

**Aus dem Institut für Pathologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Alfred C. Feller**

**Die Bedeutung der microRNA in der malignen
Transformation einer Gastritis zum extranodalen
Marginalzonenlymphom vom MALT-Typ des Magens**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Johannes D. Kuba
aus Dresden

Lübeck 2013

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Christoph Thorns
Institut für Pathologie

2. Berichterstatter / Berichterstatterin:

PD Dr. med. Erik Schlöricke
Klinik für Chirurgie, Campus Lübeck

Tag der mündlichen Prüfung:

Lübeck, den 25.04.2014

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den 25.04.2014

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Gliederung

Zusammenfassung	1
Abkürzungsverzeichnis	3
1) Einleitung und Fragestellung	
1.1) Niedrigmalignes extranodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom vom MALT-Typ des Magens	
1.1.1) Klassifikation	4
1.1.2) Vorkommen und Inzidenz	4
1.1.3) Morphologie	5
1.1.4) Klassifikation nach Wotherspoon	6
1.1.5) Identifikation	6
1.1.6) Einfluss Helicobacter Pylori Infektionen	7
1.1.7) Einfluss genetischer Veränderungen	10
1.1.8) Ausbreitung und Metastasen	13
1.1.9) Übergang in ein hochmalignes Lymphom	13
1.1.10) Symptome, Stadieneinteilung und Therapie ...	15
1.1.11) Prognose des MALT-Lymphoms des Magens	15
1.2) MicroRNA und deren Bedeutung	
1.2.1) Definition und Aufbau	16
1.2.2) Wirkmechanismus und Funktion	17
1.2.3) Einfluss auf die Immunreaktion	18
1.2.4) Einfluss auf die Tumorgenese	21
1.2.5) Sekretion der miRNA in Körperflüssigkeiten	23
1.2.6) Extrazelluläre Wirkung der miRNA	24
1.2.7) Nachweisbarkeit in FFPE Präparaten	24
1.2.8) Möglichkeiten der miRNA	24
1.3) Fragestellung	26
2) Material und Methoden	
2.1) Ethikkommission	27
2.2) Projektfinanzierung	27
2.3) Fallidentifikation	27

2.4) Präparation des Materials	
2.4.1) Probenentnahme	28
2.4.2) Extraktion aus FFPE	28
2.5) RNA in cDNA Erststrang	29
2.6) qPCR und miRNA-Profile	30
2.7) Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	32
2.8) Statistische Auswertung	32
2.9) Kontrollstudie – Verifikationsanalyse	33
3) Ergebnisse	
3.1) Initiale Studie	35
3.2) Kontrollstudie – Verifikationanalyse	45
3.3) Übereinstimmungen in beiden Studien	46
4) Diskussion	47
4.1) Die initiale Studie	48
4.2) Die Kontrollstudie	53
4.3) Ausblick	56
Literaturverzeichnis	58
I) Anhang	76
II) Veröffentlichung	84
III) Danksagung	85
IV) Lebenslauf	86

Zusammenfassung

Die Biologie der Tumorgenese des extranodalen Marginalzonen-B-Zell-Lymphoms vom MALT-Typ des Magens (MALT-Lymphom) ist nur teilweise verstanden. MALT-Lymphome sind stark mit einer Entzündung durch das Bakterium *Helicobacter pylori* (H.p.) assoziiert. Die mikroskopische Diagnose ist zwar durch die Zuhilfenahme von gentechnischen Methoden sicherer geworden, trotzdem ist die Unterscheidung zwischen einer Entzündung und einem Lymphom in bestimmten Fällen schwierig. Die Möglichkeiten der microRNA (miRNA) können sowohl in der Erforschung der Vorgänge in der Entzündung und des MALT-Lymphoms als auch im Identifizierungsprozess von wichtiger Bedeutung sein.

In dieser Arbeit wurde daher nach einem Zusammenhang zwischen der Expression einzelner miRNAs und der Entstehung einer Entzündungsreaktion und daraus eines MALT-Lymphoms des Magens gesucht. Dafür wurden Biopsate von Magenschleimhaut nach den Stadien der Wotherspoon-Klassifikation in gesunde, entzündliche und Lymphom-beinhalten Proben eingeteilt und mittels qPCR auf 376 verschiedene miRNA-Expressionen hin untersucht.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass 41 miRNAs einen signifikant graduellen Anstieg (n=33) oder Abfall (n=8) ihrer Expressionswerte in der malignen Transformation aufweisen. Einige zeigen das Vorhandensein von Lymphozyten und einer Entzündung an (z.B. miR.155, miR.566), für andere sind onkogene bzw. tumorsuppressive Wirkungen (z.B. miR.150, miR.182, miR.375) beschrieben. Weitere potentiell wichtige miRNAs konnten neu erfasst werden. Diese miRNAs können mit der Entstehung eines MALT-Lymphoms aus einer H.p. Gastritis in Verbindung gebracht werden und ermöglichen weitergehende Forschung.

Fünf miRNAs (miR.150, miR.124a, miR.550, miR.518b, miR.539) konnten identifiziert werden, die signifikant unterschiedlich in einer Gastritis im Vergleich zu einem MALT-Lymphom exprimiert werden. Darunter sind einige, z.B. miR.150 oder miR.124a, für ihre Wirkung in der Immunmodulation und Tumorgenese schon beschrieben. Andere signifikant unterschiedliche miRNAs konnten neu

hinzugefügt werden. Sie ermöglichen weiteren Einblick in die Biologie und könnten wichtige Marker in der Unterscheidung zwischen den beiden stark verknüpften Pathologien darstellen.

Die Ergebnisse wurden daraufhin an einem zweiten unabhängigen Kollektiv überprüft. MiR.150, miR.375 und miR.142.3p konnten erneut signifikant getestet und somit bestätigt werden. Sie bekräftigen den Einfluss dieser miRNAs auf die pathologischen Prozesse, die zur Entstehung eines MALT-Lymphoms des Magens führen und sollten zukünftig stärker im Fokus stehen.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wurde in weiterführenden, noch unveröffentlichten Studien erkannt, dass die CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin)-Inseln der miR.142.3p hypomethyliert sind. MiR.142.3p wird also angeschaltet und ihre protoonkogene Wirkung entfaltet sich. Eine genaue Betrachtung des Wirkmechanismus sollte sich anschließen, wie es für miR.150 und miR.155 mit Hilfe von transfizierten Lymphomzellreihen begonnen werden konnte.

Abkürzungsverzeichnis

API2	Apoptosis <u>P</u> rotein <u>I</u> nhibitor <u>2</u>
bcl	<u>B</u> - <u>C</u> ell <u>L</u> ymphom Gen
BIC	<u>B</u> -cell <u>I</u> ntegration <u>C</u> luster
CagA	<u>C</u> ytotoxin-associated <u>a</u> ntigen <u>A</u>
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
CpG	<u>C</u> ytosin- <u>p</u> hosphatidyl- <u>G</u> uanin
CT / CP- Wert	<u>C</u> ycle <u>T</u> reshold / <u>C</u> rossing <u>P</u> oint Wert
DLBCL	<u>D</u> iffuse- <u>L</u> arge- <u>B</u> - <u>Z</u> ell- <u>L</u> ymphom
DNA	<u>D</u> esoxyribonucleic <u>A</u> cid
cDNA	complementary DNA
FFPE	<u>F</u> ormalin <u>F</u> ixed <u>P</u> araffin <u>E</u> MBEDDED
FISH	<u>F</u> luoreszenz- <u>i</u> n- <u>S</u> itu- <u>H</u> ybridisierung
FoxP1	<u>F</u> orkhead <u>B</u> ox <u>P</u> rotein 1
HE- Färbung	<u>H</u> ämatoxylin <u>E</u> osin Färbung
H.p.	<u>H</u> elicobacter pylori
IgH	<u>I</u> mmunglobulin <u>h</u> eavy chain
IgM / IgG / IgD	<u>I</u> mmunglobulin der Klasse <u>M</u> / <u>G</u> / <u>D</u>
LEL	<u>L</u> ympho <u>E</u> pitheliale <u>L</u> esions
MALT	<u>M</u> ucosa <u>A</u> ssociated <u>L</u> ymphatic <u>T</u> issue
NF-κB	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor ' <u>κ</u> -light-chain-enhancer' of activated <u>B</u> -cells
NHL	<u>N</u> on- <u>H</u> odgkin- <u>L</u> ymphom
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
qPCR	quantitative PCR
rt-PCR	real-time PCR
REAL	<u>R</u> evised <u>E</u> uropean <u>A</u> merican <u>L</u> ymphoma
RISC	<u>R</u> NA- <u>i</u> nduced <u>s</u> ilencing <u>c</u> omplex
RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
mRNA	<u>M</u> essenger RNA
miRNA	<u>M</u> icro RNA
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization

Cave: Der Begriff „Wotherspoon-Score“ wurde aus dem Englischen mit Wotherspoon-Stadium übersetzt. Er ist jedoch nicht mit dem Tumorstadium gleichzusetzen und sollte diesbezüglich nicht verwechselt werden.

1) Einleitung und Fragestellung

1.1) *Niedrigmalignes extranodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom vom MALT-Typ des Magens*

1.1.1) *Klassifikation*

Das primär extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphom vom MALT-Typ (MALT-Lymphom) des Magens wird nach REAL-Klassifikation (*Harris et al., 1994*) und WHO-Klassifikation zu den niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) der B-Zell Reihe gezählt. (*Jaffe et al., 2008; Isaacson et al., 2008*) Das MALT-Lymphom gilt neben dem splenischen und dem nodalen als eigenständige Gruppe der Marginalzonenlymphome und wurde als eigene Identität erstmals 1983 von Isaacson und Wright beschrieben. (*Isaacson und Wright, 1983*) Es handelt sich um ein vor allem an Schleimhautbarrieren mit Antigenkontakt zu findendes NHL. Die histologisch sichtbare Gemeinsamkeit ist die „Mucosa associated lymphatic tissue“-Struktur (MALT), wie sie aus den Peyer-Plaques des Ileums bekannt ist. (*Spencer et al., 1985*)

1.1.2) *Vorkommen und Inzidenz*

Die Inzidenz primär gastraler Lymphome beträgt in Westeuropa weniger als 1/100000. (*Ullrich et al., 2002*) Zuerst vernahm man einen Anstieg der Inzidenz primärer gastraler Lymphome. (*Severson und Davis, 1990*) Neuerdings konnte jedoch eine Senkung der Inzidenz gezeigt werden, die auf die Einführung der H.p.-Eradikationstherapie als Standardtherapie zurückgeführt wird. (*Luminari et al., 2010*)

Primär gastrale Lymphome machen insgesamt weniger als 5% aller Malignome des Magens aus. (*Loehr et al., 1969; Muller et al., 1995*) Die im Magen auftretenden Lymphome können zu 40% in niedrigmaligne MALT-Lymphome, zu 55% in hochmaligne Diffuse-großzellige-B-Zell-Lymphome (DLBCL) und zu 5% in verschiedene weitere Lymphomentitäten aufgeteilt werden. In einem Drittel der DLBCL sind anteilig Strukturen von MALT-Lymphomen zu erkennen. (*Koch et al., 2001*)

MALT-Lymphome machen ungefähr 8% aller Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) aus. (*International Lymphoma Study Group (ILSG), 1997*) Die häufigste Lokalisation der MALT-Lymphome ist der Magen. (*Harris et al., 1994; Thieblemont et al., 2000*) Weitere, seltenere Lokalisationen eines MALT-Lymphoms können Orbita, Intestinaltrakt, Lunge, Schilddrüse, Haut, Weichteilgewebe, Blase, Niere und Zentral-Nerven-System betreffen. (*Isaacson und Wright, 1984*)

1.1.3) Morphologie

Das MALT-Lymphom zeichnet sich morphologisch durch verschieden aussehende Lymphozyten mit unregelmäßigem Kern und zentrozytenähnlichem Aspekt aus, die sich in der Marginalzone eines Lymphfollikels ausbreiten. Immunhistochemisch ist das MALT-Lymphom positiv für CD20, CD19, CD22, CD79a, bcl-10 und IgM. In 50% der Fälle kann es positiv für CD43 und bcl-2 sein. Negativ ist es hingegen für CD5, CD23, CD10, Cyclin D1 und IgD. (*Harris et al., 1994; Cogliatti und Schmid, 2002; Isaacson et al., 2008*)

Der histologische Aufbau des MALT-Lymphoms ist gekennzeichnet durch die MALT-Struktur und charakteristische lymphoepitheliale Läsionen (LEL). (*Isaacson und Wright, 1984*) Die Magenschleimhaut zeigt im gesunden mikroskopischen Bild nur wenige Lymphozyten bzw. kein organisiertes lymphatisches Gewebe. Erst sekundär kommt es nach einer Infektion zur Entzündungsreaktion in Form eines Mucosa associated lymphatic tissue (MALT). Als MALT wird der typische histologische Aufbau reaktiver Lymphozyten in einem oder mehreren Lymphfollikel in unmittelbarer Nähe von Schleimhautbarrieren genannt. Neben dem üblichen Bild eines reaktiven Lymphfollikels bei Entzündung ist des weiteren eine der Mukosa zugewandte so genannte „dome cell region“ zu erkennen. Zum Lumen hin befinden sich über dieser Zone M-Zellen des Mucosa-Epitheliums, die auf den Antigen-Transport spezialisiert sind. (*Banks, 2007*) MALT-Lymphome zeigen anfänglich diese „geordneten“ histologischen Strukturen, verlieren sie aber im Verlauf der weiteren Lymphomentwicklung, und es erscheint ein zunehmend diffuses Bild der Lymphozyten. Als lymphoepitheliale Läsion (LEL) wird dabei die Infiltration und Destruktion des Drüsengewebes durch Lymphozyten-Gruppen bezeichnet, welche die Basalmembran durchbrochen haben.

1.1.4) Klassifikation nach Wotherspoon

Die Veränderungen des histologischen Bildes von einer gesunden Magenschleimhaut zur MALT-Struktur und weiter zu einem destruierenden MALT-Lymphoms sind fließend. Zur besseren Beurteilung teilt Wotherspoon in der nach ihm benannten Klassifikation (siehe Tabelle 1) die Lymphozyteninfiltration anhand des mikroskopischen Bildes in 6 Stufen ein. (Wotherspoon et al., 1993)

Tabelle 1: Klassifikation nach Wotherspoon (Wotherspoon et al., 1993)
(LEL - lymphoepitheliale Läsion)

Wotherspoon Stadium	Diagnose	Histologisches Bild
0	Normal	Vereinzelte Plasmazellen in der Lamina propria, keine Lymphfollikel
I	Chronisch aktive Gastritis	Vereinzelt lymphozytäre Aggregate in der Lamina propria, keine Lymphfollikel, keine LEL
II	Chronisch aktive Gastritis mit Lymphfollikel	Chronisch aktive Gastritis mit prominenten Lymphfollikeln mit Mantelzone und eingestreute Plasmazellen, keine LEL
III	Verdächtiges lymphozytäres Infiltrat – wahrscheinlich reaktiv	Lymphfollikel umgeben von kleinen Lymphozyten, die diffus in der Lamina propria aufsteigen und gelegentlich in das Epithel
IV	Verdächtiges lymphozytäres Infiltrat – wahrscheinlich Lymphom	Lymphfollikel umgeben von einer Marginalzone, Lymphozyten infiltrieren diffus die Lamina propria und in kleinen Gruppen das Epithel
V	Extranodales Marginalzonen-Lymphom vom MALT-Typ	Dichtes, diffuses lymphozytäres Infiltrat der Lamina propria mit prominenten LEL

1.1.5) Identifikation

Die Abgrenzung zwischen Entzündung und Malignom ist in den Stadien III und IV der Klassifikation nach Wotherspoon uneindeutig. Außerdem bleibt die Einschätzung der Stadien, trotz Zuhilfenahme von immunhistochemisch gefärbten Präparaten, einer subjektiven Betrachtung des Pathologen unterworfen. Zur besseren Lymphomidentifizierung werden die histologischen Untersuchungen

durch biochemische Operationen wie der PCR (Polymerase Chain Reaction, siehe Abschnitt 2.6) unterstützt. Mit dieser Methode kann nach genetisch identischen Zellgruppen bzw. deren identischen Produkten gefahndet werden.

Im Falle eines Lymphoms handelt es sich um B-Zellen, die nur eine spezifische Variante von Antikörpern produzieren. Sie sind monoklonal und monoreaktiv im Gegensatz zu den in Entzündungen zu findenden polyreaktiven, also auf verschiedene Antigene gerichtete, B-Zellen. Der histologische Befund kann damit um die Information der „Monoklonalität“ erweitert werden. Die früher beschriebenen Zustände und Begriffe wie „Pseudolymphoma“, eine Lymphom-ähnliche reaktive Lymphozyteninfiltration ohne Nachweis monoklonaler B-Zellen, oder wie „monoklonale Gastritiden“, histologisches Bild einer Entzündung mit Nachweis monoklonaler B-Zellen (*Torlakovic et al., 1997; Wündisch et al., 2003*), werden nicht mehr verwendet. (*Burke, 2011*) Heute wird eine mittels IgH-PCR (Immunglobulin heavy chain) gefundene Monoklonalität in den Wotherspoon-Stadien III und IV als Beweis für das Vorhandensein eines Lymphoms angenommen. (*Hummel et al., 2006*) Als allgemeiner Standard der PCR-Untersuchung hat sich das BIOMED2 Protokoll etabliert. (*van Dongen et al., 2003; van Krieken et al., 2007; Liu et al., 2007*)

Zur weiteren Beschreibung des Befundes können FISH-Untersuchungen (Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung, siehe Abschnitt 2.7) angezeigt sein. Diese können typische genetische Veränderungen offenbaren und entscheidend auf die Therapie und Verlauf einwirken (siehe Abschnitt 1.1.7).

1.1.6) Einfluss *Helicobacter Pylori* Infektionen

Helicobacter pylori (H.p.) konnte in 55% der Fälle von chronisch inaktiver und in 88% von chronisch aktiver Gastritis als häufigster Erreger beobachtet werden. (*Hirschl, 1987*) H.p. besitzt die Fähigkeit, dem sauren Milieu der Magensäure zu trotzen und ist somit in der Lage, die Schleimhaut anzugreifen. Die Entstehung eines MALT im Magen ist Ausdruck einer Entzündungsreaktion, als deren Ursache eine Infektion mit H.p. angesehen wird. (*Wyatt und Rathbone, 1988; Stolte und Eidt, 1989*) In über 90% der Fälle von MALT-Lymphomen des Magens konnte eine Infektion mit H.p. nachgewiesen werden. (*Wotherspoon et al., 1991*) Ein durch H.p. entstandenes MALT wurde daher als Grundlage der Entstehung eines MALT-

Lymphoms erachtet. (*Parsonnet et al., 1994*) Dies konnte weiter untermauert werden, indem man zeigte, dass es in einem Großteil der Fälle zur Remission lymphomverdächtigter Infiltrate nach Eradikation von H.p. durch eine Antibiotikatherapie kommt. (*Wotherspoon et al., 1993; Fischbach et al., 2004; Wündisch et al., 2005*)

Eine chronische Infektion und Antigenkontakt führen zur Stimulation von T-Zellen, welche ihrerseits die Proliferation der B-Zellen koordinieren und stimulieren. Dieser Zusammenhang konnte streng spezifisch für H.p. und MALT-Lymphome im Magen gezeigt werden. (*Hussell et al., 1993; Hussell et al., 1996*) Des Weiteren scheinen diese T-Zellen in ihrer Fähigkeit der Selbstlimitierung ihrer proinflammatorischen Wirkung auf B-Zellen eingeschränkt zu sein. (*D'Elíos et al., 2005*) Die B-Zellen sind zu Beginn der Lymphomentstehung zwar monoklonal, aber polyreaktiv, d.h. von einer Ursprungszelle abstammend, aber auf verschiedene Antigene gerichtet. Dies repräsentiert den typischen Befund einer Entzündung mit Hypermutation der Immunzellen und widerspricht eher dem strengen Bild des monoklonalen, monoreaktiven Lymphoms. Es zeigt sich somit, dass es sich vor allem in den beginnenden Stadien der Lymphomentwicklung um einen spezifisch antigen-getriebenen bzw. sogar antigen-abhängigen Prozess handelt. (*Qin et al., 1995; Craig et al., 2010a; Craig et al., 2010b*)

Genetische Veränderungen spielen in dieser ersten Phase der Lymphomgenese eine eher untergeordnete Rolle. Obwohl die genauen Mechanismen ihrer Entstehung noch nicht vollständig verstanden sind, wird vermutet, dass genetische Veränderungen durch oxidativen Stress und gesteigerte Proliferation der Zellen im Zuge eines Entzündungsprozesses wie bei einer H.p.-Infektion begünstigt bzw. hervorgerufen werden. (*Coussens und Werb, 2002; Liu et al., 2004*) So konnte gezeigt werden, dass tumorassoziierte DNA-Methylationen nicht durch H.p. selbst, sondern durch die Immunreaktion auf H.p. verursacht werden. (*Kondo et al., 2009; Niwa et al., 2010*) Im Mausmodell wurde erkannt, dass eine Toleranz des Immunsystems gegenüber H.p. zu weniger tumorverdächtigen Läsionen bei H.p.-Besiedlung führt, trotz des weiter fortbestehenden H.p. Befalls. (*Arnold et al., 2011*)

Die Aggressivität von H.p. wird vor allem durch sogenannte Virulenzfaktoren – wie CagA und VacA – bestimmt. Das CagA-Gen (cytotoxin-associated antigen A)

befähigt H.p. zur Bildung eines Typ-4-Sekretions-Systems, mit dem es CagA-Proteine in die Schleimhautzellen einführen und dort wichtige Prozesse beeinflussen kann. VacA ist ein Zytotoxin, das zur Vakuolen-Bildung und Zellzerstörung führt sowie die Antigenpräsentation von Lymphozyten beeinflusst. Die Virulenzfaktoren werden stark mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht. (Ahmed und Sechi, 2005) So wurde CagA bei H.p.-Infektion mit einem gesteigerten Auftreten der Translokation t(11;18)(q21; q21) assoziiert. (Ye et al., 2003a) Die Virulenzfaktoren von H.p. scheinen aber nicht direkt an der Entstehung eines MALT-Lymphoms beteiligt zu sein, sondern sie führen zu einer verstärkten Entzündungsreaktion. Diese wird als Grundlage für die nachfolgende Entstehung eines MALT-Lymphoms angesehen. (Lehours et al., 2004; Arnold et al., 2011)

Eine antibiotische Eradikationstherapie gilt als Standardtherapie bei MALT-Lymphomen des Magens. (Ruskoné-Fourmestraux et al., 2011) Eine Senkung der Inzidenz von Magenlymphomen in den letzten Jahren kann auf die standardisierte Therapie bei einer H.p.-Infektion zurückgeführt werden. (Luminari et al., 2010)

In einem Teil der Fälle verbleibt aber trotz der histologischen Remission der Lymphominfiltrate nach Eradikationstherapie ein monoklonales IgH-Muster in der PCR-Untersuchung. Dies ist mit einer erhöhten Chance auf Lymphomwiederkehr, aber nicht mit genetischen Aberrationen verbunden. (Thiede et al., 2001; Montalban et al., 2005)

In bis zu 10% der MALT-Lymphome des Magens kann kein H.p. nachgewiesen werden. Diese H.p.-negativen MALT-Lymphome können häufig auf Helicobacter Heilmanii zurückgeführt werden. (Morgner et al., 2000; Nordenstedt et al., 2013)

Andere Ursachen für H.p.-negative MALT-Lymphome könnten, wie von MALT-Lymphomen anderer Lokalität bekannt, chronische Entzündungen durch weitere Keimspezien oder Autoimmunerkrankungen sein. (Hyjek und Isaacson, 1988; Hyjek et al., 1988; Jønsson et al., 1999; Ferreri et al., 2009)

H.p.-negative MALT-Lymphome sind häufiger mit genetischen Veränderungen assoziiert als H.p.-positive Fälle. Interessanterweise zeigen sie aber trotzdem teilweise eine Remission der Infiltrate nach Eradikationstherapie. (Ye et al., 2003b; Raderer et al., 2006; Nakamura et al., 2006) Das „long term outcome“ von H.p.-negativen MALT-Lymphomen ist dem der H.p.-positiven Fällen gleich. (Chung et al., 2009)

Eine H.p.-Infektion bzw. eine chronische Entzündung sind als die wichtigsten Faktoren bei der Entstehung eines MALT-Lymphoms des Magens anzusehen. Insgesamt sind aber trotz der hohen Durchseuchung der Bevölkerung (>50% – *Brown, 2000*) mit H.p. MALT-Lymphome des Magens selten. Eine Eradikationstherapie führt in 20-30% der H.p.-positiven MALT-Lymphome nicht zur Remission der Lymphominfiltrate. (*Liu et al., 2001a*) und in einem Teil der gastrischen MALT-Lymphome kann gar kein H.p. nachgewiesen werden. Weitere Faktoren scheinen somit ebenfalls auf die Ausprägung des Lymphoms einen wichtigen Einfluss zu haben.

1.1.7) Einfluss genetischer Veränderungen

In bis zu 50% aller MALT-Lymphome können genetische Aberrationen nachgewiesen werden. Zu ihnen zählen die Translokationen $t(11;18)(q21;q21)/API2-MALT1$, $t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1$, $t(1;14)(p22;q32)/IGH-BCL10$ und $t(3;14)(p14;q32)/IGH-FoxP1$ sowie Trisomien der Chromosomen 3, 7, 12 und 18. Die Häufigkeit ihres Auftretens unterscheidet sich stark zwischen den verschiedenen Lokalisationen des MALT-Lymphoms. Im Magen können in bis zu 40% der MALT-Lymphome genetische Aberrationen nachgewiesen werden. Die Translokation $t(11;18)(q21;q21)/API1-MALT1$ ist mit 20% die häufigste, währenddessen die anderen Translokationen äußerst selten auftreten. Unter den Trisomien sind im Magen vor allem die Trisomie 3 und 18 vertreten. (*Auer et al., 1997; Streubel et al., 2004; Streubel et al., 2005; Remstein et al., 2006*)

Bei $t(11;18)(q21;q21)$ -Translokation entsteht das API2/MALT1 (Apoptosis Protein Inhibitor 2/ MALT-Lymphom assoziierte Translokation)-Fusionsprotein. (*Dierlamm et al., 1999; Akagi et al., 1999*) Es führt zur eigenständigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells). (*Lucas et al., 2001*) API2 ist Mitglied der „inhibitors of apoptosis“-Gen-Familie und unterdrückt die Apoptose durch direkt und indirekt hemmende Wirkung auf die Aktivität von Caspasen 3 und 7. (*Roy et al., 1997*) Das MALT1 Gen ist eine Paracaspase, die eine wichtige Rolle in der Antigen-Rezeptor-vermittelten Aktivierung des NF- κ B-Mechanismus spielt. (*Uren et al., 2000*) Der NF- κ B-Mechanismus ist in einer Vielzahl von Zellmechanismen mit wiederum einer Vielzahl an teilnehmenden Einzelprodukten verwickelt.

Proinflammatorische und antiapoptotische Wirkungen des Mechanismus scheinen bei der Entstehung eines Lymphoms entscheidend zu sein. Das normale MALT1 Gen allein führt nicht zur verstärkten Aktivierung. Erst in Kombination mit dem BCL10 Gen findet normalerweise eine verstärkte Aktivierung des NF-κB-Mechanismus statt. Eine Veränderung dieser beiden Gene führt demnach zur veränderten Aktivität des NF-κB. Im Falle der als Protease wirkenden API2/MALT1-Fusionsproteine kommt es nicht nur vermehrt zur Aktivierung des NF-κB-Mechanismus, sondern auch zur Behinderung dessen negativer Rückkopplung. Der genaue Vorgang, wie das Fusionsprotein den NF-κB-Mechanismus zur „Unsterblichkeit“ der Zelle führt, ist noch nicht vollständig verstanden. (Du, 2011) Von Vorteil ist, dass das API2/MALT1-Fusionsprotein äußerst stabil ist, indem es ebenfalls seinem eigenen Abbau durch weitere Proteasen vorbeugt. (Izumiyama et al., 2003)

Die t(11;18)(q21;q21)-Translokation kann in allen Lokalisationen, aber vornehmlich in MALT-Lymphomen des Magens und der Lunge, nachgewiesen werden. (Ye et al., 2003a) Die Häufigkeit ihres Auftretens in MALT-Lymphomen des Magens steigt mit dem Tumorstadium an. (Liu et al., 2001b; Ye et al., 2003b) Im Gegensatz zu den nodalen oder den splenischen Marginalzonenlymphomen, reaktiven Lymphfollikeln und DLBCL ist die t(11;18)(q21;q21)-Translokation spezifisch für extranodale Marginalzonenlymphome (MALT-Lymphome). (Rosenwald et al., 1999; Remstein et al., 2000; Baens et al., 2000) Ihr Auftreten in einem MALT-Lymphom ist mit einer niedrigeren Rate an Transformation in ein DLBCL assoziiert. (Ott et al., 1997; Schreuder et al., 2003) Die Daten neuerer Studien haben diese Annahmen aber wieder in Frage gestellt. (Toracchio et al., 2009) Interessanterweise kann gerade bei H.p.-negativen MALT-Lymphomen die t(11;18)(q21;q21)-Translokation häufiger nachgewiesen werden als in H.p.-positiven Fällen. Eine verstärkte genetische Wirkung bei der Lymphomentstehung in H.p.-negativen Fällen wird vermutet. (Ye et al., 2003b) Das Auftreten der Translokation ist des Weiteren mit einer erhöhten Widerstandsfähigkeit des Lymphominfiltrates gegenüber einer Eradikationstherapie von H.p. (Liu et al., 2001a; Liu et al., 2002) und gegenüber einer Chemotherapie assoziiert. (Santón et al., 2008)

Die Translokationen t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1 (Immunglobulin heavy chain – MALT1), t(1;14)(p22;q32)/IGH-BCL10 (Immunglobulin heavy chain – B-Cell Lymphom) und t(3;14)(p14;q32)/IGH-FoxP1 (Immunglobulin heavy chain – forkhead box protein 1) sind alle am IGH Locus 14q32 lokalisiert. Sie werden aber nur äußerst selten in MALT-Lymphomen des Magens nachgewiesen.

Bei den Translokationen t(14;18)(q32;q21) und t(1;14)(p22;q32) werden die Gene BCL10 bzw. MALT1 unter Kontrolle des IGH-Gens gestellt und führen so zur Aktivierung des NF-κB-Mechanismus. (Willis et al., 1999; Murga Penas et al., 2003) Für die t(1;14)(p22;q32)-Translokation konnte gezeigt werden, dass sie vor allem in höheren Tumorstadien auftreten und eine verminderte Reaktion auf eine Eradikationstherapie zeigen. (Ye et al., 2006)

Das FoxP1 Protein der Translokation t(3;14)(p14;q32) ist nicht spezifisch für MALT-Lymphome, da es ebenfalls in DLBCL gefunden werden kann. Der genaue Wirkmechanismus ist unbekannt, aber eine Wirkung in der B-Zell-Entwicklung und Aktivierung des NF-κB-Mechanismus wird vermutet. (Du, 2011) Die FoxP1-Expression wird mit einer schlechteren Prognose und höheren Rate an Transformation in ein DLBCL assoziiert. (Sagaert et al., 2006; Han et al., 2009)

Unter den Trisomien können vor allem die Trisomien der Chromosomen 3 und 18 in MALT-Lymphomen des Magens gefunden werden. Sie sind häufig und treten oftmals in Verbindung mit Translokationen auf. Deshalb kann vermutet werden, dass sie die Entstehung von Translokationen begünstigen. (Wotherspoon et al., 1995; Brynes et al., 1996) Eine Ausnahme scheint die t(11;18)(q21;q21)-Translokation zu sein, da sie nur selten in Verbindung mit weiteren genetische Veränderungen auftritt. (Starostik et al., 2002; Zhou et al., 2006)

Eine eigene direkte Wirkung der Trisomien auf die Lymphomentstehung konnte noch nicht beschrieben werden. Sie scheinen aber eine maligne Transformation des Lymphoms anzuzeigen. So konnte die Trisomie des Chromosoms 3 mit einer Resistenz gegenüber einer H.p. Eradikationstherapie in Verbindung gebracht werden. (Taji et al., 2005) Da Trisomien häufig mit anderen genetischen Veränderungen vorkommen, kann angenommen werden, dass die schlechtere Prognose von allen beteiligten Veränderungen verursacht wird. (Krugmann et al., 2005) Weitere Untersuchungen konnten eine negative Wirkung der Trisomien 3 oder 18 auf die Prognose nicht bestätigen. (Tibiletti et al., 2007)

1.1.8) *Ausbreitung und Metastasen*

Das MALT-Lymphom des Magens spreitet per contuitatem oberflächlich oder diffus infiltrierend aus. (*Suekane et al., 1993*) Es ist dabei nicht nur in einer Lokalität zu orten, sondern kann gleichzeitig an mehreren Stellen im Magen aufgefunden werden. (*Wotherspoon et al., 1992*) Auch innerhalb histologisch unauffällig erscheinender Schleimhaut konnte mittels PCR eine weite mukosale Ausbreitung gezeigt werden. (*Du et al., 2000*)

Eine späte Neigung zur lymphogenen Metastasierung wurde beschrieben. In einem Drittel der MALT-Lymphome des Magens kommt es zur Dissemination. Das Outcome der Patienten bleibt jedoch gleich. (*Chang et al., 1999; Thieblemont et al., 2000; Ko et al., 2002*) Ein gleichzeitig auftretender Befall wurde vor allem im weiteren Gastrointestinaltrakt (*Du et al., 1996; Flieger et al., 2005*) und auch in anderen lymphatischen Geweben gefunden. (*Bertoni et al., 2000*) Umstritten bleibt, ob es sich dabei um eine Metastasierung von MALT-Lymphom-Zellen des Magens handelt oder ob die immunproliferierenden Mechanismen, die im Magen zum Lymphomentstehung führen, in anderen Geweben die Lymphomentstehung ebenfalls begünstigen. So konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten aus MALT-Lymphomen Homing-Rezeptoren aufweisen, die sie dazu befähigen, gleiche bzw. ähnlich günstige Gewebe zu identifizieren, um dort zu siedeln. (*Dogan et al., 1997*) Im Gegensatz zu MALT-Lymphomen anderer Lokalisation sind aber gastrische MALT-Lymphome nur selten gleichzeitig in weiteren MALT-Gebieten zu finden. (*Raderer et al., 2000*)

1.1.9) *Übergang in ein hochmalignes Lymphom*

In gastrischen MALT-Lymphomen kommen im Verlauf selten (2%) großkernige, zentroblastenartige Tumorzellen hinzu. (*Liu et al., 2010b*) Sie signalisieren die Transformation des MALT-Lymphoms in ein sekundäres hochmalignes Diffuse-Large-B-Zell-Lymphom (DLBCL). Des weiteren können primär in einem Drittel der DLBCL Anteile von MALT-Lymphomen erkannt werden. (*Koch et al., 2001*) Es wurde daraufhin diskutiert, ob es sich dabei um „High-grade“ MALT-Lymphome oder um DLBCL mit Anteilen von MALT-Lymphomen handelt. (*Harris et al., 2000*) Mittels PCR-Untersuchung konnten gemeinsame IgH-Veränderungen in DLBCL

und MALT-Lymphomen gefunden werden, die auf eine Entstehung des DLBCL aus dem MALT-Lymphom hindeuten. (*Peng et al., 1997*) Außerdem wurden verschiedene Trisomien vor allem in MALT-Lymphomen und DLBCL mit MALT-Anteilen nachgewiesen, die auf einen gemeinsamen Ursprung zurückgeführt werden können. (*Hoeve et al., 1999*) Des Weiteren werden im Magen bcl-6 und p53 Protein-Überexpressionen stärker in High-grade-Lymphomen und DLBCL als in Low-grade-MALT-Lymphomen gefunden und könnten eine mögliche Transformation darstellen. (*Omonishi et al., 1998*) Die häufige t(11;18)(q21;q21)-Translokation kommt nur in MALT-Lymphomen und nicht in DLBCL vor. (*Rosenwald et al., 1999*) Aber es zeigte sich, dass MALT-Lymphome mit dieser Translokation selten in DLBCL transformieren. MALT-Lymphome ohne diese Translokation weisen hingegen andere genetische Veränderungen auf, die in DLBCL ebenfalls gefunden werden können und somit eine mögliche Verbindung zu einem Teil der DLBCL darstellen. (*Starostik et al., 2002*) Weitere Untersuchungen haben andererseits gezeigt, dass kleinzellige Lymphome andere Gene expressieren als großzellige Lymphome und dass diese mit den jeweiligen klein- bzw. großzelligen Anteilen von „gemischten Lymphomen“ übereinstimmen. (*Barth et al., 2007*) Interessanterweise tragen Lymphominfiltrate des Magens, die morphologisch sowohl MALT-Lymphom-Anteile als auch DLBCL-Anteile aufweisen, Charakterzüge beider Lymphomentitäten. (*Yoshino et al., 2000*) Es hat sich auch gezeigt, dass DLBCL mit MALT-Anteilen klinisch und prognostisch dem MALT-Lymphomen gleichen, aber verschieden zu reinen DLBCL sind. (*Ang et al., 2009*) Des Weiteren reagiert ein Teil der DLBCL mit MALT-Anteilen auf eine Eradikationstherapie mit kompletter Remission der Tumordinfiltrate. Dies lässt vermuten, dass manche Fälle der DLBCL doch eines H.p.-abhängigen Ursprungs sind. (*Chen et al., 2001*)

Nach aktueller WHO-Klassifikation gibt es keine High-grade-MALT-Lymphome, sondern die Fälle, in denen Strukturen beider Lymphome auftreten, werden zu den DLBCL gezählt. Das DLBCL wird daher in primäre, also „De novo“ entstandene, DLBCL und in sekundäre, aus einem niedrigmalignen Lymphom entstandene, DLBCL unterschieden. Das DLBCL geht mit veränderter Metastasenbildung und Prognose einher und bedarf einem anderem Therapieschema. (*Stein et al., 2008*) Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede vor allem derjenigen Lymphome, die

Strukturen beider Lymphomentitäten aufzeigen, machen eine weitere Subgruppierung wünschenswert. Vor allem für eine bessere Therapieplanung der betroffenen Patienten wäre dies von großem Nutzen.

1.1.10) *Symptome, Stadieneinteilung und Therapie*

Männer und Frauen sind ungefähr gleich stark betroffen und erkranken meist erst im höheren Alter. (Koch et al., 2001; Ullrich et al., 2002) Die Patienten stellen sich meist unspezifisch mit Druckgefühl oder Schmerzen im Epigastrium, Übelkeit, Aufstoßen und Erbrechen eventuell mit Blut vor. (Koch et al., 2001)

Nach der Identifikation des Lymphoms findet das Staging mittels bildgebender Verfahren statt. MALT-Lymphome werden dabei in Stadien nach der von Musshoff und Radaszkiewicz erweiterten Ann-Arbor-Klassifikation und Paris-staging-system eingeteilt. (Musshoff, 1977; Radaszkiewicz et al., 1992; Ruskoné-Fourmestraux et al., 2003) Danach sind 70 % der MALT-Lymphome des Magens in niedrigen Tumorstadien einzuordnen. (Koch et al., 2001)

Eine antibiotische Eradikationstherapie wird primär grundsätzlich in allen Tumorstadien empfohlen. Sie kann vor allem in den niedrigen Stadien zur langfristigen vollständigen Remission und Heilung führen. Bei anhaltenden oder fortschreitenden Infiltraten sind radio-, chemo-, immuno- und chirurgisch-therapeutische Maßnahmen möglich. Aufgrund der niedrigen Fallzahl sind diese weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Ein standardisiertes Management fehlt. Sowohl auf eine Wiederkehr des MALT-Lymphoms als auch auf eine eventuelle Transformation in ein DLBCL ist zu achten, um die Therapie daraufhin zu verändern. (Ruskoné-Fourmestraux et al., 2011; Burke, 2011)

1.1.11) *Prognose des MALT-Lymphoms des Magens*

Die Fünf-Jahres-„Overall“-Überlebensrate eines MALT-Lymphoms des Magens beträgt insgesamt über 80%. Sogar in Fällen mit schlechtester Bewertung nach Internationalem Prognostischen Index ist die Fünf-Jahres-Überlebensrate mehr als 40%. (Armitage und Weisenburger, 1998) Das MALT-Lymphom wird überwiegend in niedrigen Tumorstadien diagnostiziert. Die Prognose ist in diesen Fällen mit mehr als 90% Fünf-Jahres-Überlebensrate sehr positiv. (Wündisch et al., 2005)

1.2) *MicroRNA und deren Bedeutung*

1.2.1) *Definition und Aufbau*

Kleinste RNA-Sequenzen, die auf die post-transkriptionellen Prozesse des Zellgenoms einwirken, wurden erstmals von Lee und Wightman 1993 beschrieben. (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993) Aber erst mit der Entdeckung weiterer dieser kurzen RNA-Sequenzen im Jahre 2000 (Reinhart et al., 2000) und der Benennung als microRNA – kurz miRNA (Lau et al., 2001) – begann die Aufmerksamkeit der Forschung auf sie massiv zu steigen.

MiRNAs sind kurze, ca. 22 Nukleotide lange RNA-Sequenzen, die zumeist in Introns, also in nicht für ein Protein kodierende Bereiche des Genoms, positioniert sind. Zum Teil liegen sie vor ihren genomischen Zielpunkten. Sie können allein oder in Clustern bzw. Familien vorkommen. Cluster sind Gruppen von gemeinsam hinter einem Promoter positionierten miRNAs, die meist zusammen transkribiert werden und zum Teil zu Interaktionen untereinander fähig sind. Bei Untersuchungen bietet es sich zur Vereinfachung an, das Cluster zuerst im Ganzen zu betrachten. (Bartel, 2004) MiRNAs sind stark konservierte Genomanteile, da man sie in vielerlei Organismen nachweisen kann. (Pasquinelli et al., 2000) Bis heute sind schon hunderte verschiedener miRNA gefunden worden, und ihre Zahl steigt weiterhin stetig. (siehe <http://www.mirbase.org>; <http://www.microrna.org>)

Nach der Transkription der ca. 70 bis 100 Nukleotide langen Vorläufer-Pre-miRNA mit typischer Haarnadel-Struktur wird diese durch eine „Drosha“ Ribonuklease zur ca. 60 bis 70 Nukleotide langen Pre-miRNA verkleinert. Nach aktivem Transport aus dem Zellkern durch Exportin5 wird aus der Pre-miRNA durch eine „Dicer“ Ribonuklease die miRNA-Duplex herausgeschnitten. (Cai et al., 2004) Das Zerschneiden der Pre-miRNA und Aufbrechen in einen Einzelstrang wird von einem miRLC (miRNA loading complex) durchgeführt. Dieses miRLC besteht aus mehreren Proteinen und wird im Laufe dieser Prozesse zum fertigen Produkt, einer Verbindung aus einzelsträngigen miRNA und RISC (RNA-induced silencing complex). Das RISC besteht daher ebenfalls aus mehreren verschiedenen Proteinen, die zum Teil noch nicht vollständig beschrieben wurden. (Maniataki und Mourelatos, 2005)

1.2.2) Wirkmechanismus und Funktion

Die Wirkmechanismen der miRNA werden als Epigenetik bezeichnet, da sie nicht an den genetischen Informationen selbst angreifen, sondern die „Übersetzung“ der genetischen Informationen in Proteine modulieren.

Der Komplex aus einzelsträngiger miRNA und RISC bindet über vollständige, aber häufiger über partielle RNA-RNA-Sequenzhomologien an die 3' untranslatierte Region der mRNA (Messenger RNA). Das verursacht einen Stopp der Translation der mRNA oder, in Fällen vollständiger Homologien vermehrt, sogar die Deadenylation mit konsekutiver Degradation der mRNA. Der Stopp der Translation findet vor allem während der Initiationsphase der Proteinzusammensetzung statt. Unterbrechungen in der Postinitiationsphase werden vermutet, konnten aber noch nicht vollständig bewiesen werden. In seltenen Fällen, wie zum Beispiel in Verbindung mit dem „fragile X related protein 1“, wurde beobachtet, dass miRNA auch zur erhöhten Verarbeitung von mRNA führen können. Dies ist aber eher die Ausnahme als die Regel. (Fabian et al., 2010)

Wie schon früh entdeckt wurde, ist die Fähigkeit zur Verhinderung der Translation abhängig von der Verbindungsstärke der Sequenzhomologien. Die sogenannte „Seed“-Region der miRNAs ist ein ca. 8 Nukleotide langer Abschnitt, der vornehmlich für die Interaktion mit den mRNA verantwortlich ist und meist am 5' Ende der miRNA liegt. Je stärker die Verbindung zwischen miRNA und mRNA an dieser Stelle, desto stärker die repressive Wirkung. Die Stärke der Verbindung ist dabei nicht nur von der Übereinstimmung der Nukleotidpaare, sondern auch von anderen Faktoren wie den Konzentrationen der Sequenzen abhängig. Potentiell kann sich eine miRNA an mehreren mRNA binden, und eine mRNA kann, zum Teil synergistisch, das Ziel mehrerer verschiedener miRNAs sein. (Doench und Sharp, 2004) Interessanterweise werden die Mechanismen der miRNAs ebenfalls von Regulationsfaktoren moduliert, vornehmlich von weiteren Proteinen wie dem HuR und Dead-end 1. Dies eröffnet einen Einblick in die vielfältigen epigenetischen Regulationmöglichkeiten, die bei weitem noch nicht verstanden sind. Es wird vermutet, dass viele der beschriebenen Prozesse in mikroskopisch sichtbaren zellulären Aggregaten, den sogenannten P-Bodies oder Stress Granula, stattfinden. Die genaue Beziehung zwischen miRNA-Prozessen und P-Bodies ist noch nicht vollständig erforscht. (Fabian et al., 2010)

Durch Computeranalysen von potentiellen miRNA-Bindungsstellen kann angenommen werden, dass miRNAs über 60% der für Proteine kodierenden Gene beeinflussen. (Friedman et al., 2009) MiRNAs sind somit im Stande, auf zahlreiche, wenn nicht sogar auf fast alle, zelluläre Prozesse einzuwirken: Auf die frühe Entwicklung (Reinhart et al., 2000), Zelldifferenzierung (Chen et al., 2004), Proliferation (He et al., 2005; He et al., 2007), Apoptose (Brennecke et al., 2003), Fett Metabolismus (Xu et al., 2003) und viele mehr. Krankhafte Prozesse können an Dysregulationen der miRNAs erkannt oder sogar durch diese ausgelöst werden. So konnten verdächtige miRNAs in chronisch lymphatischer Leukämie (Calin et al., 2004a), im Kolon Adenokarzinom (Michael et al., 2003), im Burkitt's Lymphom (Metzler et al., 2004), bei viraler Infektion (Pfeffer et al., 2004) und weiteren Erkrankungen gezeigt werden.

1.2.3) Einfluss auf die Immunreaktion

MiRNAs haben Einfluss auf nahezu alle Zellprozesse. Daher ist es nicht erstaunlich, dass man den miRNAs ebenfalls eine Wirkung bei komplexen Abläufen wie den Reaktionen des Immunsystems zuschreibt. MiRNAs wirken sowohl auf das unspezifische als auch auf das spezifische Immunsystem. Sie beeinflussen stark die Differenzierung, die gegenseitige Regulation und die einzelnen Funktionen der Zellen im Immunsystem. (O'Connell et al., 2010)

Aus der Vielzahl der beteiligten miRNAs scheinen einige – wie miR.155, miR.181a, miR.17-92, miR.150 und miR.146 – von besonderer Bedeutung für das Immunsystem zu sein und sollen kurz vorgestellt werden.

MiR.155 entstammt dem größeren Transkript BIC (B-cell integration cluster). Es wird stark bei der aktiven Immunantwort vor allem von B- und T-Zellen, aber auch von Makrophagen und dendritischen Zellen induziert. Bei fehlendem miR.155 kommt es zur fehlerhaften Immunantwort mit weitreichenden Veränderung verschiedener Gene, unter anderem für die Chemotaxis und Zelldifferenzierung.

MiR.181a scheint vornehmlich die Differenzierung von T-Zellen zu beeinflussen, indem es auf die Stärke des T-Zell-Rezeptors wirkt. Bei Überexpression von miR.181a kommt es zu einem Anstieg von Vorläufer-B-Zellen und Abfall von Vorläufer-T-Zellen. Wie miR.181 ist auch das miR.17-92 Cluster an der Entwicklung der Lymphozyten beteiligt. Das miR.17-92 Cluster beinhaltet die

miR.17, miR.18a, miR.19a, miR.19b, miR.20a und miR.92a. Es wird in Vorläufer-B- und T- Zellen als auch in Monozyten hoch exprimiert. In späteren Entwicklungsstadien ist es dagegen niedrig exprimiert. MiR.150 wirkt auf den Transkriptionsfaktor c-Myb und ist stark in der Entwicklung von B-Zellen aber auch von Megakaryozyten involviert. Einfluss auf die Entwicklung und auf die Signalwege verschiedener immunaktiver Zellen hat auch miR.146.

Ein Zusammenhang von vielen weiteren miRNAs mit Funktionen im Immunsystem werden vermutet, konnten aber bis jetzt nur teilweise nachgewiesen werden. (*Baltimore et al., 2008; O'Connell et al., 2010*)

Eine Infektion mit H.p. ist häufig Auslöser einer akuten und chronischen Gastritis. Diese gilt als wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von Krebserkrankungen im Magen. MiRNAs sind an der Modulation der Immunantwort auf eine H.p.-Infektion beteiligt und stehen im Verdacht, die Veränderung einer Entzündung zu einem Tumor zu beeinflussen. So konnten schon einige miRNAs gemessen werden, die signifikant verschieden in H.p.-infizierten im Vergleich zu nicht infizierten Proben exprimiert waren. Die Mehrzahl, darunter miR.203, miR.375, let-7, werden herunter reguliert. Allein miR.223 konnte vermehrt in infizierten Proben gefunden werden. Einige miRNAs – miR.223, miR.375, miR.220c – sind stark mit der Ausprägung der Aktivität, der chronischen Entzündung und dem H.p.-Befall assoziiert. Nach antibiotischer Eradikationstherapie „erholen“ sich die miRNA-Profile, indem einige durch H.p.-Infektion erniedrigte miRNA-Level wieder ansteigen. (*Matsushima et al., 2011*)

In Zelllinien konnte beobachtet werden, dass Mitglieder der let-7 Familie durch Zugabe von CagA-Virulenzfaktor von H.p. vermindert exprimiert werden. (*Matsushima et al., 2011*) Weitere Untersuchungen an Zelllinien zeigten, dass bei Infektion mit H.p. die Expression von miR.155 als auch von miR.16 und miR.146a gesteigert wird. Eine erhöhte Expression von miR.155 bei Infektion mit H.p. konnte daraufhin auch in Proben von Magengewebe nachgewiesen werden. Für diese gesteigerte Expression durch H.p. scheint der NF-κB-Mechanismus und das Activator-Protein-1 erforderlich zu sein. MiR.155 scheint auf diesem Wege als negative Kontrolle in Immunreaktionen zu wirken. (*Xiao et al., 2009*)

Weiter wurde speziell in T-Zellen eine Erhöhung der miR.155 infolge einer H.p.-Infektion festgestellt. T-Zellen spielen eine führende Rolle bei der Regulation der

Immunreaktionen bei einer H.p.-Infektion. Die Induktion von miR.155 findet dabei über cAMP und FoxP3-Mechanismen statt. (*Fassi Fehri et al., 2010*) Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass miR.155 in H.p.-infizierten Zellen überexprimiert wird. Es zeigte sich, dass ohne miR.155 keine ausreichende Immunantwort entstand, die auf eine fehlerhafte Regulierung durch die T-Zellen zurückzuführen ist. Somit scheint miR.155 von großer Bedeutung für die Entwicklung einer chronischen Gastritis zu sein. (*Oertli et al., 2011*)

MiR.146a wurde als ein weiterer Bestandteil der Immunantwort bei einer Infektion durch H.p. erkannt. Es hemmt die Produktion verschiedener immunspezifischer Proteine, darunter „Interleukin-1-receptor-associated-kinase-1“ (IRAK1) und „TNF-receptor-associated-factor-6“ (TRAF6), und ist womöglich an der Negativkontrolle einer H.p.-Infektion beteiligt. Bei der Induktion dieser miRNA scheint wiederum der NF-κB-Mechanismus von entscheidender Bedeutung zu sein. (*Liu et al., 2010c*)

Eine mögliche Verbindung zwischen H.p.-Infektion und Entstehung von Krebserkrankungen kann für weitere miRNAs vermutet werden. Eine Überexpression von miR.21 wurde in H.p.-infizierter Magenschleimhaut festgestellt. MiR.21 ist ebenfalls verstärkt in Magenkarzinomen zu finden und bewirkt erhöhte Zellproliferation und einen Stopp der Apoptose. (*Zhang et al., 2008*) Die Expression von miR.218 wird, wie auch in Adenokarzinomen des Magens, durch eine H.p.-Infektion in den Mucosa-Zellen des Magens herunterreguliert. MiR.218 wirkt als Tumorsuppressor durch seine hemmende Wirkung auf Zellwachstum und durch vermutete gesteigerte Apoptose. Des Weiteren wird eine Wirkung von miR.218 auf den NF-κB-Mechanismus angenommen – ein weiterer Hinweis auf die Verbindung von H.p.-Infektion und Tumorgenese. (*Gao et al., 2010*) Es konnte ebenso gemessen werden, dass das Level an Methylation von miR.34a/b bei H.p.-negativer Schleimhaut kleiner als bei H.p.-positiver Schleimhaut ist. Interessanterweise ist das Ausmaß der Methylierung in H.p.-positiven Fällen gleich dem bei Magenkrebs. (*Suzuki et al., 2010*) In MALT-Lymphomen konnte daraufhin die miR.34a mit einer erhöhten Rate der Transformation in ein DLBCL assoziiert werden. (*Craig et al., 2011a*)

1.2.4) Einfluss auf die Tumorgenese

In einer Vielzahl an Krebserkrankungen wurden veränderte miRNA-Profile nachgewiesen. Häufig sind miRNAs an tumorassoziierten Regionen oder fragilen Stellen im Genom positioniert. (Calin et al., 2004b) Interessant ist insbesondere die Wirkung der miRNAs auf sogenannte Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene. Durch ihre posttranskriptionell hemmende Wirkung sind miRNAs im Stande, entweder Tumor fördernde Gene (Onkogene) oder auch Tumor hemmende Gene (Tumorsuppressorgene) zu unterdrücken. Sie selbst fungieren dann ebenfalls als Tumor fördernde (Proto-Onkogene) oder Tumor hemmende (Proto-Tumorsuppressorgene) Produkte. (Zhang et al., 2007) MiRNAs mit eindeutig onkogener Wirkung werden auch „Oncomir“ genannt. Einige der häufiger und am besten erforschten onkogenen miRNAs sind miR.155, miR.21 oder miR.17-92. Sie sind schon bekannt für ihre Wirkung in der Regulation der Immunantwort.

Für miR.155 wurde neben seiner wichtigen Rolle bei der Regulation des Immunsystems gezeigt, dass eine Überexpression einen der wichtigsten Schritte zur B-Zell-Leukämie darstellt. An miR.21 wurde demonstriert, dass es zur Tumorregression kommt, wenn die Level an miR.21 sanken. Weiter konnten verschiedene Tumorentitäten mit miR.17-92 Cluster in Verbindung gebracht werden. MiR.17-92 interagiert dabei mit dem Myc-Gen, aber die genauen Mechanismen sind noch nicht vollständig erforscht.

Im Gegensatz dazu wurden bestimmte miRNAs, wie das miR.15a-16.1 Cluster oder let.7, bereits als tumorsuppressive miRNAs beschrieben. MiR.15a-16.1 wurden in mehr als 50% der B-Zell-chronisch-lymphatischen-Leukämie (B-CLL) nicht gefunden. Im Mausmodell wurde daraufhin gezeigt, dass es nach Wiedereinführung der miR.15a-16.1 zu einer Erniedrigung des Zell Zyklus Regulators Cyclin D und damit zu einer erhöhten Apoptosis kommt. Die let7-Familie reguliert das onkogen wirkende RAS-Gen. Durch Erniedrigung der let.7 wird RAS verstärkt exprimiert und führt zur vermehrten Zellproliferation.

Die genauen zellulären Wirkmechanismen dieser und weiterer tumorassoziierten miRNAs sind nur teilweise verstanden. Die Untersuchungen erweisen sich als schwierig, da sowohl miRNAs über verschiedene Wege wirken als auch Veränderungen an den beteiligten Proteinen an der Genese und Regulation von Krebserkrankungen teilhaben können. MiRNAs können an den verschiedenen

Charaktereigenschaften des Tumors beteiligt sein. Sie beeinflussen dabei nicht nur die Entstehung, sondern auch die Fähigkeit zur Metastasierung und die Resistenz gegenüber Therapien. So führt eine miR.10b-Erhöhung und miR.31-Erniedrigung zur verstärkten Metastasierung – anscheinend ohne Einfluss auf andere Seiten der Tumorgenese zu nehmen. (*Kasinski und Slack, 2011*)

Im Falle von Lymphomen konnte für das Burkitt-Lymphom, Primäres-Mediastinales-B-Zell-Lymphom, Hodgkin-Lymphom und DLBCL eine erhöhte Expression von miR.155 gefunden werden. MiR.155 gehört zu einem größeren Transkript namens BIC (B-cell integration cluster) und wirkt an c-Myc-Gene, die mit der Tumorentstehung assoziiert sind. (*Metzler et al., 2004; Eis et al., 2005; Kluiver et al., 2005*) Im Mausmodell wurde deutlich, dass es bei miR.155 Überexpression zur Proliferation von prä-leukämischen Vorläufer-B-Zellen kommt, die sich weiter zur vollständigen Malignität verändern. (*Costinean et al., 2006*)

Das miR.17-92 Cluster konnte ebenfalls in verschiedenen Lymphomentitäten – darunter Diffuse-Large-B-Cell-Lymphom, Follikuläre Lymphome, Mantelzell Lymphome, Primär kutanes B-Zell-Lymphom – dargestellt werden. (*Ota et al., 2004*) Neben den veränderten miR.17-92-Cluster-Profilen wurde auch im Mausmodell die Neigung zur B-Zell-Lymphom-Genese gezeigt. (*He et al., 2005*) Das miR.17-92 Cluster wirkt dabei über das Bim und Pten Gen hemmend und führt so zu einer Erhöhung des onkogen wirkenden c-Myc Systems und der Lymphomentstehung. (*Xiao et al., 2008*)

Für das MALT-Lymphom des Magens sind bislang nur vereinzelt Studien durchgeführt worden. So konnten miR.200c, miR.200b, miR.203, miR.141, miR.720, miR.205 in MALT-Lymphomen verringert gegenüber Tonsillen-Gewebe aufgefunden werden. MiR.203 war in MALT-Lymphomen am stärksten herunterreguliert, was auf eine Hypermethylation der Promoterregion zurückzuführen ist. Wenn in vitro miR.203 hinzugegeben wird, wird das Zielgen ABL1 gehemmt und es kommt zum Stopp der Tumorzellen-Proliferation. Eine ABL1-Überexpression konnte dabei in Chronisch-lymphatischer-Leukämie mit dem B-Zell-Rezeptor und NF- κ B Mechanismus in Verbindung gebracht werden. (*Craig et al., 2011b*) Des weiteren hat diese Gruppe gezeigt, dass sich miRNA-Profile von MALT-Lymphomen und DLBCL in vielen miRNAs signifikant unterscheiden. Die Profile von Gastritis und MALT-Lymphomen waren hingegen

weniger unterschiedlich. Die Transformation eines MALT-Lymphoms zu DLBCL geht mit einer Veränderung der miRNA-Profile einher. Viele der miRNAs befinden sich unter Hemmung des Myc-Gens, welches auffällig häufiger in DLBCL als im MALT-Lymphom nachgewiesen werden kann. Eine der am meisten deregulierten miRNA ist miR.34, welche auf FoxP1 wirkt und mit einer erhöhten Rate der Transformation eines MALT-Lymphoms zu einem DLBCL assoziiert ist. (Craig et al., 2011a)

1.2.5) Sekretion der miRNA in Körperflüssigkeiten

MiRNAs bzw. miRNA-Profile werden vor allem aus den entsprechenden Gewebeschnitten extrahiert und analysiert. Die Forschergruppe um Lawrie zeigte aber anhand DLBCL, dass spezifische miRNAs in humanen Blutseren nicht nur nachgewiesen werden können, sondern sowohl für die Diagnose als auch als prognostische Marker verwendet werden könnten. (Lawrie et al., 2008) Auch für Erkrankungen wie Diabetes, Lungenkarzinom, Kolorektale Karzinome (Chen et al., 2008b), Prostata Karzinom (Mitchell et al., 2008), Brustkrebs (Roth et al., 2010), Ovarialkarzinom (Resnick et al., 2009), Nierenzell Karzinom (Redova et al., 2012), Magenkarzinom (Tsujiura et al., 2010) und weitere konnten daraufhin veränderte miRNA-Profile im Blutserum beobachtet werden.

MiRNAs gelangen dabei nicht zufällig bei Zelllyse nach extrazellulär, sondern werden in biochemischen Gebilden wie Exosomen und Mikrovesikeln organisiert sekretiert. Diese biochemischen Schutzhüllen aus Lipoproteinen sind verantwortlich für die Stabilität der miRNAs gegenüber den RNAsen im Blut. Die Beständigkeit der miRNAs in Blutuntersuchungen könnte von besonderer Bedeutung in der Entwicklung noninvasiver Tests sein. (Kosaka et al., 2010) Des Weiteren werden miRNAs auch in anderen Körperflüssigkeiten gefunden (Weber et al., 2010) und mit entsprechenden Erkrankungen in Verbindung gebracht, wie es anhand von Sputum bei Nicht-kleinzelligen Lungen-Karzinom (Xie et al., 2010) oder Urin bei Urothelkarzinom (Snowdon et al., 2012) gezeigt wurde.

1.2.6) Extrazelluläre Wirkung der miRNA

Die Sekretion der miRNAs scheint nicht zufällig zu geschehen. Es wird weiterhin vermutet, dass miRNAs durch Rezeptoren vermittelte Endozytose oder Membranfusion in anderen Zellen wieder aufgenommen werden. MiRNAs können auf diese Weise von einer Zelle zu einer anderen Zelle transportiert werden, wie es für verschiedene Zelltypen, darunter auch Zellen des Immunsystems und von Tumorgewebe, gezeigt werden konnte. MiRNAs sind also im Stande, in anderen Zellen ihre Wirkung zu vermitteln. Sie können Zellprozesse anderer Gewebe, potenziell im gesamten Körper, modulieren und sind somit in der Lage, eine Art Zellkommunikation zu betreiben. Die genauen Zusammenhänge, wie, wann und warum es zur Sekretion bzw. zu Aufnahme kommt bzw. ob diese ebenfalls bestimmten Regulationsfaktoren unterliegen, sind noch nicht vollständig erforscht. (Kosaka et al., 2010; Vickers und Remaley, 2012)

1.2.7) Nachweisbarkeit in FFPE Präparaten

Aufgrund ihrer Kürze und der Einbindung in ein Proteinkomplex sind miRNA-Moleküle sehr stabil. Trotz langer Lagerungszeiten und chemischer Bearbeitung ist es möglich, sie aus FFPE-Präparaten (formalin fixed paraffin embedded) zu isolieren. (Nelson et al., 2004) Weiter konnte von verschiedenen Forschergruppen, darunter vom eigenen Institut, gezeigt werden, dass die Ergebnisse der miRNA-Analysen von FFPE-Präparaten mit denen aus frischen bzw. fresh-frozen-Geweben vergleichbar sind. (Xi et al., 2007; Hoefig et al., 2008; Doleshal et al., 2008) Untersuchungen auf miRNAs in archivierten FFPE-Präparaten sind somit gleichwertig zu Untersuchungen an frischem Gewebe und erlauben Rückschlüsse auf die miRNA Prozesse im lebenden Gewebe.

1.2.8) Möglichkeiten der miRNA

Die Anwendungsmöglichkeiten der miRNA scheinen vielfältig. Für die Forschung eröffnen sie einen tieferen Einblick in zelluläre Mechanismen des Körpers. Sie erweitern nicht nur das Verständnis der gesunden Prozesse und Zellinteraktionen, sondern auch der krankhaften Zustände. Vor allem die Stabilität und Nachweisbarkeit der miRNAs in FFPE-Präparaten ermöglicht, z.B. in dieser Arbeit,

langfristige retrospektive Studien. Dies ist von Nutzen, um nötige Fallzahlen auch bei seltenen Erkrankungen zu erreichen.

Im klinischen Gebrauch können die Eigenschaften der miRNAs sowohl für die Diagnostik als auch für die Therapie von Nutzen sein. MiRNAs tragen zur besseren Definition und Unterscheidung von Krankheiten bei. *(Lu et al., 2005)* Unter anderem gelang es einer Arbeitsgruppe aus Lübeck zu zeigen, dass mit Hilfe von miRNA-Analysen DLBCL und Follikuläre-Lymphome nicht nur von gesunden Geweben, sondern auch voneinander unterschieden werden können. *(Roehle et al., 2008)* Des Weiteren könnten miRNAs künftig diagnostische Verfahren vereinfachen, indem sie eine Diagnosestellung bzw. Verlaufskontrolle schon durch eine Blutentnahme oder Magensaftprobe anstatt durch aufwändigere Gewebeentnahme ermöglichen.

In der Therapie könnten miRNAs eine wichtige Rolle spielen. Krankheitsverursachende miRNAs könnten medikamentös beeinflusst oder krankheitshemmende miRNAs stimuliert werden. Auch könnte die Sensitivität des Tumorgewebes auf Chemotherapeutika durch miRNAs beeinflusst werden. *(Wu, 2010; Kasinski und Slack, 2011)*

1.3) Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Zusammenhang zwischen der Expression einzelner miRNAs und der Entstehung einer Entzündungsreaktion sowie eines MALT-Lymphoms des Magens aufzuzeigen.

Hypothese ist, dass einige miRNAs signifikant verstärkt oder vermindert in der malignen Transformation auftreten. Sie weisen somit auf eine essentielle Bedeutung dieser miRNAs bei der Entzündungsreaktion- und Lymphomentstehung hin. Die Detektion und Beschreibung von bestimmten miRNAs mit veränderter Expression könnte sowohl einen tieferen Einblick in die Biologie der Tumorgenese eröffnen als auch zu Fortschritten in der Diagnostik und Therapie dieser Erkrankung führen.

Aus diesem Grund sollen miRNA-Profile von humanen Magenbiopsaten verschiedener Ausprägung von Entzündung und von Lymphom erstellt werden. Das Probenmaterial soll aus FFPE-Präparaten des Archivs des pathologischen Instituts Lübecks akquiriert werden. Die miRNA-Profile werden durch qPCR Analyse erstellt. Zur besseren Beschreibung und Vergleichbarkeit der Studiengruppe werden Informationen über IgH-Monoklonalität und mittels FISH-Analyse gefundene genetische Aberrationen ausgewertet.

Die Arbeit besteht aus zwei Teilen: Die initiale Studie und die Kontrollstudie. Mit der initialen Studie soll grundlegend auf signifikante miRNAs untersucht werden, um diese in der Kontrollstudie im Sinne einer Verifikationsanalyse an einem zweiten unabhängigen Kollektiv zu bestätigen.

2) Material und Methoden

2.1) Ethikkommission

Der Antrag (Aktenzeichen: 09-006) für die Verwendung humanen Materials in dieser Arbeit wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck am 27. Januar 2009 genehmigt.

2.2) Projektfinanzierung

Die Arbeit und die darin enthaltenen Material- und Personalkosten wurden durch eine Förderung der Deutschen Forschungsgesellschaft finanziert (Aktenzeichen: TH 813/4-1). Weitere finanzielle Abhängigkeiten liegen nicht vor.

2.3) Fallidentifikation

Die initiale Studie beinhaltet 68 Fälle (siehe Tabelle 2), die aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck identifiziert wurden. Es handelt sich um FFPE-Präparate von Biopsien von Gastroskopien und Gastrektomien aus den Jahren 2005 bis 2010. Die Fälle und die Angaben aus der Datenbank wurden anonymisiert. Alle Fälle wurden erneut mikroskopiert sowie mithilfe von HE und immunhisto-chemisch gefärbten Präparaten in die Stadien nach Wotherspoon eingeteilt (siehe Abb.1 bis Abb.6; siehe Tabelle 1). Präparate mit Ulkus, intestinaler Metaplasie oder starken Granulozyteninfiltraten wurden verworfen, um eventuelle Einwirkungen auf die miRNA-Profile auszuschließen. Informationen über den PCR-Nachweis von IgH-Monoklonalität nach BIOMED2 Protokoll (*van Dongen et al., 2003; van Krieken et al., 2007*) wurden aus den Aufzeichnungen übernommen.

Tabelle 2: Fallzahlen pro Wotherspoon-Stadium der initialen Studie

Wotherspoon-Stadium	Fallzahl
0 („normal“)	14
I („chronisch aktive Gastritis“)	10
II („chronisch aktive Gastritis mit Lymphfollikel“)	11
III („lymphozytäres Infiltrat wahrscheinlich reaktiv“)	11
IV („lymphozytäres Infiltrat wahrscheinlich Lymphom“)	10
V („extranodales Marginalzonen Lymphom vom MALT-Typ“)	12

2.4) *Präparation des Materials*

2.4.1) *Probenentnahme*

Den FFPE-Präparaten wurden 4x20 µm Schnitte – somit ca. 0,24 mm² – entnommen. Die richtige Position der Probenentnahme wurde durch HE-gefärbte Präparate vor und nach Entnahme gesichert.

2.4.2) *Extraktion aus FFPE*

Die Extraktion der RNA aus FFPE erfolgte mit dem „RecoverAll Kit“. Der Ablauf entspricht den Angaben des Herstellers.

„RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit – optimized for FFPE Samples“
AM1975

Ambion Inc.

2130 Woodward St.; Austin; Texas 78744-1837; USA

Die RNA-Konzentration der Proben wurde mit dem „NanoDrop“-Spectrophotometer System gemessen. Für jeden Fall wurde eine Menge von mindestens 4800ng RNA erbracht.

„NanoDrop-Spectrometer ND 1000“

NanoDrop Technologies

3411 Silverside Rd; Bancroft Building; Wilmington; DE 19810; USA

2.5) RNA in cDNA Erststrang

Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase ist es möglich, RNA-Sequenzen in ihre komplementäre DNA (cDNA) zu überschreiben, um diese somit für die herkömmliche PCR nutzbar zu machen. (*Spiegelman et al., 1971*)

In dieser Arbeit wurden für die Reverse Transkriptase PCR 4800 ng RNA je Fall verwendet, so dass pro Well der 384-Well-Platte nach Abzug von Pipetierüberhang mindestens 10 ng RNA Material vorlag. Als Primer und Reverse Transkriptase wurde „TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit“ nach den Angaben des Herstellers verwendet.

„TaqMan Human MicroRNA Assay Set, 446 miRNAs“ (4383443)

„TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit“ (4366597)
Applied Biosystems, Inc.
850 Lincoln Centre Drive; Foster City; CA 94404; USA

„Nuclease-free Water“
Ambion Inc.
2130 Woodward St.; Austin; Texas 78744-1837; USA

Ein Reaktionsansatz von 7,5 µl pro Well der 384-Well-Platte beinhaltete:

- 1) 4,581 µl RNA (10 ng RNA mit Nuklease-freiem H₂O ins Verhältnis gemischt)
- 2) 1,5 µl 5x Primer
- 3) 0,075 µl dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
- 4) 0,5 µl RT (Reverse Transkriptase)
- 5) 0,75 µl 10x RT- Puffer
- 7) 0,094 µl RNase-Inhibitor

Um effektiver arbeiten zu können, wurden die aufwendigen Pipettierschritte zum Teil von dem „Biomek NXP“ Roboter durchgeführt.

„Biomek NXP“
Beckman Coulter, Inc.
250 South Kraemer Boulevard; Brea CA 92821-6232; USA

Der Reverse Transkriptase PCR erfolgte im „T1 Biometric Thermocycler“ nach folgenden Einstellungen:

„T1 Biometric Thermocycler“
Biometra GmbH
Rudolf-Wissell-Str. 30; 37079 Göttingen; Deutschland

Einstellung des T1 Biometric Thermocycler:

- 1) 30 Minuten bei 16°C
- 2) 30 Minuten bei 42°C
- 3) 5 Minuten bei 85°C
- 4) Abkühlen auf 4°C

2.6) *qPCR und miRNA-Profile*

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen, die seit ihrer Erfindung 1983 von Kary Mullis zu einer Standardprozedur bei der Analyse von genetischem Material geworden ist und verschiedene Erweiterungen erfahren hat. (*Saiki et al., 1988*)

In dieser Arbeit wird eine quantitative PCR (qPCR), auch real-time PCR (rt-PCR) genannt, mit 376 verschiedene fluoreszierenden miRNA Primern (TaqMan Human MicroRNA) verwendet. Bei einer qPCR ist bereits während der vielen Amplifikationszyklen eine Auswertung möglich, denn die fluoreszierenden Primer ändern ihr Verhalten bei Anlagerung an die Ziel-miRNA. Im Falle von TaqMan-Primer kommt es während der Arbeit der Polymerase in der Amplifikationphase zur Trennung des die Fluoreszenz unterdrückenden Anteils vom fluoreszierenden Anteils der Primer, so dass daraufhin detektierbare Leuchtsignale entstehen.

„TaqMan Human MicroRNA Assay Set, 446 miRNAs“ (4383443)

„TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG“ (4324020)
Applied Biosystems, Inc.
850 Lincoln Centre Drive; Foster City; CA 94404; USA

„Nuclease-free Water“
Ambion Inc.
2130 Woodward St.; Austin; Texas 78744-1837; USA

Ein Reaktionsansatz von 10 µl pro Well der 384Well Platte beinhaltetete:

- 1) 0,67 µl cDNA
- 2) 1 µl 20x Primer
- 3) 5 µl TaqMan Master Mix
- 4) 3,33 µl Nuklease freies H₂O

Erneut kam der „Biomek NXP“ Roboter zum Einsatz.

„Biomek NXP“
Beckman Coulter, Inc.
250 South Kraemer Boulevard; Brea CA 92821-6232; USA

Die qPCR-Analysen wurden mit Hilfe des „Lightcycler 480“ durchgeführt und die CT-Werte der einzelnen miRNA-Profile ermittelt. In vorhergegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die qPCR-Analyse des „Lightcycler 480“ den Geräten von Applied Biosystems gleichwertig ist (*Roehle et al., 2008*) und somit für die Analyse der TaqMan-Primer verwendet werden kann.

„Lightcycler 480 Real-Time PCR Systems“
Roche AG
Grenzacherstrasse 124; 4070 Basel; Schweiz

Einstellung des Lightcycler 480:

- 1) Enzym Aktivierung: 10 Minuten bei 95°C
- 2) Amplifikation mit 40 Zyklen:
 - 15 Sekunden auf 95°C (Rampe 4,4°C/sek; Analyse)
 - 1 Minute bei 60°C (Rampe 2,2°C/sek)
- 3) Abkühlen: 30 Sekunden 40°C (Rampe 2°C/sek)

Als Cycle Treshold (CT) Wert, auch Crossing Point (CP) Wert genannt, wird die Anzahl von Zyklen bezeichnet, die es benötigt, bis die gemessene Fluoreszenz des Markers signifikant größer ist als die Grundfluoreszenz der Lösung. Der CT-Wert gibt also den Zeitpunkt des ersten eindeutigen Nachweises des spezifisch fluoreszierenden Markers an. Die Fluoreszenz sollte daraufhin eine exponentielle Kurve der PCR-Amplifikation beschreiben und erst zum Ende aufgrund des Verbrauch an Substraten davon abweichen. Eine miRNA mit niedrigem CT-Wert lag demnach in der ursprünglichen Lösung in großer Menge, eine miRNA mit hohem CT-Wert dagegen in kleiner Menge vor. Somit sind verminderte CT-Werte mit einer vermehrten Expression derjenigen miRNA gleich zu setzen. Konnte eine

miRNA bis zum Ablauf der 40 Analysezyklen nicht detektiert werden, gilt sie als nicht enthalten und ihr CT-Wert wurde auf 40 gesetzt. Bei einer PCR mit 40 Zyklen (ca. 1 Billion Vervielfältigung) kann man davon ausgehen, dass selbst nur eine einzige nachzuweisende miRNA zu fluoreszieren begonnen hätte.

2.7) *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)*

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren, das es ermöglicht, bestimmte bekannte DNA-Sequenzen nachzuweisen. Dazu werden komplementäre Nukleinsäure-Sequenzen mit einem Signalstoff verbunden, so dass sie nach Anlagerung an die zu untersuchenden DNA ihre Position anzeigen. (*Pardue und Gall, 1969*) Soweit Material vorhanden, wurden in dieser Arbeit alle Fälle der Wotherspoon Stadien IV und V der initialen Studie mittels FISH auf eventuelle Veränderungen des MALT1 Gen untersucht. Insgesamt konnten 16 Untersuchungen durchgeführt werden. Verwendet wurde die „Dual Color Break apart probe for LSI MALT1 (18q21)“ nach Protokoll des Herstellers. Diese kann ein Auseinandergehen von benachbarten Sequenzen im MALT1 Gen anzeigen und somit implizieren, dass Translokationen wie t(11;18)(q21;q21) oder t(14;18)(q21;q32) stattgefunden haben.

„Vysis LSI MALT1 (18q21) Dual Color Break Apart Rearrangement Probe“
Abbott Laboratories
100 Abbott Park Road; Abbott Park; Illinois 60064-3500; USA

2.8) *Statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung wurde durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck (Direktor Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Andreas Ziegler, Projektbetreuer Dipl.-Math. oec. Andrea Senft und Dipl.-Inform. Silke Szymczak) durchgeführt. Zur Auswertung wurde die Statistik-Software „R“ Version 2.11.1 (2010-05-31) benutzt. Ausgeschlossen wurden Fälle (n=3), in denen mehr als 45% der miRNA nicht detektierbar waren (CT=40). Des Weiteren wurden miRNAs (n=103) ausgeschlossen, die in mehr als 50% der Fälle nicht detektierbar waren (CT=40). Die Daten wurden einer quantilen Normalisierung unterzogen, um

die Untersuchungsergebnisse hinsichtlich ihrer Expressionsintensität miteinander vergleichbar zu machen. (Meyer et al., 2010)

Mit dem Jonckheere-Terpstra-Test wurde speziell hinsichtlich der Möglichkeit von Trends der Expressionswerte zwischen den Wotherspoon-Stadien getestet und daraufhin die Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Weiterhin fand eine Einteilung der Daten in drei Gruppen nach „Gesund“, „Gastritis“ und „MALT-Lymphom“ statt (siehe Tabelle 3), um auf eine signifikante Unterscheidung dieser Zustände zu untersuchen. MiRNAs der Wotherspoon-Stadien III und IV, deren Klonalität unbekannt war, entfielen in der Gruppeneinteilung (n=1). Mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde speziell getestet, ob Gruppe 2 („Gastritis“) und 3 („MALT-Lymphom“) sich in ihren Expressionswerten voneinander unterscheiden. Daraufhin wurde die Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

Tabelle 3: Gruppierung der Fälle der initialen Studie; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test um signifikant unterschiedlich exprimierte miRNAs der Gruppe 2 („Gastritis“) und 3 („MALT-Lymphom“) zu identifizieren

Gruppierung	Einschlusskriterien	Fallzahl
Gruppe 1 („Gesund“)	Fälle des Wotherspoon-Stadiums 0	13
Gruppe 2 („Gastritis“)	Fälle der Wotherspoon-Stadien I und II sowie Fälle der Wotherspoon-Stadien III und IV ohne Nachweis von Klonalität	33
Gruppe 3 („MALT-Lymphom“)	Fälle der Wotherspoon-Stadien III und IV mit Nachweis von Klonalität sowie Fälle des Wotherspoon-Stadiums V	18

2.9) Kontrollstudie – Verifikationsanalyse

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit und somit zur Bestätigung der Ergebnisse wurde eine Verifikationsanalyse – die Kontrollstudie – durchgeführt.

Dafür wurden weitere 60 FFPE-Präparate von Biopsien von Gastroskopien und Gastrektomien aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck identifiziert (siehe Tabelle 4). Sie stammen aus den Jahren 2005 bis 2011. Die Fälle und Datenbankangaben wurden anonymisiert. Stadieneinteilung und Ausschlussverfahren entsprachen dem Prozedere der initialen Studie.

Tabelle 4: Fallzahlen pro Wotherspoon-Stadium der Kontrollstudie

Wotherspoon-Stadium	Fallzahl
0 („normal“)	10
I („chronisch aktive Gastritis“)	10
II („chronisch aktive Gastritis mit Lymphfollikel“)	10
III („lymphozytäres Infiltrat wahrscheinlich reaktiv“)	10
IV („lymphozytäres Infiltrat wahrscheinlich Lymphom“)	10
V („extranodales Marginalzonen Lymphom vom MALT-Typ“)	10

In der Kontrollstudie wurden 20 miRNAs verwendet, die in der initialen Studie signifikant waren. Materialien, Geräte und Ablauf der Untersuchungen sind die selben wie in der initialen Studie. Es fanden jedoch keine FISH-Untersuchungen statt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck (Direktor Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Andreas Ziegler, Projektbetreuer Dipl.-Math. oec. Andrea Senft und Dipl.-Inform. Silke Szymczak). Zur Auswertung wurde die Statistik-Software „R“ Version 2.11.1 (2010-05-31) benutzt. Ausgeschlossen wurden sowohl Fälle (n=1), in denen mehr als 15% der miRNAs nicht detektierbar (CT=40) waren, als auch miRNAs (n=0), die in mehr als 50% der Fälle nicht detektierbar waren (CT=40).

Die Daten wurden mittels housekeeping miRNA U6 (RNU6B) normalisiert. Als „housekeeping“ bezeichnet man eine miRNA, die in allen Gewebeproben gleich exprimiert wird und somit die zahlreichen Untersuchungen miteinander vergleichbar macht. (Meyer *et al.*, 2010) In der Kontrollstudie wurden je Fall 3 miRNA U6 Messungen durchgeführt und mit den Mittelwerten aus diesen Ergebnissen die Fälle miteinander normalisiert. Wiederum wurden Jonckheere-Terpstra-Test und Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

Die Werte der 6 Wotherspoon-Stadien wurden - wie in der initialen Studie - in Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1 („Gesund“; n=10), Gruppe 2 („Gastritis“; n=30), Gruppe 3 („MALT-Lymphom“; n=17) MiRNAs der Wotherspoon-Stadien III und IV, deren Klonalität unbekannt war, entfielen in der Gruppeneinteilung (n=2). Mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und Bonferroni-Korrektur wurden die Gruppen 2 („Gastritis“) und 3 („MALT-Lymphom“) miteinander verglichen.

3) Ergebnisse

3.1) *Initiale Studie*

Alle Fälle wurden mithilfe von HE- und immunhistochemisch gefärbten Präparaten in die Stadien nach Wotherspoon eingeteilt (siehe Abb.1 bis Abb.6; siehe Tabelle1) und die richtige Position der Probenentnahme kontrolliert.

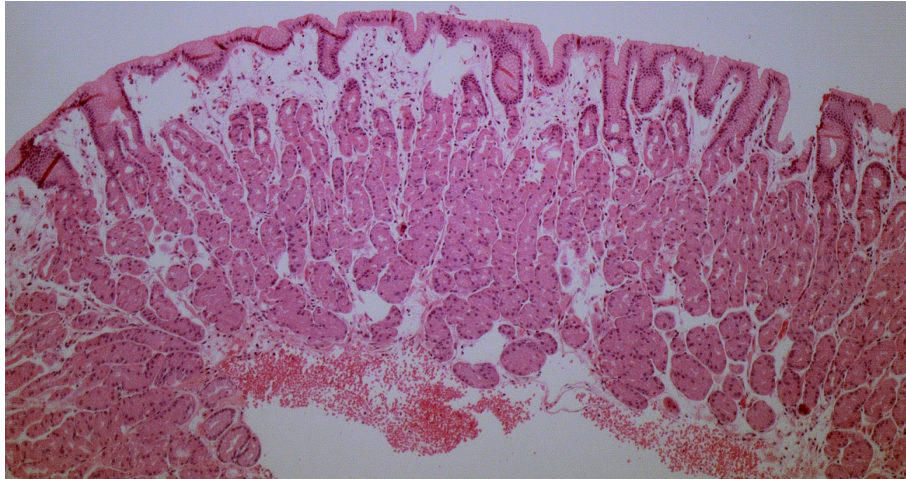


Abb.1: Mikroskopisches Bild der Magenschleimhaut (Probe aus der initialen Studie) in HE-Färbung und 40facher Vergrößerung. Zu sehen ist der typische Drüsenaufbau gesunder Magenmukosa (Wotherspoon-Stadium 0) mit nur vereinzelt aufzufindenden Lymphozyten.

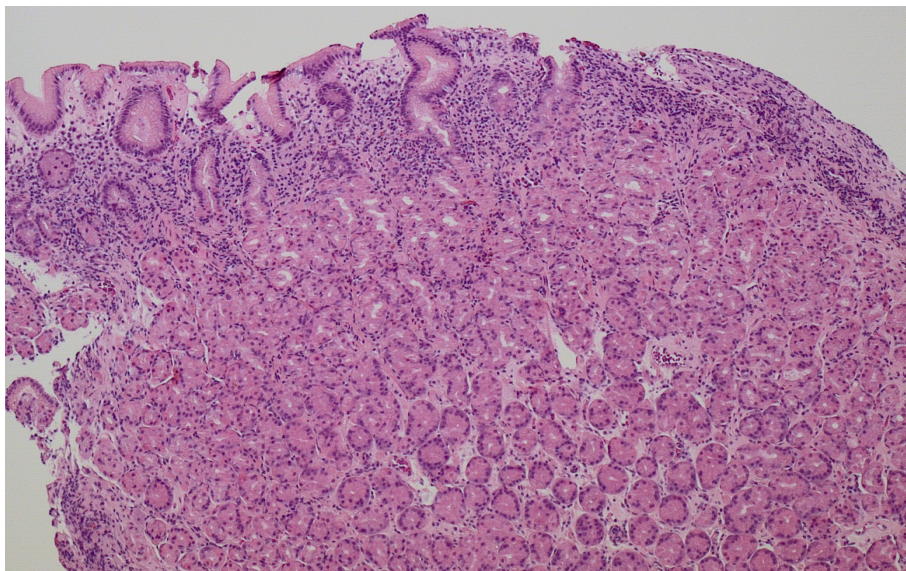


Abb.2: Mikroskopisches Bild der Magenschleimhaut (Probe aus der initialen Studie) in HE-Färbung und 40facher Vergrößerung. Zu sehen sind die typischen Strukturen der Magenmukosa mit verstreut zu findenden Lymphozyten gemäß einem Wotherspoon-Stadium I (chronisch aktive Gastritis).

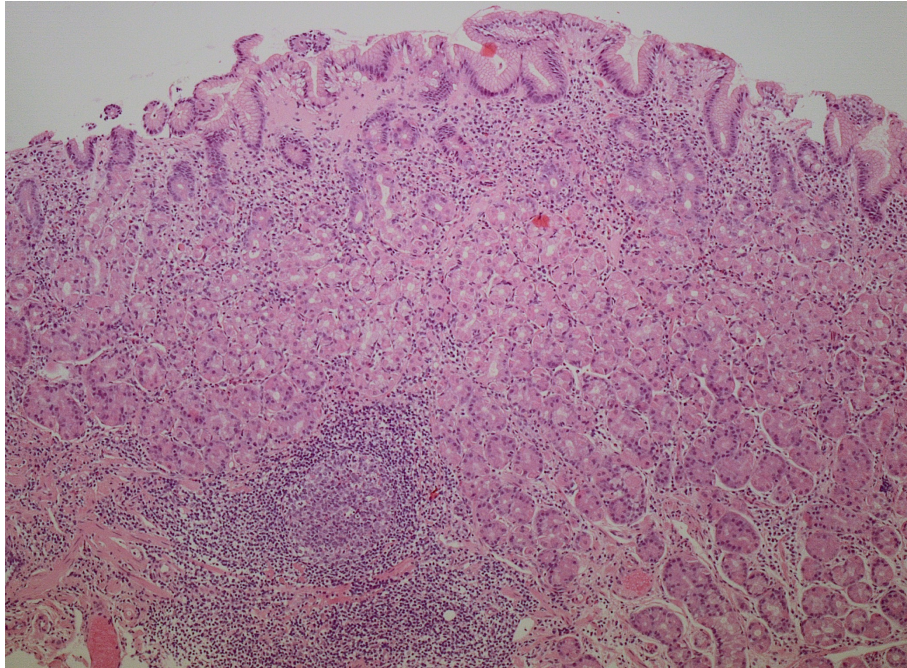


Abb.3: Mikroskopisches Bild der Magenschleimhaut (Probe aus der initialen Studie) in HE-Färbung und 40facher Vergrößerung. Die Abbildung zeigt die Magenmukosa mit vermehrt zu findenden Lymphozyten und prominenten Lymphfollikel entsprechend einem Wotherspoon-Stadium II (chronisch aktive Gastritis).

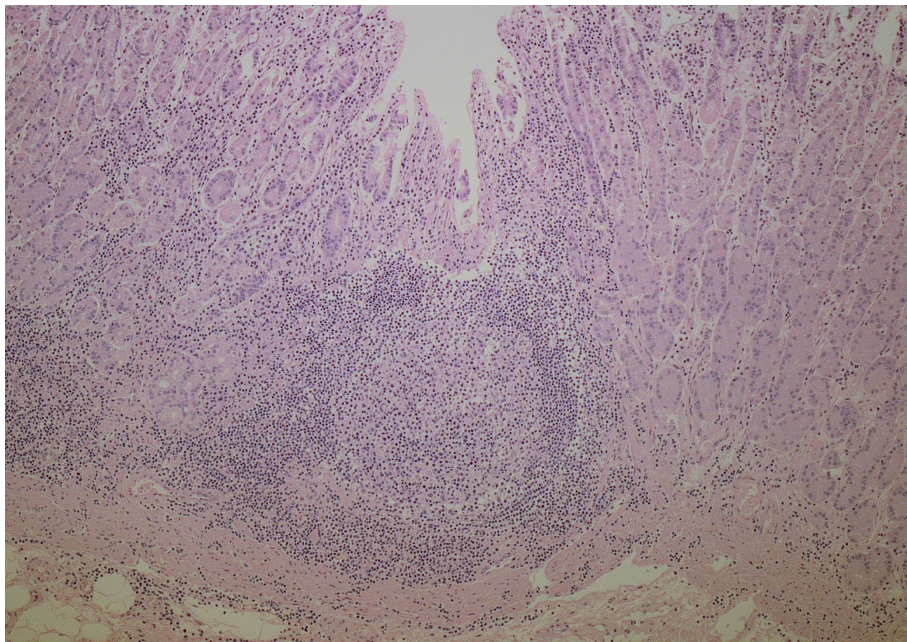


Abb.4a: Mikroskopisches Bild der Magenschleimhaut (Probe aus der initialen Studie) in HE-Färbung und 40facher Vergrößerung. Zu sehen ist Magenmukosa, in der flächenhaft Lymphozyten und prominente Lymphfollikel zu finden sind. Mit dem Nachweis von vereinzelt lymphoepithelialen Läsionen (LEL) (siehe Abb.4b) entspricht dies einem Wotherspoon-Stadium III.

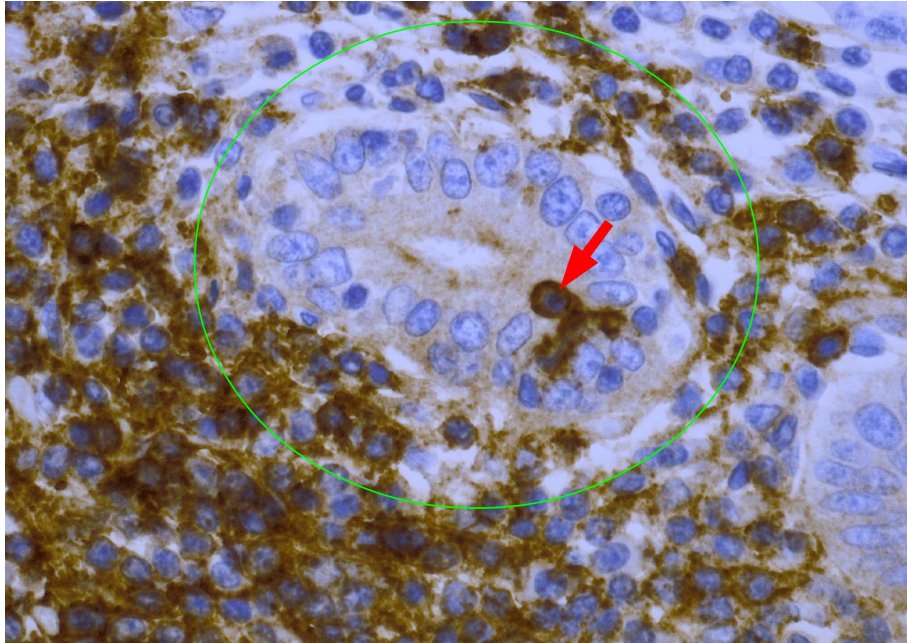


Abb.4b: CD20 immunhistochemisch gefärbter (braun) Ausschnitt der Abb.4a in 400facher Vergrößerung. Zu erkennen ist ein Querschnitt durch eine Magendrüse (grüner Kreis), in die ein Lymphozyt (roter Pfeil) vordringt – eine sogenannte lymphoepitheliale Läsion (LEL) – typisch für Wotherspoon-Stadium III.

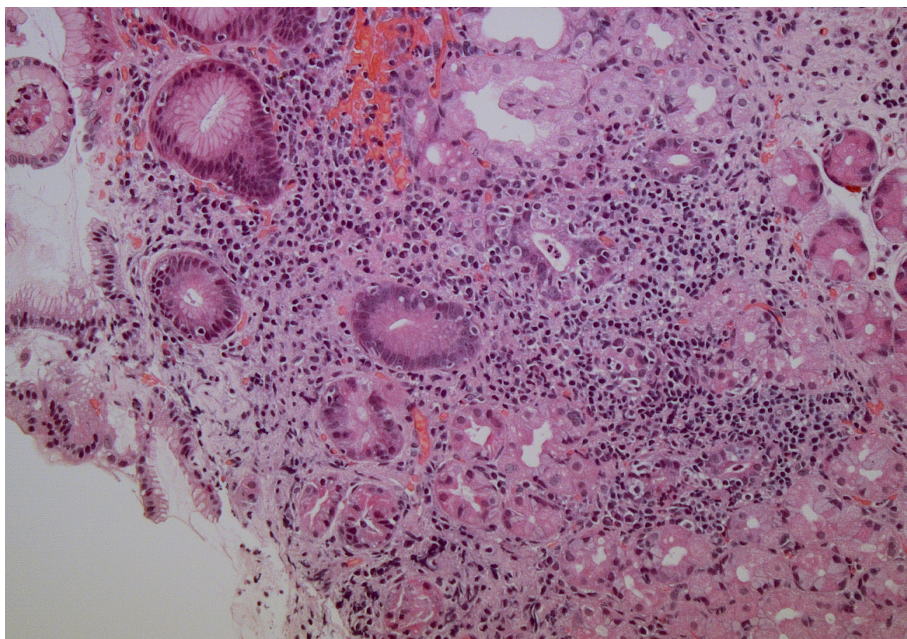


Abb.5a: Mikroskopisches Bild der Magenschleimhaut (Probe aus der initialen Studie) in HE-Färbung und 100facher Vergrößerung. Die Abbildung zeigt große Lymphozyteninfiltrate, die beginnen, die Drüsenstruktur der Mukosa zu verdrängen und zu destruieren – entspricht Wotherspoon-Stadium IV.

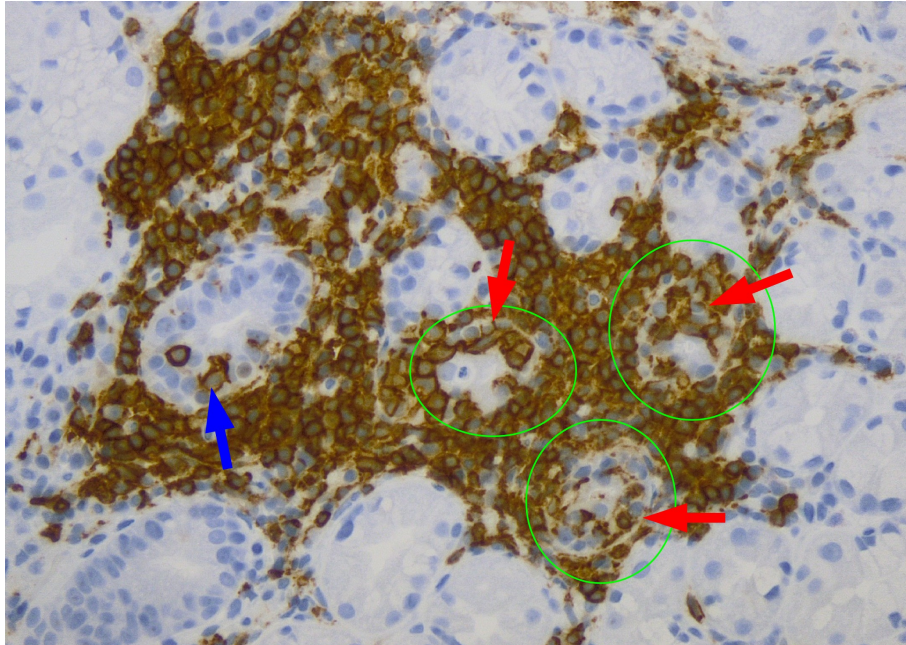


Abb.5b: CD20 immunhistochemisch gefärbter (braun) Ausschnitt der Abb.5a in 200facher Vergrößerung. Zu erkennen ist ein Querschnitt durch Magendrüsen (grüne Kreise) mit sowohl einzelnen (blauer Pfeil) als vor allem auch Gruppen von Lymphozyten (rote Pfeile), die in das Epithel vordringen und den Drüsenaufbau zerstören – sogenannte lymphoepitheliale Läsionen (LEL).

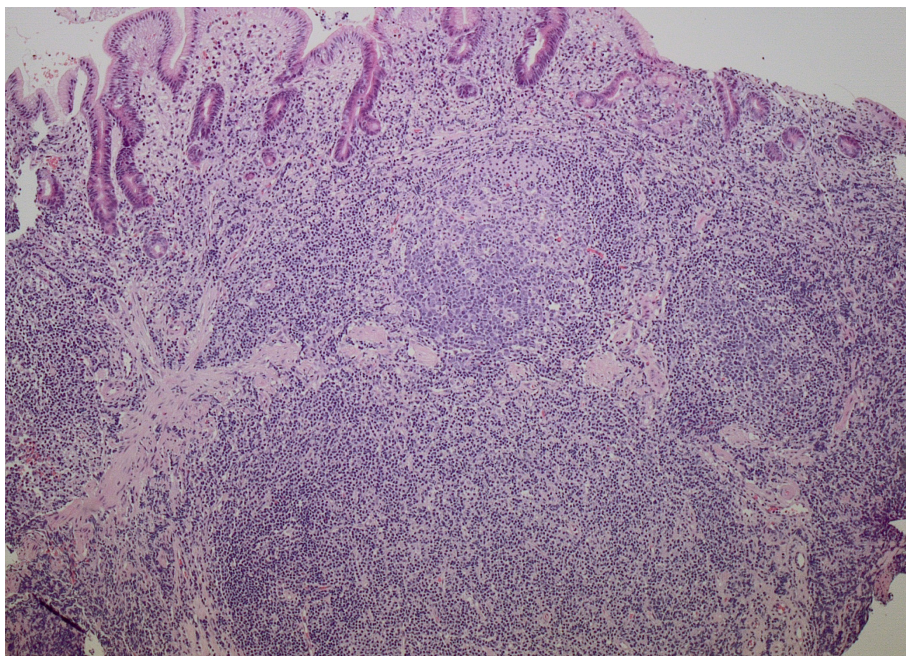


Abb.6: Mikroskopisches Bild der Magenschleimhaut (Probe aus der initialen Studie) in HE-Färbung und 40facher Vergrößerung. Deutlich sichtbar ist ein dichtes, diffuses lymphozytäres Infiltrat mit arealweise völliger Destruktion der typischen Strukturen der Magenmukosa gemäß einem Wotherspoon-Stadium V.

Die Untersuchungen auf Monoklonalität in den Wotherspoon-Stadien III, IV und V wurden mittels PCR auf IGH-Locus nach Biomed2 Protokoll durchgeführt. Ein monoklonales Bild ergab sich in 1 (9%), 5 (50%) und 12 (100%) der Fälle.

Die FISH-Untersuchung auf das Vorhandensein von Translokationen wurde in 16 Fällen der Wotherspoon-Stadien IV und V der initialen Studie durchgeführt. Sie erbrachte 13 (81,3%) negative und drei (18,7%) positive Fälle. Zwei (25%) der positiven Fälle sind aus dem Wotherspoon-Stadium V, einer (12,5%) der positiven Fälle aus dem Wotherspoon-Stadium IV.

Der Jonckheere-Terpstra-Test erbrachte 41 (15% der 273 gewerteten miRNAs) signifikante miRNAs. Davon stiegen die Expressionswerte von 33 miRNAs an und fielen bei acht miRNAs hingegen ab (siehe Tabelle 5). In Boxplot-Diagrammen zeigen die miRNAs vornehmlich linear ansteigende oder abfallende Verläufe. Bei einigen miRNAs ist zu erkennen, dass sich ihre Expressionswerte in pathologischen Stadien stark vom Gesunden unterscheiden, innerhalb der Stadien aber weniger stark verändern (siehe Abb. 7 bis 11 und Anhang).

Tabelle 5: Signifikant veränderte miRNAs im Jonckheere-Terpstra-Test und Bonferroni-Korrektur der initialen Studie

	miRNA	mittlere Differenz	Konfidenzintervall	p-Wert (nicht adjustiert)
1	miR.150	3.48	[3.13, 3.94]	1.19e-11
2	miR.518b	2.68	[1.91, 3.57]	1.86e-10
3	miR.566	3.01	[2.15, 4.87]	2.57e-10
4	miR.142.3p	5.03	[3.65, 6.16]	3.46e-10
5	miR.142.5p	2.85	[2.25, 3.54]	5.38e-09
6	miR.494	3.63	[2.19, 4.33]	7.90e-09
7	miR.182	-1.77	[-2.34, -1.13]	2.24e-08
8	miR.575	2.34	[1.60, 3.13]	3.44e-08
9	miR.198	1.93	[1.19, 2.66]	6.31e-08
10	miR.375	-2.19	[-2.90, -1.59]	7.35e-08
11	miR.138	3.45	[2.64, 4.60]	9.01e-08
12	miR.572	2.56	[1.79, 3.14]	1.65e-07
13	miR.124a	2.24	[1.43, 3.34]	1.95e-07
14	miR.519d	2.72	[1.87, 3.62]	3.04e-07

15	miR.335	-1.95	[-2.67, -1.14]	4.24e-07
16	miR.155	5.47	[4.17, 6.83]	6.47e-07
17	miR.202	1.56	[0.84, 2.19]	6.47e-07
18	miR.429	-2.42	[-3.29, -1.57]	6.87e-07
19	miR.188	1.81	[1.01, 2.68]	7.29e-07
20	miR.153	-2.57	[-3.80, -1.44]	1.21e-06
21	miR.135a	-2.31	[-3.30, -1.42]	1.93e-06
22	miR.584	2.19	[1.33, 3.18]	2.50e-06
23	miR.612	2.64	[1.87, 4.29]	3.02e-06
24	miR.596	1.26	[0.79, 1.84]	5.28e-06
25	miR.346	2.34	[1.29, 3.37]	7.99e-06
26	miR.550	1.43	[0.77, 1.95]	1.08e-05
27	miR.100	1.20	[0.81, 1.52]	1.33e-05
28	miR.199a	1.50	[0.78, 2.13]	2.88e-05
29	miR.148a	-2.06	[-3.16, -0.87]	3.62e-05
30	miR.601	1.48	[0.82, 2.30]	4.73e-05
31	miR.342	1.28	[0.73, 1.91]	4.96e-05
32	miR.604	1.40	[0.83, 1.97]	5.63e-05
33	miR.7	-3.59	[-5.10, -1.28]	6.17e-05
34	miR.149	1.01	[0.45, 1.46]	8.99e-05
35	miR.549	1.68	[0.70, 2.47]	9.52e-05
36	miR.212	1.01	[0.51, 2.49]	1.16e-04
37	miR.361	1.54	[0.62, 2.09]	1.25e-04
38	miR.492	1.78	[0.57, 2.79]	1.33e-04
39	miR.23b	1.38	[0.61, 1.89]	1.64e-04
40	let.7f	-1.20	[-1.82, -0.66]	1.72e-04
41	miR.565	1.89	[1.02, 3.08]	1.80e-04

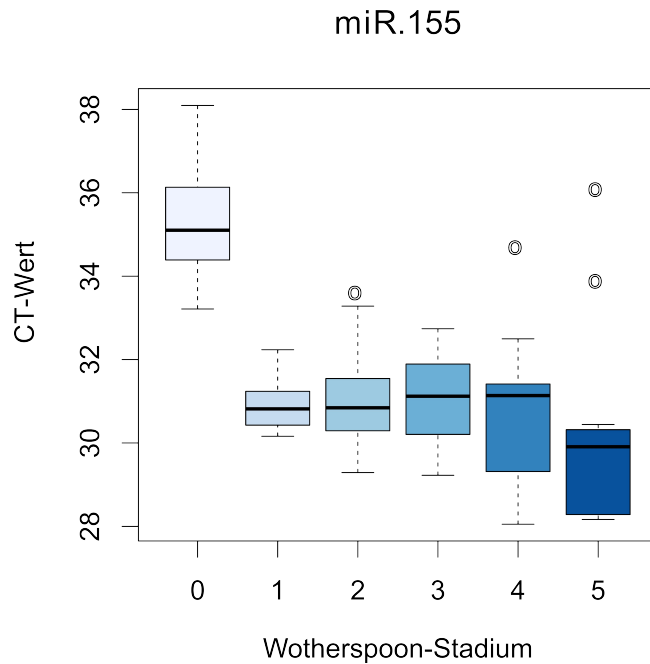


Abb.7: Boxplot-Diagramm der miR.155 der initialen Studie – p-Wert = 6.47×10^{-7} (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Wotherspoon-Stadien. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median an; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)

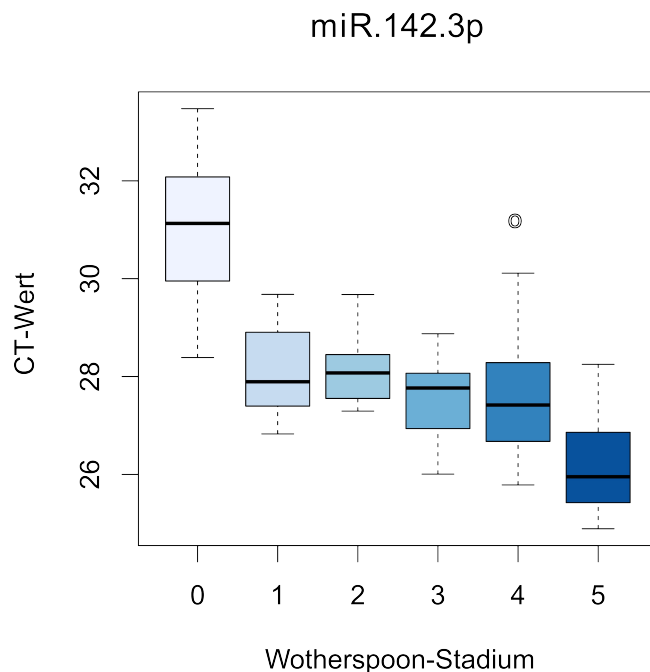


Abb.8: Boxplot-Diagramm der miR.142.3p der initialen Studie – p-Wert= 3.46×10^{-10} (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Wotherspoon-Stadien. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median an; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)

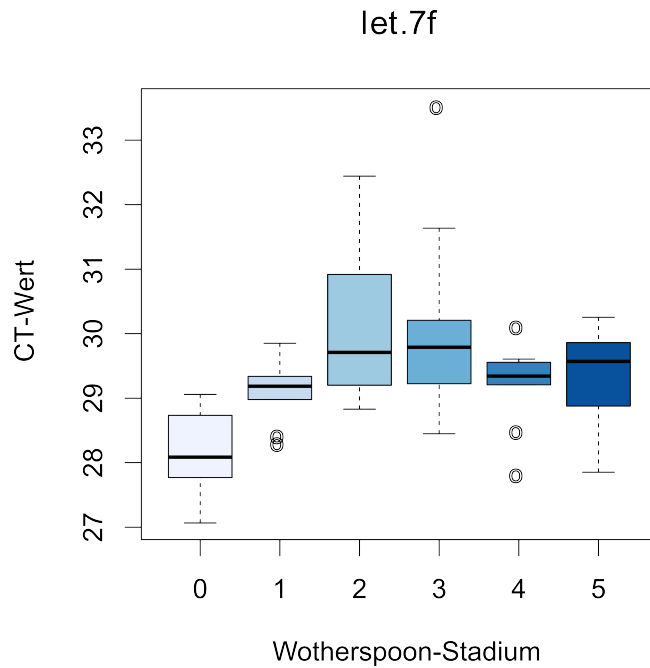


Abb.9: Boxplot-Diagramm der let.7f der initialen Studie – p-Wert = 1.72×10^{-4} (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Wotherspoon-Stadien. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median an; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)

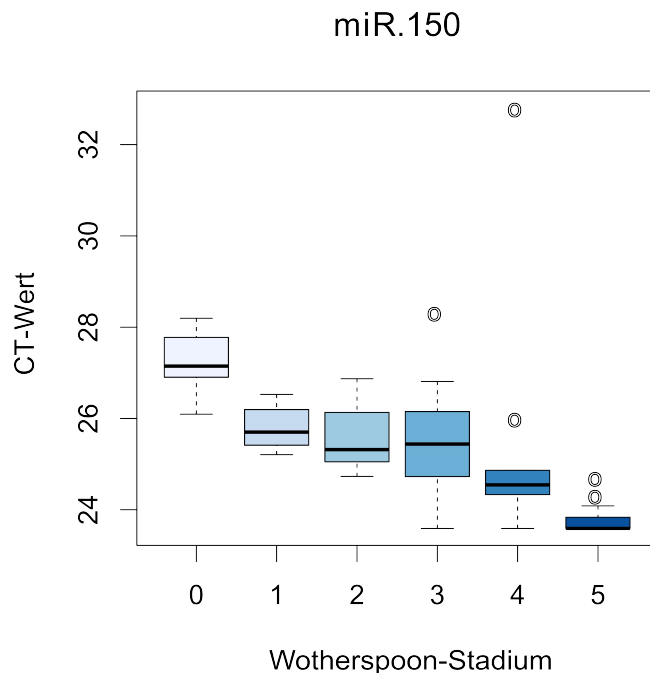


Abb.10: Boxplot-Diagramm der miR.150 der initialen Studie – p-Wert = 1.19×10^{-11} (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Wotherspoon-Stadien. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median an; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)

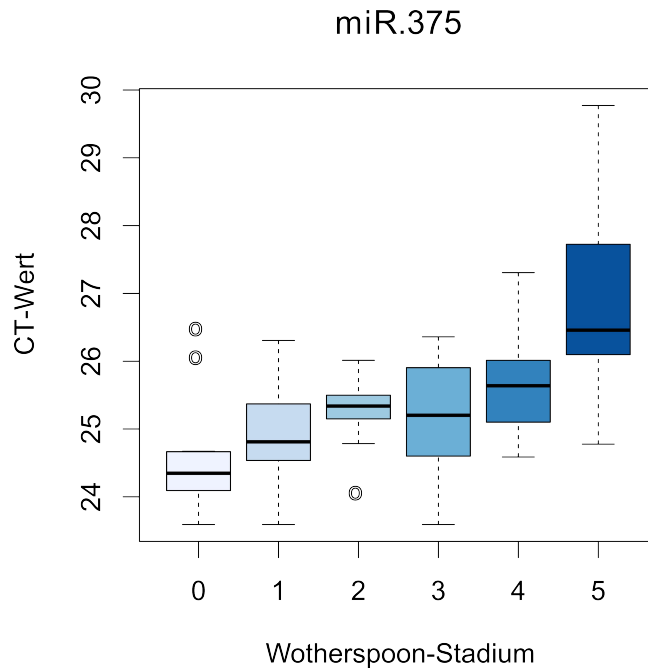


Abb.11: Boxplot-Diagramm der miR.375 der initialen Studie – p-Wert = 7.35×10^{-08} (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Wotherspoon-Stadien. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median an; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)

Im Vergleichstest Wilcoxon-Mann-Whitney-Test der Gruppe 2 („Gastritis“: Fälle der Wotherspoon-Stadien I und II sowie Fälle der Wotherspoon-Stadien III und IV ohne Nachweis von Klonalität) und Gruppe 3 („MALT-Lymphom“: Fälle der Wotherspoon-Stadien III und IV mit Nachweis von Klonalität sowie Fälle des Wotherspoon-Stadiums V) waren fünf miRNAs (12% der 273) signifikant unterschiedlich. Vier dieser miRNAs weisen erhöhte Expressionswerte in „MALT-Lymphom“ gegenüber „Gastritis“ auf. Nur eine miRNA ist in der „Gastritis“-Gruppe stärker exprimiert als in der „MALT-Lymphom“-Gruppe (siehe Tabelle 6, siehe Abb.12 und Abb.13).

Tabelle 6: Signifikant unterschiedlich exprimierte miRNAs im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zum Vergleich der Gruppe 2 („Gastritis“) und Gruppe 3 („MALT-Lymphom“) und Bonferroni-Korrektur der initialen Studie

	miRNA	mittlere Differenz	Konfidenzintervall	p-Wert (nicht adjustiert)
1	miR.150	1.47	[1.03, 1.98]	1.21e-05
2	miR.550	0.92	[0.52, 1.27]	2.54e-05
3	miR.124a	1.56	[0.94, 2.05]	5.44e-05
4	miR.518b	1.21	[0.58, 1.71]	9.95e-05
5	miR.539	-1.12	[-1.67, -0.50]	1.37e-04

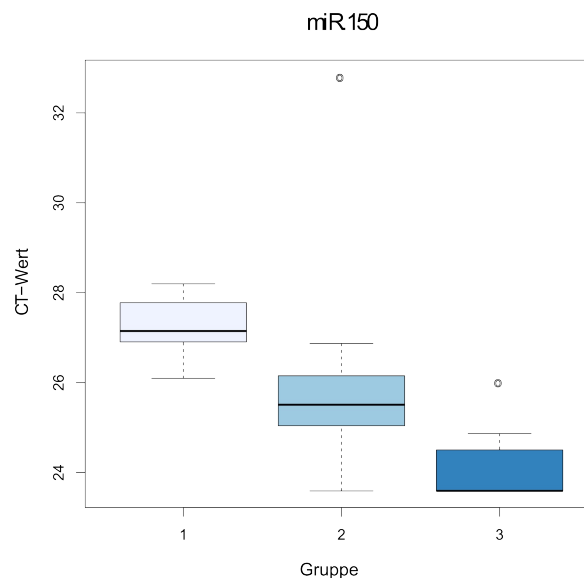


Abb.12: Boxplot-Diagramm der miR.150 der initialen Studie – p-Wert = 1.21×10^{-5} (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Gruppen 1 („Gesund“), 2 („Gastritis“) und 3 („MALT-Lymphom“). Die Gruppe 1 wird nur zur Veranschaulichung gezeigt, im Vergleichstest Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurden Gruppe 2 und 3 miteinander verglichen. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median an; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)

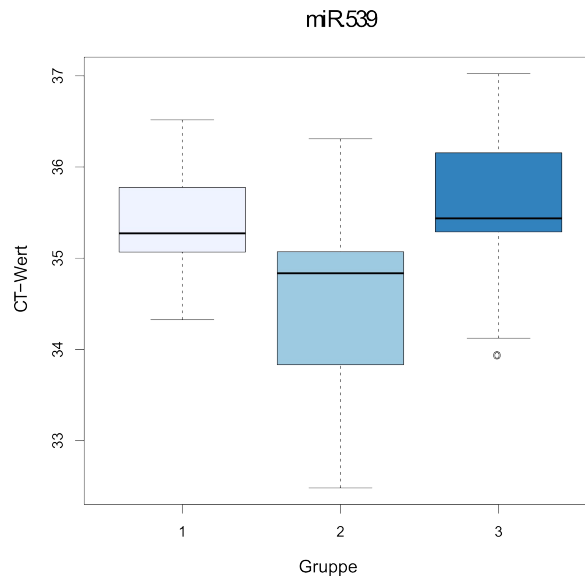


Abb.13: Boxplot-Diagramm der miR.539 der initialen Studie – p-Wert = 1.37×10^{-4} (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Gruppen 1 („Gesund“), 2 („Gastritis“) und 3 („MALT-Lymphom“). Die Gruppe 1 wird zur Veranschaulichung gezeigt, im Vergleichstest Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurden Gruppe 2 und 3 miteinander verglichen. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median an; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)

3.2) Kontrollstudie – Verifikationsanalyse

Die Biopsate des zweiten unabhängigen Kollektivs wurden mithilfe von HE- und immunhistochemisch gefärbten Präparaten wiederum nach der Wotherspoon-Klassifikation eingeteilt (siehe Tabelle 1) und die richtige Position der Probenentnahme kontrolliert.

Ein monoklonales Bild des IGH-Locus nach Biomed2-Protokoll ergab sich in 2 (20%), 6 (60%) und 10 (100%) Fällen der Wotherspoon-Stadien III, IV und V.

Jonckheere-Terpstra-Test erbrachte vier (20% der 20 gewerteten miRNA) signifikant veränderte miRNAs (siehe Tabelle 7). Jeweils zwei miRNAs verzeichnen einen ansteigenden bzw. abfallenden Verlauf in den Boxplot-Diagrammen (siehe Anhang). Mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurden die in Gruppe 2 („Gastritis“) und 3 („MALT-Lymphom“) aufgeteilten Fälle miteinander verglichen und vier signifikant unterschiedliche miRNAs (20%) getestet. Zwei der miRNAs haben erhöhte, die beiden anderen erniedrigte Expressionswerte in „MALT-Lymphom“ im Vergleich zu „Gastritis“ (siehe Tabelle 8).

Tabelle 7: Signifikant veränderte miRNAs im Jonckheere-Terpstra-Test und Bonferroni-Korrektur der Kontrollstudie

	miRNA	mittlere Differenz	Konfidenzintervall	p-Wert (nicht adjustiert)
1	miR.150	0.12	[0.09, 0.14]	3.98e-09
2	miR.142.3p	0.15	[0.13, 0.18]	5.13e-07
3	miR.375	-0.08	[-0.13, -0.04]	2.70e-05
4	miR.494	-0.06	[-0.09, -0.04]	9.40e-04

Tabelle 8: Signifikant unterschiedlich exprimierte miRNAs im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zum Vergleich der Gruppe 2 („Gastritis“) zur Gruppe 3 („MALT-Lymphom“) und Bonferroni-Korrektur der Kontrollstudie

	miRNA	mittlere Differenz	Konfidenzintervall	p-Wert (nicht adjustiert)
1	miR.150	0.06	[0.04, 0.08]	4.07e-07
2	miR.142.3p	0.09	[0.05, 0.12]	1.55e-05
3	miR.494	-0.06	[-0.08, -0.03]	9.13e-05
4	miR.124a	-0.05	[-0.08, -0.02]	1.64e-03

3.3) Übereinstimmungen in beiden Studien

Sowohl in der initialen Studie als auch in der Kontrollstudie wurden miR.150, miR.142.3p, miR.375 und miR.494 im Jonckheere-Terpstra-Test signifikant getestet. Im Vergleich der Boxplot-Diagramme beider Studien zeigen miR.150, miR.142.3p und miR.375 gleichbleibende Tendenzen. Dagegen stellt sich miR.494 in der initialen Studie ansteigend, in der Kontrollstudie abfallend dar.

Gemeinsam waren im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test beider Studien miR.150 und miR.124a signifikant unterschiedlich exprimiert. Im Boxplot-Diagramm zeigt miR.150 in beiden Studien einen ansteigenden Charakter. MiR.124a hingegen stellt sich in den Boxplot-Diagrammen in den Studien unterschiedlich dar.

4) Diskussion

Das MALT-Lymphom des Magens ist selten und sein Verhalten benigne. Eine Besonderheit ist die starke Assoziation des MALT-Lymphoms mit einer Entzündung durch das Bakterium *Helicobacter pylori* (H.p.). (*Isaacson et al., 2008*) In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass der Entstehung eines MALT-Lymphoms eine Entzündung vorausgeht. Nicht zuletzt die Remission des MALT-Lymphoms in den meisten Fällen nach einer H.p.-Eradikationstherapie bewies dies eindrücklich und veränderte die Therapierichtlinien und Prognose immens. (*Wotherspoon et al., 1993*) Genetische Aberrationen scheinen erst im Verlauf der vor allem antigen-getriebenen Entstehung des MALT-Lymphoms vorzukommen. Ihr Erscheinen deutet auf einen schwierigen Verlauf und teilweise auf ein erhöhtes Risiko der Transformation des benignen MALT-Lymphoms in ein malignes DLBCL hin. (*Liu et al., 2002; Sagaert et al., 2006*) Die Transformation des MALT-Lymphoms in ein DLBCL ist aber nicht ausschließlich von genetischen Veränderungen verursacht. (*Liu et al., 2010b*) Das MALT-Lymphom des Magens ist daher ein beeindruckendes Beispiel für die stufenweise Entwicklung von Tumorerkrankungen aufgrund eines spezifischen Auslösers. Die im Gesunden frei von Lymphozyten erscheinende Magenschleimhaut entwickelt nach Infektion mit H.p. die Strukturen einer Gastritis. Diese bilden die Grundlage für entstehende MALT-Lymphome, die teilweise in maligne DLBCL übergehen. Nach Entfernung der „auslösenden“ Substanz kommt es meist zur Rückbildung der pathologischen Strukturen. MALT-Lymphome des Magens eignen sich daher besonders für Untersuchungen der epigenetischen Abläufe bei Infektionsreaktionen und bei der malignen Transformation. Die Klassifikation nach *Wotherspoon* teilt den histologisch fließenden Übergang von der gesunden Schleimhaut zu Lymphom in fünf Stadien ein. (*Wotherspoon et al., 1993*) Die mikroskopisch zu beurteilenden Stadien sind jedoch abhängig von der Einschätzung des Mikroskopierenden und leider teilweise uneindeutig. Weitere Untersuchungen wie die PCR- und FISH-Analysen können helfen, die Diagnose eindeutiger zu stellen. Eine mittels PCR gefundene Monoklonalität des IgH-Locus in den *Wotherspoon*-Stadien III und IV wird als Beweis für das Vorhandensein eines Lymphoms angenommen. (*Hummel et al., 2006*) Die genauen Mechanismen und der Zeitpunkt der Veränderung einer Gastritis in ein MALT-Lymphom sind aber noch nicht vollständig aufgeklärt.

Es ist belegt, dass miRNAs einen bedeutenden epigenetischen Einfluss auf nahezu alle Zellprozesse haben. Die Erforschung der miRNAs offenbart bedeutsame Einblicke in die Mechanismen zahlreicher Erkrankungen. MiRNAs wirken sowohl in der Organisation der Immunantwort als auch in der Entstehung von Tumorerkrankungen. (O'Connell et al., 2010) Eine wichtige Wirkung auch auf die Entzündungsreaktionen und die Entstehung des MALT-Lymphoms im Magen kann daher vermutet werden und wurde teilweise untersucht. Die vielfältigen Möglichkeiten der miRNAs können somit zum besseren Verständnis der Pathologie des MALT-Lymphoms und zu Fortschritten in Diagnostik und Therapie führen.

4.1) Die initiale Studie

Die vorliegende Arbeit besteht aus zwei Teilen: die initiale Studie und die Kontrollstudie. In der initialen Studie wurden die Magenproben auf 376 verschiedene miRNAs untersucht. Dabei wurden in Trend-Tests 41 signifikante miRNAs ermittelt. Mit dieser Arbeit konnte der Einfluss einer Überexpression der miR.155 gezeigt werden. Im Boxplot-Diagramm (siehe Abb.7) ist gut zu erkennen, wie miR.155 in den Wotherspoon-Stadien I bis V verstärkt gegenüber gesunder Schleimhaut exprimiert wird, aber innerhalb dieser Stadien die Expressionswerte nur noch geringfügig ansteigen. Es besteht also eine enge Assoziation der miR.155 zur Entzündungsreaktion. MiR.155 wurde schon früher in Verbindung mit einer H.p.-Gastritis gebracht und eine Wirkung auf den NF- κ B-Mechanismus vermutet. (Xiao et al., 2009) Sie ist außerdem maßgeblich mit der Organisation der Immunprozesse in einer H.p.-Gastritis assoziiert, indem sie auf die T-Zellen einwirkt. (Fassi Fehri et al., 2010) Schon bei anderen Krebserkrankungen des Immunsystems konnte für miR.155 ein Zusammenhang mit der Lymphomgenese nachgewiesen werden. (Metzler et al., 2004; Kluiver et al., 2005; Eis et al., 2005) Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die beschriebenen Wirkungen von miR.155 in der Immunmodulation und lassen einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung eines MALT-Lymphoms, womöglich über die Wirkung von miR.155 auf den NF- κ B-Mechanismus, vermuten.

Ähnliche Verläufe wie bei miR.155 sind auch in den Boxplot-Darstellungen der miR.566, miR.565, miR.212 (siehe Anhang) und miR.142.3p (siehe Abb.8) zu sehen. Diese miRNAs werden in den Stadien I bis V verstärkt gegenüber gesunder Schleimhaut exprimiert. Innerhalb der Stadien I bis V ist dagegen ein geringerer Anstieg der Expression zu erkennen. Der Verlauf der Expressionswerte lässt eine Wirkung dieser vier miRNAs in der Entzündungsreaktion und in der Immunmodulation stark vermuten. Dabei sollte jedoch stets bedacht werden, dass die vermehrte Expression auch nur die vermehrte Ansammlung von Lymphozyten in den Proben widerspiegeln könnte. Für miR.142.3p ist eine maßgebliche Wirkung in der Regulation der Immunantwort auf verschiedenen Ebenen beschrieben worden. (*Sun et al., 2011b*) Weiter konnte der Einfluss dieser miRNA auch auf die Tumorgenese beobachtet werden. MiR.142.3p ist dabei sowohl mit gesteigerten Expressionswerten wie bei T-Zell-akuter-lymphatischer-Leukämie (*Lv et al., 2012*), als auch mit gesenkten Werten wie bei Mantelzelllymphomen (*Zhao et al., 2010*) erkannt worden. Auch für miR.212 wurde eine unterschiedliche Wirkung in verschiedenen Krebserkrankungen beschrieben, die sie sowohl onkogen als auch tumorsuppressiv beeinflusst. (*Park et al., 2011*) In weiteren Untersuchungen sollten daher die Wirkweisen der beschriebenen miRNAs näher bestimmt werden.

Die Expressionswerte von let.7f zeigen hingegen einen umgekehrten Verlauf (siehe Abb.9). Diese miRNA wird in den Stadien I bis V gegenüber gesunden Fällen vermindert exprimiert, verbleibt in diesen Stadien aber dann auf gleich niedrigem Niveau. Da in gesunder Schleimhaut nur wenige bis keine Lymphozyten zu finden sind, ist fraglich, inwieweit dieser Abfall der Expression auf die Lymphozyten übertragen werden kann. Für let.7f ist bekannt, dass es bei Infektion des Magens mit H.p. vermindert exprimiert wird. (*Matsushima et al., 2011*) Einen tumorsuppressiven Einfluss konnte für sie ebenfalls nachgewiesen werden. Let.7 wirkt dabei auf das onkogene RAS-Protein hemmend. (*Johnson et al., 2005*) In Magenkarzinomen konnte diese Wirkung der let.7 in der Metastatenbildung und Dissemination gezeigt werden. (*Liang et al., 2011*) Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass es zu einer Verringerung des tumorsuppressiven let.7f in der Entzündungsreaktion einer Gastritis kommt und zu einer eventuellen Verstärkung der MALT-Lymphomgenese durch fehlendes let.7f führen könnte.

Andere der signifikant getesteten miRNAs, miR.150, miR.199a, miR.494 oder miR.124a, zeigen in den Boxplot-Diagrammen eher linear ansteigende oder abfallende Verläufe. Diese lineare Steigerung bzw. Abfall entspricht den Vorstellungen von der Entwicklung des MALT-Lymphoms aus den Entzündungsreaktionen einer H.p. assoziierten Gastritis. Sie offenbaren eine zunehmende Deregulierung einiger miRNAs auf dem Weg zur Entzündung und zum Lymphom und können als wichtige Einflussfaktoren auf diesen Prozess angenommen werden. Inwieweit sie direkt an der malignen Transformation beteiligt sind oder eventuell nur die Zunahme der pathologischen Strukturen anzeigen, sollte weiter abgeklärt werden.

Unter diesen miRNAs sind einige nicht unbekannt. So zeigt z.B. miR.150 (siehe Abb.10), welche schon für ihre Wirkung in der Immunmodulation beschrieben wurde, einen ansteigenden Verlauf der Expressionswerte. Erhöhte Expressionswerte dieser miRNA wurden bereits in Magenkarzinomen gefunden. (*Wu et al., 2010*) Im Gegensatz dazu konnten verringerte Expressionswerte von miR.150 unter anderem in Mantelzelllymphomen (*Zhao et al., 2010*) und NK/T-Zell-Lymphomen (*Watanabe et al., 2011*) nachgewiesen werden. MiR.150 wirkt somit in verschiedenen Lokalisationen in unterschiedlicher Weise und könnte durchaus auch Einfluss auf die Entstehung eines MALT-Lymphoms haben. So wurde Notch3 als Zielgen von miR.150 erkannt (*Ghisi et al., 2011*), das wiederum hemmend auf den NF- κ B-Mechanismus wirkt. (*Barbarulo et al., 2011*) Eine erhöhte Expression von miR.150 könnte so zu einer verstärkten Aktivierung des NF- κ B-Mechanismus und seiner Wirkung auf die MALT-Lymphomgenese im Magen führen.

Weitere miRNAs, wie miR.199a, miR.494 oder miR.124a (siehe Anhang), zeigen ebenfalls ansteigende Verläufe ihrer Expressionswerte. Eine Überexpression der miR.199a in Magenkarzinomen wurde bereits nachgewiesen und mit einer hemmenden Wirkung auf wichtige Tumorsuppressorgene assoziiert. (*Song et al., 2010*) In einer anderen Studie wurde miR.199a mit einer hemmenden Wirkung auf IKK β in Verbindung gebracht. IKK β wirkt wiederum negativ auf den NF- κ B-Mechanismus, so dass eine verstärkte Expression von miR.199a zur Aktivierung des NF- κ B führt und potentiell positiv auf die Entstehung von MALT-Lymphomen einwirkt. (*Chen et al., 2008a*) Eine vermehrte Expression der miR.494 wurde mit

einer möglichen onkogenen Wirkungsweise assoziiert. (*Liu et al., 2010a*) In Cholangiokarzinomen wurde allerdings miR.494 auch mit einer tumorsuppressiven Wirkung beschrieben. (*Olaru et al., 2011*) MiR.124a wurde in verschiedenen Tumoren vornehmlich in verringerter Expression nachgewiesen. (*Li et al., 2009; Wong et al., 2011; Zheng et al., 2012*) Weiter konnte gezeigt werden, dass die miR.124a Genomregion in H.p. infizierter Magenschleimhaut verstärkt methyliert gegenüber nicht infizierter Schleimhaut ist und so Vorstufen für Magenkarzinome darstellen. (*Ando et al., 2009*) Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen aber eine andere Wirkweise vermuten. Eine Verbindung zur MALT-Lymphomgenese könnte über das miR.124a Zielgen I κ B ζ bestehen, welches die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B vermindert. (*Lindenblatt et al., 2009*) Eine Überexpression von miR.124a könnte so zur Steigerung des NF- κ B-Mechanismus führen und speziell die MALT-Lymphogenese antreiben. Zur Klärung der teils unterschiedlich beschriebenen Wirkweisen der miR.150, miR.199a, miR.494 und miR.124a sind künftig weitere Betrachtungen der Wirkmechanismen dieser miRNAs in MALT-Lymphomen des Magens nötig.

Unter den miRNAs mit linear abfallenden Expressionswerten sind ebenfalls schon einige – z.B. miR.7, miR.182, miR.135a, miR.429, miR.335 (siehe Anhang) und miR.375 (siehe Abb.11) – für ihren Einfluss in der Tumorgenese beschrieben worden. So ist miR.7 für ihre tumorsuppressive Wirkung in verschiedenen Krebserkrankungen bekannt. (*Xiong et al., 2011*) Auch für miR.182 konnten verringerte Expressionswerte in Lungen- als auch Magenkarzinomen nachgewiesen und einer tumorsuppressiven Wirkung zugeschrieben werden. (*Sun et al., 2010; Zhang et al., 2011; Kong et al., 2012*) Des Weiteren wurden miR.135a und miR.429 mit einer tumorsuppressiven Wirkung im Magenkarzinomen in Verbindung gebracht (*Sun et al., 2011a; Wu et al., 2012*) und auch miR.335 hat einen bekannten maßgeblichen Einfluss auf das Verhalten des Magenkarzinoms. (*Xu et al., 2012*) Für miR.375 wurde eine verringerte Expression sowohl in kolorektalen Karzinomen (*Dai et al., 2012*) als auch in Ösophaguskarzinomen (*Leidner et al., 2012*) gezeigt. Auch in Magenkarzinomen war miR.375 verringert, und die tumorsuppressive Wirkung wurde unter anderem auf PDK1 und JAK2 als Zielgene von miR.375 zurückgeführt. (*Tsukamoto et al., 2010; Ding et al., 2010*) Interessanterweise konnte eine Verringerung der miR.375

Expression schon in H.p. infizierten Magenproben gegenüber nicht infizierten Proben gezeigt werden. (*Matsushima et al., 2011*) MiR.375 könnte somit ein wichtiges Bindeglied zwischen einer H.p.-Entzündung und der Entstehung eines MALT-Lymphoms darstellen und sollte weiter untersucht werden.

Alle 41 signifikant getesteten miRNA haben potentiell einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung sowohl einer Gastritis als auch eines MALT-Lymphoms. Daher müssen weiterführende Untersuchungen angestrebt und diese miRNAs konzentriert betrachtet werden, um ihre Wirkweise zu erklären und die teilweise unterschiedlichen Auswirkungen zu begründen.

Die Differenzierung zwischen Entzündung und Lymphom ist schwierig. Alle Fälle wurden daher in Gruppen eingeteilt, um veränderte miRNAs, die hilfreich zur Unterscheidung sein könnten, zu finden. Dabei beinhaltete die „Gastritis“-Gruppe alle Fälle der Wotherspoon-Stadien I und II sowie Fälle der Stadien III und IV ohne Nachweis von Klonalität. In der „MALT-Lymphom“-Gruppe sind alle Fälle der Wotherspoon-Stadien III und IV mit Nachweis von Klonalität sowie Fälle des Stadiums V zusammengefasst. Die „Gastritis“-Gruppe wurde daraufhin mit der „MALT-Lymphom“-Gruppe verglichen. Fünf miRNAs waren signifikant unterschiedlich exprimiert in den beiden Gruppen. Der Großteil dieser miRNAs – miR.150 (siehe Abb.12), miR.550, miR.124a und miR.518b – wird in der „MALT-Lymphom“-Gruppe stärker als in der „Gastritis“-Gruppe exprimiert. Betrachtet man zum Vergleich die Expressionswerte von „Gastritis“- und „MALT-Lymphom“-Gruppe sind beide gegenüber normaler Schleimhaut erhöht. Eine onkogene Wirkung kann daher für diese miRNA vermutet werden und wurde wie z.B. bei miR.150 teils schon beschrieben. Weiter konnte miR.150 schon in vorhergehenden Studien als Marker zur Unterscheidung von DLBCL sowohl zu Lymphknotengewebe als auch zu Follikulären Lymphom identifiziert und genutzt werden. (*Roehle et al., 2008*)

MiR.539 ist hingegen in der „Gastritis“-Gruppe stärker als in der „MALT-Lymphom“-Gruppe exprimiert (siehe Abb.13). Die Expressionswerte der „MALT-Lymphom“-Gruppe entsprechen annähernd denen der normalen Schleimhaut. Eine tumorsuppressive Wirkung der miR.539 ist nicht ausgeschlossen, aber es

liegt näher zu vermuten, dass miR.539 speziell in der Regulation der Immunantwort bei einer H.p.-Infektion des Magens involviert sein könnte.

Alle fünf miRNAs weisen auf eine generell veränderte Expression von miRNAs in den beiden verschiedenen pathologischen Zuständen hin. Könnten sie somit als Marker für die Unterscheidung von Gastritis und Lymphom genutzt werden? Im Falle des MALT-Lymphoms des Magens ist eine enge Verknüpfung der Entzündung mit der Entstehung des Lymphoms bekannt. Es ist also zu vermuten, dass es sowohl direkt über onkogen wirkende miRNAs als auch indirekt über proinflammatorisch wirkende miRNAs zur Steigerung der MALT-Lymphomgenese kommt. Weitere Forschung zu den Wirkmechanismen ist von Nöten, um die in dieser Arbeit potentiell entscheidenden miRNAs als sichere Marker zu identifizieren.

Einige der zuvor in der Literatur gefundenen stark assoziierten miRNAs konnten in dieser Arbeit nicht durch signifikante Ergebnisse bekräftigt werden. Sowohl die speziell mit einer Entzündung durch H.p. assoziierten miRNA, wie miR.21, miR.34, miR.146a, miR.218, miR.223, miR.220c und miR.203 (siehe Kapitel 1.2.4), als auch weitere speziell mit dem MALT-Lymphom des Magens assoziierte miRNAs, darunter miR.200c, miR.203, miR.141 und miR.205 (siehe Kapitel 1.2.5), wurden nicht signifikant getestet. Obwohl ohne ausreichende Signifikanz in den statistischen Tests, zeigen einige der miRNAs – wie z.B. miR.203 – in dieser Arbeit tendenziell die gleiche Veränderung der Expressionswerte wie beschrieben und stehen somit nicht im Widerspruch zu den Aussagen der Literatur. (*Craig et al., 2011b*)

4.2) *Die Kontrollstudie*

Zur Bestätigung der Ergebnisse der initialen Studie wurde eine gleichartig aufgebaute, aber auf ein neues unabhängiges Kollektiv basierende Kontrollstudie durchgeführt. Dafür wurden 20 der in der initialen Studie signifikant getesteten miRNAs verwendet. In der Kontrollstudie konnten die Ergebnisse der initialen Studie teilweise bestätigt werden. Im Trend-Test wurden vier der miRNAs erneut signifikant getestet. Drei von ihnen – miR.150, miR.142.3p und miR.375 (siehe Anhang) – zeigen den gleichen Verlauf der Expressionswerte wie in der initialen

Studie und bestätigen somit, dass diese miRNAs in der Entwicklung von Entzündung und MALT-Lymphom im Magen womöglich eine bedeutende Rolle spielen. MiR.494 wurde zwar in beiden Studien signifikant getestet. Aber im Boxplot-Diagramm der Kontrollstudie ist ein abfallender Verlauf der Expression zu erkennen. Dies steht im Widerspruch zu den steigenden Expressionswerten der initialen Studie. Die Hinweise auf einen bedeutenden Einfluss dieser miRNA konnten somit nicht bekräftigt werden. Ihre spezielle Wirkweise und die Begründung für die unterschiedliche Expressionsmuster in beiden Studien bleiben weiter zu erforschen.

Auch in der Kontrollstudie wurden die Fälle in Gruppen eingeteilt und die „Gastritis“-Gruppe mit der „MALT-Lymphom“-Gruppe verglichen. Es wurden vier miRNAs – miR.150, miR.142.3p, miR.494 und miR.124a – als signifikant unterschiedlich exprimiert erkannt. Im Falle von miR.150 bestätigen sich die Ergebnisse der initialen Studie und bestärken, dass miR.150 eine der wichtigsten Einflussfaktoren in der Entzündung und Tumorgenese ist. MiR.142.3p wurde zwar im Gruppenvergleich der initialen Studie nicht signifikant getestet, aber die Trendkurve in der initialen Studie steht im Einklang mit dem Verlauf der Expressionswerte in der Kontrollstudie. Dass miR.142.3p nun auch im Gruppenvergleich signifikant unterschiedlich verändert ist, unterstreicht ihren wichtigen Einfluss in der Veränderung von Entzündung zu Lymphom. Weiteres Augenmerk sollte zukünftig verstärkt auf diese miRNA gelegt werden.

Die miR.494 und miR.124a wurden zwar signifikant unterschiedlich getestet, aber ihre Trends sind von denen der initialen Studie verschieden. So wurden sie in der initialen Studie mit gegenüber gesunder Magenschleimhaut verstärkten Expressionwerten in den Wotherspoon-Stadien, dagegen in der Kontrollstudie mit verringerten Expressionwerten gemessen. Obwohl miR.124a in beiden Studien signifikant unterschiedlich in der „MALT-Lymphom“-Gruppe gegenüber der „Gastritis“-Gruppe ist, beschreibt sie den Sachverhalt in umgekehrter Version. Welche Rolle sie in den Prozessen der H.p.-Immunreaktion und der Entwicklung eines MALT-Lymphoms spielen, muss weiter untersucht werden.

Welche Gründe können zu den teilweise unterschiedlichen Ergebnissen der Kontrollstudie geführt haben? Zum einen wurden nicht alle in der initialen Studie signifikant getesteten miRNAs in der Kontrollstudie überprüft. Des Weiteren sind

die Ausschlusskriterien der statistischen Aufarbeitung in der Kontrollstudie enger gefasst und führen zu einer strengeren Auswahl. Dies erklärt zum Teil, warum von den zuerst 41 signifikant getesteten miRNAs nun in der Kontrollstudie nur noch fünf als signifikant hervortreten. Die veränderten Trends bzw. unterschiedlichen Verlaufsformen der Expressionswerte einzelner miRNAs erklärt dies hingegen nicht. Die Unterschiede können in der Biologie und Wirkweise der miRNAs begründet sein. Auch wenn eine miRNA signifikant getestet wurde und somit mit den Prozessen der Immunmodulation und Lymphomgenese assoziiert werden kann, ist es denkbar, dass sich ihre Wirkung auf andere Prozesse bezieht. Des Weiteren können miRNAs an verschiedenen Zielpunkten binden und durch weitere Faktoren reguliert werden. Es entsteht ein sehr verstricktes Netz gegenseitiger Regulation, so dass es weiter denkbar wäre, dass eine miRNA in einem Gewebe verschiedene Funktionen ausführen und in verschiedenen Mechanismen unterschiedlich agieren kann. In Bezug auf miR.124a und miR.494 sind weitere Forschung nötig, um deren Wirkweise genauer zu verstehen und ihren Einfluss in die pathologischen Prozesse bewerten zu können, zumal sie auch in der Literatur mit teilweise widersprüchlichen Wirkungen in Verbindung gebracht wurden.

Der Ablauf beider Studien wurde standardisiert, aber trotzdem sollte die Möglichkeit der Fehlerquellen nicht unerwähnt bleiben. So könnte die Größe der Studiengruppe für signifikante statistische Auswertung hinterfragt werden. Die Auswahl der Fälle als auch die Stadieneinteilung nach Wotherspoon unterliegen keiner systematischen, aber eventuell unbeabsichtigten subjektiven Einschätzung. Nicht zuletzt sind die Proben von unterschiedlicher Qualität. Einige stammen aus größeren Gastrektomiebiopsaten, andere aus kleineren Gastroskopieproben. Eine unterschiedliche Zusammensetzung und Menge der Zellanteile wäre denkbar und würde zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Kontrollstudie, wie wichtig es ist, neuentdecktes Wissen kritisch zu hinterfragen und mit weiteren gleichartigen Untersuchungen zu überprüfen. Damit werden nicht nur technische Fehlerquellen minimiert, sondern auch einer Fehlinterpretation der Daten entgegengewirkt. In der Kontrollstudie dieser Arbeit wurden die gleichen Techniken und Materialien an einem neuen, vollständig unabhängigen Probenkollektiv ein zweites Mal verwendet. So konnte gezeigt werden, dass bestimmte miRNAs – miR.150,

miR.375, miR.142.3p – sich erneut hervortun. Andere hingegen fallen nicht auf oder sind sogar mit entgegengesetzten Ergebnissen getestet worden. Erst so ist es möglich, die Wichtigkeit der miRNAs in den Prozessen zu erkennen und erste Aussagen über deren Wirkung zu vermuten. Das Durchführen von Kontrollstudien verstärkt die Gütekriterien Objektivität, Repräsentativität, Validität, Reliabilität einer Untersuchung und ist für erfolgreiche Forschung von immenser Bedeutung.

4.3) *Ausblick*

Mit dieser Arbeit konnten einige signifikant unterschiedlich exprimierte miRNAs erkannt und wie im Falle von miR.150, miR.375 und miR.142.3p in einer unabhängigen Kontrollstudie bestätigt werden. Sie weisen auf eine wichtige Relevanz dieser miRNAs sowohl für die Entwicklung einer Immunreaktion bei H.p.-Infektion des Magens als auch für die Entstehung eines MALT-Lymphoms hin. Sie eröffnen einen neuen Blick auf die Veränderung der Pathologien im Magen und erweitern die bekannten Prozesse um neue epigenetische Einflussfaktoren. Die in dieser Arbeit aufgezeigten miRNAs ermöglichen, dass zukünftige Forschung stärker fokussiert werden kann, um ein tieferes Verständnis in die Prozesse der Immunreaktion und Lymphomgenese zu erlangen.

So konnte in weiterführenden, noch unveröffentlichten Studien der Methylierungsstatus der CpG-Inseln von miR.142.3p gemessen werden. CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin)-Inseln sind Abschnitte des DNA-Stranges, die sich meist in der Promoterregion von Genen befinden und einen verstärkten Gehalt von Guanosin und Cytosin aufweisen. Durch epigenetische Methylierungen können sie zu verringerter Transkription dieser Genomregion führen. Im Falle von miR.142.3p stellte sich heraus, dass die CpG-Insel hypomethyliert ist und damit angeschaltet wird. MiR.142.3p wird somit verstärkt exprimiert und entfaltet ihre potentiell protoonkogene Wirkung. Eine genaue Betrachtung des Wirkmechanismus sollte weiter angestrebt werden.

Eine solche Betrachtung kann mittels Transfektionsstudien geschehen, wie sie aufgrund der Datenlage dieser Arbeit für miR.150 und miR.155 begonnen wurde. Dabei werden DNA-Regionen der miR.150 und miR.155 in Lymphomzellreihen transfiziert, um die Auswirkungen der gesteigerten Expression zu untersuchen. Bei

der Interpretation der Ergebnisse müssen mögliche Einschränkungen der In-Vitro-Analysen bedacht werden. Die Verwendung von ausschließlich lymphatischen Zelllinien vereinfacht das Versuchsmodell zwar, aber es repräsentiert damit nicht mehr das übliche Mikromilieu der Magenschleimhaut. Dadurch fehlen eventuell wichtige andere Zelltypen und entscheidende Interaktionen. Zum Beispiel entfallen bestimmte Zytokine und deren Wirkung als Überlebensvorteil. Nichtsdestotrotz ist gerade mit diesen Studien erst eine genaue Betrachtung und Beschreibung der Wirkung einzelner miRNAs in bestimmten Zellen möglich und Vereinfachungen unabdingbar für die weitere Forschung in dem Bereich.

Mit diesem Wissen über bestimmte miRNAs und deren Möglichkeiten könnten in Zukunft Fortschritte in der Diagnostik und Therapie nicht nur von MALT-Lymphomen des Magens, sondern auch anderer Erkrankungen erreicht werden. Für MALT-Lymphome des Magens wäre es vorstellbar, dass miRNA-Marker sowohl zu einer eindeutigeren Differenzierung zwischen Gastritis und MALT-Lymphom als auch zur Abgrenzung des MALT-Lymphoms zu anderen Lymphomentitäten führen könnten, wie es für andere Erkrankungen schon erkannt wurde. (Lu et al., 2005; Roehle et al., 2008) Diese miRNAs könnten dann nicht nur aus Gewebeproben, sondern auch aus Blut- oder Magensaftproben extrahiert werden und somit die aufwändigen Untersuchungen vereinfachen. (Lawrie et al., 2008) In der Therapie werden miRNAs schon teilweise erfolgreich angewendet und auch für MALT-Lymphome des Magens, besonders der Fälle mit schwierigen Verläufen, wäre eine solche Herangehensweise denkbar. (Wu, 2010; Kasinski und Slack, 2011) Eine solche Therapie könnte somit schwierige und risikoreiche andere Therapieformen verringern bzw. vollkommen ersetzen. Damit würde die Erforschung der miRNAs schlussendlich den Patienten direkt zu Gute kommen.

Literaturverzeichnis

- Ahmed N, Sechi LA (2005) Helicobacter pylori and gastroduodenal pathology: new threats of the old friend. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 4, 1
- Akagi T, Motegi M, Tamura A, Suzuki R, Hosokawa Y, Suzuki H, Ota H, Nakamura S, Morishima Y, Taniwaki M, Seto M (1999) A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18) (q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene* 18, 5785-5794
- Ando T, Yoshida T, Enomoto S, Asada K, Tatematsu M, Ichinose M, Sugiyama T, Ushijima T (2009) DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer* 124, 2367-2374
- Ang M, Hee SW, Quek R, Yap SP, Loong S, Tan L, Tao M, Lim ST (2009) Presence of a high-grade component in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma is not associated with an adverse prognosis. *Ann Hematol* 88, 417-424
- Armitage JO, Weisenburger DD (1998) New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 16, 2780-2795
- Arnold IC, Lee JY, Amieva MR, Roers A, Flavell RA, Sparwasser T, Müller A (2011) Tolerance rather than immunity protects from Helicobacter pylori-induced gastric preneoplasia. *Gastroenterology* 140, 199-209
- Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM, Cotter FE, Greiner TC, Sanger WG, Horsman DE (1997) t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol* 8, 979-985
- Baens M, Maes B, Steyls A, Geboes K, Marynen P, De Wolf-Peeters C (2000) The product of the t(11;18), an API2-MLT fusion, marks nearly half of gastric MALT type lymphomas without large cell proliferation. *Am J Pathol* 156, 1433-1439
- Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD (2008) MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 9, 839-845
- Banks PM (2007) Gastrointestinal lymphoproliferative disorders. *Histopathology* 50, 42-54
- Barbarulo A, Grazioli P, Campese AF, Bellavia D, Di Mario G, Pelullo M, Ciuffetta A, Colantoni S, Vacca A, Frati L, Gulino A, Felli MP, Screpanti I (2011) Notch3 and canonical NF-kappaB signaling pathways cooperatively regulate Foxp3 transcription. *J Immunol* 186, 6199-6206
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297

- Barth TFE, Barth CA, Kestler HA, Michl P, Weniger MA, Buchholz M, Möller P, Gress T (2007) Transcriptional profiling suggests that secondary and primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal (GI) tract are blastic variants of GI marginal zone lymphoma. *J Pathol* 211, 305-313
- Bertoni F, Sanna P, Tinguely M, Roggero E, Conconi A, Gisi M, Cazzaniga G, Biondi A, Pedrinis E, Cavalli F, Zucca E (2000) Association of gastric and Waldeyer's ring lymphoma: a molecular study. *Hematol Oncol* 18, 15-19
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36
- Brown LM (2000) *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* 22, 283-297
- Brynes RK, Almaguer PD, Leathery KE, McCourty A, Arber DA, Medeiros LJ, Nathwani BN (1996) Numerical cytogenetic abnormalities of chromosomes 3, 7, and 12 in marginal zone B-cell lymphomas. *Mod Pathol* 9, 995-1000
- Burke JS (2011) Lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract: a review and pragmatic guide to diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 135, 1283-1297
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957-1966
- Calin GA, Liu C, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004a) MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11755-11760
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004b) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2999-3004
- Chang DK, Chin YJ, Kim JS, Jung HC, Kim CW, Song IS, Kim CY (1999) Lymph node involvement rate in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma--too high to be neglected. *Hepatogastroenterology* 46, 2694-2700
- Chen C, Li L, Lodish HF, Bartel DP (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* (80-) 303, 83-86
- Chen LT, Lin JT, Shyu RY, Jan CM, Chen CL, Chiang IP, Liu SM, Su IJ, Cheng AL (2001) Prospective study of *Helicobacter pylori* eradication therapy in stage I(E) high-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the stomach. *J Clin Oncol* 19, 4245-4251
- Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Kelly MG, Fest S, Visintin I, Leiser A, Schwartz PE, Rutherford T, Mor G (2008a) Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells. *Oncogene* 27, 4712-4723

- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang C (2008b) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18, 997-1006
- Chung SJ, Kim JS, Kim H, Kim SG, Kim CW, Jung HC, Song IS (2009) Long-term clinical outcome of helicobacter pylori-negative gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma is comparable to that of h. pylori-positive lymphoma. *J Clin Gastroenterol* 43, 312-317
- Cogliatti SB, Schmid U (2002) Who is WHO and what was REAL?. *Swiss Med Wkly* 132, 607-617
- Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, Croce CM (2006) Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7024-7029
- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867
- Craig VJ, Arnold I, Gerke C, Huynh MQ, Wündisch T, Neubauer A, Renner C, Falkow S, Müller A (2010a) Gastric MALT lymphoma B cells express polyreactive, somatically mutated immunoglobulins. *Blood* 115, 581-591
- Craig VJ, Cogliatti SB, Arnold I, Gerke C, Balandat J, Wündisch T, Müller A (2010b) B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in Helicobacter-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia* 24, 1186-1196
- Craig VJ, Cogliatti SB, Imig J, Renner C, Neuenschwander S, Rehrauer H, Schlapbach R, Dirnhofer S, Tzankov A, Müller A (2011a) Myc-mediated repression of microRNA-34a promotes high-grade transformation of B-cell lymphoma by dysregulation of FoxP1. *Blood* 117, 6227-6236
- Craig VJ, Cogliatti SB, Rehrauer H, Wündisch T, Müller A (2011b) Epigenetic silencing of microRNA-203 dysregulates ABL1 expression and drives Helicobacter-associated gastric lymphomagenesis. *Cancer Res* 71, 3616-3624
- D'Elia MM, Amedei A, Benagiano M, Azzurri A, Del Prete G (2005) Helicobacter pylori, T cells and cytokines: the "dangerous liaisons". *FEMS Immunol Med Microbiol* 44, 113-119
- Dai X, Chiang Y, Wang Z, Song Y, Lu C, Gao P, Xu H (2012) Expression levels of microRNA-375 in colorectal carcinoma. *Mol Med Rep* 5, 1299-1304
- 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 (1999) 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* 93, 3601-3609

- Ding L, Xu Y, Zhang W, Deng Y, Si M, Du Y, Yao H, Liu X, Ke Y, Si J, Zhou T (2010) MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. *Cell Res* 20, 784-793
- Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18, 504-511
- Dogan A, Du M, Koulis A, Briskin MJ, Isaacson PG (1997) Expression of lymphocyte homing receptors and vascular addressins in low-grade gastric B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 151, 1361-1369
- Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE (2008) Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 10, 203-211
- Du M (2011) MALT lymphoma: many roads lead to nuclear factor-kb activation. *Histopathology* 58, 26-38
- Du MQ, Diss TC, Dogan A, Ye HT, Aiello A, Wotherspoon AC, Pan LX, Isaacson PG (2000) Clone-specific PCR reveals wide dissemination of gastric MALT lymphoma to the gastric mucosa. *J Pathol* 192, 488-493
- Du MQ, Xu CF, Diss TC, Peng HZ, Wotherspoon AC, Isaacson PG, Pan LX (1996) Intestinal dissemination of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood* 88, 4445-4451
- Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE (2005) Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3627-3632
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79, 351-379
- Fassi Fehri L, Koch M, Belogolova E, Khalil H, Bolz C, Kalali B, Mollenkopf HJ, Beigier-Bompadre M, Karlas A, Schneider T, Churin Y, Gerhard M, Meyer TF (2010) Helicobacter pylori induces miR-155 in T cells in a cAMP-Foxp3-dependent manner. *PLoS ONE* 5, e9500
- Ferreri AJM, Ernberg I, Copie-Bergman C (2009) Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J Intern Med* 265, 421-438
- Fischbach W, Goebeler-Kolve M, Dragosics B, Greiner A, Stolte M (2004) Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive Helicobacter pylori eradication therapy: experience from a large prospective series. *Gut* 53, 34-37
- Flieger D, Keller R, May A, Eil C, Fischbach W (2005) Capsule endoscopy in gastrointestinal lymphomas. *Endoscopy* 37, 1174-1180
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19, 92-105
- Gao C, Zhang Z, Liu W, Xiao S, Gu W, Lu H (2010) Reduced microRNA-218 expression is associated with high nuclear factor kappa B activation in gastric cancer. *Cancer* 116, 41-49

- Ghisi M, Corradin A, Basso K, Frasson C, Serafin V, Mukherjee S, Mussolin L, Ruggero K, Bonanno L, Guffanti A, De Bellis G, Gerosa G, Stellin G, D'Agostino DM, Basso G, Bronte V, Indraccolo S, Amadori A, Zanovello P (2011) Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood* 117, 7053-7062
- Han S, Wu X, Wan L, Zeng Q, Li J, Liu Z (2009) FOXP1 expression predicts polymorphic histology and poor prognosis in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Dig Surg* 26, 156-162
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD (2000) The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology* 36, 69-86
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, et al. (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361-1392
- He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828-833
- Hirschl AM (1987) Frequency of occurrence of *Campylobacter pylori* and analysis of the systemic and local immune response. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 266, 526-542
- Hoefig KP, Thorns C, Roehle A, Kaehler C, Wesche KO, Repsilber D, Branke B, Thieme M, Feller AC, Merz H (2008) Unlocking pathology archives for microRNA-profiling. *Anticancer Res* 28, 119-123
- Hoeve MA, Gisbertz IA, Schouten HC, Schuurin E, Bot FJ, Hermans J, Hopman A, Kluin PM, Arends JW, van Krieken JH (1999) Gastric low-grade MALT lymphoma, high-grade MALT lymphoma and diffuse large B cell lymphoma show different frequencies of trisomy. *Leukemia* 13, 799-807
- Hummel M, Oeschger S, Barth TFE, Loddenkemper C, Cogliatti SB, Marx A, Wacker H, Feller AC, Bernd H, Hansmann M, Stein H, Möller P (2006) Wotherspoon criteria combined with B cell clonality analysis by advanced polymerase chain reaction technology discriminates covert gastric marginal zone lymphoma from chronic gastritis. *Gut* 55, 782-787
- Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J (1993) The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342, 571-574

- Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J (1996) 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* 178, 122-127
- Hyjek E, Isaacson PG (1988) Primary B cell lymphoma of the thyroid and its relationship to Hashimoto's thyroiditis. *Hum Pathol* 19, 1315-1326
- Hyjek E, Smith WJ, Isaacson PG (1988) Primary B-cell lymphoma of salivary glands and its relationship to myoepithelial sialadenitis. *Hum Pathol* 19, 766-776
- International Lymphoma Study Group (ILSG) (1997) A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 89, 3909-3918
- Isaacson P, Wright DH (1983) Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 52, 1410-1416
- Isaacson P, Wright DH (1984) Extranodal malignant lymphoma arising from mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer* 53, 2515-2524
- Isaacson PG, Chott A, Nakamura S, Müller-Hermelink HK, Harris NL, Swerdlow SH (2008) Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Hrsg.): *World Health Organisation Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4. Aufl., 214-217, IARC Press, Lyon
- Izumiyama K, Nakagawa M, Yonezumi M, Kasugai Y, Suzuki R, Suzuki H, Tsuzuki S, Hosokawa Y, Asaka M, Seto M (2003) Stability and subcellular localization of API2-MALT1 chimeric protein involved in t(11;18) (q21;q21) MALT lymphoma. *Oncogene* 22, 8085-8092
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG (2008) Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 112, 4384-4399
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635-647
- Jønsson V, Wiik A, Hou-Jensen K, Christiansen M, Ryder LP, Madsen HO, Geisler C, Hansen MM, Thomsen K, Vorstrup S, Svejgaard A (1999) Autoimmunity and extranodal lymphocytic infiltrates in lymphoproliferative disorders. *J Intern Med* 245, 277-286
- Kasinski AL, Slack FJ (2011) Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11, 849-864
- Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, Kroesen B, van den Berg A (2005) BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* 207, 243-249

- Ko YH, Han JJ, Noh JH, Ree HJ (2002) Lymph nodes in gastric B-cell lymphoma: pattern of involvement and early histological changes. *Histopathology* 40, 497-504
- Koch P, del Valle F, Berdel WE, Willich NA, Reers B, Hiddemann W, Grothaus-Pinke B, Reinartz G, Brockmann J, Temmesfeld A, Schmitz R, Rube C, Probst A, Jaenke G, Bodenstern H, Junker A, Pott C, Schultze J, Heinecke A, Parwaresch R, Tiemann M (2001) Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: I. Anatomic and histologic distribution, clinical features, and survival data of 371 patients registered in the German Multicenter Study GIT NHL 01/92. *J Clin Oncol* 19, 3861-3873
- Kondo T, Oka T, Sato H, Shinnou Y, Washio K, Takano M, Morito T, Takata K, Ohara N, Ouchida M, Shimizu K, Yoshino T (2009) Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by *Helicobacter pylori* infection promotes development and progression of gastric MALT lymphoma. *Int J Oncol* 35, 547-557
- Kong W, Bai R, Liu T, Cai C, Liu M, Li X, Tang H (2012) MicroRNA-182 targets cAMP-responsive element-binding protein 1 and suppresses cell growth in human gastric adenocarcinoma. *FEBS J* 279, 1252-1260
- Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T (2010) Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 101, 2087-2092
- Krugmann J, Tzankov A, Dirnhofer S, Fend F, Wolf D, Siebert R, Probst P, Erdel M (2005) Complete or partial trisomy 3 in gastro-intestinal MALT lymphomas co-occurs with aberrations at 18q21 and correlates with advanced disease stage: a study on 25 cases. *World J Gastroenterol* 11, 7384-7385
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (80-) 294, 858-862
- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CSR, Harris AL (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 141, 672-675
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854
- Lehours P, Ménard A, Dupouy S, Bergey B, Richy F, Zerbib F, Ruskoné-Fourmestreaux A, Delchier JC, Mégraud F (2004) Evaluation of the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect Immun* 72, 880-888
- Leidner RS, Ravi L, Leahy P, Chen Y, Bednarchik B, Streppel M, Canto M, Wang JS, Maitra A, Willis J, Markowitz SD, Barnholtz-Sloan J, Adams MD, Chak A, Guda K (2012) The microRNAs, MiR-31 and MiR-375, as candidate markers in Barrett's esophageal carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 51, 473-479

- Li KKW, Pang JC, Ching AK, Wong CK, Kong X, Wang Y, Zhou L, Chen Z, Ng H (2009) miR-124 is frequently down-regulated in medulloblastoma and is a negative regulator of SLC16A1. *Hum Pathol* 40, 1234-1243
- Liang S, He L, Zhao X, Miao Y, Gu Y, Guo C, Xue Z, Dou W, Hu F, Wu K, Nie Y, Fan D (2011) MicroRNA let-7f inhibits tumor invasion and metastasis by targeting MYH9 in human gastric cancer. *PLoS ONE* 6, e18409
- Lindenblatt C, Schulze-Osthoff K, Totzke G (2009) IkappaBzeta expression is regulated by miR-124a. *Cell Cycle* 8, 2019-2023
- Liu H, Bench AJ, Bacon CM, Payne K, Huang Y, Scott MA, Erber WN, Grant JW, Du M (2007) A practical strategy for the routine use of BIOMED-2 PCR assays for detection of B- and T-cell clonality in diagnostic haematopathology. *Br J Haematol* 138, 31-43
- Liu H, Hamoudi RA, Ye H, Ruskone-Fourmesttraux A, Dogan A, Isaacson PG, Du M (2004) t(11;18)(q21;q21) of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma results from illegitimate non-homologous end joining following double strand breaks. *Br J Haematol* 125, 318-329
- Liu H, Ruskon-Fourmesttraux A, Lavergne-Slove A, Ye H, Molina T, Bouhnik Y, Hamoudi RA, Diss TC, Dogan A, Megraud F, Rambaud JC, Du MQ, Isaacson PG (2001a) Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to Helicobacter pylori eradication therapy. *Lancet* 357, 39-40
- Liu H, Ye H, Dogan A, Ranaldi R, Hamoudi RA, Bearzi I, Isaacson PG, Du MQ (2001b) T(11;18)(q21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10. *Blood* 98, 1182-1187
- Liu H, Ye H, Ruskone-Fourmesttraux A, De Jong D, Pileri S, Thiede C, Lavergne A, Boot H, Caletti G, Wündisch T, Molina T, Taal BG, Elena S, Thomas T, Zinzani PL, Neubauer A, Stolte M, Hamoudi RA, Dogan A, Isaacson PG, Du M (2002) T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to H. pylori eradication. *Gastroenterology* 122, 1286-1294
- Liu L, Jiang Y, Zhang H, Greenlee AR, Han Z (2010a) Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Life Sci* 86, 192-198
- Liu T, Dei P, Kuo S, Lin C (2010b) Early low-grade gastric MALToma rarely transforms into diffuse large cell lymphoma or progresses beyond the stomach and regional lymph nodes. *J Formos Med Assoc* 109, 463-471
- Liu Z, Xiao B, Tang B, Li B, Li N, Zhu E, Guo G, Gu J, Zhuang Y, Liu X, Ding H, Zhao X, Guo H, Mao X, Zou Q (2010c) Up-regulated microRNA-146a negatively modulate Helicobacter pylori-induced inflammatory response in human gastric epithelial cells. *Microbes Infect* 12, 854-863
- Loehr WJ, Mujahed Z, Zahn FD, Gray GF, Thorbjarnarson B (1969) Primary lymphoma of the gastrointestinal tract: a review of 100 cases. *Ann Surg* 170, 232-238

- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838
- Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N, McAllister-Lucas LM, Abazeed ME, Chen FF, Yamaoka S, Seto M, Nunez G (2001) Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem* 276, 19012-19019
- Luminari S, Cesaretti M, Marcheselli L, Rashid I, Madrigali S, Maiorana A, Federico M (2010) Decreasing incidence of gastric MALT lymphomas in the era of anti-Helicobacter pylori interventions: results from a population-based study on extranodal marginal zone lymphomas. *Ann Oncol* 21, 855-859
- Lv M, Zhang X, Jia H, Li D, Zhang B, Zhang H, Hong M, Jiang T, Jiang Q, Lu J, Huang X, Huang B (2012) An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor- α and cAMP/PKA pathways. *Leukemia* 26, 769-777
- Maniataki E, Mourelatos Z (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19, 2979-2990
- Matsushima K, Isomoto H, Inoue N, Nakayama T, Hayashi T, Nakayama M, Nakao K, Hirayama T, Kohno S (2011) MicroRNA signatures in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. *Int J Cancer* 128, 361-370
- Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A (2004) High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 39, 167-169
- Meyer SU, Pfaffl MW, Ulbrich SE (2010) Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity?. *Biotechnol Lett* 32, 1777-1788
- Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 1, 882-891
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10513-10518
- Montalban C, Santón A, Redondo C, García-Cosío M, Boixeda D, Vazquez-Sequeiros E, Norman F, de Argila CM, Alvarez I, Abaira V, Bellas C (2005) Long-term persistence of molecular disease after histological remission in low-grade gastric MALT lymphoma treated with H. pylori eradication. Lack of association with translocation t(11;18): a 10-year updated follow-up of a prospective study. *Ann Oncol* 16, 1539-1544

- Morgner A, Lehn N, Andersen LP, Thiede C, Bennedsen M, Trebesius K, Neubauer B, Neubauer A, Stolte M, Bayerdörffer E (2000) *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. *Gastroenterology* 118, 821-828
- Muller AF, Maloney A, Jenkins D, Dowling F, Smith P, Bessell EM, Toghill PJ (1995) Primary gastric lymphoma in clinical practice 1973-1992. *Gut* 36, 679-683
- Murga Penas EM, Hinz K, Röser K, Copie-Bergman C, Wlodarska I, Marynen P, Hagemeyer A, Gaulard P, Löning T, Hossfeld DK, Dierlamm J (2003) Translocations t(11;18)(q21;q21) and t(14;18)(q32;q21) are the main chromosomal abnormalities involving MLT/MALT1 in MALT lymphomas. *Leukemia* 17, 2225-2229
- Musshoff K (1977) [Clinical staging classification of non-Hodgkin's lymphomas (author's transl)]. *Strahlentherapie* 153, 218-221
- Nakamura S, Matsumoto T, Ye H, Nakamura S, Suekane H, Matsumoto H, Yao T, Tsuneyoshi M, Du M, Iida M (2006) *Helicobacter pylori*-negative gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a clinicopathologic and molecular study with reference to antibiotic treatment. *Cancer* 107, 2770-2778
- Nelson PT, Baldwin DA, Scearce LM, Oberholtzer JC, Tobias JW, Mourelatos Z (2004) Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods* 1, 155-161
- Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M, Ushijima T (2010) Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 70, 1430-1440
- Nordenstedt H, Graham DY, Kramer JR, Rugge M, Verstovsek G, Fitzgerald S, Alsarraj A, Shaib Y, Velez ME, Abraham N, Anand B, Cole R, El-Serag HB (2013) *Helicobacter pylori*-Negative Gastritis: Prevalence and Risk Factors. *Am J Gastroenterol* 108, 65-71
- O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D (2010) Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 10, 111-122
- Oertli M, Engler DB, Kohler E, Koch M, Meyer TF, Müller A (2011) MicroRNA-155 is essential for the T cell-mediated control of *Helicobacter pylori* infection and for the induction of chronic Gastritis and Colitis. *J Immunol* 187, 3578-3586
- Olaru AV, Ghiaur G, Yamanaka S, Luvsanjav D, An F, Popescu I, Alexandrescu S, Allen S, Pawlik TM, Torbenson M, Georgiades C, Roberts LR, Gores GJ, Ferguson-Smith A, Almeida MI, Calin GA, Mezey E, Selaru FM (2011) MicroRNA down-regulated in human cholangiocarcinoma control cell cycle through multiple targets involved in the G1/S checkpoint. *Hepatology* 54, 2089-2098

- Omonishi K, Yoshino T, Sakuma I, Kobayashi K, Moriyama M, Akagi T (1998) bcl-6 protein is identified in high-grade but not low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas of the stomach. *Mod Pathol* 11, 181-185
- Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, Seto M (2004) Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 64, 3087-3095
- Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, Ott MM, Müller-Hermelink HK (1997) The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Res* 57, 3944-3948
- Pardue ML, Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64, 600-604
- Park J, Henry JC, Jiang J, Esau C, Gusev Y, Lerner MR, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD (2011) miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun* 406, 518-523
- Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelstein JH, Friedman GD (1994) Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330, 1267-1271
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89
- Peng H, Du M, Diss TC, Isaacson PG, Pan L (1997) Genetic evidence for a clonal link between low and high-grade components in gastric MALT B-cell lymphoma. *Histopathology* 30, 425-429
- Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* (80-) 304, 734-736
- Qin Y, Greiner A, Trunk MJ, Schmausser B, Ott MM, Müller-Hermelink HK (1995) Somatic hypermutation in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type B-cell lymphoma. *Blood* 86, 3528-3534
- Radaszkiewicz T, Dragosics B, Bauer P (1992) Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: factors relevant to prognosis. *Gastroenterology* 102, 1628-1638
- Raderer M, Streubel B, Wöhrer S, Häfner M, Chott A (2006) Successful antibiotic treatment of Helicobacter pylori negative gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphomas. *Gut* 55, 616-618
- Raderer M, Vorbeck F, Formanek M, Osterreicher C, Valencak J, Penz M, Kornek G, Hamilton G, Dragosics B, Chott A (2000) Importance of extensive staging in patients with mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma. *Br J Cancer* 83, 454-457

- Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, Svoboda M, Vyzula R, Slaby O (2012) Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med* 10, 55
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906
- Remstein ED, Dogan A, Einerson RR, Paternoster SF, Fink SR, Law M, Dewald GW, Kurtin PJ (2006) The incidence and anatomic site specificity of chromosomal translocations in primary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) in North America. *Am J Surg Pathol* 30, 1546-1553
- Remstein ED, James CD, Kurtin PJ (2000) Incidence and subtype specificity of API2-MALT1 fusion translocations in extranodal, nodal, and splenic marginal zone lymphomas. *Am J Pathol* 156, 1183-1188
- Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE (2009) The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 112, 55-59
- Roehle A, Hoefig KP, Repsilber D, Thorns C, Ziepert M, Wesche KO, Thieme M, Loeffler M, Klapper W, Pfreundschuh M, Matolcsy A, Bernd H, Reiniger L, Merz H, Feller AC (2008) MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas. *Br J Haematol* 142, 732-744
- Rosenwald A, Ott G, Stilgenbauer S, Kalla J, Brecht M, Katzenberger T, Greiner A, Ott MM, Gawin B, Döhner H, Müller-Hermelink HK (1999) Exclusive detection of the t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas (MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas. *Am J Pathol* 155, 1817-1821
- Roth C, Rack B, Müller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H (2010) Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 12, R90
- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16, 6914-6925
- Ruskoné-Fourmestreaux A, Dragosics B, Morgner A, Wotherspoon A, De Jong D (2003) Paris staging system for primary gastrointestinal lymphomas. *Gut* 52, 912-913
- Ruskoné-Fourmestreaux A, Fischbach W, Aleman BMP, Boot H, Du MQ, Megraud F, Montalban C, Raderer M, Savio A, Wotherspoon A (2011) EGILS consensus report. Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT. *Gut* 60, 747-758
- Sagaert X, de Paepe P, Libbrecht L, Vanhentenrijk V, Verhoef G, Thomas J, Wlodarska I, De Wolf-Peeters C (2006) Forkhead box protein P1 expression in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas predicts poor prognosis and transformation to diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 24, 2490-2497

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (80-) 239, 487-491
- Santón A, García-Cosío M, Bellosillo B, Rodríguez P, Cristóbal E, Serrano S, Besses C, Abraira V, Salar A, Montalbán C (2008) Persistent monoclonality after histological remission in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma treated with chemotherapy and/or surgery: influence of t(11;18)(q21;q21). *Leuk Lymphoma* 49, 1516-1522
- Schreuder MI, Hoeve MA, Hebeda KM, Verdijk MA, Ligtenberg MJ, Bot FJ, Chott A, van Krieken JHJM (2003) Mutual exclusion of t(11;18)(q21;q21) and numerical chromosomal aberrations in the development of different types of primary gastric lymphomas. *Br J Haematol* 123, 590-599
- Severson RK, Davis S (1990) Increasing incidence of primary gastric lymphoma. *Cancer* 66, 1283-1287
- Snowdon J, Boag S, Feilotter H, Izard J, Siemens DR (2012) A pilot study of urinary microRNA as a biomarker for urothelial cancer. *Can Urol Assoc J* , 1-5
- Song G, Zeng H, Li J, Xiao L, He Y, Tang Y, Li Y (2010) miR-199a regulates the tumor suppressor mitogen-activated protein kinase kinase 11 in gastric cancer. *Biol Pharm Bull* 33, 1822-1827
- Spencer J, Finn T, Pulford KA, Mason DY, Isaacson PG (1985) The human gut contains a novel population of B lymphocytes which resemble marginal zone cells. *Clin Exp Immunol* 62, 607-612
- Spiegelman S, Watson KF, Kacian DL (1971) Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 2843-2845
- Starostik P, Patzner J, Greiner A, Schwarz S, Kalla J, Ott G, Müller-Hermelink HK (2002) Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways. *Blood* 99, 3-9
- Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan JKC, Gatter KC, Campo E (2008) Diffuse Large B Cell Lymphoma - not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Hrsg.): *World Health Organisation Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4. Aufl., 233-237, IARC Press, Lyon
- Stolte M, Eidt S (1989) Lymphoid follicles in antral mucosa: immune response to *Campylobacter pylori*?. *J Clin Pathol* 42, 1269-1271
- Streubel B, Simonitsch-Klupp I, Müllauer L, Lamprecht A, Huber D, Siebert R, Stolte M, Trautinger F, Lukas J, Püspök A, Formanek M, Assanasen T, Müller-Hermelink H, Cerroni L, Raderer M, Chott A (2004) Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites. *Leukemia* 18, 1722-1726
- Streubel B, Vinatzer U, Lamprecht A, Raderer M, Chott A (2005) T(3;14) (p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia* 19, 652-658

- Suekane H, Iida M, Yao T, Matsumoto T, Masuda Y, Fujishima M (1993) Endoscopic ultrasonography in primary gastric lymphoma: correlation with endoscopic and histologic findings. *Gastrointest Endosc* 39, 139-145
- Sun T, Wang C, Xing J, Wu D (2011a) miR-429 modulates the expression of c-myc in human gastric carcinoma cells. *Eur J Cancer* 47, 2552-2559
- Sun Y, Fang R, Li C, Li L, Li F, Ye X, Chen H (2010) Hsa-mir-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 501-507
- Sun Y, Varambally S, Maher CA, Cao Q, Chockley P, Toubai T, Malter C, Nieves E, Tawara I, Wang Y, Ward PA, Chinnaiyan A, Reddy P (2011b) Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality. *Blood* 117, 6172-6183
- Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano H, Yoshikawa K, Kimura T, Kudo T, Harada E, Sugai T, Takamaru H, Niinuma T, Maruyama R, Yamamoto H, Tokino T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y (2010) Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. *Carcinogenesis* 31, 2066-2073
- Taji S, Nomura K, Matsumoto Y, Sakabe H, Yoshida N, Mitsufuji S, Nishida K, Horiike S, Nakamura S, Morita M, Taniwaki M (2005) Trisomy 3 may predict a poor response of gastric MALT lymphoma to Helicobacter pylori eradication therapy. *World J Gastroenterol* 11, 89-93
- Thieblemont C, Berger F, Dumontet C, Moullet I, Bouafia F, Felman P, Salles G, Coiffier B (2000) Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma is a disseminated disease in one third of 158 patients analyzed. *Blood* 95, 802-806
- Thiede C, Wündisch T, Alpen B, Neubauer B, Morgner A, Schmitz M, Ehninger G, Stolte M, Bayerdörffer E, Neubauer A (2001) Long-term persistence of monoclonal B cells after cure of Helicobacter pylori infection and complete histologic remission in gastric mucosa-associated lymphoid tissue B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 19, 1600-1609
- Tibiletti MG, Milani K, Martin V, Zucca E, Motta T, Cortelazzo S, Pinotti G, Mazzucchelli L, Pruneri G, Martinelli G, Barbazza R, Capella C, Bertoni F (2007) Chromosome instability and translocation t(11;18) in primary gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT-type. *Hematol Oncol* 25, 184-188
- Toracchio S, Ota H, de Jong D, Wotherspoon A, Ruge M, Graham DY, Samani A, El-Zimaity HMT (2009) Translocation t(11;18)(q21;q21) in gastric B-cell lymphomas. *Cancer Sci* 100, 881-887
- Torlakovic E, Cherwitz DL, Jessurun J, Scholes J, McGlennen R (1997) B-cell gene rearrangement in benign and malignant lymphoid proliferations of mucosa-associated lymphoid tissue and lymph nodes. *Hum Pathol* 28, 166-173

- Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E (2010) Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 102, 1174-1179
- Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, Tanigawa M, Nguyen LT, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M (2010) MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Res* 70, 2339-2349
- Ullrich A, Fischbach W, Blettner M (2002) Incidence of gastric B-cell lymphomas: a population-based study in Germany. *Ann Oncol* 13, 1120-1127
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6, 961-967
- van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JHJM, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17, 2257-2317
- van Krieken JHJM, Langerak AW, Macintyre EA, Kneba M, Hodges E, Sanz RG, Morgan GJ, Parreira A, Molina TJ, Cabeçadas J, Gaulard P, Jasani B, Garcia JF, Ott M, Hannsmann ML, Berger F, Hummel M, Davi F, Brüggemann M, Lavender FL, Schuurin E, Evans PAS, White H, Salles G, Groenen PJTA, Gameiro P, Pott C, Dongen JJMV (2007) Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21, 201-206
- Vickers KC, Remaley AT (2012) Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Curr Opin Lipidol* 23, 91-97
- Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N, Sawada K (2011) The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia* 25, 1324-1334
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56, 1733-1741
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862
- Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG, Dyer MJ (1999) *Bcl10* is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 96, 35-45

- Wong KY, So CC, Loong F, Chung LP, Lam WWL, Liang R, Li GKH, Jin D, Chim CS (2011) Epigenetic inactivation of the miR-124-1 in haematological malignancies. *PLoS ONE* 6, e19027
- Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG (1993) Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342, 575-577
- Wotherspoon AC, Doglioni C, Isaacson PG (1992) Low-grade gastric B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT): a multifocal disease. *Histopathology* 20, 29-34
- Wotherspoon AC, Finn TM, Isaacson PG (1995) Trisomy 3 in low-grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood* 85, 2000-2004
- Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG (1991) *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 338, 1175-1176
- Wu H, Huang M, Cao P, Wang T, Shu Y, Liu P (2012) MiR-135a targets JAK2 and inhibits gastric cancer cell proliferation. *Cancer Biol Ther* 13, 281-288
- Wu Q, Jin H, Yang Z, Luo G, Lu Y, Li K, Ren G, Su T, Pan Y, Feng B, Xue Z, Wang X, Fan D (2010) MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2. *Biochem Biophys Res Commun* 392, 340-345
- Wu W (2010) MicroRNA: potential targets for the development of novel drugs?. *Drugs R D* 10, 1-8
- Wündisch T, Neubauer A, Stolte M, Ritter M, Thiede C (2003) B-cell monoclonality is associated with lymphoid follicles in gastritis. *Am J Surg Pathol* 27, 882-887
- Wündisch T, Thiede C, Morgner A, Dempfle A, Günther A, Liu H, Ye H, Du M, Kim TD, Bayerdörffer E, Stolte M, Neubauer A (2005) Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Oncol* 23, 8018-8024
- Wyatt JI, Rathbone BJ (1988) Immune response of the gastric mucosa to *Campylobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl* 142, 44-49
- Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J (2007) Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA* 13, 1668-1674
- Xiao B, Liu Z, Li B, Tang B, Li W, Guo G, Shi Y, Wang F, Wu Y, Tong W, Guo H, Mao X, Zou Q (2009) Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. *J Infect Dis* 200, 916-925
- Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K (2008) Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 9, 405-414

- Xie Y, Todd NW, Liu Z, Zhan M, Fang H, Peng H, Alattar M, Deepak J, Stass SA, Jiang F (2010) Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 67, 170-176
- Xiong S, Zheng Y, Jiang P, Liu R, Liu X, Chu Y (2011) MicroRNA-7 inhibits the growth of human non-small cell lung cancer A549 cells through targeting BCL-2. *Int J Biol Sci* 7, 805-814
- Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA (2003) The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 13, 790-795
- Xu Y, Zhao F, Wang Z, Song Y, Luo Y, Zhang X, Jiang L, Sun Z, Miao Z, Xu H (2012) MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bcl-w and specificity protein 1. *Oncogene* 31, 1398-1407
- Ye H, Gong L, Liu H, Ruskone-Fourmesttraux A, de Jong D, Pileri S, Thiede C, Lavergne A, Boot H, Caletti G, Wündisch T, Molina T, Taal BG, Elena S, Neubauer A, Maclennan KA, Siebert R, Remstein ED, Dogan A, Du M (2006) Strong BCL10 nuclear expression identifies gastric MALT lymphomas that do not respond to H pylori eradication. *Gut* 55, 137-138
- Ye H, Liu H, Attygalle A, Wotherspoon AC, Nicholson AG, Charlotte F, Leblond V, Speight P, Goodlad J, Lavergne-Slove A, Martin-Subero JI, Siebert R, Dogan A, Isaacson PG, Du M (2003a) Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of H pylori in gastric MALT lymphoma. *Blood* 102, 1012-1018
- Ye H, Liu H, Raderer M, Chott A, Ruskone-Fourmesttraux A, Wotherspoon A, Dyer MJS, Chuang S, Dogan A, Isaacson PG, Du M (2003b) High incidence of t(11;18)(q21;q21) in Helicobacter pylori-negative gastric MALT lymphoma. *Blood* 101, 2547-2550
- Yoshino T, Omonishi K, Kobayashi K, Mannami T, Okada H, Mizuno M, Yamadori I, Kondo E, Akagi T (2000) Clinicopathological features of gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas: high grade transformation and comparison with diffuse large B cell lymphomas without MALT lymphoma features. *J Clin Pathol* 53, 187-190
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302, 1-12
- Zhang L, Liu T, Huang Y, Liu J (2011) microRNA-182 inhibits the proliferation and invasion of human lung adenocarcinoma cells through its effect on human cortical actin-associated protein. *Int J Mol Med* 28, 381-388
- Zhang Z, Li Z, Gao C, Chen P, Chen J, Liu W, Xiao S, Lu H (2008) miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest* 88, 1358-1366
- Zhao J, Lin J, Lwin T, Yang H, Guo J, Kong W, Dessureault S, Moscinski LC, Reznia D, Dalton WS, Sotomayor E, Tao J, Cheng JQ (2010) microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood* 115, 2630-2639

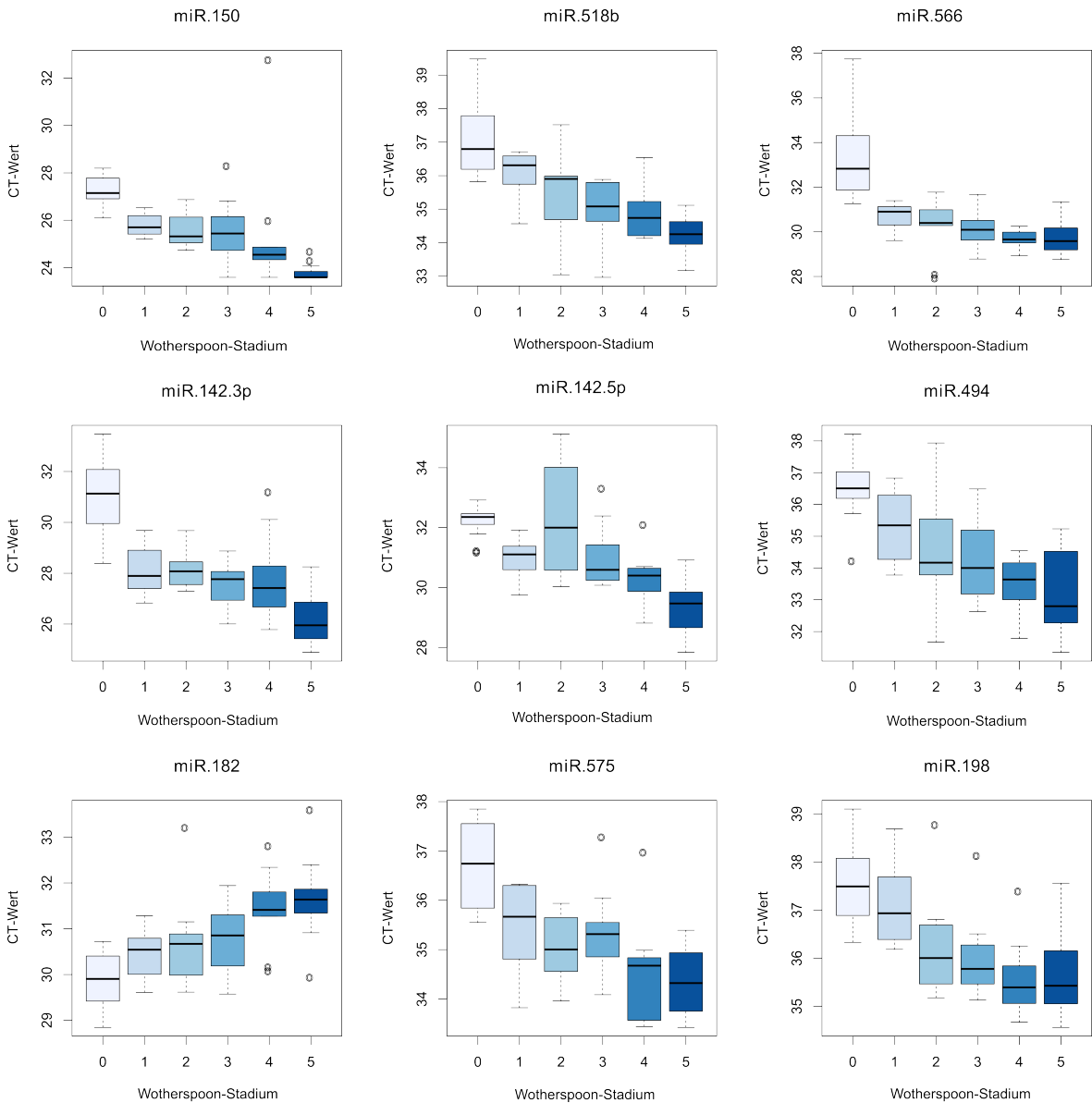
Zheng F, Liao Y, Cai M, Liu Y, Liu T, Chen S, Bian X, Guan X, Lin MC, Zeng Y, Kung H, Xie D (2012) The putative tumour suppressor microRNA-124 modulates hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by repressing ROCK2 and EZH2. *Gut* 61, 278-289

Zhou Y, Ye H, Martin-Subero JI, Hamoudi R, Lu Y, Wang R, Siebert R, Shipley J, Isaacson PG, Dogan A, Du M (2006) Distinct comparative genomic hybridisation profiles in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with and without t(11;18)(q21;q21). *Br J Haematol* 133, 35-42

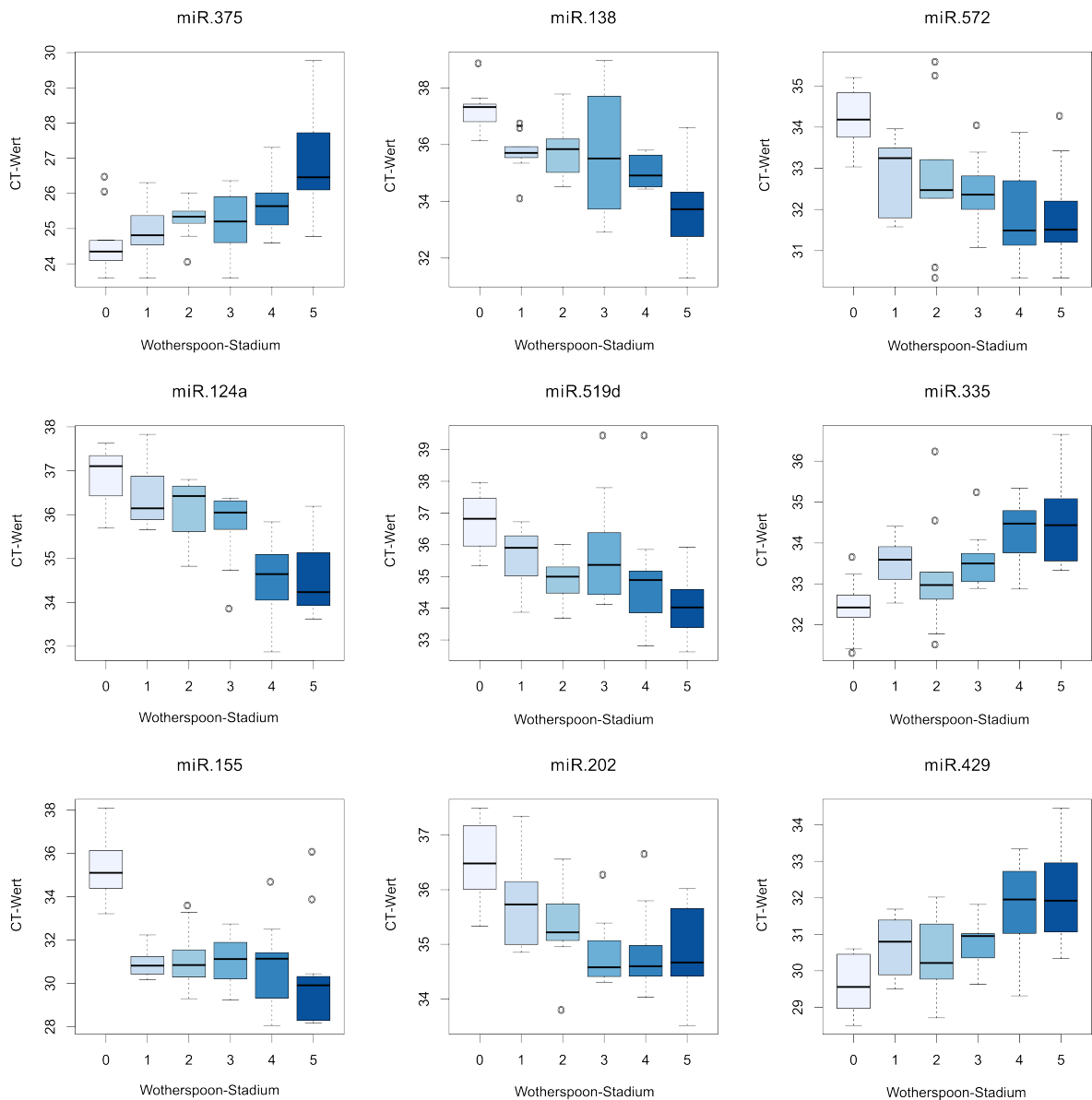
I) Anhang

Boxplot-Diagramme der im Jonckheere-Terpstra-Test und Bonferroni-Korrektur signifikant veränderten miRNAs der initialen Studie

(Darstellung der CT-Werte gegenüber den Wotherspoon Stadien. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)

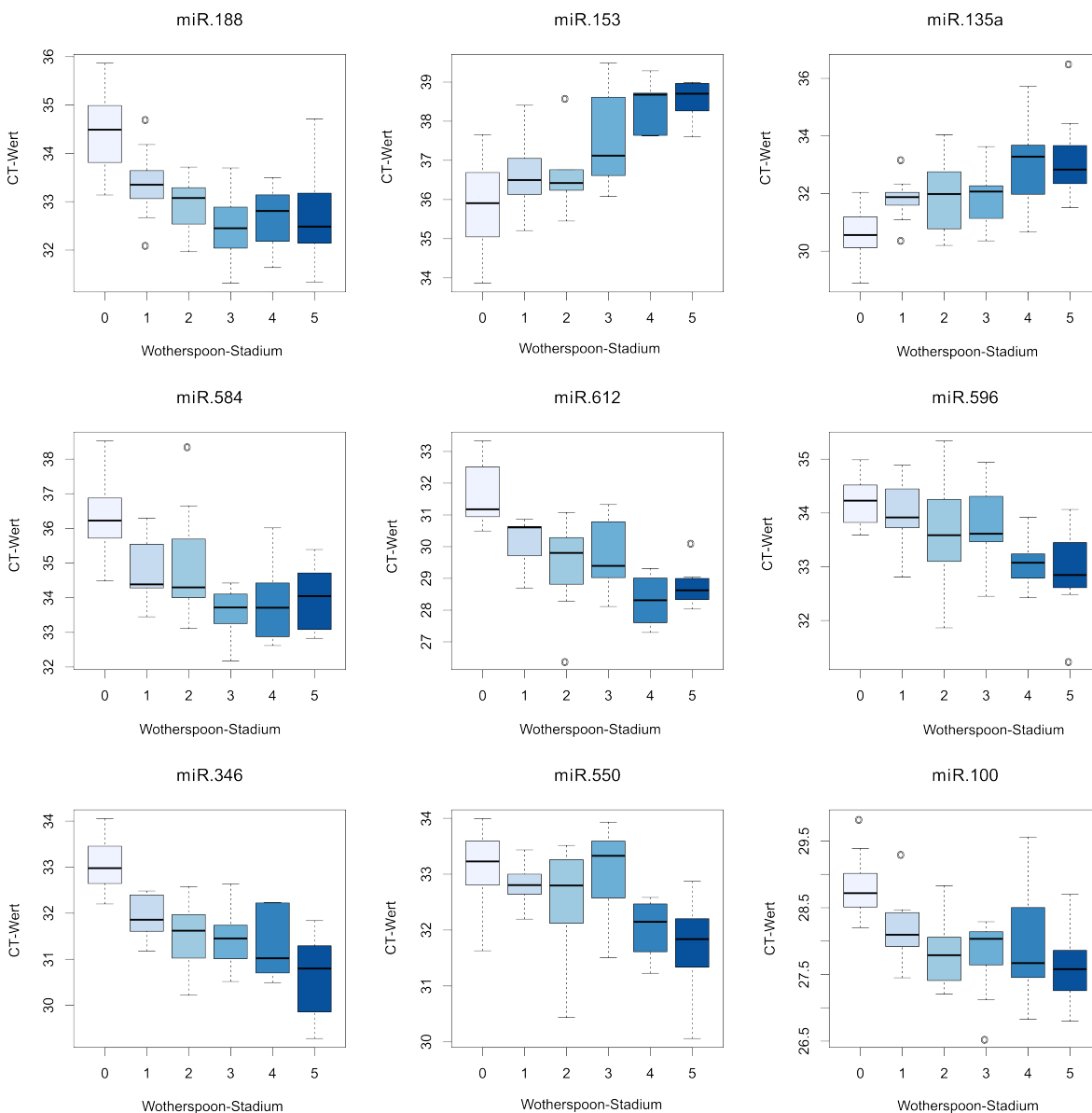


Boxplot-Diagramme der im Jonckheere-Terpstra-Test und Bonferroni-Korrektur signifikant veränderten miRNAs der initialen Studie (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Wotherspoon Stadien. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)

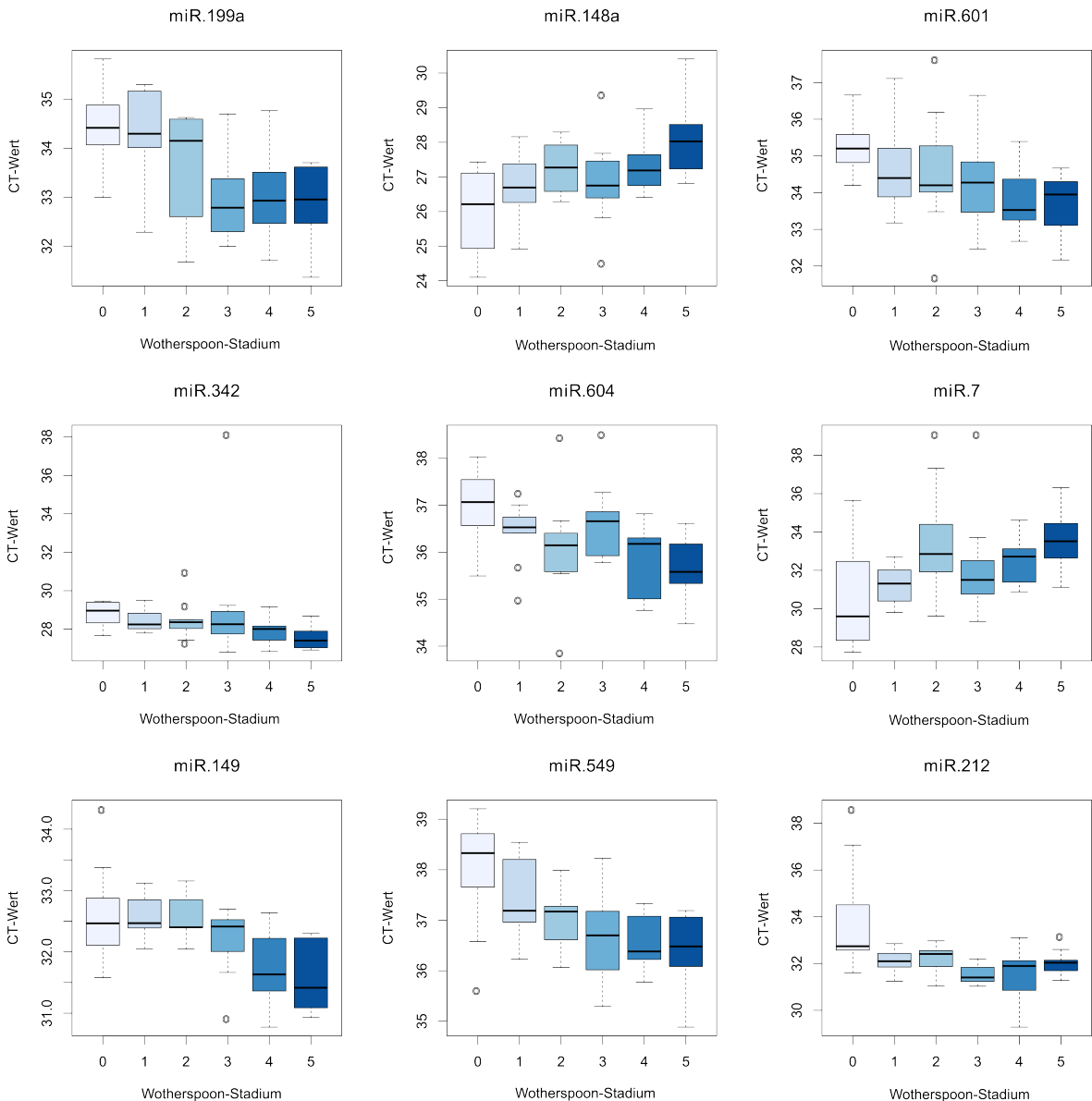


Boxplot-Diagramme der im Jonckheere-Terpstra-Test und Bonferroni-Korrektur signifikant veränderten miRNAs der initialen Studie

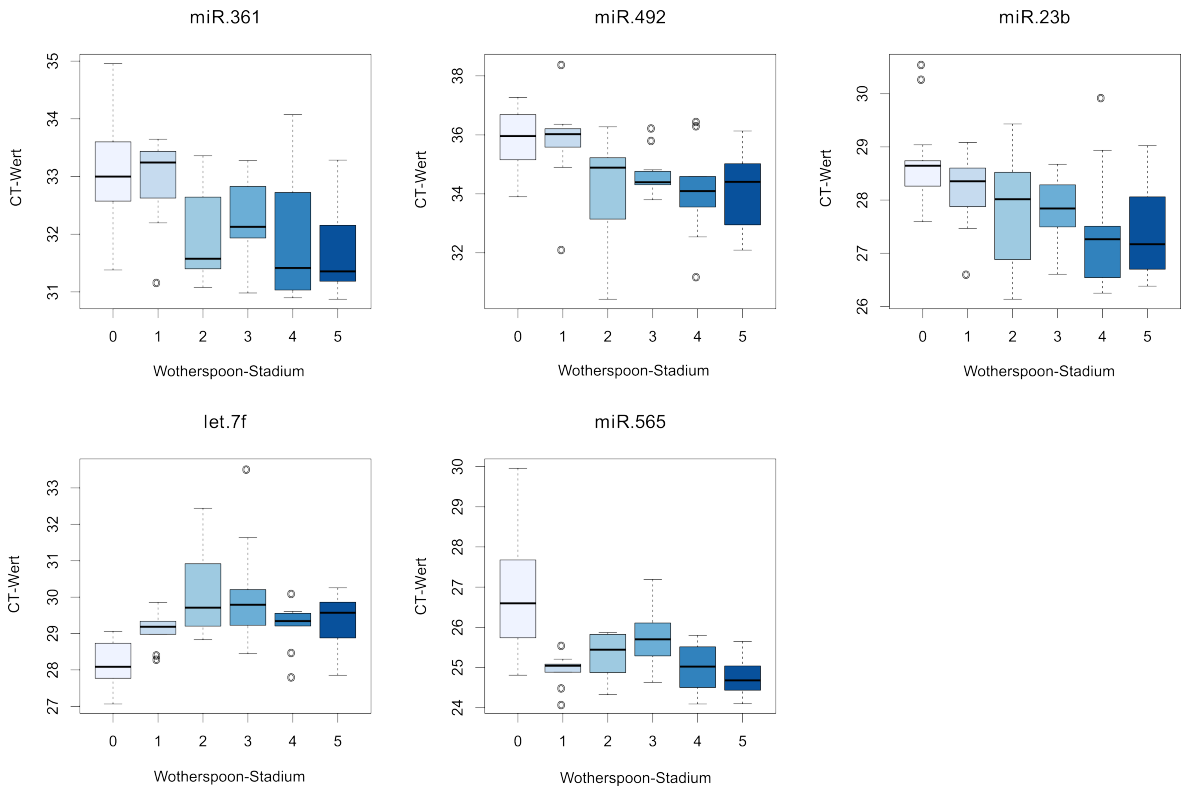
(Darstellung der CT-Werte gegenüber den Wotherspoon Stadien. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)



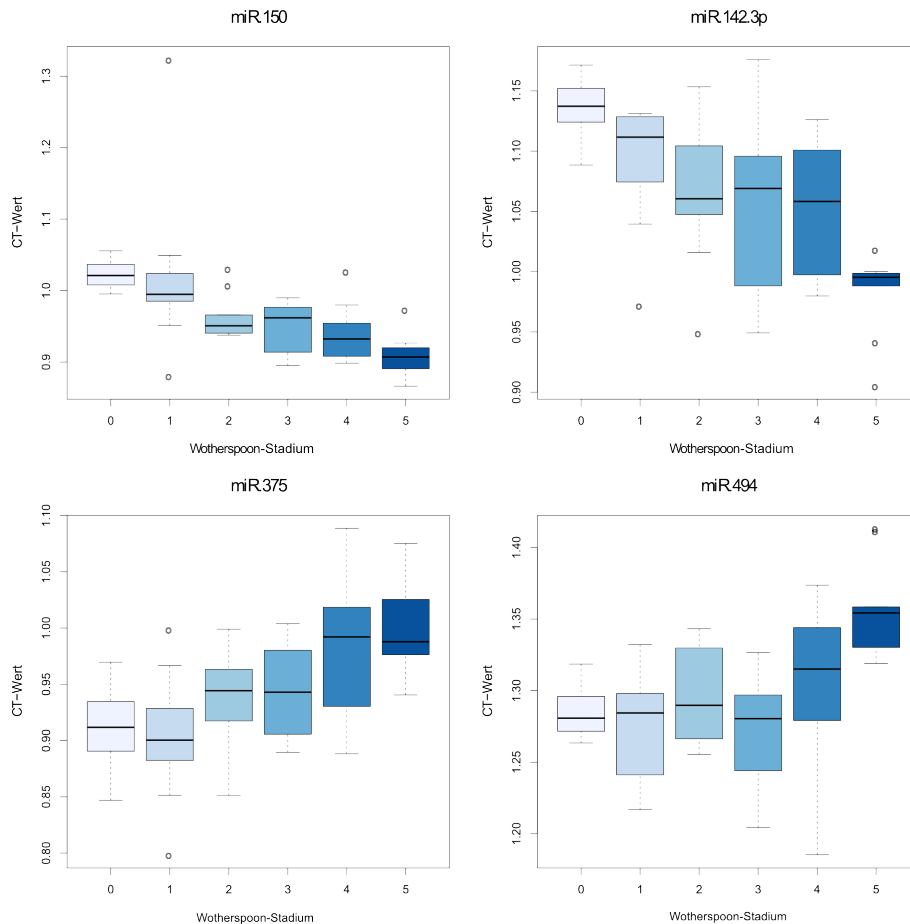
Boxplot-Diagramme der im Jonckheere-Terpstra-Test und Bonferroni-Korrektur signifikant veränderten miRNAs der initialen Studie (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Wotherspoon Stadien. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)



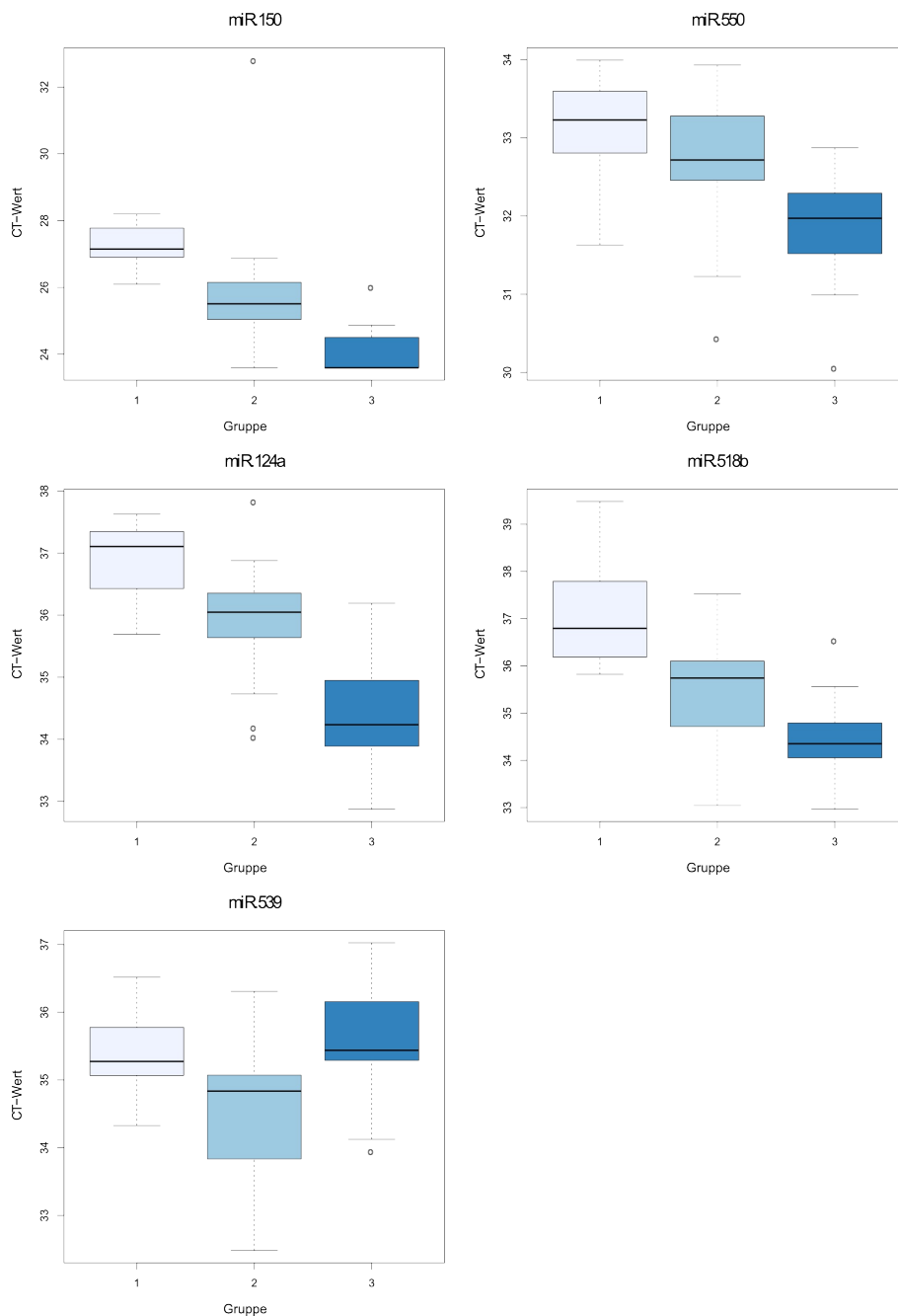
Boxplot-Diagramme der im Jonckheere-Terpstra-Test und Bonferroni-Korrektur signifikant veränderten miRNAs der initialen Studie (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Wotherspoon Stadien. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)



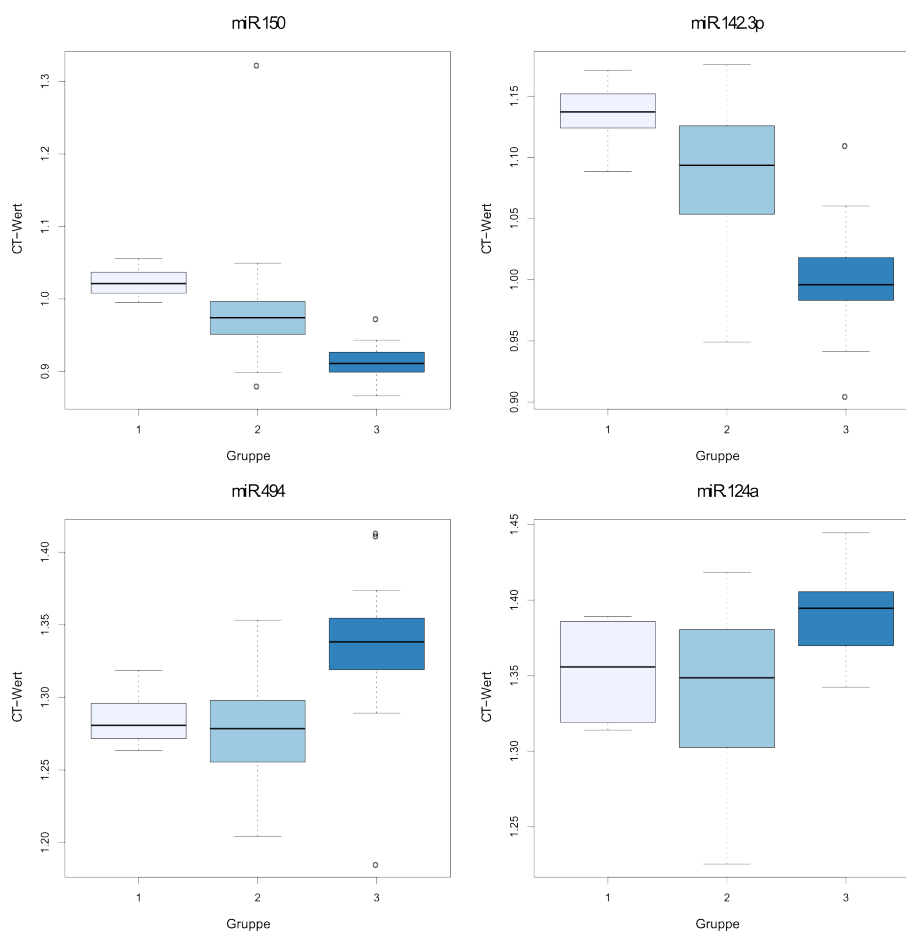
Boxplot-Diagramme der im Jonckheere-Terpstra-Test und Bonferroni-Korrektur signifikant veränderten miRNAs der Kontrollstudie (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Wotherspoon Stadien. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.



Boxplot-Diagramme der im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und Bonferroni-Korrektur signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs der initialen Studie (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Gruppen 1 („Gesund“), 2 („Gastritis“) und 3 („MALT-Lymphom“). Die Gruppe 1 wird nur zur Veranschaulichung gezeigt, im Vergleichstest Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurden Gruppe 2 und 3 miteinander verglichen. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median an; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)



Boxplot-Diagramme der im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und Bonferroni-Korrektur signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs der Kontrollstudie (Darstellung der CT-Werte gegenüber den Gruppen 1 („Gesund“), 2 („Gastritis“) und 3 („MALT-Lymphom“). Die Gruppe 1 wird nur zur Veranschaulichung gezeigt, im Vergleichstest Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurden Gruppe 2 und 3 miteinander verglichen. Die obere und untere Kanten der Box beschreiben das obere bzw. untere Quartil; der prominente mittlere Balken zeigt den Median an; die Whisker präsentieren die Werte, die sich innerhalb der 1,5x Boxlänge befinden, über die Whisker hinausgehende Werte sind als „Ausreißer“ mit Kreisen veranschaulicht.)



II) Veröffentlichung

Thorns C, Kuba J, Bernard V, Senft A, Szymczak S, Feller AC, Bernd H (2012)
Deregulation of a distinct set of microRNAs is associated with transformation of gastritis into MALT lymphoma. Virchows Arch 460, 371-377

Thorns C, Kuba J, Feller AC, Bernard V, Senft A, Szymczak S, Bernd H (2012)
Transformation of gastritis to gastric marginal zone lymphoma is associated with deregulated expression of microRNAs. Der Pathologe 33 Sonderheft 1, 28 (Vortrag von Bernard auf der 96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., Berlin, 31. Mai 2012)

III) Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen großen Dank aussprechen an all diejenigen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Christoph Thorns. Seine Hilfe sowohl bei der theoretischen Ausarbeitung als auch bei der praktischen Umsetzung waren von größter Bedeutung für das Gelingen der vorliegenden Arbeit. Vor allem die anspruchsvollen Diskussionen mit ihm und seine kritischen Hinweise und Ratschläge waren für mich von großem Wert. In der Zusammenarbeit mit Prof. Thorns und seinem Team hatte ich die Möglichkeit an zukunftsorientierter Forschung mitzuwirken.

Für die freundliche und immer hilfsbereite Unterstützung bei den praktischen Arbeiten möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck bedanken. Insbesondere gebührt mein Dank Annette Aufsess und Biggi Branke, die mich in die Techniken eingewiesen und bei der Umsetzung der Abläufe immer gerne unterstützt haben.

Des weiteren bedanke ich mich bei dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck, insbesondere bei Dipl.-Math. oec. Andrea Senft und Dipl.-Inform. Silke Szymczak, für die Beratung und Durchführung der statistischen Auswertung.

Auch meiner Familie und Freunden möchte ich hiermit meinen großen Dank aussprechen. Ich möchte besonders meinen Eltern danken, da sie mich jederzeit unterstützt und mir das Studium als auch die Dissertation erst ermöglicht haben. Bei meiner Schwester möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mir bei schwierigen Phase besonders während der Dissertationsarbeit gerne geholfen hat. Diesbezüglich gilt ein großer Dank auch vielen Freunden, die mich ebenfalls oft genug mit Diskussionen und Telefonaten voran getrieben und mich ermutigt haben.

IV) Lebenslauf

Name: Johannes Dietrich Kuba
Geburtsdatum: 27. Dez. 1985 in Dresden



Dissertation

Dez. 2012 - Mai 2013	Ausarbeitung der Dissertation
April 2012	Veröffentlichung (Erstautor: Prof. Dr. med. Thorns)
Aug. 2011 - Okt. 2011	Statistische Auswertung der Daten am Institut für Medizinische Biometrie und Statistik
April 2011 - Aug. 2011	Fallakquisition und Untersuchungen (Kontrollstudie)
Jan. 2011 - April 2011	Statistische Auswertung der Daten am Institut für Medizinische Biometrie und Statistik
Okt. 2009 - Dez. 2010	Fallakquisition und Untersuchungen (Initiale Studie)
Jan. 2009	Ethikantrag genehmigt

Beruf

Dez. 2012	Approbation / Mitglied der Sächsischen Ärztekammer
-----------	--

Studium

Okt./Nov. 2012	2. Staatsexamen Medizin an der Universität zu Lübeck
Aug. 2011 - Aug. 2012	Praktisches Jahr in Südafrika, Irland, Heide
Sept./ Okt. 2008	1. Staatsexamen Medizin an der Universität zu Lübeck
seit Okt. 2006	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck

Vorausbildung

März 2006 - Sept. 2006	Pflegepraktikum im Krankenhaus Dresden
Okt. 2005 – März 2006	Studium der Physik an der TU Dresden
Aug. 2004 - Sept. 2005	Anderer Dienst im Ausland – Camphill Ballytobin, Irland
Juli 2004	Abitur im Gymnasium "Luisenstift" in Radebeul
Sept. 1992	Beginn der Schulausbildung in Dresden