am häufigsten gefundene Aberration war die Amplifikation der Region 3q26.2-27, welche den BCL-6- bzw. den PIK3CA-Genlocus beinhaltet. Auch wurden Amplifikationen des MLL-Genlocus auf 11q23-24 und der Region 18q21 und LOH der Regionen 6q23.3-25.3 und 7q31 gefunden. Beim Vergleich mit den DLBCL stellte sich außerdem heraus, dass Allelverluste auf 6q und 7q frühe Ereignisse in der Progression zu DLBCL zu sein scheinen.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Einfach destilliertes Wasser
Bp	basepairs = Basenpaare
CA	Kalifornien
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementary Determining Region
CGH	Comparative Genomic Hybridization
cM	centi-Morgan
DLBCL	Diffuse Large B-Cell Lymphoma = Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH	Fluorescence in Situ-Hybridization
FU	Fluorescence-Units = Fluoreszenz-Einheiten
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
H.p.	Helicobacter pylori
LEL	lymphoepitheliale Läsion
LOH	Loss of Heterozygosity = Verlust der Heterozygotie
m	männlich
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue = Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
min	Minute
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	high frequency MSI = große Häufigkeit an MSI

MSI-L	low frequency MSI = geringe Häufigkeit an MSI
MSS	Mikrosatellitenstabilität
MZBCL	Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
n.u.	nicht untersucht
neg	negativ
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerasekettenreaktion
pos	positiv
RER+	Replication-Error positiv
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sIg	surface immunoglobulin = Oberflächenimmunglobulin
TBE	Tris, Borat und EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
unbek.	unbekannt
w	weiblich
WHO	World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation

## 6.2 Literaturverzeichnis

---

- 1 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, Warnke RA: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994 Sep 1;84(5):1361-1392
- 2 Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, and Bloomfield CD: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999 Dec;17(12):3835-3849
- 3 The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997 Jun 1;89(11):3909-3918
- 4 Radaszkiewicz T, Dragosics B, Bauer P: Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: factors relevant to prognosis. *Gastroenterology* 1992 May; 102(5):1628-1638
- 5 Hyjek E, Smith WJ, Isaacson PG: Primary B-cell lymphoma of salivary glands and its relationship to myoepithelial sialadenitis. *Hum Pathol* 1988 Jul;19(7):766-76
- 6 Hyjek E, Isaacson PG: Primary B cell lymphoma of the thyroid and its relationship to Hashimoto's thyroiditis. *Hum Pathol* 1988 Nov;19(11):1315-26
- 7 Isaacson PG: Extranodal lymphomas: The MALT-Concept. *Verh.Dtsch.Ges.Path.* 1992; 76: 14-23
- 8 Musshoff K: Klinische Stadieneinteilung der nicht- Hodgkin-Lymphome, *Strahlentherapie* 1977; 153:218-221
- 9 Bayerdörffer E, Neubauer A, Rudolph B, Thiede C, Lehn N, Eidt S, Stolte M: Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylory. *Lancet* 1995 Jun 24;345:1591-1594

- 
- 10 Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG: Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Lancet* 1993 Sep 4;342:575-577
  - 11 Cogliatti SB, Schmid U, Schumacher U, Eckert F, Hansmann ML, Hedderich J, Takahashi H, and Lennert K: Primary B-cell gastric lymphoma: a clinicopathological study of 145 patients. *Gastroenterology* 1991;101(5):1159-1170
  - 12 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
  - 13 Ott MM, Linke B, Gerhard N, Kneba M, Greiner A, Ott G, Müller-Hermelink HK: Charakterisierung klonaler B-Zell-Populationen in gastralen MALT-Lymphomen und chronischer Gastritis mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 1994;78:302-304
  - 14 Fend F, Schwaiger A, Weyrer K, Propst A, Mairinger T, Umlauf F, Judmaier G, Grunewald K: Early diagnosis of gastric lymphoma: gene rearrangement analysis of endoscopic biopsy samples. *Leukemia* 1994 Jan;8(1):35-39
  - 15 Isaacson PG: Gastrointestinal Lymphoma, *Human Pathology* 1994 October; 25(10): 1020-1029
  - 16 Eids S, Stolte M, Fischer R: *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 1994 May;47(5):436-439
  - 17 Ott G, Kirchner T, Seidl S, Müller-Hermelink HK: Primary gastric lymphoma is rarely associated with Epstein-Barr virus. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993;64(5):287-291
  - 18 Greiner A, Kirchner T, Ott G, Marx A, Fischbach W, Müller-Hermelink HK: Occurrence of multiple lymphoepithelioma-like carcinomas and MALT-type lymphoma in the stomach: detection of EBV in carcinomas but not in lymphoma. *Histopathology* 1996;29:51-56
  - 19 Bouzourene H, Haefliger T, Delacretaz F, Saraga E: The role of *Helicobacter pylori* in primary gastric MALT lymphoma. *Histopathology* 1999;34:118-123

- 
- 20 Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG: Helicobacter pylory-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 1991 Nov 9;338(9):1175-6
- 21 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 May;136(5):1153-64
- 22 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 May;30(5):425-9
- 23 De Wolf-Peeters C, Achten R: The histogenesis of large-cell gastric lymphomas. *Histopathology* 1999 Jan;34(1):71-5
- 24 Chan WY, Wong N, Chan AB, Chow JH, Lee JC: Consistent copy number gain in chromosome 12 in primary diffuse large cell lymphomas of the stomach. *Am J Pathol* 1998 Jan;152(1):11-6
- 25 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 Jul;84(7):582-8
- 26 Horsman D, Gascoyne R, Klasa R, Coupland R: t(11;18)(q21;q21.1): a recurring translocation in lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)? *Genes Chromosomes Cancer* 1992 Mar;4(2):183-7
- 27 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 Oct;8(10):979-85
- 28 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 in high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Research* 1997 Sep 15;57:3944-3948
- 29 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 Apr;156(4):1183-8

- 
- 30 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 Apr;156(4):1433-9
- 31 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 Nov;14(11):1967-74
- 32 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)(q21;q21) Associated With Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphomas. *Blood* 1999 Jun 1;93(11):3601-3609
- 33 Dierlamm J, Pittaluga S, Stul M, Wlodarska I, Michaux L, Thomas J, Verhoef G, Verhest A, Depardieu C, Cassiman JJ, Hagemeijer A, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe H: BCL6 gene rearrangements also occur in marginal zone B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 1997 Sep;98(3):719-25
- 34 Wotherspoon AC, Pan LX, Diss TC, Isaacson PG: Cytogenetic study of B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer Genet Cytogenet* 1992 Jan;58(1):35-8
- 35 Willis TG, Jadayel DM, Du M, 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 Jan 8;96:35-45
- 36 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 Dec 15;86(12):4587-4593
- 37 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 Jan 7;345(8941):26-7
- 38 Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Andersen MK, Hansen NE, Zeuthen J, Hou-Jensen K, Guldborg P: Somatic Fas mutations in Non-Hodgkin's



- 
- Lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 1998 Nov 1;92(9):3018-3024
- 39 Seeberger H, Starostik P, Schwarz S, Knorr C, Kalla J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Greiner A: Loss of Fas (CD95/APO-1) regulatory function is an important step in early MALT-type lymphoma development. *Lab Invest* 2001;81(7):977-986
- 40 Ott G, Kalla J, Steinhoff A, Rosenwald A, Katzenberger T, Roblick U, Ott MM, Müller-Hermelink HK: Trisomy 3 is not a common feature in malignant lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Pathol* 1998;153(3):689-694
- 41 Wotherspoon AC, Finn TM, Isaacson PG: Trisomy 3 in low-grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood* 1995 Apr 15;85(8):2000-2006
- 42 Brynes RK, Almaguer PD, Leathery KE, McCourty A, Arber DA, Medeiros LJ, Nathwani BN: Numerical cytogenetic abnormalities of chromosomes 3, 7, and 12 in marginal zone B-cell lymphomas. *Mod Pathol* 1996 Oct;9(10):995-1000
- 43 Xu WS, Chan ACL, 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
- 44 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 Feb;148(2):643-648
- 45 Barth TFE, Döhner H, Werner CA, Stilgenbauer S, Schlotter M, Pawlita M, Lichter P, Möller P, Bentz M: Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract. *Blood* 1998 June 1;91(11):4321-4330
- 46 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 Feb 15;95(4):1180-1187
- 47 Rosenwald A, Ott G, Stilgenbauer S, Kalla J, Brecht 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(6):1817-1821

- 
- 48 Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press; 1989
- 49 Burton MP, Schneider BG, Brown R, Escamilla-Ponce N, Gulley ML: Comparison of histologic stains for use in PCR analysis of microdissected, paraffin-embedded tissues. *BioTechniques* 1998 Jan;24:86-92
- 50 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 Jul 1;78(1):192-6
- 51 Segal GH, Jorgensen T, Masih AS, Braylan RC: Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: I. Low grade B-cell lymphoproliferative disorders of nonfollicular center cell type [see comments]. *Hum Pathol* 1994;25(12):1269-1275
- 52 Segal GH, Jorgensen T, Scott M, Braylan RC: Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: II. Follicular lymphomas [see comments]. *Hum Pathol* 1994;25(12):1276-1282
- 53 Litt M, Hauge X, Sharma V: Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. *BioTechniques* 1993;15(2):280-284
- 54 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998 Nov 15;58(22):5248-57
- 55 Smyrk TC: Colon cancer connections. Cancer syndrome meets molecular biology meets histopathology. *Am J Pathol* 1994 Jul;145(1):1-6
- 56 Perucho M: Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med* 1997;2:630-631
- 57 Kinzler KW, Vogelstein B: Cancer-susceptibility genes. gatekeeper and caretaker. *Nature* 1997;386:761-763
- 58 Wooster R, Cleton-Jansen AM, Collins N, Mangion J, Cornelis RS, Cooper CS, Gusterson BA, Ponder BA, von Deimling A, Wiestler OD, et al.: Instability of

- 
- short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet* 1994 Feb;6(2):152-6
- 59 Chong J, 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, *Laboratory Investigation* 1997 Dec;77(6):639-645
- 60 Hoeve MA, Ferreira Mota SC, Schuurung 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 Nov;13(11):1804-11
- 61 Starostik P, Greiner A, Schwarz S, Patzner J, Schultz A, Müller-Hermelink HK: The role of microsatellite instability in gastric low- and high-grade lymphoma development. *Am J Pathol* 2000 Oct;157(4):1129-36
- 62 Offit K, Wong G, Filippa DA, Tao Y, Chaganti RS: Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood* 1991 Apr 1;77(7):1508-15
- 63 Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, Leung C, Nourishirazi M, Orazi A, Chaganti RS, Rothman P, Stall AM, Pandolfi PP, Dalla-Favera R: The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 1997 Jun;16(2):161-70
- 64 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 Jan;21(1):99-102
- 65 Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JJ, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Staudt LM, et al: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000 Feb 3;403(6769):503-11
- 66 Stoffel A, Rao PH, Louie DC, Krauter K, Liebowitz DN, Koeppen H, Le Beau MM, Chaganti RS: Chromosome 18 breakpoint in t(11;18)(q21;q21) translocation associated with MALT lymphoma is proximal to BCL2 and distal to DCC. *Genes Chromosomes Cancer* 1999 Feb;24(2):156-9

- 
- 67 Wotherspoon AC, Pan L, Diss TC, Isaacson PG: A genotypic study of low grade B-cell lymphomas, including lymphomas of mucosa associated lymphoid tissue (MALT). *Journal of Pathology* 1990;162:135-140
- 68 Porfiri E, Secker-Walker LM, Hoffbrand AV, Hancock JF: DCC tumor suppressor gene is inactivated in hematologic malignancies showing monosomy 18. *Blood* 1993 May;81(10): 2696-2701
- 69 Younes A, Zhao S, Jendiroba D, Kleine HD, Cabanillas F, M Andreeff M: Decreased expression of the deleted in colorectal carcinoma gene in non- Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1995 May;85(10): 2813-2816
- 70 Varrault A, Ciani E, Apiou F, Bilanges B, Hoffmann A, Pantaloni C, Bockaert J, Spengler D, Journot L: hZAC encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region frequently lost in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Jul 21;95(15):8835-40
- 71 Bilanges B, Varrault A, Basyuk E, Rodriguez C, Mazumdar A, Pantaloni C, Bockaert J, Theillet C, Spengler D, Journot L: Loss of expression of the candidate tumor suppressor gene ZAC in breast cancer cell lines and primary tumors. *Oncogene* 1999 Jul 8;18(27):3979-88
- 72 Liu H, Ruskon-Fourmestraux 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 Jan 6;357(9249):39-40

---

## ***Danksagung***

An dieser Stelle möchte ich nun die Gelegenheit nutzen, allen, die mir bei der Vollen-  
dung dieser Arbeit ihre Unterstützung gaben, Danke zu sagen. Besonders danken möch-  
te 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 Dr. A. Greiner, die mich exzellent eingearbeitet hatten und die immer  
spontan Zeit für meine Fragen fanden. Auch danken möchte ich Frau S. Müller, Dr. S.  
Schwarz und vielen weiteren Mitarbeitern des Pathologischen Instituts Würzburg für  
viel Unterstützung, Anregung und Motivation während der Zeit im Labor. Dank auch an  
Herrn U. Schroeders für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen. Der größte Dank  
jedoch geht an meine Eltern.

---

## Lebenslauf - Jochen Patzner

### PERSÖNLICHE ANGABEN

Adresse: Semmelweisstr. 1, 86156 Augsburg,  
jochen.patzner@gmx.de  
Geburtsdatum: 6. August 1974  
Geburtsort: Bad Mergentheim  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### SCHULAUFBILDUNG

08/81 - 07/85: Grundschule Bad Mergentheim  
08/85 - 07/94: Deutschordengymnasium Bad Mergentheim, Abitur 1994 (Leistungskursfächer: Mathematik und Musik)

### ZIVILDIENTST

07/94 - 09/95: Zivildienst in der Hufelandklinik Bad Mergentheim

### HOCHSCHULAUFBILDUNG UND BERUFLICHER WERDEGANG

11/95 - 07/97: Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
08/97: Physikum  
11/97 - 05/02: Klinisches Studium bis zum 3.Staatsexamen  
04/01: 1.PJ-Tertial in der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg bei Prof. Toyka  
08/01: 2.PJ-Tertial in der Chirurgischen Klinik des Kantonsspitals Luzern/Schweiz bei Prof. Stulz und Prof. von Flüe  
12/01: 3.PJ-Tertial in der Abteilung für Innere Medizin im Julius-Spital Würzburg bei Prof. Auer und Priv.-Doz. Dr. Meesmann  
seit 07/02: AiP in der Abteilung für Neurologie und klinische Neurophysiologie des Zentralklinikums Augsburg bei Prof. Stöhr

### VERÖFFENTLICHUNGEN WISSENSCHAFTLICHER ARBEITEN

„The role of microsatellite instability in gastric low- and high-grade lymphoma development.“ *American Journal of Pathology* 2000 Oct;157(4):1129-36

„Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways“ *Blood* 2002 Jan;99(1):3-9