

Aus dem Institut für Pathologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Röcken)  
Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister  
(Leiter: Prof. Dr. med. W. Klapper )  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

---

# Molekulargenetische Charakterisierung pädiatrischer T-Zell lymphoblastischer Lymphome unter Herstellung von Genexpressionsprofilen

---

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**EVA NIENDORF**  
aus Greifswald

Kiel 2013

**Datum der mündlichen Prüfung:**  
11.12.2013

**Referent:**  
Prof. Dr. med. W. Klapper,  
Institut für Pathologie

**Koreferent:**  
Priv.-Doz. Dr. Brüggemann,  
Klinik für Innere Medizin II mit Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1	Non-Hodgkin-Lymphome	4
1.2	Epidemiologie des T-lymphoblastischen Lymphoms	4
1.3	Das T-lymphoblastische Lymphom im Kindesalter	5
1.4	Ziele der Arbeit	6
<b>2</b>	<b>Material</b> .....	<b>7</b>
2.1	Patientenkollektiv	7
2.2	Untersuchungsgut	7
2.3	Verwendete Materialien	9
2.3.1	Molekulargenetische Untersuchung	9
2.3.2	Immunhistochemische Untersuchung	10
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>11</b>
3.1	Molekularbiologische Untersuchungen	11
3.1.1	Simultane Isolierung von RNA und DNA	11
3.1.1.1	Prinzip .....	11
3.1.1.2	Lysierung und Homogenisierung .....	13
3.1.1.3	Isolierung der totalen RNA .....	13
3.1.1.4	Isolierung der genomischen DNA .....	14
3.1.1.5	Konzentrationsmessungen.....	14
3.1.1.6	Aufkonzentration von Proben niedriger Konzentration .....	15
3.1.2	InVitro Transkription	16
3.1.2.1	Prinzip .....	16
3.1.2.2	Erststrang-Synthese cDNA .....	18
3.1.2.3	Zweitstrang-Synthese cDNA.....	18
3.1.2.4	Reinigung der doppelsträngigen cDNA .....	19
3.1.2.5	Synthese Biotin markierter cRNA (in vitro Transkription) .....	19
3.1.2.6	Reinigung der IVT-Produkte/cRNA .....	20
3.1.2.7	Fragmentierung der cRNA .....	21
3.1.2.8	Hybridisierung der Gene Chip Arrays .....	21
3.1.2.9	Statistische Analyse der Genexpression.....	22
3.2	Immunhistologie	23
3.2.1	Prinzip der Färbung	23
3.2.2	Tissue Micro Arrays	24
3.2.3	Immunhistochemische Färbung von MLC1	25
3.2.3.1	Entparaffinierung .....	25
3.2.3.2	Antigen Retrieval .....	25
3.2.3.3	Primärantikörper anti-MLC1.....	26
3.2.3.4	Sekundärantikörper .....	26
3.2.3.5	Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB).....	26
3.2.3.6	Kernfärbung, Entwässerung, Deckelung.....	27
3.2.4	Auswertung	27

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
4.1	Genexpressionsanalysen	28
4.1.1	Überprüfung der Qualität von total-RNA und amplifizierter RNA	28
4.1.2	Analysen der Genexpressionsprofile im Hinblick auf späteres Rezidivvorkommen	31
4.1.3	Korrelation zwischen Genexpressionsprofil und histologischem Subtyp	33
4.2	Immunhistochemie	37
4.2.1	Etablierung und Antigen Retrieval	37
4.2.2	Färbung von Tissue Micro Arrays	40
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>43</b>
5.1	Unterschiede in der Genexpression zwischen T-lymphoblastischen Lymphomen im Kindesalter mit und ohne späteres Rezidiv	44
5.1.1	Ausgewählte differenziell exprimierte Kandidatengene	44
5.1.1.1	HIPK2.....	44
5.1.1.2	CTAGE5 und SSX1 .....	45
5.2	Genexpressionsunterschiede zwischen T-lymphoblastischen Lymphomen unterschiedlichen histologischen Subtypes bzw. Ausreifungsgrades	47
5.3	Immunhistochemische Färbung als Ausdruck differentieller Proteinexpression	49
5.4	Vergleich relevanter Gene für T-ALL und T-LBL	50
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Publikation der Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>64</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>75</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>76</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Das T-Zell Lymphoblastische Lymphom (T-LBL) gehört der großen Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) an. Dabei handelt es sich um maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems mit Tendenz zur Generalisierung ins Knochenmark (KM) und das zentrale Nervensystem (ZNS; AWMF-Leitlinien-Register 2009). Zu den bekannten onkogenen Mechanismen gehören zum Beispiel durch Translokation oder Deletion verursachte genetische Aberrationen. Die genetischen Veränderungen führen zur Deregulation von Zellwachstums-, Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptosevorgängen. (Hiddemann et al. 2005).

Die NHL machen ca. 4-7% der malignen Erkrankungen im Kindesalter aus und gehören somit zu den häufigsten Krebserkrankungen im Alter unter 15 Jahren (Kaatsch 2004, 2008, 2011; Kinderkrebsregister). NHL werden nach der *World Health Organisation* (WHO) und *Revised European American Lymphoma* (REAL) Klassifikation unterteilt in Lymphome der B- und T-Zell-Reihe. Innerhalb dieser Entitäten wird nochmals unterschieden nach reifen (peripheren) und unreifen Neoplasien. Diese Einteilung bezieht sich auf die korrespondierenden, physiologischen Entwicklungs- und Differenzierungsstufen lymphozytärer Vorläufer.

## 1.2 Epidemiologie des T-lymphoblastischen Lymphoms

Das T-LBL ist insgesamt eine seltene Erkrankung, die sich vorwiegend im Kindes- und Jugendalter manifestiert. Während die T-LBL nur etwa 2% im Erwachsenenalter ausmachen, liegt der Anteil der Erkrankungen im Kindesalter bei 20 bis 30% aller NHL (Hoelzer et al 2002, Baleyrier et al 2008, Smock et al 2008). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei etwa 9 Jahren. Männliche Patienten sind mit einem Verhältnis von etwa 2,5:1 mehr als doppelt so häufig betroffen wie weibliche Patienten (Burkhardt et al 2005, 2010). Mit einem Anteil von 80-90% ist das T-LBL deutlich häufiger als das B-Zell- lymphoblastische Lymphom (Vogetseder et al 2011).

### 1.3 Das T-lymphoblastische Lymphom im Kindesalter

Das T-LBL ist eine neoplastische Veränderung unreifer Vorläuferzellen (Lymphoblasten) der T-Zell-Reihe. Im Gegensatz zur T-Zell–Akuten Lymphatischen Leukämie (T-ALL), welche durch eine Knochenmarksinfiltration von mehr als 25% definiert ist, manifestiert sich das Lymphom häufig im Rahmen eines Befalls mediastinaler Lymphknoten. Daraus resultieren bei entsprechender Tumorgröße die klinischen Leitsymptome Husten, Stridor, Dyspnoe, Ödementwicklung oder eine Erhöhung des Jugularvenendruckes. Initial zeigen weniger als 20% aller betroffenen Kinder eine Knochenmarksinfiltration und ca. 4% eine Infiltration des ZNS (Burkhardt 2010). Mit Fortschreiten der Krankheit oder Auftreten eines Rezidivs erhöht sich dieser Anteil. Dabei sind die häufigsten Lokalisationen ein Wiederauftreten am initialen Ursprungsort, gefolgt vom Knochenmark und mit Abstand dem ZNS (Burkhardt et al 2009). Mit der derzeitig favorisierten Therapie nach dem NHL-BFM90-Protokoll, welches in den Grundzügen dem Konzept der Behandlung einer T-ALL entspricht, können dauerhafte Remissionsraten von bis zu 90 % erreicht werden (Reiter et al 2000). Die Therapie setzt sich, abhängig vom Tumorstadium (Einteilung nach dem St. Judes System, Murphy 1980), aus einer Induktionsphase, einem Extrakompartiment-Protokoll und einer Erhaltungstherapie zusammen. Ab Stadium III werden diese ergänzt durch ein Re-Induktionsprotokoll und zusätzliche kraniale Radiotherapie. Gegebenenfalls kann auf die kraniale Radiotherapie in Stadium III und IV verzichtet werden, wenn initial keine ZNS-Beteiligung vorlag (Burkhardt et al. 01/2006). Ist mit diesem Vorgehen nach 33 Tagen kein oder nur ein unzureichender Tumorregress zu erreichen, erfolgt der Übergang zum ALL-Hochrisiko-Protokoll (Reiter et al 2000).

Neben den guten Gesamterfolgen bei der Behandlung des kindlichen T-LBL erleiden ca. 10% der behandelten Patienten eine Progression der Erkrankung oder das Auftreten eines Rezidivs. Trotz intensiver Bemühungen haben diese Patienten nach wie vor eine in der Regel infauste Prognose (Burkhardt et al 2009). Aus vorangegangenen Studien geht hervor, dass die Erkrankung bei weiblichen Adoleszenten oftmals mit einem schlechteren Verlauf assoziiert ist (Burkhardt et al 2011). Auch der Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) auf dem Chromosom 6q korreliert mit einer verschlechterten Prognose (Burkhardt et al 2008). Klar festgelegte Faktoren zur Vorhersagbarkeit des Verlaufes, wie sie beispielsweise bei der T-ALL (Ansprechen auf Prednison, Ansprechen des KM, *Minimal Residual Disease* Evaluation (MRD), genetische Aberrationen) oder anderen NHL (Stadium, extranodale

Manifestationen, Alter, Serum- Lactat-Dehydrogenase, Performance-Status: The International Non Hodgkins's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993) existieren, konnten für das T-LBL bisher jedoch nicht definiert werden.

#### **1.4 Ziele der Arbeit**

Der dringende Bedarf an prognostischen Faktoren für den Verlauf des T-LBL im Kindesalter diene als Grundlage für die vorliegende Arbeit. Das Ziel bestand darin, anhand von Genexpressionsanalysen folgende Fragen zu klären:

- 1) Finden sich Unterschiede in der Genexpression zwischen T-LBL im Kindesalter mit und ohne späteres Rezidiv ?
- 2) Finden sich Genexpressionsunterschiede zwischen T-LBL unterschiedlichen histologischen Subtypes bzw. Ausreifungsgrades?
- 3) Lässt sich eine differentielle Genexpression auf mRNA-Ebene auch mit immunhistochemischen Färbungen als Nachweis auf Proteinebene darstellen?

## 2 Material

### 2.1 Patientenkollektiv

Die Fallgruppe zur Untersuchung T-LBL im Kindesalter bestand aus 33 pädiatrischen Biopsien (Patientenalter 1-16 Jahre) mit einem Durchschnittsalter von 7 und Median bei 6 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Etwa 21% der Betroffenen waren weiblich. Die Rezidivrate lag ebenfalls bei 21% aller Patienten (Tabelle 1).

Tabelle 1: Patientenkollektiv T-lymphoblastisches Lymphom		
	<i>Absolute Anzahl</i>	<i>Prozentuale Teilmenge</i>
<b>Geschlecht</b>	33	
Männlich	26	(78,8%)
Weiblich	7	(21,2%)
<b>Rezidiv</b>	33	
Ja	7	(21,2%)
Nein	26	(78,8%)
<b>Subtyp</b>	32 *	
Cortical	20	(62,5%)
nicht cortical	12	(37,5%)
<b>Anteil Tumorzellen (%)</b>	25**	
80-100%	18	(72%)
Unter 80%	7	(28%)

\* fehlende immunhistochemische Daten für einen Patienten mit Rezidiv

\*\* keine Informationen zum Tumorzellgehalt für 8 Patienten

### 2.2 Untersuchungsgut

Die Verwendung der Materialien fand in anonymisierter Form entsprechend der Richtlinien der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian- Albrechts Universität zu Kiel statt (Stellungnahme der Ethikkommission D447/10).



Bei dem zu untersuchenden Material für die Genexpressionsanalysen handelte es sich um primäre Biopsate der Initialtumoren aller Patienten aus den Jahren 1990 bis 2003. Sie wurden kryokonserviert und bis zur Bearbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. In Vorbereitung auf die Isolierung totaler RNA wurden von den kryokonservierten Gewebsblöcken 15-20 Schnitte á 20  $\mu\text{m}$  angefertigt und mit 350  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer behandelt. Das im Puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol inhibiert die Aktivität von RNasen und verhindert somit den Abbau von RNA.

Dünnschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen. Die für immunhistochemische Färbungen (IHC) benötigten Paraffinschnitte von 3-5  $\mu\text{m}$  Stärke wurden mittels Schlittenmikrotom aus korrespondierenden Paraffinblöcken geschnitten.

In der immunhistologischen Beurteilung wurde als Grundlage der Tumorzellgehalt in Hämatoxylin – Eosin- gefärbten Schnitten bestimmt.

Weiterhin wurden alle Fälle zur Abklärung der Linienzugehörigkeit und des Reifungsgrades immunhistochemisch charakterisiert: (i) Nachweis des T-Zell-Markers CD3 (CD= *Cluster of Differentiation*), (ii) die Bestätigung der Unreife durch TdT (Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase) und/oder CD34 und (iii) der Ausschluss von B-Zell-Zugehörigkeit (CD79a) sowie (iv) der Ausschluß myeloischer Herkunft (MPO= Myeloperoxidase).

In Anlehnung an Versuche zur Klassifizierung der T-LBL nach den Kriterien der *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL) für leukämische Neoplasien wurden die vorliegenden Lymphome anhand von IHC in einen kortikalen, CD1a positiven und einen nicht-kortikalen, CD1a negativen Subtyp unterteilt (Oschlies et al. 2011). Somit lagen für alle später hybridisierten Fälle (mit Ausnahme von 2 Fällen) aktuelle CD1a-Daten vor. Der CD1a-Status der zwei Ausnahmen wurde im ersten Fall von der Befunddatenbank des Instituts für Hämatopathologie übernommen (ältere Information der Färbung zum Diagnosezeitpunkt), und zum zweiten Fall lagen durchflußzytometrische Daten vor, die eine eindeutige Zuordnung erlaubten.

Eine Einteilung der nicht-kortikalen Typen in prä-, prothymisch und reifzellig wie bei der T-ALL ist mit immunhistochemischen Mitteln an formalin-fixiertem und paraffin-eingebetteten (FFPE) Material nicht möglich, da eine dafür notwendige, sichere Differenzierung zwischen

plasmatischer und membranständiger CD3-Färbung nicht gewährleistet werden kann (Oschlies et al. 2011).

## 2.3 Verwendete Materialien

### 2.3.1 Molekulargenetische Untersuchung

#### 1. RNA Isolation, Aufreinigung

→ QIAshredder homogenizer	Qiagen, 79654
→ AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen, 80204
→ RNase-Free DNase Set	Qiagen, 79254
→ RNeasy Micro Kit	Qiagen, 74004

#### 2. Reverse Transkription

→ GeneChip T7-Oligo(dT) Promoter Primer Kit	Affymetrix, 900375
SuperScript™ II RT	Invitrogen Life Technologies, 18064
<i>E. coli</i> DNA Ligase	Invitrogen Life Technologies, 18052
<i>E. coli</i> DNA Polymerase I	Invitrogen Life Technologies, 18010
<i>E. coli</i> RNaseH	Invitrogen Life Technologies, 18021
T4 DNA Polymerase	Invitrogen Life Technologies, 18005
5X Second-strand buffer	Invitrogen Life Technologies, 10812
10 mM dNTP	Invitrogen Life Technologies, 18427
→ GeneChip® Sample Cleanup Module	Affymetrix, 900371

#### 3. In vitro Transkription

→ BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit	Enzo Life Sciences, ENZ-42655
---	-------------------------------

#### 4. Microarray-Hybridisierung

Human Genome U133 Plus 2.0 Array (30 arrays)	Affymetrix, 900467
Human Genome U133 Plus 2.0 Array (6 arrays)	Affymetrix, 900466
→ GeneChip Hybridization Control Kit	Affymetrix, 900454
→ GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit	Affymetrix, 900720
Wash Buffer A	Affymetrix, 900721
Wash Buffer B	Affymetrix, 900722

#### 5. Zusätzliche Chemikalien

0.5M EDTA	Sigma
14.3 M $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)	Merck
Ethanol (70% und 96–100%)*	Merck

#### 6. Laborzubehör und Geräte

Pipetten	BioZym PreCision
Sterile, RNase-freie Pipettenspitzen	Eppendorf

Zentrifuge  
Vortexgerät  
Thermomixer  
Brutschrank  
Photometer  
Bioanalyzer 2100

Biofuge Pico, Heraeus  
Reax Top, Heidolph  
Thermomixer Comfort, Eppendorf  
Typ B 5028, Heraeus  
BioPhotometer, Eppendorf  
Typ G2938B, Agilent

### 2.3.2 Immunhistochemische Untersuchung

Xylol  
Ethanol (70%, 96%, 100%)  
Methanol  
Wasserstoffperoxid (Perhydrol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%)

hausintern  
hausintern  
J.T. Baker, 8045  
Merck, 107210

Proteinase K, Ready-to-use  
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System

Dako, S3020  
Dako, K3468

Tris- Waschpuffer, Zusammensetzung für pH 6

10 l Aqua dest.  
9,0 g Trizma-Base  
68,5 g Trizma HCL  
87,8 g Natriumchlorid  
5 ml Tween 20  
→ pH-Wert-Einstellung auf 3 und 8 mit Trizma HCl

Sigma, T1503  
Sigma, T3253  
Merck, 106400  
Merck, 822184

→ primärer Antikörper

Anti-MLC1, antibody produced in rabbit  
Probenverdünnungspuffer VIR-DIL aus HAMA-ELISA

Sigma, HPA003040  
Medac, 10018-A

→ sekundärer Antikörper

Zytochem Plus HRP Polymer System

Zytomed Systems, POLHRP-100

## **3 Methoden**

### **3.1 Molekularbiologische Untersuchungen**

#### **3.1.1 Simultane Isolierung von RNA und DNA**

##### *3.1.1.1 Prinzip*

DNA und RNA wurden mittels des AllPrep DNA/RNA Mini Kits (Qiagen) isoliert.

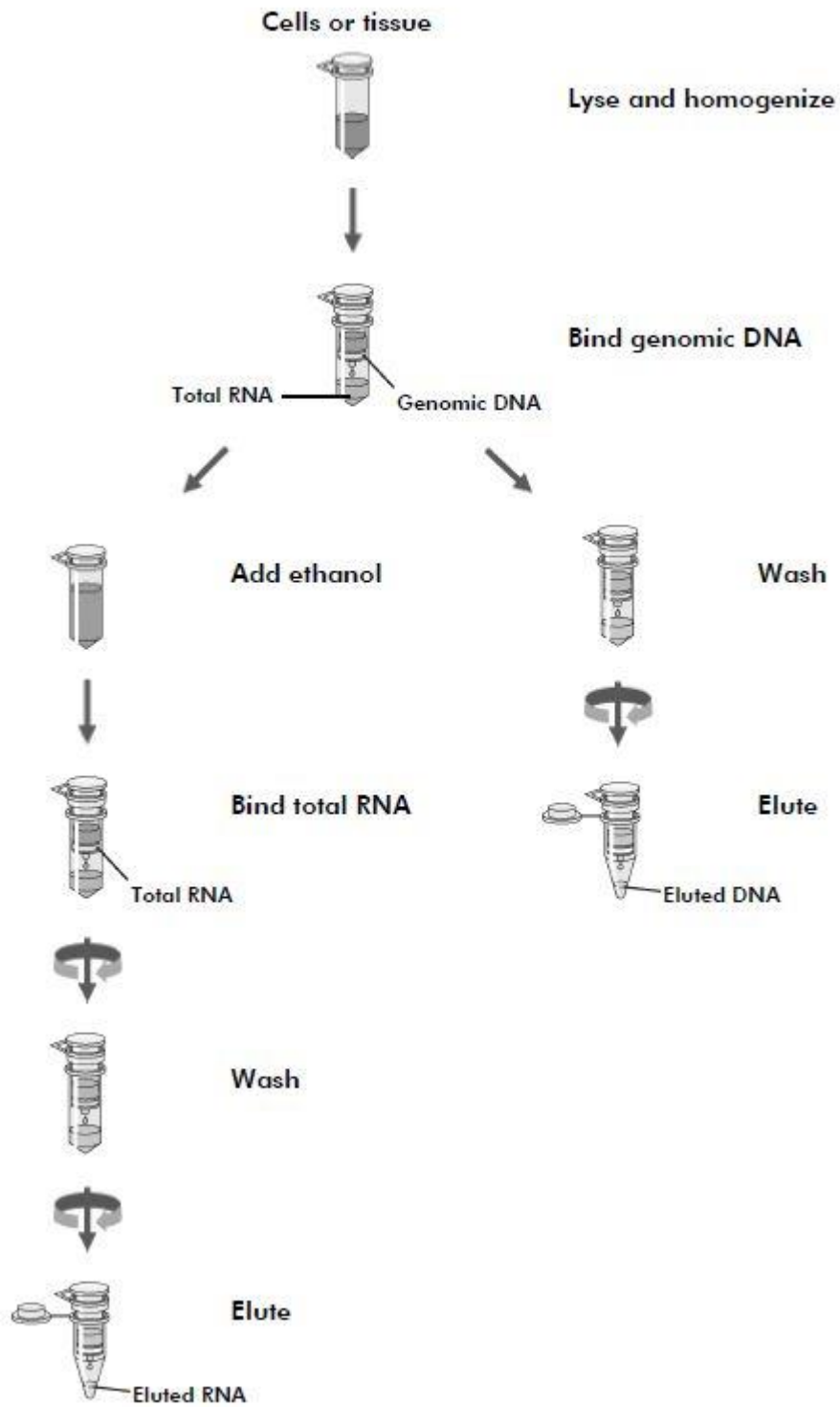
Zur Homogenisierung des Gewebes wird die *QIA Shredder* Säule genutzt. Das Prinzip derartiger Säulen basiert auf einer Membran, die vorbestimmte Stoffe bindet oder passieren lässt. Unterstützt wird diese siebartige Funktionsweise durch Zentrifugation, welche mittels Fliehkraft die abzutrennenden Komponenten durch die Membran drückt. Die *QIA Shredder* Säule bindet den großmolekularen Zellabfall und trennt ihn von DNA und RNA.

Letztere befinden sich dann in dem gereinigten und homogenisierten, wässrigen Durchfluss.

Bei der anschließenden Verwendung der DNA Säule wird DNA auf der Säulenmembran gebunden, die RNA gelangt mit dem Durchfluss in das Tube und wird auf eine RNA-bindende Säule gegeben. Es folgen Waschschrte in beiden Säulen unter Anwendung verschiedener Puffer, die Gewebsreste und Proteine aus der Säulenmembran lösen.

Anschließend werden die jeweils säulengebundene DNA und RNA von der Membran eluiert und liegen nun als wässrige Lösung vor. (Übersicht, Abbildung 1)

## AllPrep DNA/RNA Procedure



**Abb 1:** DNA/RNA Isolierung (AllPrep DNA/RNA Mini Handbook 11/2005, Qiagen)

### **3.1.1.2 Lysierung und Homogenisierung**

Nach kurzem Antauen der vorbereiteten Probe (siehe 2.2) wurde das grobe Lysat auf dem Vortexer durchmischt und kurz zentrifugiert. Das Lysat wurde auf eine *QIA Shredder* Säule pipettiert und 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um größere Gewebestücke zu zerkleinern.

Der Durchfluss wurde auf eine *All Prep* DNA Säule zwecks DNA-Bindung pipettiert und bei 10.000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Säule wurde in einem neuen 2 ml Reaktionsgefäß platziert und bei Raumtemperatur für die spätere DNA-Isolierung zur Seite gestellt

### **3.1.1.3 Isolierung der totalen RNA**

Zum Durchfluss aus der *All Prep* Säule wurden 350 µl 70% Ethanol gegeben und mit Hilfe der Pipette durchmischt. Anschließend wurde eine *RNeasy* Säule mit der Lösung beladen und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses erfolgte ein zusätzlicher Zwischenschritt zur Entfernung von DNA-Kontaminationen mittels eines DNase-Verdau. Dazu wurden 350 µl des Puffers RW1 auf die *RNeasy* Säule gegeben und für 15 Sekunden (10.000rpm) zentrifugiert; der Durchfluss wurde verworfen.

Ein DNase I- Inkubationsmix aus 10 µl DNase I- Stammlösung und 70 µl des Puffers RDD wurde hergestellt und auf die *RNeasy* Säule pipettiert. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und zentrifugiert (15 sek, 10.000 rpm). Der Durchfluss wurde verworfen.

Die *RNeasy* Säule wurde nun zweimalig mit jeweils 500 µl RPE-Puffer beladen und zentrifugiert (10.000 rpm), im ersten Durchgang 15 Sekunden, im zweiten 2 Minuten. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Es erfolgte die erneute Zentrifugation für 1 Minute bei maximaler Drehgeschwindigkeit, um die Säule gut zu trocknen.

Die *RNeasy*-Säule mit der gebundenen total-RNA wurde mit 30 µl RNase-freien Wassers beladen und 1 Minute zentrifugiert (10.000 rpm). Das Eluat wurde noch einmal auf die gleiche Säule pipettiert und 1 min (10.000 rpm) zentrifugiert, um die Konzentration der RNA zu erhöhen. Das so gewonnene I. Eluat mit der aufgereinigten totalen RNA wurde sofort auf

Eis gestellt. Ein II. Eluat wurde auf dieselbe Weise hergestellt, indem die gleiche Säule mit diesmal 15 µl RNase-freien Wassers beladen wurde. Auch dieses wurde für die nachfolgenden Konzentrationsmessungen auf Eis gestellt, für welche jeweils 2 mal 1 µl des jeweiligen Eluates entnommen wurden. Die übrige RNA- Lösung wurde bei -80°C eingefroren.

#### **3.1.1.4 Isolierung der genomischen DNA**

Die Aufreinigung der DNA erfolgte ähnlich dem Prinzip der RNA- Isolierung. Die anfangs zur Seite gestellte *DNA AllPrep*- Säule wurde mit 500 µl des Puffers AW1 beladen, 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl des Puffers AW2 beladen und 2 Minuten bei maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit zentrifugiert, um die Membran zu waschen. Der Durchfluss wurde verworfen und nochmalig 1 Minute bei maximaler Umdrehung zentrifugiert.

Die Säule wurde mit 100 µl EB-Puffer beladen. Nach einer Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur wurde 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Eluat im Tube belassen. Mit nochmals 100 µl EB-Puffer wurde diese Prozedur wiederholt. Daraus resultierten 200 µl Eluat mit aufgereinigter DNA, welches sofort auf Eis gestellt wurde. Es folgte wieder die Entnahme von jeweils 2 mal 1 µl für die folgenden Messungen. Die restliche DNA wurde bei -20°C gelagert, um gegebenenfalls für zukünftige Experimente genutzt zu werden.

#### **3.1.1.5 Konzentrationsmessungen**

Von den gewonnenen Eluaten (RNA I und II, DNA) wurden jeweils 2 mal 1 µl für Messungen im Photometer und *Bioanalyzer* entnommen.

In einer Verdünnung von jeweils 1:100 mit Wasser wurde direkt nach der Isolierung der Nukleinsäuren die UV-spektrometrische Konzentrationsmessung durchgeführt.

Gemessen wird die Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (in diesem Fall  $\lambda = 260\text{nm}$ ) beim Durchgang durch die zu untersuchende Substanz (RNA/DNA- Eluat). Mit Hilfe dieses Wertes OD (optische Dichte, 1 Einheit  $\text{OD}_{260}$  entspricht 40 µg/ml RNA oder 50 µg/ml dsDNA) kann die Konzentration berechnet werden. Zusätzlich lässt sich eine Aussage über

die Reinheit der Nukleinsäuren treffen. Dafür wird der Quotient aus der Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260\text{nm}$  und  $\lambda = 280\text{nm}$  (= Absorptionsmaximum verunreinigender Aminosäuren/Alkohol) gebildet. Liegt er bei 1,8 bis 2, kann von einer reinen RNA-/DNA-Lösung ausgegangen werden.

Konzentration und Integrität von totaler RNA, in vitro transkribierter RNA und fragmentierter RNA wurden außerdem mittels *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) dokumentiert.

Die gemessenen Werte wurden für die weiteren Prozeduren tabellarisch festgehalten.

### **3.1.1.6 Aufkonzentration von Proben niedriger Konzentration**

Bei 6 RNA-Proben wurde eine für die in vitro-Transkription zu geringe Konzentration gemessen. Zum Aufkonzentrieren wurde das *RNeasy Micro Kit* (Qiagen) verwendet.

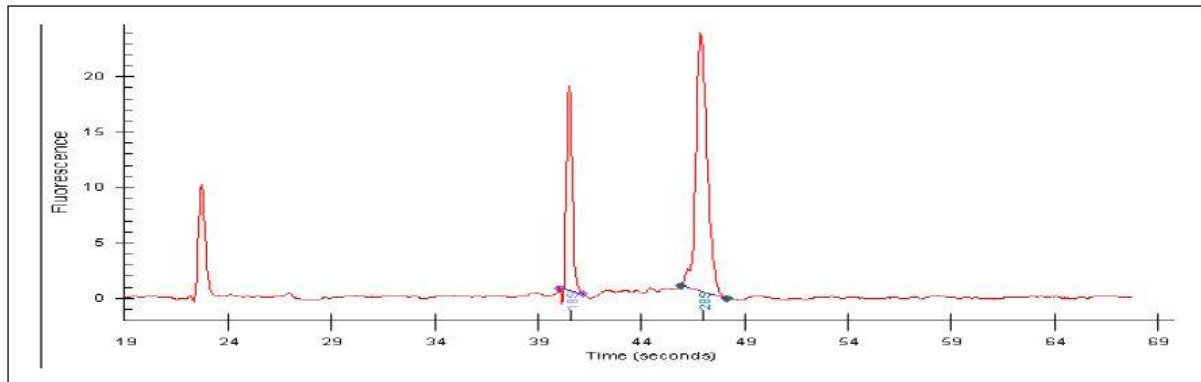
Jedes der RNA-Eluate mit zu geringer Konzentration wurde mit RNase-freiem Wasser auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Dazu wurden 350  $\mu\text{l}$  vorbereiteten RLT-Puffers und 250  $\mu\text{l}$  100% Ethanol gegeben und mit der Pipette vermischt. Die insgesamt 700  $\mu\text{l}$  wurden zügig auf die *RNeasy Elute Spin*-Säule geladen und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die an die Säule gebundene RNA wurde mit 700  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer und mit 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer gewaschen.

Der letzte Waschschrift erfolgte mit 500  $\mu\text{l}$  80% Ethanol. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde in ein neues 2 ml *Collection Tube* gesteckt und mit offenem Deckel 5 min bei 13000 rpm zwecks Trocknung zentrifugiert. Durchfluss und *Collection Tube* wurden verworfen und die Säule in einem neuen 1,5 ml Tube platziert. Sie wurde mit 14  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser beladen und bei maximaler Geschwindigkeit 1 Minute lang zentrifugiert. Der Durchfluss wurde abermals auf die Säule geladen und noch einmal gleichartig zentrifugiert. Das Resultat war das I. Eluat.

Für das II. Eluat wurde die Säule wieder in ein neues 1,5 ml Tube gesetzt und nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  RNase-freien Wassers erneut ebenso zentrifugiert.

Abschließend wurden wieder jeweils 2 mal 1  $\mu\text{l}$  für Konzentrationsmessungen in Photometer und *Bioanalyzer* (Siehe Abbildung 2) entnommen.





**Abb. 2:** *Bioanalyzer*-Messung der totalen RNA: Für eine hoch qualitative, totale RNA-Probe sollten zwei gut definierte peaks (entsprechend 18S und 28S Untereinheiten ribosomaler RNA) sichtbar sein. Leichte Erhebungen in der Basislinie spiegeln den Anteil der vorhandenen messenger RNA (mRNA) wieder (GeneChip® Expression Analysis Technical Manual, Affymetrix).

### 3.1.2 InVitro Transkription

#### 3.1.2.1 Prinzip

Um mögliche Unterschiede in der Genexpression unter Anwendung der Affymetrix-Plattform zu untersuchen, ist es notwendig, die vorliegenden mRNA- Nukleinsäuresequenzen „lesen“ zu können. Dazu wird eine markierte und geschnittene Form dieser mRNA benötigt, um als Hybridisierungspartner für Gensequenzen auf dafür vorgesehenen Chips zu fungieren. Die Herstellung dieser markierten RNA erfolgte mit Hilfe eines Systems nach dem Affymetrix *Gene Chip Protokoll*, welches nacheinander die notwendigen Prozesse miteinander verknüpft:

Im ersten Schritt wird die sogenannte copy-DNA (=cDNA) transkribiert. Mit Hilfe des T7-(dT)<sub>24</sub> Primers und reverser Transkriptase (RT) wird aus einem mRNA-Strang ein komplementärer cDNA- Strang synthetisiert. Dieser wird bei der darauf folgenden Zweitstrangsynthese zu einem Doppelstrang ergänzt. Die Doppelstrang-DNA fungiert als Matrize für die anschließende in vitro Transkription (IVT). Von der hergestellten cDNA werden mit Hilfe von Enzymen und Biotin-markierten Ribonukleotiden RNA-Moleküle synthetisiert. Nach Fragmentierung der nun amplifizierten RNA erfolgt die Hybridisierung an DNA-Sequenzen auf dem Chip. Gebundene RNA-Fragmente werden mittels ihrer Biotin-Markierung detektiert (Abbildung 3)

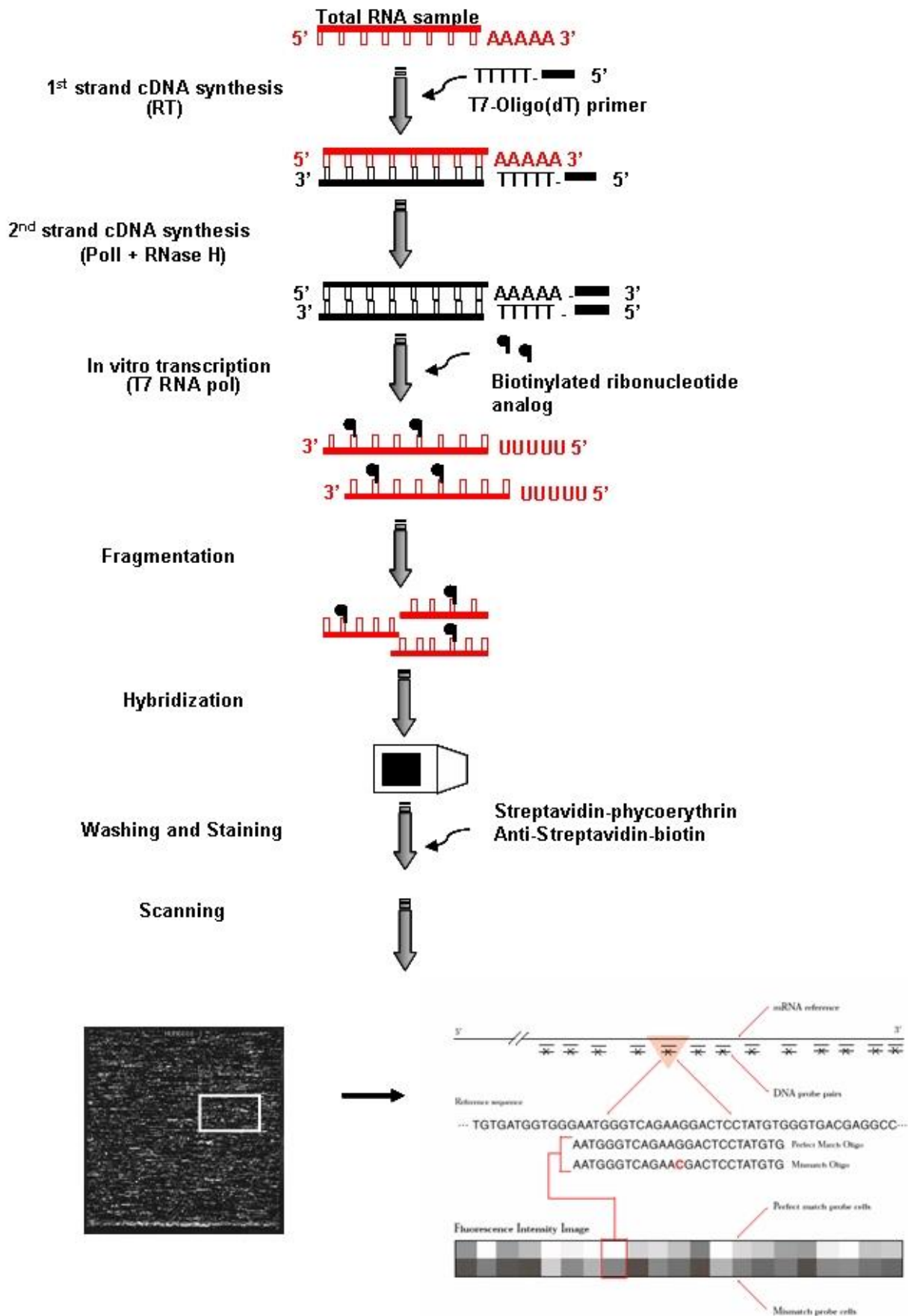


Abb. 3: Schematischer Ablauf cDNA-Synthese, IVT, Hybridisierung (Expression Arrays Principle, Affymetrix)

### 3.1.2.2 *Erststrang-Synthese cDNA*

Zur Vorbereitung der Erststrang- Synthese wurden von den RNA- Lysaten jeweils 5 µg entnommen und in ein RNase- freies Tube gegeben. Dazu wurden 2 µl T7-(dT)<sub>24</sub> Primer und bis zu 5 µl RNase- freien Wassers pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 70 ° C wurde das Tube zügig für 1 Minute auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert.

Eine zuvor auf 42 ° C erwärmte Mischung aus 4 µl 5 x *first strand reaction buffer*, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP pro Ansatz wurde hinzugefügt und kurz auf dem Vortexer gemischt. Es folgte eine Inkubation der Substanzen bei 42 ° C für 2 Minuten.

Anschließend folgte die Zugabe von 1µl *Superscript II RT*. Das Tube wurde mit dem Finger angeschnippt und kurz zentrifugiert, um die Reaktion am Boden des Tubes zu konzentrieren. Es folgte die Inkubation bei 42 ° C für eine Stunde, nach deren Ablauf das Reaktionsgefäß für 2 Minuten auf Eis gestellt wurde. Danach wurde es kurz zentrifugiert, um Kondensationsflüssigkeit an den Wänden des Tubes herunterzubringen. Die Synthese des ersten cDNA- Stranges war hiermit abgeschlossen.

### 3.1.2.3 *Zweitstrang-Synthese cDNA*

Die Zweitstrangsynthese begann mit der Vorbereitung eines Mastermixes (Pipettiermengen pro Probe):

- 91 µl DEPC- behandeltes Wasser
- 30 µl 5x *second strand reaction buffer*
- 3 µl 10mM dNTP Mix
- 1 µl *E. Coli* DNA Ligase (10 U/µl)
- 4 µl *E. Coli* DNA Polymerase I (10U/ µl)
- 1 µl *E.Coli* RNase H (2 U/ µl)

Für jede Probe wurden 130 µl Mastermix zu den zuvor auf Eis gelagerten Erststrang- Syntheseprodukten (20 µl) hinzugegeben, mit den Fingern angeschnippt, anzentrifugiert und für zwei Stunden bei 16 ° C inkubiert. Danach wurden 2 µl 5 U/µl T4 DNA Polymerase hinzugefügt und nochmals bei gleicher Temperatur 5 Minuten inkubiert. Mit der anschließenden Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA wurde die Synthese der doppelsträngigen cDNA gestoppt.

Es schloss sich entweder der direkte Übergang zur Reinigung der hergestellten cDNA oder die zwischenzeitliche Lagerung der Syntheseprodukte bei -20 ° C an.

#### **3.1.2.4 Reinigung der doppelsträngigen cDNA**

Für die Aufreinigung der cDNA wurde das Kit *GeneChip Sample Cleanup Module* von Affymetrix benutzt. Zunächst wurden 600 µl *cDNA Binding Buffer* zu den Syntheseprodukten gefügt und auf dem Vortexer kurz gemischt. Bei Überprüfung der Farbe sollte diese dem gelben Farbton des Puffers entsprechen.

Eine *cDNA-Cleanup*-Säule wurde mit 500 µl der Probe beladen und 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Mit dem Rest (262 µl) wurde auf der gleichen Säule ebenso verfahren, Durchfluss und Tube wurden danach verworfen.

Um die auf der Membran befindliche cDNA zu reinigen wurde die Säule mit 750 µl *cDNA Wash Buffer* beladen, bei 10.000 rpm 1 Minute lang zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugierung bei offenem Tubendeckel und maximaler Drehzahl für 5 min. Die Säule wurde abermals in ein neues 1,5 ml Tube gesteckt und mit 14 µl *cDNA Elution Buffer* unter einminütiger Inkubation beladen. Es folgte die Zentrifugierung bei 13.000 rpm für eine Minute. Ebenso wurde nach erneuter Beladung der Säule mit 10 µl des *Elution Buffers* verfahren. Insgesamt resultierte ein Endvolumen von ca. 22 µl (24 µl - 2µl Verlust) der gereinigten cDNA- Lösung.

#### **3.1.2.5 Synthese Biotin markierter cRNA (in vitro Transkription)**

Zur Herstellung der Biotin-markierten cRNA wurde das BioArray *High Yield RNA Transcript Labeling Kit* (Enzo Life Sciences) benutzt. Der Mastermix bestand aus folgenden Komponenten pro Probe:

- 4 µl 10x HY *Reaction Buffer* (Vial 1)
- 4 µl 10x *Biotin Labeled Ribonucleotides* (Vial 2)
- 4 µl 10x DTT (Vial 3)
- 4 µl 10x RNase Inhibitor Mix ( Vial 4)
- 2 µl 20x T7 RNA Polymerase (Vial 5)

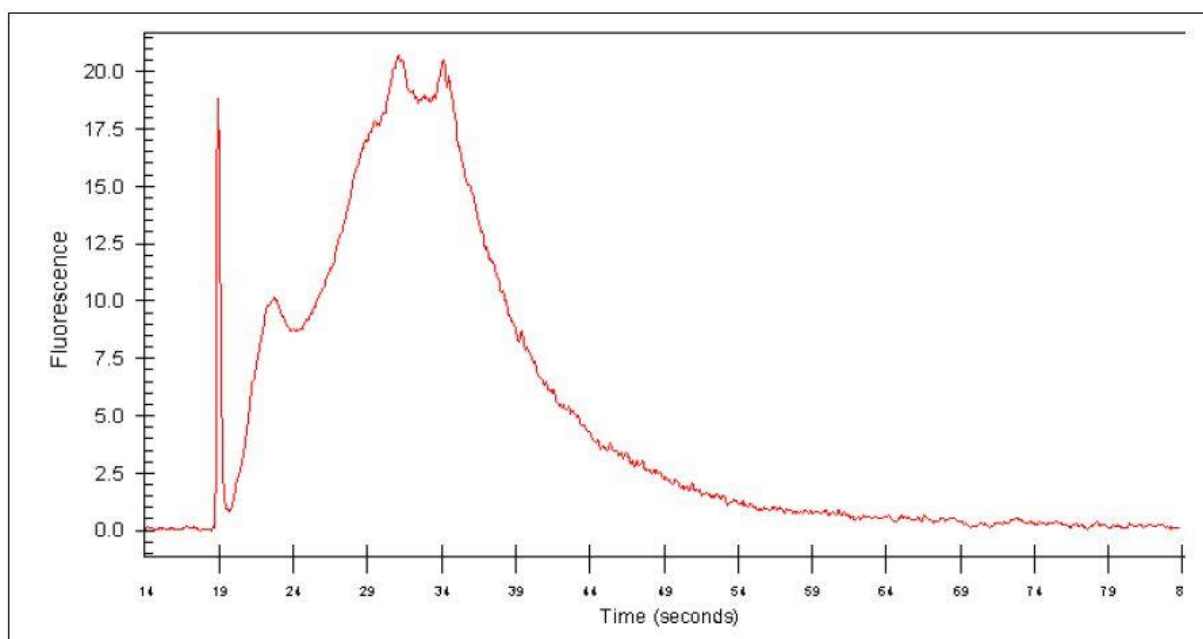
Die 18 µl des Mixes wurden mit 22 µl gereinigter cDNA vermischt und kurz zentrifugiert. Während der nachfolgenden 5-stündigen Inkubation bei 37 ° C wurde per IVT cRNA synthetisiert.

### 3.1.2.6 Reinigung der IVT-Produkte/cRNA

Für die Reinigung der cRNA wurden vorbereitend 60 µl RNase-freien Wassers zu den 40 µl des IVT-Produktes gegeben, 3 Sekunden im Vortexer gemischt und kurz zentrifugiert. Ebenso wurde nach Zugabe von 350 µl IVT *cRNA Binding Buffer* verfahren. Dazu wurden 250 µl 100% Ethanol mit der Pipette gemischt. Die insgesamt 700 µl wurden auf eine IVT *cRNA-Cleanup*-Säule geladen, 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss mit Tube verworfen. Nach Einsetzen in ein neues Tube wurde die Säule mit 500 µl IVT *cRNA Wash Buffer* beladen, 15 sek. bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Nach Auftragen von 500 µl 80% Ethanol auf die Säule wurde ebenso verfahren und der Durchfluss verworfen. Es wurde nochmals, bei offenem Tubendeckel, für 5 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert.

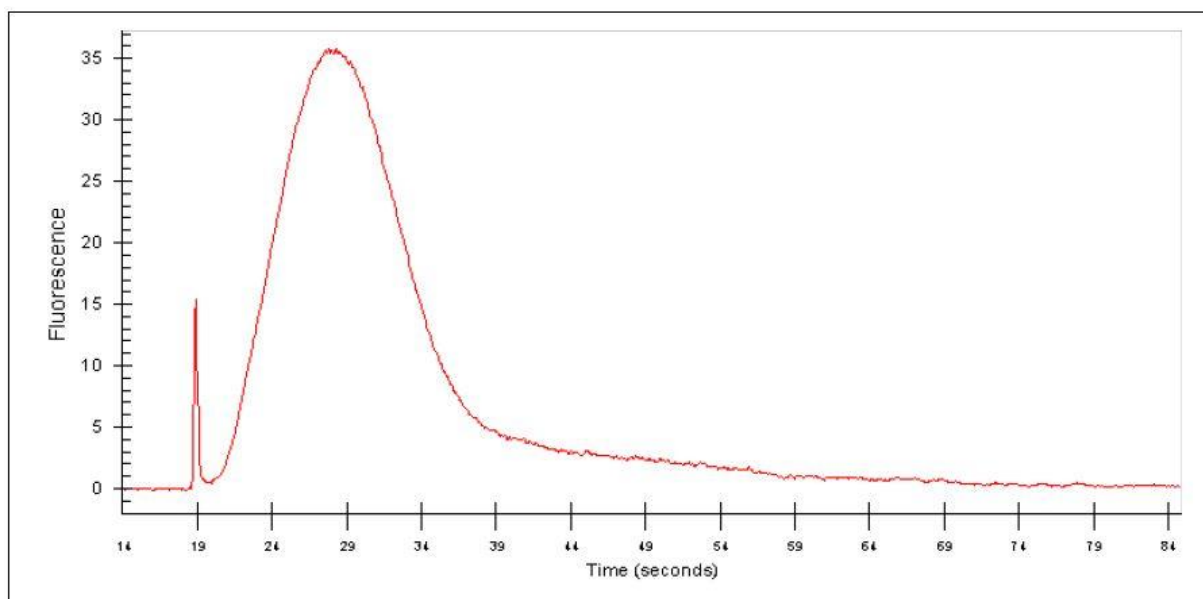
Nach dem Umsetzen der Säule in ein neues 1,5 ml Tube wurde diese mit 20 µl RNase- freiem Wasser beladen und nach einer Inkubationszeit von 2 min zentrifugiert (1 min bei 13.000 rpm). Dieser Vorgang wurde mit weiteren 20 µl RNase- freien Wassers wiederholt, so dass insgesamt 40 µl Lösung mit gereinigter, Biotin-markierter cRNA vorlagen. Es erfolgte die Kontrolle der RNA- Amplifikation mittels *Bioanalyzer* (Abb. 4).



**Abb. 4:** Bioanalyzer- Messung Biotin-markierter cRNA: Verteilung der cRNA-Molekülgrößen auf bis zu 4000 nt nach in vitro Transkription (GeneChip® Expression Analysis Technical Manual, Affymetrix).

### 3.1.2.7 Fragmentierung der cRNA

Zur gesamten Menge der hergestellten markierten cRNA wurden 8 µl Fragmentierungspuffer zugefügt und für 35 Minuten bei 94 ° C inkubiert. Anschließend wurde das Tube für 2 Minuten in Eis heruntergekühlt und kurz zentrifugiert. Damit war die Fragmentierung abgeschlossen. Es wurden wieder jeweils 2 mal 1µl für die Messungen (Abb. 5) entnommen. Die restliche fragmentierte cRNA wurde bei -70 ° C bis zur Hybridisierung mit den *Gene Chip Arrays* gelagert.



**Abb. 5:** *Bioanalyzer*- Messung: Biotin-markierte, fragmentierte cRNA einer Durchschnittsgröße von ca. 200 nt (*GeneChip*@Expression Analysis Technical Manual, Affymetrix).

### 3.1.2.8 Hybridisierung der *Gene Chip Arrays*

Der für die Hybridisierung genutzte Chip von Affymetrix war der *Human Genome (HG) U133 Gene Chip*. Diese Arrays ermöglichen Genexpressionsanalysen für über 47.000 kodierende Genfragmente und Varianten, die mehr als 38.500 gut untersuchte Gene beinhalten.

Um die fragmentierte cRNA auf dem *Gene Chip Array* hybridisieren zu können, erfolgte zunächst die Behandlung von jeweils 15 µg cRNA mit einem Hybridisierungs-Mastermix. Dieser bestand für jeweils eine Probe aus folgenden Komponenten:

30 µl H<sub>2</sub>O  
5 µl *Control Oligonucleotide B2* (3 nM)  
15 µl *20x Eukaryotic Hybridization Controls*  
150 µl *2x Hybridization Buffer*

Der Cocktail (insgesamt 300 µl) wurde jeweils 5 Minuten lang erst bei 99°C, dann bei 45°C inkubiert und anschließend weitere 5 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert.

In der Zwischenzeit wurden 200 µl eines *1x Hybridization Buffer* in die Arrays pipettiert und dann für 10 Minuten unter Rotation mit 60 rpm bei 45°C inkubiert.

Der Hybridisierungspuffer wurde wieder aus der Array-Kartusche entfernt und diese mit 200 µl des vorbereiteten Hybridisierungs-Cocktails befüllt. Es folgte die 16-stündige Inkubation der Arrays bei 45°C und Rotation mit 60 rpm im Hybridisierungsofen. Nach Ablauf der Hybridisierungsreaktion wurde der Mix im Array durch 250µl *Wash Buffer A* ersetzt.

Dem *Affymetrix Gene Chip* Protokoll entsprechend erfolgte zunächst die Eingabe der Daten (Project, Sample, Experiment) in die *GeneChip® Operating Software* (GCOS) und das Priming der *Fluidics Station*.

Dem Protokoll entsprechend wurden der *Streptavidin Phycoerythrin (SAPE) Solution Mix* und die *Antibody Solution* für das Staining vorbereitet und an den vorgegebenen Stellen der *Fluidics Station* platziert. Anschließend wurde das *Wash and Stain* Protokoll durchlaufen und der Scanvorgang eingeleitet. Alle Schritte erfolgten nach dem Protokoll für die *Fluidics Station 400*.

### **3.1.2.9 Statistische Analyse der Genexpression**

Zur Analyse der Expressionsdaten wurde die GCOS der Firma Affymetrix verwendet. Diese Software akquiriert die auf den Gene Chips vorhandenen Informationen und kann Analysen der Genexpressionsdaten automatisch durchführen. Für diese Anwendung verfügt GCOS über die Möglichkeiten gebündelter oder einzelner Analysen der Expressionsdaten.

Prinzipiell werden dabei, mit Hilfe statistischer Berechnungen, Transkripte quantifiziert und in Form von Intensitätswerten ausgedrückt. Diese Dichtewerte werden anschließend miteinander verglichen, um Unterschiede in der relativen Expression herauszuarbeiten. Das Programm ermöglicht es dem Nutzer, die berechneten Informationen/Intensitätsdaten abzurufen und sie für weitere Datenanalysen, Befundanzeigen oder visuelle Darstellungen zu nutzen.

Für die letztlich gewählte Darstellungsform der Expressionsprofile wurden die zuvor berechneten Daten mit Hilfe der Software PARTEK eingepflegt und farblich in Form der hier verwendeten Heat Maps dargestellt.

## **3.2 Immunhistologie**

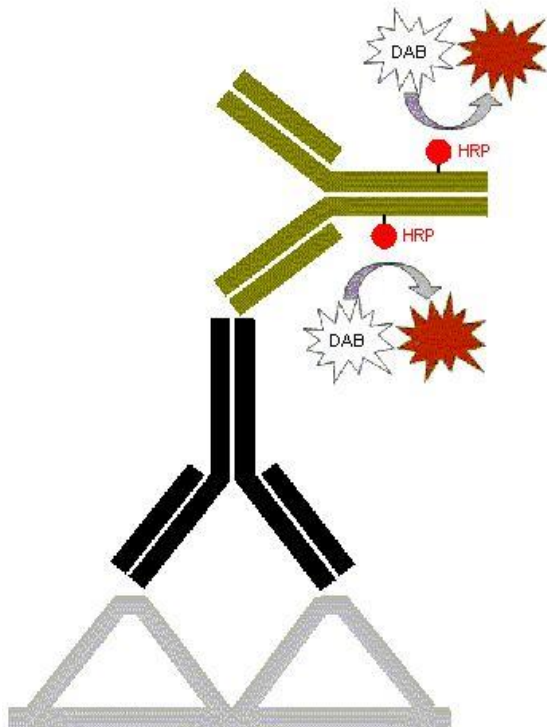
### **3.2.1 Prinzip der Färbung**

Zur IHC eines Proteins werden verschiedene Methoden eingesetzt. Das grundsätzliche Prinzip besteht aus der Bindung eines gegen das gesuchte Antigen (z.B. Oberflächenprotein) gerichteten (Primär-)Antikörpers. Dieser ist direkt oder indirekt markiert und kann in der Regel licht- oder fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden.

Bei der direkten Vorgehensweise trägt der primäre, gegen das Antigen gerichtete Antikörper auch die Markierung. Die indirekte Methode arbeitet mit einem unkonjugierten (nicht markierten) Primär-Antikörper und einem gegen diesen gerichteten Enzym-markierten Sekundär-Antikörper (2-Schritt-Methode). Erweiternd kann noch ein dritter, ebenfalls markierter Tertiär-Antikörper hinzugefügt werden (3-Schritt-Methode). Indirekte sind häufig empfindlicher als direkte Methoden, da mehrere Sekundär-Antikörper (dadurch auch mehr Enzym) an einen Primär-Antikörper binden können und so zu einer Signalverstärkung führen.

Die Färbung des Proteins MLC1 erfolgte nach der Zwei-Schritt-indirekten Methode, wie in Abbildung 6 zu sehen, mittels eines polyklonalen Primär-Antikörpers (schwarz in Abb. 6). Dessen signalverstärkende Wirkung wird durch Bindung an verschiedene Epitope hervorgerufen. Der Sekundär-Antikörper (grün in Abb. 6) ist mit einer Meerrettich-Peroxidase (*Horse Radish Peroxidase*, HRP) konjugiert, welche die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Elektronen zu Wasser und Sauerstoff katalysiert. Der Elektronendonator dafür ist das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin), welches nach Oxidation eine rotbraune Farbe annimmt und somit lichtmikroskopisch sichtbar wird.





Sekundärantikörper - anti-rabbit  
 HRP - Horseradish Peroxidase \*  
 Primärantikörper - anti-MLC1, rabbit  
 Antigen - MLC1

\*Meerrettichperoxidase

**Abb. 6:** 2- Schritt-indirekte Methode (<http://www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php>→09.12.2012)

### 3.2.2 Tissue Micro Arrays

*Tissue Micro Arrays* (TMA) sind eine Zusammenstellung sehr kleiner, kreisförmig gestanzter Ausschnitte aus den ursprünglichen Paraffinblöcken der zu untersuchenden Tumorgewebe. Diese Stanzungen werden in definierter Ordnung in einem neuen Paraffinblock zusammengestellt. Hiervon können 3-5 µm dünne Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen werden. Zur Färbung wurde ein von den zuvor bearbeiteten Fällen völlig unabhängiges Set (n=127) unterschiedlicher T- und B-LBL genutzt. Die Zusammenstellung erfolgte aus im Institut bereits vorhandenen Paraffinblöcken unterschiedlicher Studien (EURO-LB 02, NHL-BFM und NHL-BFM 95). Parallel zu den TMAs liefen bei jeder IHC Schnitte von Tonsille, Cerebellum und Amygdala als repräsentative Anteile des ZNS als Positiv-Kontrollen mit.

### 3.2.3 Immunhistochemische Färbung von MLC1

#### 3.2.3.1 Entparaffinierung

Die auf den Objektträgern befindlichen Paraffinschnitte wurden zunächst 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (100% - 100% - 100% - 96% - 96% - 70%) hydriert. Die endogene Peroxidase wurde durch 10-minütige Behandlung der Schnitte in einer Wasserstoffperoxid-Lösung (200 ml Methanol und 6 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) blockiert, um später falsch positive Ergebnisse zu verhindern. Die Schnitte wurden erst in destilliertem Wasser, dann in Tris-Waschpuffer gespült.

#### 3.2.3.2 Antigen Retrieval

Die Konservierung organischen Materials in Formalin kann zum Verlust der Antigenität eines Gewebes führen. Dabei wird die biochemische Struktur der Epitope so verändert, dass sie nicht mehr für den entsprechenden Primär-Antikörper zur Verfügung stehen. Ursächlich werden Quervernetzungen zwischen Epitopen und anderen Proteinen angenommen (Shi et al. 1997). Eine Vorbehandlung, die zur Umkehrung dieser Vorgänge und damit deutlichen Verbesserung der Färbeergebnisse führt, wird als Demaskierung/ Antigen Retrieval bezeichnet. Dafür existieren bisher zwei etablierte Möglichkeiten: das *heat induced epitope retrieval* (HIER), eine Vorbehandlung durch Erhitzen - meist aufkochen in einer Citratlösung bestimmten pH-Wertes (Shi et al. 1991), und die Verwendung von Enzymen. Das HIER wurde auch im Protokoll des verwendeten Primär-Antikörpers als Methode der Wahl beschrieben, brachte aber an lymphatischem Material (menschliche Tonsille) nicht die gewünschte Anfärbung im Zytoplasma. Daher erfolgte vor der endgültigen Färbung der TMAs die Etablierung des Antikörpers.

Zur Demaskierung des Antigens MLC1 wurden die entparaffinierten Schnitte letztlich mit einer zuvor auf 37°C erwärmten Proteinase K *Ready-to-use*-Lösung behandelt. Dazu wurden jeweils 3-4 Tropfen der Enzymlösung auf die Objektträger verteilt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte die Spülung mit Waschpuffer.

### **3.2.3.3 Primärantikörper anti-MLC1**

Es wurde der polyklonale Kaninchen-anti-MLC1-Antikörper der Klasse IgG von der Firma Sigma-Aldrich eingesetzt. In einer Verdünnung von 1:50 mit entsprechendem Puffer (VIR-DIL) wurden jeweils 200 µl der Lösung auf den TMAs verteilt und anschließend für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Auswaschen der überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper erfolgte mit Tris-Waschpuffer.

### **3.2.3.4 Sekundärantikörper**

Das *Zytochem-Plus HRP Polymer-Kit* (Zytomed) ist ein auf Polymeren basierendes System, das mehrere Moleküle Sekundär-Antikörper (anti-Maus/-Kaninchen) mit mehreren Molekülen HRP vernetzt. Der so erhöhte Enzymgehalt führt zu einer Anhebung der Signalstärke bei der späteren Farbreaktion.

Das Kit besteht aus 3 Komponenten: der *Blocking Solution*, dem *Post Block Reagent* und dem HRP-Polymer (Poly-HRP anti-Rabbit IgG). Die *Blocking* Lösung dient der Minimierung von Hintergrundfärbungen durch unspezifische Bindung des Primär- oder Sekundär-Antikörpers im HRP-Polymer. Sie entfiel aufgrund der Verwendung eines geeigneten Verdünnungspuffers für den Primär-Antikörper.

Nach einer 20 Minuten langen Inkubation mit 200 µl *Post Block Reagent* und Spülung mit Waschpuffer folgte die Auftragung von 200 µl HRP-Polymer für 30 Minuten und eine erneute Spülung.

### **3.2.3.5 Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)**

Das Chromogen DAB (DAKO) fungiert als Substrat für die HRP. Durch Oxidation nimmt es seine typisch braune Farbe an und ist unter Licht sichtbar. Die Proben wurden für 1-2 Minuten mit einem Ansatz aus 1 ml Puffer und 2 Tropfen des Konzentrates behandelt. Anschließend wurde mit Waschpuffer gespült.

### 3.2.3.6 Kernfärbung, Entwässerung, Deckelung

Nach Färbung des Antigens erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne durch die Standardmethode mit Hämalaun nach Mayer. Die Schnitte wurden 4 Minuten lang in der Farblösung und anschließend 15 Minuten in Leitungswasser belassen.

Die Objektträger wurden dann zur Entwässerung durch die aufsteigende Alkoholreihe (70% - 96% - 96% - 100% - 100% - 100% - [100%Alkohol+Xylol (1:1)] – [100%Alkohol+Xylol (1:1)]) geführt, in Xylol (4 mal) geklärt und sofort maschinell mit Pertex eingedeckelt.

### 3.2.4 Auswertung

Bei der Auswertung der Gewebsschnitte wurde der prozentuale Anteil gefärbter Zellen geschätzt und in 5 Kategorien unterteilt:

Anteil gefärbter Zellen	0%	1%-25%	26%-50%	51%-75%	>75%
Entsprechender Score	0	1	2	3	4

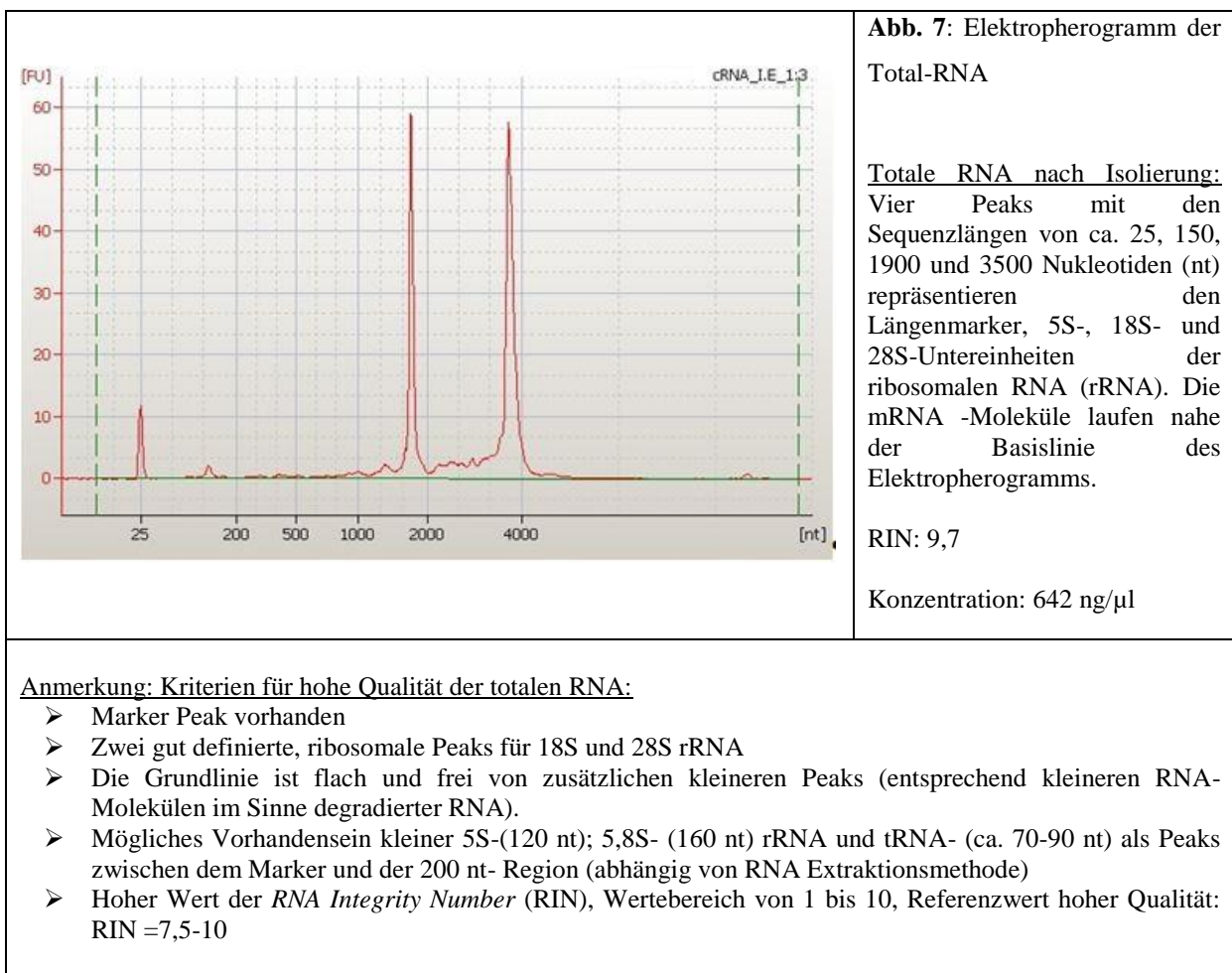
**Tab. 2:** Scoreeinteilung

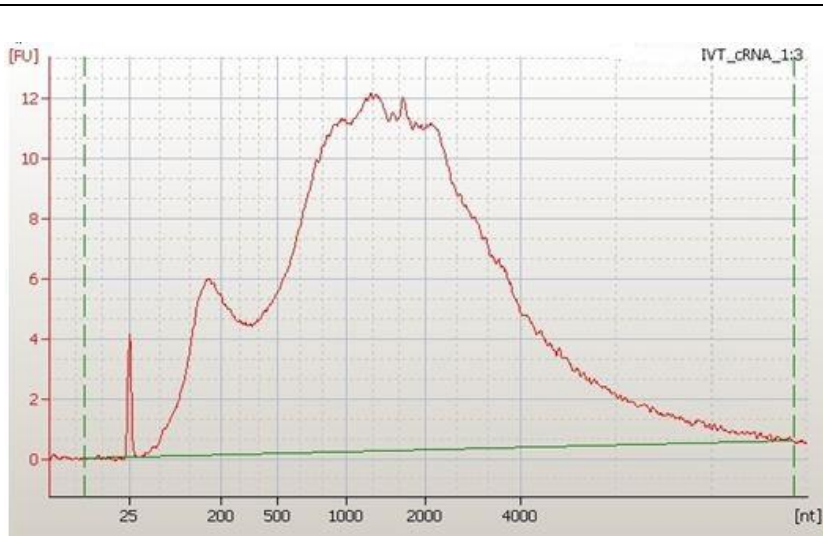
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Genexpressionsanalysen

#### 4.1.1 Überprüfung der Qualität von total-RNA und amplifizierter RNA

Für eine Untersuchung der Genexpressionsprofile standen 33 kryokonservierte Tumorbiopsate von Patienten mit T-LBL zur Verfügung. Im Verlauf der aufeinanderfolgenden Arbeitsschritte wurden für jeden Fall insgesamt drei Analysen mittels *Bioanalyzer* durchgeführt, um Konzentration und Qualität der total-RNA, der amplifizierten cRNA und der fragmentierten cRNA zu bestimmen. Folgende Beispiele (Abb. 7-9) der bearbeiteten Fälle stehen stellvertretend für Elektropherogramme von Standard-RNA-Produkten.

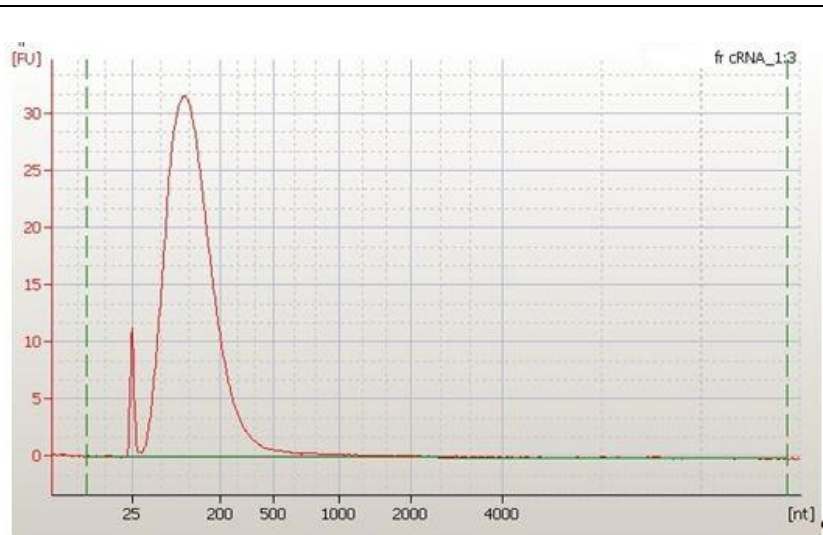




**Abb. 8:** Elektropherogramm amplifizierter cRNA

cRNA nach erfolgter in vitro Transkription:

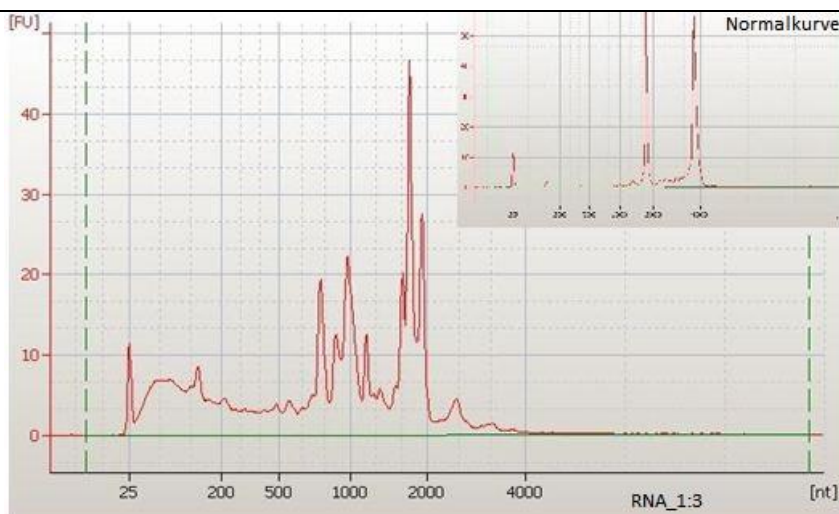
Vervielfältigte, Biotin markierte cRNA mit Verteilung der Nukleotidgrößen bis zu 4000 nt



**Abb. 9:** Elektropherogramm fragmentierter cRNA:

Biotin markierte, fragmentierte cRNA mit einer Durchschnittsgröße von etwa 150 nt

Nach Isolation der totalen RNA wurden 5 Fälle aufgrund ungenügender RNA-Qualität oder zu geringer RNA-Konzentration zurückgestellt (Abb. 10-12).

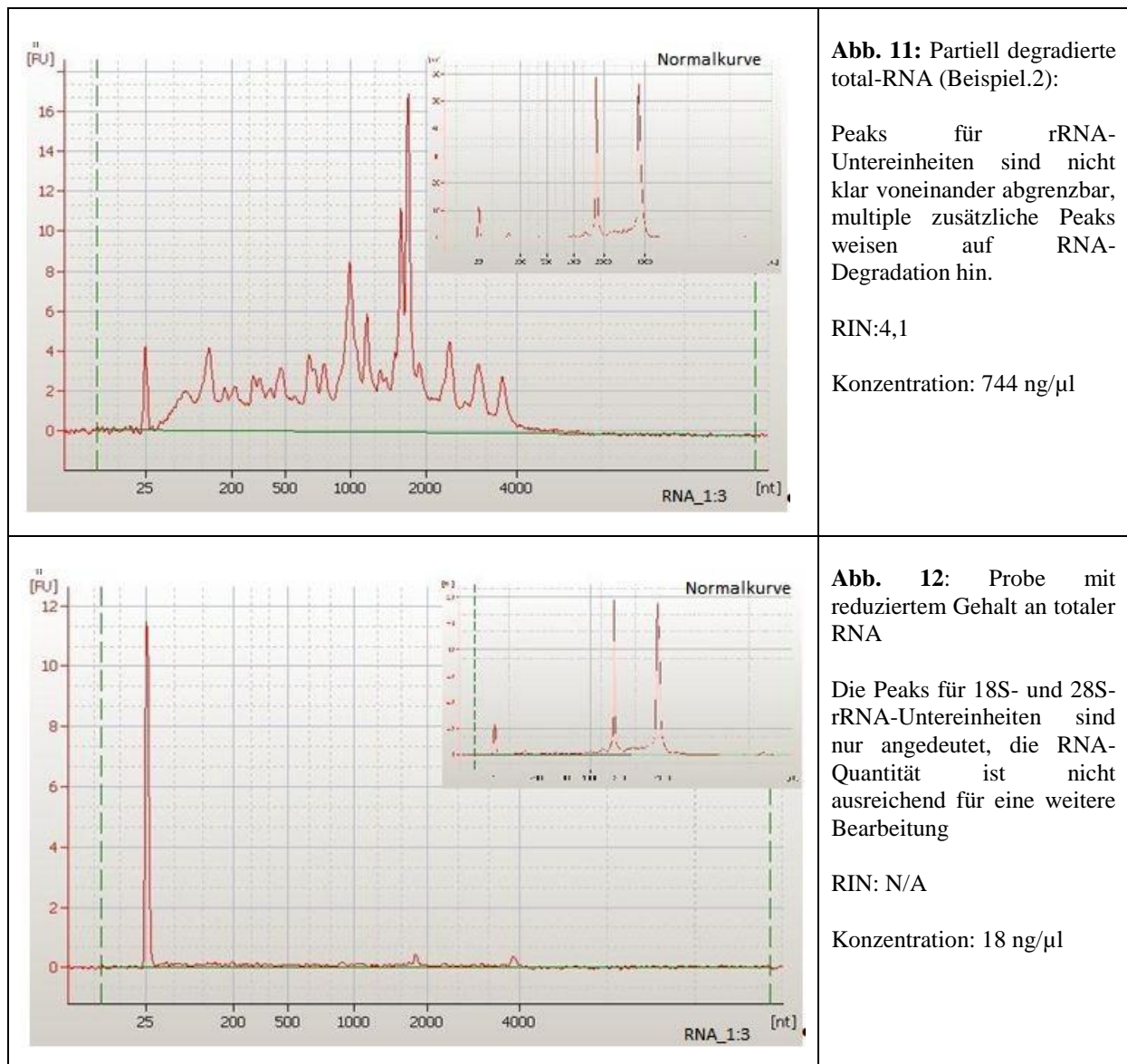


**Abb. 10:** Partiiell degradierte total-RNA (Beispiel 1):

Peaks für rRNA-Untereinheiten sind nicht klar voneinander abgrenzbar, partiell degradierte RNA-Fragmente sind als zusätzliche Peaks sichtbar.

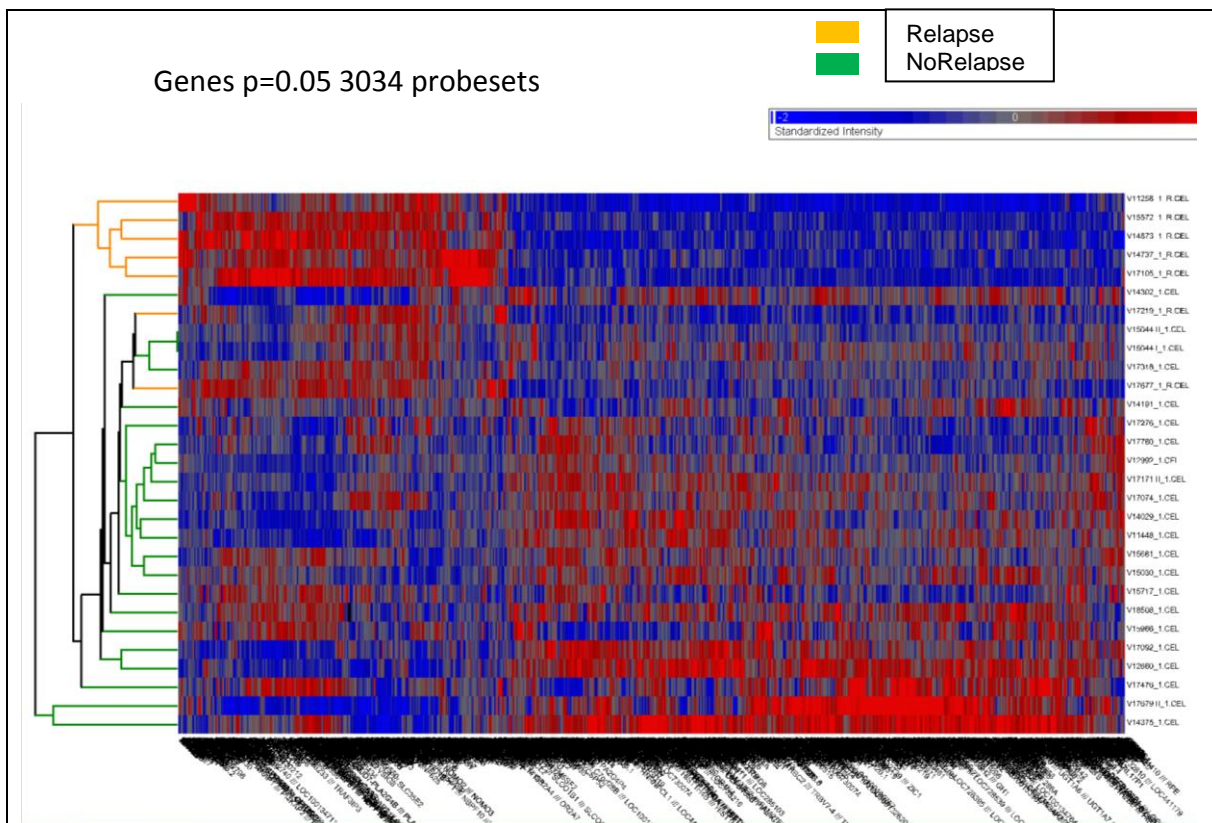
RIN:4,8

Konzentration: 1080 ng/μl



Durch Beladung der Chips mit der fragmentierten, Biotin markierten cRNA wurden Expressionsanalysen von insgesamt 28 Fällen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Form von *Heat Maps* abgebildet worden. Sie sind eine farbliche Darstellung hoch- oder herunterregulierter Expression der auf dem Chip aufgetragenen Gene und wurden im Anschluss ausgewertet.

#### 4.1.2 Analysen der Genexpressionsprofile im Hinblick auf späteres Rezidivvorkommen



13: Nicht supervidierte Analyse: Clusterung von Genexpressionsprofilen bei p=0,05

Anmerkungen:

- Spalten: Kandidatengene, Genkurzbezeichnungen unten, durch die hohe Zahl in dieser Darstellung nicht lesbar; eine genaue Genauflistung dieser Heat Map findet sich im Appendix, Tabelle A1;
- Zeilen: einzelne Fälle mit Patienten-ID-Nummern rechts und phylogenetischem Clusterbaum links (Fälle mit späterem Rezidiv [gelb] und ohne späteres Rezidiv [grün])
- Rot = vermehrte Expression, blau = verminderte Expression, grau: relativ unveränderte Expression eines Gens

Die nicht supervidierte Analyse der Daten (Abb. 13) zeigt eine Vielzahl (n=3034) von Genexpressionsprofilen, deren Verteilung bei einem p-Wert von 0,05 gerade nicht mehr als zufällig anzusehen ist. Das spiegelt sich in der Tendenz zur Anhäufung (engl.: Clustering) überexprimierter Gene im linken oberen und rechten unteren Feld, sowie der verminderten Expression im rechten oberen und linken unteren Bereich wieder. Trotz eines insgesamt relativ zergliederten Profils lässt dieses Anhäufungsmuster eine sehr grobe Aufteilung in Fälle mit und ohne späteres Rezidiv zu. Fünf von 7 (71,4 %) Fällen mit späterem Rezidiv bilden ein Genexpressionscluster, während 2 von 7 (28,6 %) Fällen mit späterem Rezidiv mit ihrem



Genexpressionsprofil etwas abweichen und nicht direkt dem Cluster zugeordnet werden können.

Im nächsten Schritt wurde der p-Wert auf 0,002 festgelegt, um mögliche Kandidatengene zur Unterscheidung von Fällen mit und ohne späteres Rezidiv weiter einzukreisen. Dadurch wurde eine höhere Trennschärfe ermöglicht und ein rein zufälliges Clustering nahezu ausgeschlossen. Zusätzlich wurden die Fälle zur besseren Abgrenzung nach Rezidiv und Nicht- Rezidiv geclustert (Abb. 14).

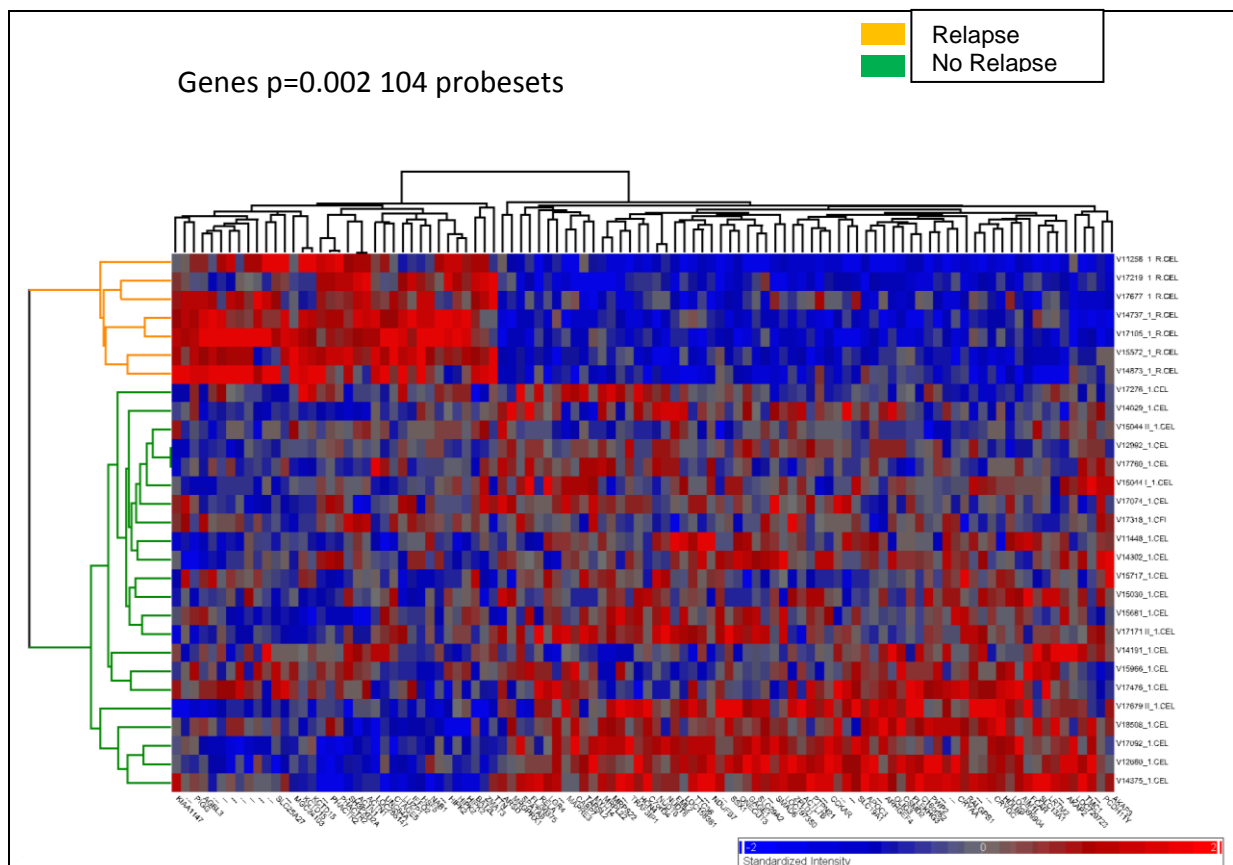


Abb. 14.: Supervidierte Analyse: Clustering bei  $p = 0,002$

Anmerkungen:

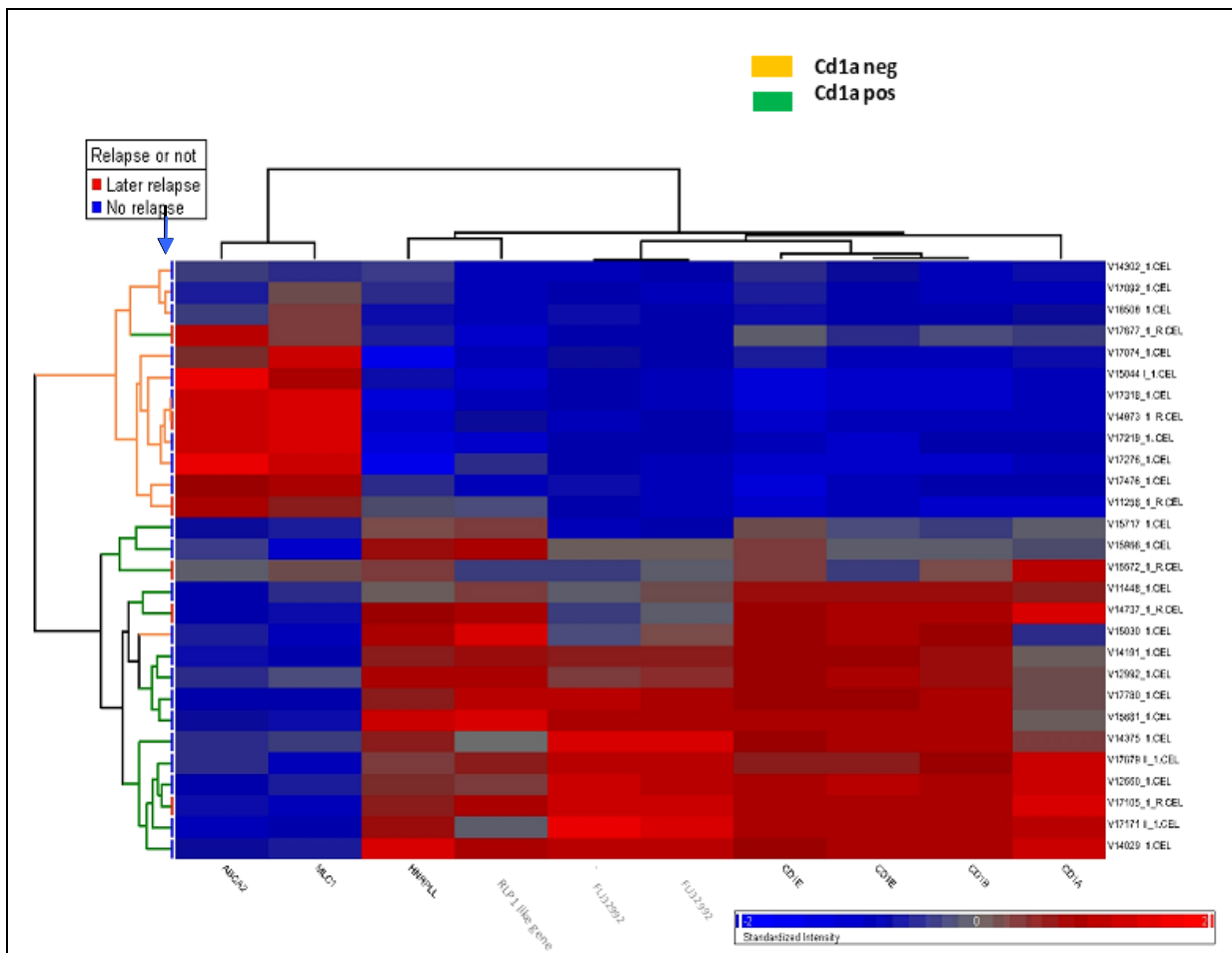
- Supervidierte Einteilung in Fälle mit späterem Rezidiv (gelb) und ohne ein späteres Rezidiv (grün). 104 Probe Sets bleiben bei  $p = 0,002$  bestehen, erneute Clusterung angedeutet.
- **Spalten:** Kandidatengene, Genkurzbezeichnungen unten; genaue Bezeichnungen im Appendix, Tabelle A2. **Zeilen:** einzelne Fälle mit Patienten-ID-Nummern rechts und phylogenetischem Clusterbaum links (Fälle mit späterem Rezidiv [gelb] und ohne späteres Rezidiv [grün])
- Rot = vermehrte Expression, blau = verminderte Expression, grau: relativ unveränderte Expression eines Gens

Dem niedrigeren p-Wert entsprechend ist die Anzahl von signifikanten Genen reduziert ( $n=104$ ). Genauere Angaben zu den in Abb. 14 gezeigten Genen befinden sich im Anhang in

Tabelle A2. Beide Gruppen sind deutlich voneinander getrennt. Die supervidierte Analyse zeigt, dass Fälle mit späterem Rezidiv und diejenigen ohne ein späteres Rezidiv unterscheidbare Genexpressionsprofile zeigen. Darunter finden sich Gene, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind und in Assoziation mit malignen Erkrankungen stehen. Dazu zählt „*homeodomain interacting protein kinase 2*“ (HIPK2), die als proapoptotisches Protein eine wichtige Funktion in der Inhibition des Zellzyklus, insbesondere bei der Tumorgenese hat (Puca et al 2009, Nardinocchi et al. 2009). Das „*Synovial Sarcoma, Breakpoint 1*“ (SSX1) wird durch die Translokation t(X;18)(p11.2;q11.2) dereguliert, die charakteristischerweise in Synovialen Sarkomen vorkommt und sich vermutlich auf Transkriptionsabläufe im Rahmen des Zellwachstums und der Proliferation auswirkt (Przybyl et al. 2012). Weitere in diesem Kontext interessante Gene sind das „*Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen 5*“ (CTAGE5) als tumorspezifisches Antigen (Usener et al 2003) und das „*Heat shock transcription factor family member 5*“ (HSF5) aus der Familie der Hitzeschock- Proteine, deren Funktion in der Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Proteinstoffwechsels innerhalb der Zelle liegt.

#### **4.1.3 Korrelation zwischen Genexpressionsprofil und histologischem Subtyp**

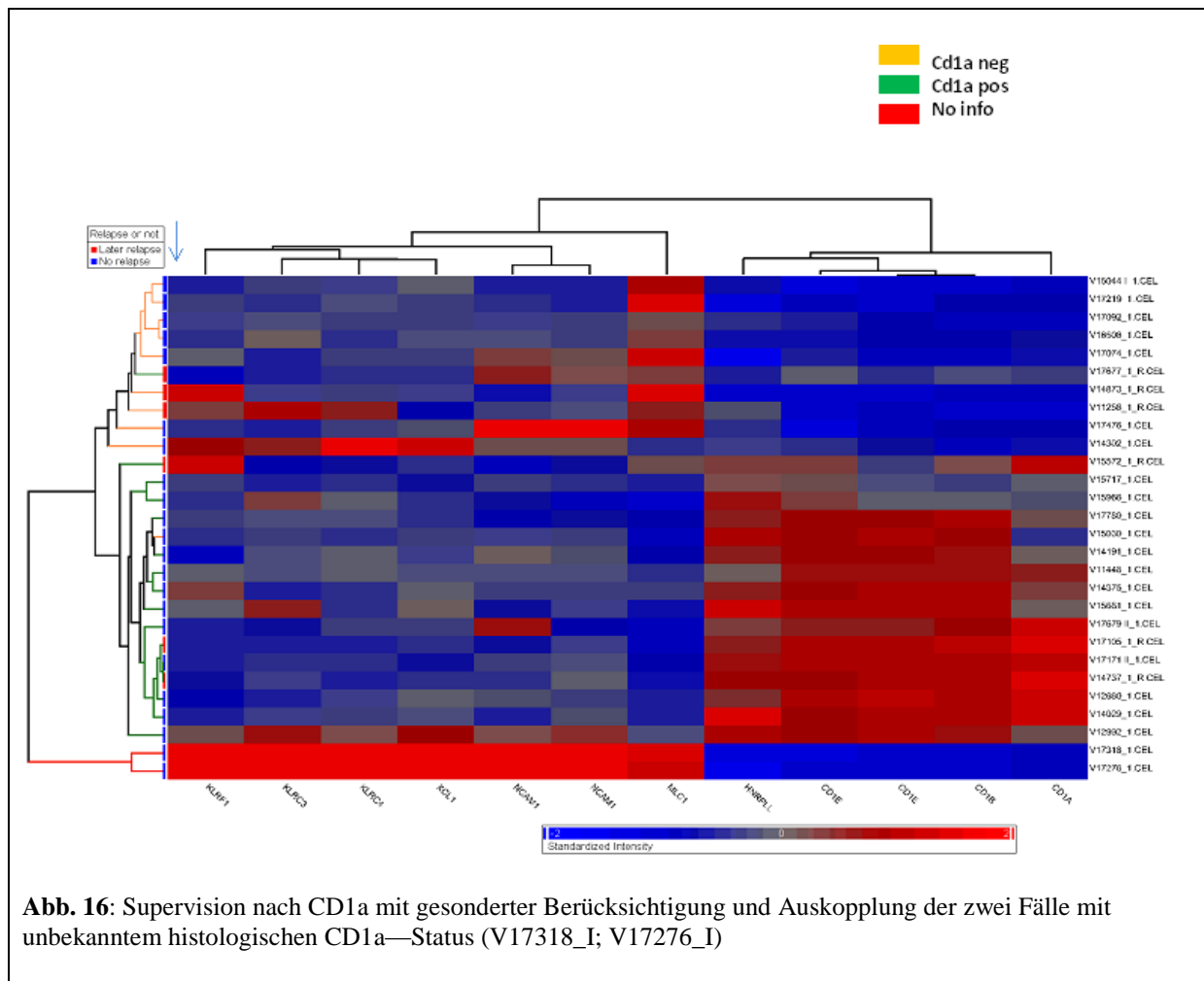
Der immunhistologische Nachweis des Oberflächenmarkers CD1a wird in der Routinediagnostik für die Unterteilung des T-LBL in 2 histologische Subtypen, den kortikalen und nicht kortikalen Subtyp herangezogen. Der Datensatz wurde demensprechend nach CD1a-positiven und CD1a-negativen Fällen supervidiert geclustert. In der ersten Analyse (Abb. 15) wurden zwei Fälle (V17318\_I; V17276\_I) mit unbekanntem CD1a-Status in der IHC als CD1a-negativ aufgestellt. Diese beiden Fälle wurden in der zweiten Analyse (Abb. 16) als "CD1a unbekannt" deklariert. Ihre Expressionsprofile erscheinen gesondert am unteren Ende der *Heat Map* (Abb. 16) und ähneln eher den Genexpressionsprofilen von CD1a-negativen Fällen.



**Abb. 15:** Supervision nach CD1a ohne gesonderte Berücksichtigung der beiden Fälle mit unbekanntem CD1a-Status

Anmerkungen:

- Im phylogenetischen Stammbaum findet sich hier zusätzlich die Information über ein späteres Rezidiv (rot) oder die eingetretene Remission (blau) am Ende der Stammbaumpfade (siehe blauer Pfeil)



Die Genexpressionsdaten für CD1a stimmten in allen Fällen mit der IHC überein. CD1a war in 8 Fällen stark und in 3 Fällen moderat exprimiert. In 5 Fällen war die CD1a-Expression mäßig, während 12 Fälle herunterregulierte CD1a-Expression zeigten. Diese 12 Fälle waren (unter Berücksichtigung der 2 fraglichen Fälle) in der IHC CD1a-negativ, während die mäßig bis stark exprimierten Fälle eine durchweg positive Färbung zeigten. Die immunhistochemisch erzielten Ergebnisse stimmten im Ganzen mit den Genexpressionsergebnissen für CD1a überein.

Insgesamt zeigen sich in den zwei *Heat Maps* neben der CD1-Familie nur wenige signifikant unterschiedlich exprimierte Gene (Tabelle A3 Anhang). Dazu gehören „Megalenzephalie Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten“ (MLC1), „*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like*“ (HNRPLL) und „*ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2*“ (ABCA2). Insbesondere das erstgenannte MLC1 scheint sich aufgrund der Darstellung gegensätzlich zu CD1a zu verhalten und könnte eine Rolle in der Unterscheidung der histologischen Subtypen spielen.

Heat Maps für CD1a- und MLC1-Expression wurden bezüglich der Rezidivereignisse einzeln ausgewertet (Daten nicht gezeigt) und tabellarisch festgehalten (Tabelle 3 und 4). Auch die Relationen von CD1a und MLC1 zueinander wurden untersucht (Tabelle 5):

<b>Expression CD1a bezogen auf das Rezidivereignis</b>			
	überexprimiert	herunterreguliert	mäßig exprimiert
späteres Rezidiv 6 (=100%)	3 (50%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)
ohne späteres Rezidiv 22 (=100%)	8 (36,4%)	10 (45,4%)	4 (18,2%)

**Tab. 3.:** CD1a Expression bezogen auf späteres Rezidivereignis

<b>Expression MLC1 bezogen auf das Rezidivereignis</b>			
	überexprimiert	herunterreguliert	mäßig exprimiert
Späteres Rezidiv 6 (=100%)	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0 (0%)
Ohne späteres Rezidiv 22 (=100%)	8 (36,4%)	13 (59,1%)	1 (4,5%)

**Tab. 4.:** MLC1 Expression bezogen auf Rezidivereignis

Bei vergleichender Betrachtung fällt eine leicht erhöhte Tendenz zur MLC1-Überexpression bei später rezidierten Fällen (67% der Patienten) im Vergleich zur Expression von CD1a (50% der Patienten) auf. Für die nicht rezidierten Fälle sind in Umkehrung mehr als die Hälfte der Fälle (ca. 59%) herunterreguliert für MLC1, im Gegensatz zu CD1a (ca. 45%).

Um eine objektive Beurteilung der Verteilung von CD1a- und MLC1-Expressionsprofilen auf die beiden Gruppen späteres Rezidiv versus Nicht-Rezidiv zu erhalten, wurde mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism* der gepaarte T-Test zur Erlangung eines p-Wertes durchgeführt. Dieser betrug für die CD1a-Expression  $p=0,0669$  und für die Verteilung von MLC1  $p=0,2136$ . Beide Werte stellen demnach grobe Tendenzen und keine signifikanten Größen dar.

Ein weiterer Aspekt der Betrachtungen lag in der vergleichenden Darstellung der Beziehung von CD1a und MLC1 zueinander. Dazu wurden die jeweiligen Expressionsdaten in Tabelle 5 aufgestellt:

Expression MLC1 und CD1 im Verhältnis zueinander			
MLC1	positiv	negativ	neutral
CD1a			
positiv	1 (3,6%)	10 (35,7%)	0 (0%)
negativ	10 (35,7%)	2 (7,1%)	0 (0%)
neutral	1 (3,6%)	3 (10,7%)	1 (3,6%)

**Tab. 5:** Gegenüberstellung von MLC1 und CD1a

Auffallend ist der hohe Anteil (n=20, 71,4%) der Fälle mit entgegengesetzter Expression für CD1a und MLC1 (gelb markierte Felder). Die Berechnung der Korrelation von CD1a und MLC1 unter Ausschluss der mäßig exprimierten Fälle ergibt einen Koeffizienten von -0,74 und bestätigt die Vermutung eines nahezu linearen korrelativen Zusammenhangs.

## 4.2 Immunhistochemie

Nach bisherigen Ergebnissen aus der Genprofilanalyse könnte MLC1 ein Unterscheidungsmerkmal zwischen kortikalem und nicht-kortikalem Subtyp des T-LBL darstellen. Daher wurde der Versuch angeschlossen, eine funktionierende immunhistologische Färbung für das Protein MLC1 an Paraffin-Material zu etablieren, um die Ergebnisse aus den Genexpressionsanalysen auf immunhistochemischer Ebene zu bestätigen. Der Vorteil einer solchen Färbung liegt in der einfacheren, Material-, Kosten- und Zeit schonenden Durchführung.

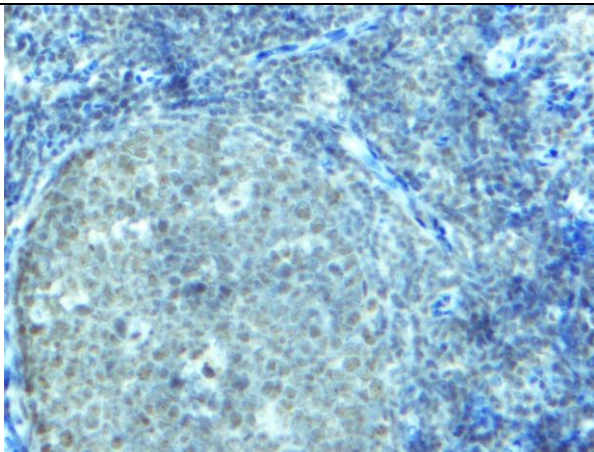
### 4.2.1 Etablierung und Antigen Retrieval

Bei erstmaliger Anwendung des Anti-MLC1-Antikörpers an einer für lymphatisches Gewebe beispielhaften, menschlichen Tonsille konnte trotz exakter Durchführung des mitgelieferten Standardprotokolls keine verlässliche Anfärbung außerhalb des Nukleus, wie es für ein Membranprotein zu erwarten wäre, reproduziert werden. Um dies zu erreichen, wurden verschiedene Methoden des *Antigen-Retrievals* im Sinne einer „*Test Battery*“ (Shi et al, 1997) ausprobiert. Dazu wurden neben den Paraffinschnitten einer Tonsille jeweils der eines

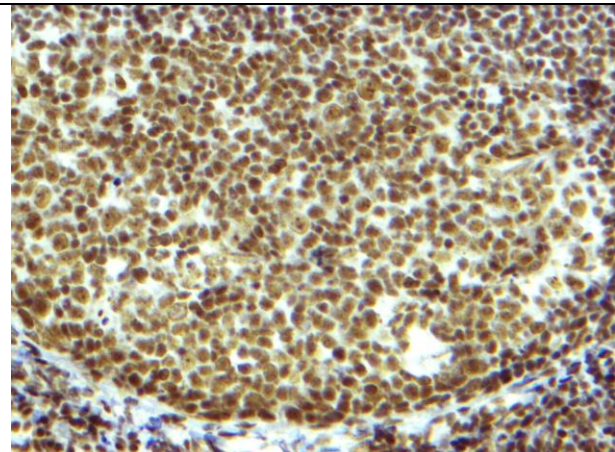
Cerebellums und einer Amygdala menschlicher Herkunft als Positivkontrollen verwendet (Boor et al 2005, Teijido et al. 2004). Es wurde mit der Durchführung des HIER bei pH-Werten im neutralen (pH=6), sauren (pH=3) und basischen (pH=8) Bereich begonnen, durch einen Versuch ohne jegliche Vorbehandlung weitergeführt und mit enzymatischen Vorbehandlungen durch Protease (Guan N. et al. 2008), einer *Fast Enzyme*-Mixtur und Proteinase K (Mori F. et al 2011) beendet. Alle Durchgänge wurden jeweils in den Verdünnungen des Primärantikörpers von 1:100 und 1:50 durchgeführt. Bei Behandlung mit dem Sekundär-Antikörper wurde jeweils mit *Histofine*, einem universalen Immuno-Enzym-Polymer, und dem Plus HRP Polymer-System gearbeitet.

Die Inkubation mit Proteinase K bei 37°C für 15 Minuten in Verbindung mit einer 1:50 Verdünnung des Primär-Antikörpers und anschließender Verwendung des Plus HRP Polymer Systems brachte letztlich den erwünschten Erfolg mit einer Anfärbung, die sich klar außerhalb des Zellkerns befand

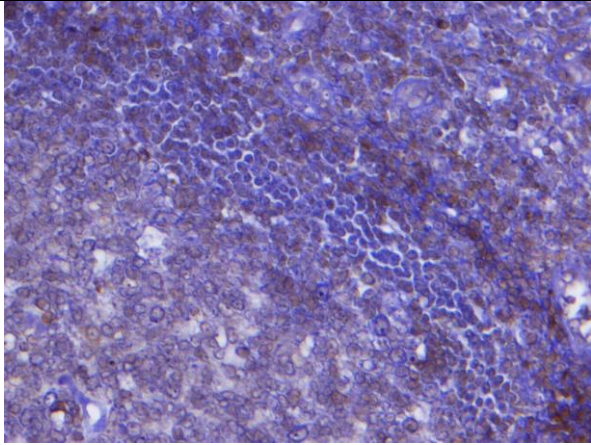
Die Abbildungen 17-24 zeigen die Entwicklung und Optimierung einzelner Protokollschritte bis hin zum optimalen Färbeergebnis an lymphatischem Gewebe.



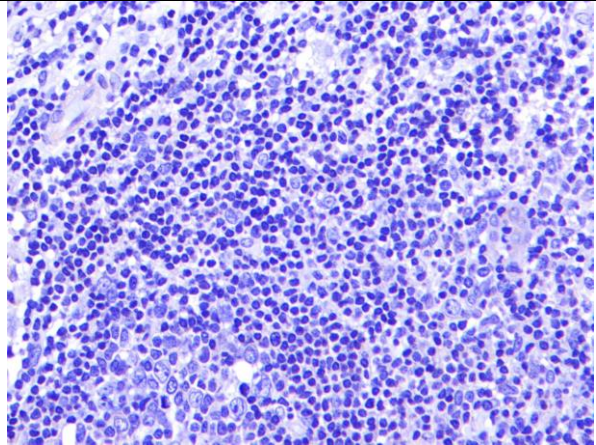
**Abb. 17:** Antigen Retrieval: Kochen bei pH 6, Verd. 1:100



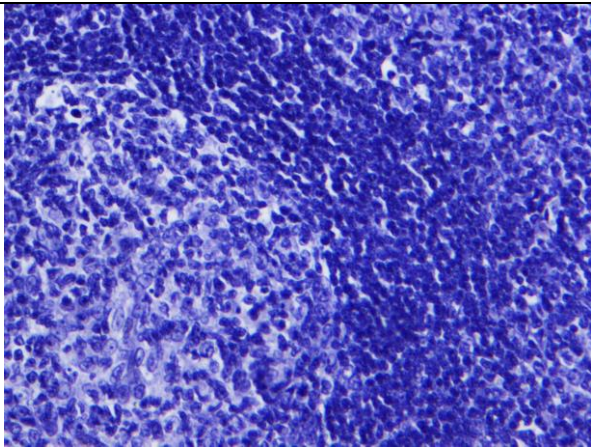
**Abb. 18:** Antigen Retrieval: Kochen bei pH 8, Verd. 1:100



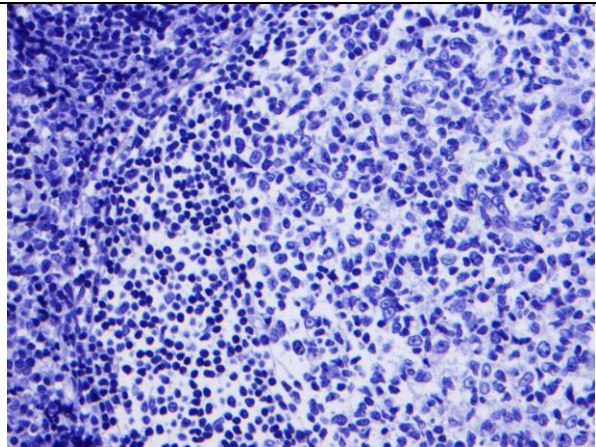
**Abb. 19:** Antigen Retrieval: Kochen bei pH 3, Verd. 1:100



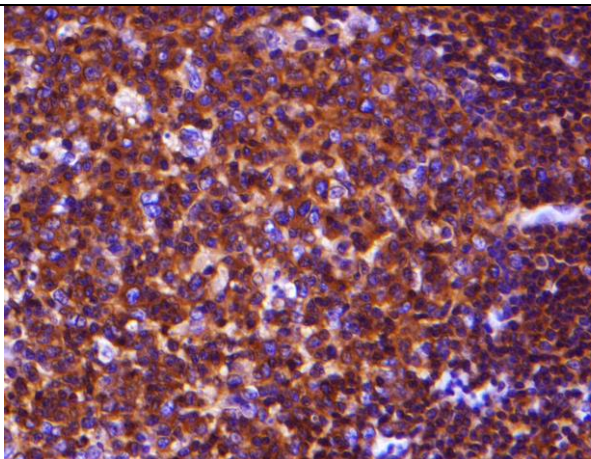
**Abb. 20:** Kein Antigen Retrieval, Verdünnung 1:100



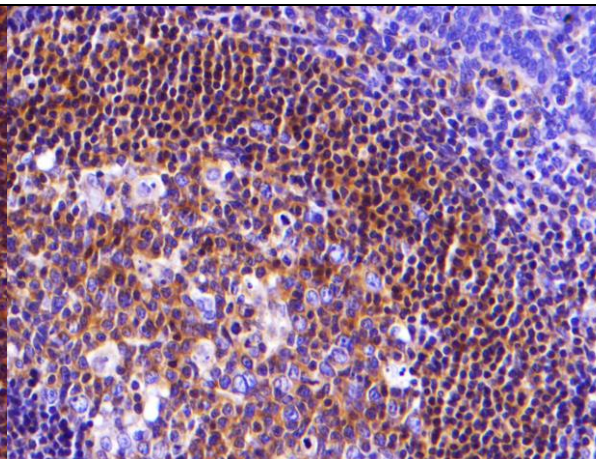
**Abb. 21:** Antigen Retrieval: ProteaseXXIV (37°C), Verd. 1:100



**Abb. 22:** Antigen Retrieval Fast Enzyme Mix, Verd. 1:100



**Abb. 23:** Antigen Retrieval: Proteinase K, Verd. 1:100



**Abb. 24:** Optimiertes Färbeprotokoll, Proteinase K bei 37°C Verdünnung 1:50, Verstärkersystem: Plus HRP Polymer- System

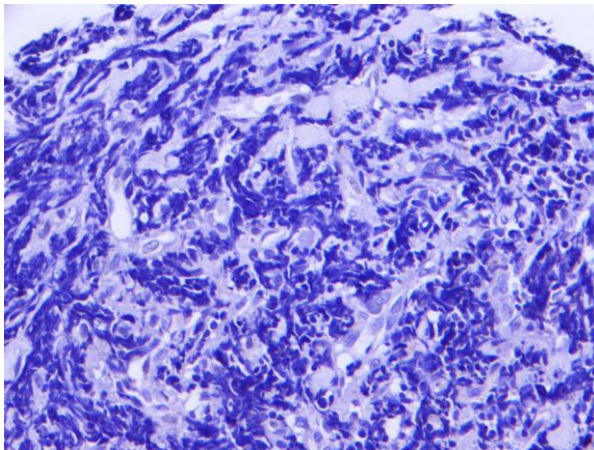


#### 4.2.2 Färbung von Tissue Micro Arrays

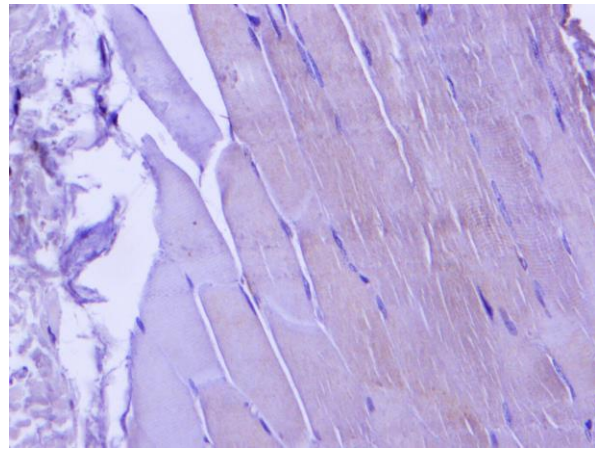
Nach Entwicklung eines funktionierenden Färbeprotokolls für das Protein MLC1 an der menschlichen Tonsille erfolgte die Übertragung auf TMAs, auf die ein unabhängiges Set von LBL-Studienfällen der T- und B-Zell-Reihe (EURO-LB 02, NHL-BFM und NHL-BFM 95) aufgebracht worden war. Die Auswertung (Tabelle 6) der MLC1-gefärbten TMAs zeigte, dass 19,8% der insgesamt 127 Fälle aufgrund ungenügender Qualität einzelner Cores (Gewebsstanzenschnitt auf dem TMA) schlecht oder gar nicht beurteilbar waren. Die Gründe lagen einerseits bei den Gewebsstanzen selbst (fehlende oder nicht repräsentative Cores (Abb. 25-26) und andererseits in der Färbung, die zum Teil nicht evaluierbar war. Zudem zeigte sich in einigen Präparaten (16,5%) eine intranukleäre Färbung (Abb. 27-28), welche schon in den ersten Vorversuchen das hauptsächliche Problem darstellte. Ein Membranprotein, um das es sich bei MLC1 handeln soll, kann im Zytoplasma (Abb. 29-30) als Bestandteil von Zellorganellen auftreten, ist jedoch nicht im Nukleus zu erwarten.

<b>Beurteilbare Färbung n=81 (63,8%)</b>	
Zytoplasmatische Färbung	13 (10,2 %)
Keine Anfärbung	68 (53,5 %)
<b>Problemfälle n=46 (36,2%)</b>	
fehlender Core	12 (9,5 %)
nicht repräsentativer Core	12 (9,5 %)
nicht auswertbare Färbung	1 (0,8 %)
nukleäre Färbung	21 (16,5 %)

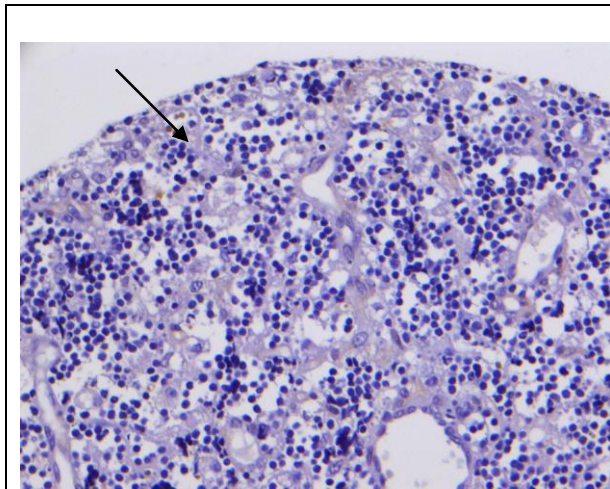
**Tab. 6:** Auswertung der gefärbten TMAs



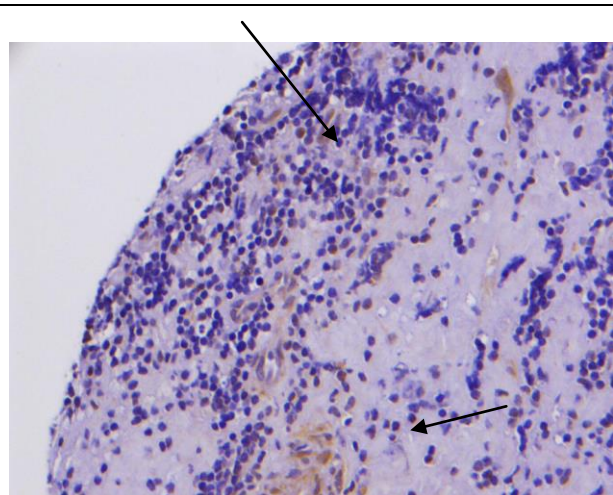
**Abb. 25:** Nicht repräsentativer Core



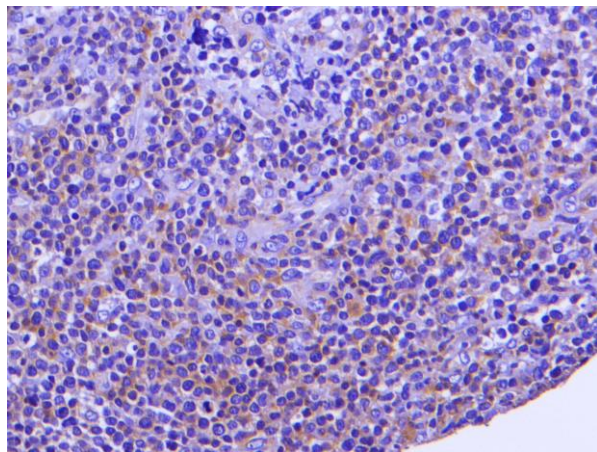
**Abb. 26:** Nicht repräsentativer Core



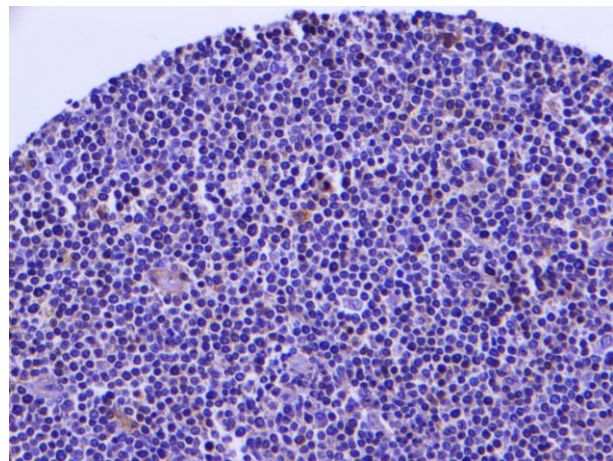
**Abb. 27:** Nukleäre Färbung (s. Pfeil)



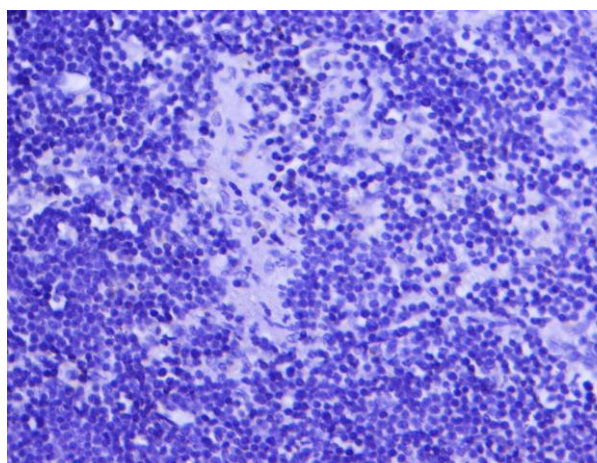
**Abb. 28:** Nukleäre Färbung (S. Pfeil)



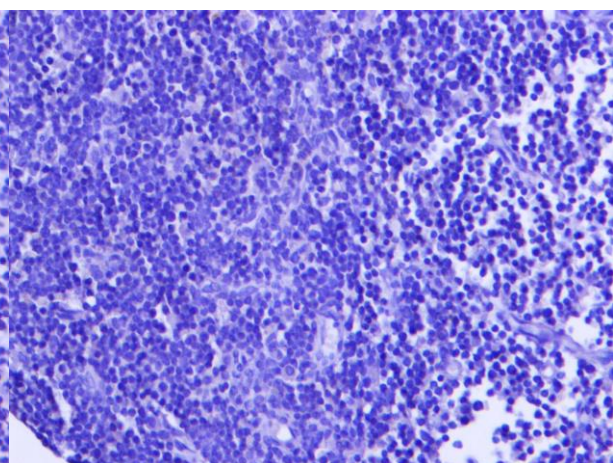
**Abb. 29:** Beurteilbares TMA: Gehalt pos. Zellen: 50-75%



**Abb. 30:** Beurteilbares TMA: Gehalt pos. Zellen: 1-25%



**Abb. 31:** Beurteilbares TMA: keine Anfärbung



**Abb. 32:** Beurteilbares TMA: keine Anfärbung

Da in neun der insgesamt 127 gefärbten Fälle (ca. 7 %) auch die Genexpressionsdaten vorlagen, wurden diese mit den IHC-Färbeergebnissen verglichen. Zwei Fälle fielen aufgrund

unzureichender Cores (einmal fehlend, einmal nicht repräsentativ) weg und zwei Fälle zeigten eine nukleäre Anfärbung und wurden nicht in den Vergleich miteinbezogen. Von den übrigen 5 Fällen zeigten nur 2 eine Übereinstimmung der Expressionsdaten mit den immunhistochemischen Ergebnissen.

## 5 Diskussion

Das T-LBL ist mit einem Anteil von 20-30% eines der häufigsten NHL im Kindesalter (Baleyrier et al 2008, Smock et al 2008). Der guten Quote von bis zu 90% derer, die unter Therapie nach der NHL-BFM90- Studie in Remission gehen (Reiter et al 2000), steht eine in der Regel infauste Prognose bei Auftreten eines Rezidivs gegenüber. Nur etwa 14% der Patienten mit Rezidiv erreichen eine stabile Remission. Ca. 11 % versterben aufgrund von Komplikationen durch die aggressive chemotherapeutische Behandlung, darunter insbesondere Infektionen und Toxizität. Der Großteil der Patienten, insgesamt 75%, verstirbt jedoch trotz intensivierter Therapie an einem zügigen Fortschreiten der Erkrankung (Burkhardt et al 2009).

Trotz intensiver Forschung konnten bislang keine sicheren Faktoren identifiziert werden, die sich im Vorfeld der Therapie dazu eignen, eine verlässliche Aussage zur Prognose zu machen. Derartige Unterscheidungskriterien sind jedoch dringend notwendig, um noch vor Beginn der Therapie Hochrisikopatienten herausfiltern und gesondert behandeln zu können. Ziel einer solchen Auftrennung ist einerseits, Patienten mit guter Prognose nicht durch erhöhte Therapierisiken zu gefährden, andererseits aber denjenigen mit hohem Rezidivrisiko eine optimierte, intensiviertere Therapie zukommen zu lassen.

Potentielle Unterschiede in der Genexpression der Primärtumore mit und ohne späteres Rezidiv könnten sich daher als erster prognostischer Hinweis auf den Krankheitsverlauf erweisen.

Neben der Problematik fehlender Prognosefaktoren wird seit langem die fragliche Beziehung des T-LBL zur T-ALL kontrovers diskutiert (Burkhardt et al 2010). Es ist weitgehend nicht bekannt ob es sich um zwei voneinander verschiedene oder nur Varianten einer Erkrankung handelt und ob sie auf der Genexpressionsebene voneinander unterschieden werden können. Da für die T-ALL prognostische Marker bereits publiziert sind, liefert unsere Untersuchung die Möglichkeit, Genexpressionsprofile zwischen T-LBL und T-ALL direkt miteinander zu vergleichen.

Darüber hinaus besteht in der Diagnostik die Schwierigkeit einer zuverlässigen Einteilung der T-LBL. Derzeit existiert die von der EGIL-Klassifikation für T-ALL definierte,

immunologische Einteilung in den jeweils unreifen pre- und pro-Subtyp, sowie den reifen kortikalen und reifen medullären Subtyp. Für die T-ALL können diese durchflusszytometrisch bestimmt werden, für Gewebeproben der T-LBL ist die Methode jedoch wenig praktikabel. Bei den hier durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen am FFPE-Material muss die Einteilung auf den kortikalen und nicht kortikalen Subtyp reduziert werden, da für eine weitere Differenzierung die Färbeergebnisse nicht ausreichend zuverlässig sind (Oschlies et al 2011). Eine genauere Charakterisierung und Bestätigung durch Genexpressionsprofile fehlt bislang.

## **5.1 Unterschiede in der Genexpression zwischen T-lymphoblastischen Lymphomen im Kindesalter mit und ohne späteres Rezidiv**

Die Analysen der Genexpressionsprofile ergaben eine Vielzahl von Genen, die zwischen den T-LBL-Gruppen mit und ohne späteres Rezidiv differentiell exprimiert waren. Unter den insgesamt 104 höher signifikanten Genen ( $p \leq 0.02$ ) waren z.B. „*homeodomain interacting protein kinase 2*“ (HIPK2), das „*heat shock transcription factor family member 5*“ (HSF), das „*synovial sarcoma, X breakpoint 1* (SSX1)“-Gen und das *Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen 5* (CTAGE5), deren Funktionen in der Tumorsuppression und Zellzyklusregulation liegen. Mit Ausnahme von SSX1 waren diese Gene bei den später rezidierten Fällen hochreguliert. Die gesamte Liste der differentiell exprimierten Gene ist im Appendix in Tabelle A2 zusammengefasst.

### **5.1.1 Ausgewählte differentiell exprimierte Kandidatengene**

#### **5.1.1.1 HIPK2**

Das Gen HIPK2 kodiert für ein Protein, welches zunehmend in den Blickpunkt onkologischer Forschung rückt. Grund dafür ist die enge Verbindung des Proteins zum Tumorprotein p53 (TP53), einem bekannten Tumorsuppressor. Als Transkriptionsfaktor aktiviert p53 die Expression von Genen, die für ihre Rolle in der Arretierung des Zellzyklus, in DNA-Reparatur-, Alterungs- und Apoptoseprozessen bekannt sind. Daneben scheint es auf weitere Faktoren einzuwirken, die in Mechanismen der Tumorprogression und die Entwicklung von Chemoresistenzen involviert sind (Puca et al 2008, Nardinocchi et al. 2009).

Interessanterweise sind in den p53 Pathway involvierte Gene wie HIPK2 und ein weiteres, ebenso unter den T-LBLs differenziell exprimiertes Gen, das „*zinc finger, matrin-type 3*“ (ZMAT3), bei den später rezidivierten Fällen hochreguliert. Dieses Ergebnis deckt sich mit vermehrt auftretenden Angaben in der Literatur, in denen eine erhöhte Expression von p53 nicht selten mit einer schlechteren Prognose bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen korreliert (Lee et al. 2011, Jadali et al. 2011, Gallo et al. 1995). Auch für T-LBL ist dieser Sachverhalt schon beschrieben worden (Naresh et al. 2002).

Zwar widerspricht das der Annahme, eine erhöhte Aktivität tumorsuppressiver Pathways müsste eine Verbesserung der Prognose zur Folge haben, aber zunehmend finden sich Hinweise auf ein weitaus breiteres Aktionsspektrum von p53 als bisher bekannt. So könnte p53 zellprotektiv und –erhaltend wirken, wenn regulatorische Wege für Reparaturmechanismen angeschaltet werden. Ein solcher Mechanismus ist auch in neoplastischen Zellen denkbar, im Sinne einer Fehlleitung bei der Entscheidung zwischen Apoptose oder Erhaltung mit geplanter Reparatur (Vousden and Prives 2009).

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz liegt in der Vielfältigkeit der Mutationen, mit denen p53 im Rahmen der Tumorentstehung und –erhaltung bekannt ist. Das sind in der Regel Mutationen mit Funktionsverlust bei der Zellzyklusarretierung und Apoptose, die ein erhöhtes Potential für neoplastische Veränderungen nach sich ziehen. Möglich sind ebenfalls sogenannte *Gain of Function* Mutationen, die zu Veränderungen eben dieser p53-gesteuerten Regulation des Zellzyklus führen und ein Ungleichgewicht zugunsten zellerhaltender Prozesse im Sinne einer Tumorentstehung fördern (Olivier et al. 2010).

Unsere Ergebnisse der Hochregulation von p53-assoziierten Genen fügen sich ein in die Reihe zunehmender Anhaltspunkte für eine erweiterte Funktion des Proteins über die reine Tumorsuppression hinaus in den Bereich der Reparatur defizienter Zellfunktionen. Bestätigen sich die Hinweise, bietet diese Funktion von p53 neue Ansätze im diagnostischen prätherapeutischen Bereich. In der Konsequenz ist eine mögliche Optimierung und Erweiterung medikamentös durchgeführter Tumortherapien dann ebenfalls denkbar.

#### **5.1.1.2 CTAGE5 und SSX1**

Interessant im Rahmen möglicher Unterscheidungskriterien zwischen Patienten mit und ohne späteres Rezidiv sind die zwei Gene SSX1 und CTAGE5. Beide gehören der wachsenden Gruppe sogenannter *Cancer-Testis*-Antigene (CTA) an. Sie kommen, abgesehen von den

adulten Testes nicht oder nur minimal (z.B. Thyroidea) in gesundem Gewebe vor. Stattdessen finden sie sich in diversen neoplastischen Veränderungen unterschiedlicher histologischer Gewebe, wo sie bei Nachweis mit einem höheren Tumorstadium und schlechterer Prognose in Zusammenhang gebracht werden. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine mögliche Provokation der körpereigenen Immunabwehr durch diese Antigene in Form humoraler und T-Zell-zytotoxischer Reaktionen (Meklat et al 2007).

Für CTAGE5 (Synonyme: *meningioma expressed antigen*, MEA6, MGEA11) existieren Untersuchungen, bei denen in Seren betroffener Krebspatienten mit kutanem T-Zell-Lymphom (CTCL) oder Melanom gegen das CTA gerichtete Antikörper nachgewiesen wurden, die bei gesunden Probanden in der Regel nicht auftraten. Insbesondere die Isoformen CTAGE 1 und 5 scheinen die Immunreaktion auszulösen (Usener et al 2003). CTAGE 5 tritt häufig im Zusammenhang mit CTCL, aber auch in hämatologischen und anderen Neoplasien wie dem kolorektalen Karzinom, Mammakarzinom und Melanom auf.

Auch für SSX- Antigene sind derartige Immunreaktionen beschrieben worden (Güre et al 2002). SSX1 findet sich in diversen Neoplasien des hämatologischen Systems, unter anderem in der ALL (Niemeyer et al. 2003), dem Hodgkin-Lymphom (Xie et al. 2003, Colleoni et al. 2002) und dem multiplen Myelom (Taylor et al. 2005). SSX1 und SSX2 sind ein häufiges Ziel für die Translokation t(X;18)(p11.2;q11.2), welche zur Bildung des Fusionsproteins SSX-SS18 führt und in rund 70% aller synovialen Sarkome gefunden werden kann (Przybyl et al. 2012).

Mit CTAGE und SSX, die als Tumor-Testis-Antigene identifiziert worden sind und zudem immunologische Antworten bei erkrankten Patienten hervorrufen, bestehen hoffnungsvolle Ansatzpunkte für die Entwicklung immunologischer Therapieoptionen (Scanlan et al 2002, Smith et al. 2010). Der große Vorteil dieser Tumormarker liegt in der breiten Verteilung in Tumorgewebe bei gleichzeitig sehr limitiertem Auftreten in normalem, gesundem Gewebe (abgesehen von den Testes, welche wenig immunogenes Gewebe darstellen). Das könnte sie zu optimalen Zielen einer differenzierten Tumorthherapie machen, davon ausgehend, dass gesundes Gewebe durch die hohe Spezifität der Tumor-Antigene möglichst wenig geschädigt wird.

Als Voraussetzung hierfür wäre eine Etablierung von Immunhistochemien notwendig, um diese Gene auf potentielle Markerqualitäten im Hinblick auf Prognose/Risikoeinschätzung etc. zu testen. Da die heutige Therapie jedoch noch auf histologischen und nicht molekularen

Subtypen basiert, wurde im nachfolgenden versucht, ein Bezug zwischen histologischer Subtypisierung und molekularen Profilen der T-LBL herzuleiten.

## **5.2 Genexpressionsunterschiede zwischen T-lymphoblastischen Lymphomen unterschiedlichen histologischen Subtypes bzw. Ausreifungsgrades**

Um die Vielfältigkeit hämatologischer Erkrankungen und Neoplasien behandeln zu können, ist es aus diagnostischer und in der Konsequenz therapeutischer Hinsicht notwendig, ein System zu schaffen, welches reproduzierbar Kriterien vorgibt, anhand derer eine sinnvolle Identifizierung und Einordnung der Erkrankungen erfolgen kann. Im hämatoonkologischen Bereich gelten die unterschiedlichen Reifungsstadien der physiologischen Zellentwicklung als Basis für die Klassifikationssysteme der verschiedenen Zellreihen. Anhand festgelegter Marker kann, wie bei der EGIL-Klassifikation der T-ALL, der Reifegrad der entarteten Zelle mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt werden. Diese diagnostische Information zieht in der Konsequenz Entscheidungen bezüglich Prognose und Therapie mit sich.

Aktuelle Untersuchungen bemühen sich um ein ähnlich verlässliches Klassifikationssystem bei T-LBL. Versuche, eine immunhistochemische Subtypisierung nach dem Vorbild der EGIL-Klassifikation an Paraffinmaterialien zu etablieren gestalten sich als schwierig. Anhand von Oberflächenantigenen unterteilt dieses System die lymphoblastischen Tumorzellen in 4 Klassen, welche optimalerweise deren Ausreifungsgrad entsprechen. Dazu gehören die frühen Formen des pro- und pre-T-LBL und die reiferen Ausprägungen, das kortikale und medulläre T-LBL. Nicht klassifizierbare Lymphome werden unter „*not otherwise specified*“ (NOS) zusammengefasst. Die Hauptproblematik dieser Einteilung in unreife und reife Subtypen der T-LBL besteht in der unzuverlässigen immunhistochemischen Unterscheidung zwischen cytoplasmatischem und membranständigem CD3. Eine sichere Unterteilung auf immunhistochemischer Ebene ist derzeit nur über CD1a, welches den kortikalen vom zusammengefassten nicht-kortikalen Subtyp trennt, möglich (Oschlies et al. 2011).

Da es sich bei dieser Unterteilung um eine postulierte Unterscheidung von Reifegraden handelt, bestand für die durchgeführten Expressionsanalysen die Erwartung deutlich trennbarer Expressionsprofile zwischen beiden Subtypen. Entgegen dieser Erwartung fanden sich nur sehr wenig differenziell exprimierte Gene, die eine Unterscheidung beider Reifegrade voneinander zulassen: MLC1, HNRPLL und ABCA2. Die ebenfalls voneinander verschieden



exprimierten Gene für CD1 bestätigten lediglich die vorher schon immunhistochemisch bestimmten 2 Subtypen.

Die genaue Funktionsweise von MLC1 ist noch nicht abschließend geklärt, es wird jedoch vermutet, dass es sich um ein Zellmembranprotein mit Transportfunktion handelt. Höchstwahrscheinlich spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation von osmotischen und Volumenverhältnissen zur Aufrechterhaltung der Integrität neuralen Gewebes. (Brignone et al. 2011).

HNRPLL ist ein RNA-bindendes Protein, welches als starker Regulator alternativer splicing-Vorgänge in T-Zellen bekannt ist. Damit trägt es zu unterschiedlichen Entwicklungs- und Reifungsmechanismen von T-Zellen bei, wie der Generierung von memory-T-Zellen (Wu Z et al. 2008), Interaktionen/Signalfunktionen des T-Zell-Rezeptors (TCR) (Wu Z et al. 2010) oder der Interaktion zwischen natürlichen Killer-T-Zellen und konventionellen T-Zellen (Yabas M. et al. 2011).

Das Protein ABCA2 gehört zur großen Gruppe der *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter und findet sich bevorzugt im hämatopoetischen (insbesondere in Makrophagen) und neuronalen Gewebe wieder. Bekannt ist es im Zusammenhang mit der Entwicklung von Medikamentenresistenzen bei Tumorerkrankungen. Dabei fungieren diverse Pharmaka als Substrat und können durch Hochregulierung des Transporters, wie bei Neoplasien häufig zu beobachten, zu einer als „*tumor escaping*“ bezeichneten Resistenzentwicklung führen (Mack et al. 2008).

Die geringe Anzahl der differenziell exprimierten Gene zwischen dem kortikalen und nicht kortikalen Subtyp führt zur Frage, ob der derzeitige Ansatz zur Subklassifizierung von T-LBL in Anlehnung an die EGIL-Kriterien zielführend ist. Möglicherweise wurde die Tragweite dieser Klassifizierung für T-LBL falsch gewichtet. Sollte sich herausstellen, dass die Unterteilung nach unterschiedlichen Ausreifungsgraden bei den T-LBL nach dem derzeitigen Wissensstand nicht anwendbar ist, böte sich hier ein Argument für die These der Unterschiedlichkeit zwischen LBL und ALL. Denn andauernde Diskussionen beschäftigen sich mit der Frage, ob T-ALL und T-LBL leukämische und solide Varianten derselben Grunderkrankung einer T-Zell-Vorläufer-Neoplasie, oder zwei voneinander unabhängige, verschiedene Erkrankungen sind. Sollte sich die Klassifikation der T-ALL nicht auf das T-LBL übertragen lassen, unterstützt das die These, dass es sich bei T-ALL und T-LBL um zwei voneinander unabhängige Krankheiten handelt.

### **5.3 Immunhistochemische Färbung als Ausdruck differentieller Proteinexpression**

Als das Gen mit der höchsten Signifikanz bei der unterschiedlichen Expression zwischen kortikalem und nicht kortikalem Typ wurde das Protein MLC1 ausgewählt und immunhistochemisch an Paraffinmaterial untersucht. Das Ziel bestand in der Bestätigung der Ergebnisse der Genexpression auf Proteinebene.

MLC1 steht bislang vorrangig im Zusammenhang mit Erkrankungen des zentralen Nervensystems, insbesondere der Megalenzephalischen Leukoencephalopathie mit subkortikalen Zysten., welche sein Namensgeber ist. Es handelt sich um eine rezessiv vererbte Krankheit, die durch Makrozephalie, Minderung motorischer und kognitiver Funktionen und eine cerebelläre Ataxie gekennzeichnet ist (Teijido et al. 2004).

MLC1 ist ein Membranprotein, welches vermutlich Transportfunktionen besitzt und im Bereich des ZNS für die Integrität des Nervengewebes, sowie wahrscheinlich die Funktion der Blut-Hirn-Schranke eine Rolle spielt (Teijido et al. 2004, 2007). Davon abgesehen konnte es in allen Linien der weißen Blutzellen nachgewiesen werden (Boor et al. 2005).

Ein unabhängiges Set lymphoblastischer Lymphome der B- und T-Zell-Reihe wurde mit dem Ziel zusammengestellt, die Ergebnisse bezüglich der MLC1- Expression auch auf Proteinebene zu validieren.

Die Färbungen an den TMAs gestalteten sich problematisch und stimmten in Teilen nicht mit den zuvor gefundenen Expressionsmustern auf mRNA-Ebene überein. Fehler im Ablauf des Färbeprotokolls oder der Qualität der Färbematerialien wurden durch die stets stereotype Durchführung nach Protokoll, sowie die herstellergerechte Lagerung der Reagenzien minimiert. Tatsächlich zeigten nach optimiertem *Antigen Retrieval* die Testschnitte der Tonsille wiederholt gute, differenzierte Färbeargebnisse, während die Färbungen der TMAs zum Teil unzuverlässige Ergebnisse vorwiesen. Das lässt ein Problem in Alter und Qualität der TMA-Ausschnitte vermuten. Die Biopsien waren zum überwiegenden Teil während der Neunziger Jahre entnommen worden und somit zwischen 10 und 20 Jahre alt. Erschwerend kamen die nunmehr kleinen, teilweise unzureichenden Gewebeproben hinzu. Zur Bestätigung

dieser Hypothese sind weitere Färbungen nach gleichem Protokoll an möglichst frischen, hochwertigen Ganzschnitten in Zukunft notwendig.

Bei Beurteilung der Ergebnisse muss außerdem bedacht werden, dass zwischen den Messungen der mRNA und Bestimmung des immunhistochemischen Status deutliche Unterschiede bezüglich der Möglichkeit von Abstufungen bestehen. So ist die Messung relativer mRNA Level sehr sensitiv und erlaubt einen ausreichenden Spielraum für differenzierte, quantitativ geprägte Abstufungen. Dagegen erkennt die immunhistochemische Färbung von Proteinen lediglich starke und schwache Positivität oder Negativität. Eine quantitative Aussage lässt sich hiermit kaum treffen. Bezüglich der durchgeführten Untersuchungen bedeutet dies, dass die Unterscheidbarkeit zwischen schwach und stark exprimierten Proteinen bei der Immunhistochemie deutlich geringer ist als bei Genexpressionsanalysen, die auf RNA-Ebene ablaufen.

Ein weiterer Aspekt, der zur kritischen Betrachtung der gefundenen Ergebnisse herangezogen werden kann, sind Mechanismen der post-transkriptionalen Regulierung. Sie greifen nach Entstehung der mRNA in den Translationsprozess, bestehend aus Initiation, Elongation und Terminierung, ein und verändern diesen. Sowohl repressive als auch aktivierende Funktionen sind möglich und führen auf unterschiedlichen Ebenen zur Regulierung der Proteinsynthese. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus sind Micro-RNAs (miRNA), nicht kodierende RNA-Sequenzen von rund 21 nt Länge, welche vermutlich in den Initiationsprozess der Translation eingreifen und je nach Stoffwechsellage der Zelle eine repressive oder stimulierende Wirkung bei der Proteinsynthese entfalten (Filipowicz et al 2008).

#### **5.4 Vergleich relevanter Gene für T-ALL und T-LBL**

Die Frage, ob die T-ALL und das T-LBL leukämische und solide Variante derselben Grunderkrankung einer T-Zell-Vorläufer-Neoplasie, oder zwei voneinander unabhängige Erkrankungen sind, ist weitgehend ungeklärt. Die T-ALL und das T-LBL werden anhand des prozentualen Anteils der Blasten im Knochenmark unterschieden. Die Grenze von 25% ist hierbei willkürlich festgelegt und spiegelt keine nachweislich unterscheidbaren Erkrankungsbilder wieder. Beide Erkrankungen stimmen in vielerlei Hinsicht, wie beispielsweise dem Immunphänotyp, Morphologie oder Klinik (Geschlechtsverteilung, Alter, Erfolg eines ähnlichen Therapiekonzeptes) überein. Unterschiede zeigen sich beim

bevorzugten Manifestationsort (LBL: vorderes Mediastinum, ALL: Knochenmark), bei der Lokalisation von Rezidiven (LBL: lokal, ALL: systemisch) und dem medianen Zeitraum bis zum Wiederauftreten eines Rezidivs (LBL: 10 Monate ALL: 12-13 Monate). Während bei der T-ALL in den letzten Jahren durch die Identifikation prognostisch relevanter Risikofaktoren, wie dem initialen Ansprechen auf die Therapie oder dem Auftreten von MRD das Outcome der Patienten mithilfe einer entsprechenden Therapieanpassung erheblich verbessert werden konnte, fehlen solche validierten Faktoren bislang beim T-LBL (Burkhardt 2010). Tendenzen für eine vermutlich ungünstige Wirkung auf die Prognose haben die Kombination des weiblichen Geschlechts mit dem Adoleszenzalter, sowie das Vorhandensein eines LOH auf der Chromosomenregion 6q (Burkhardt et al. 08/2006). Letzteres traf auch auf eine kleine Auswahl unserer Fälle zu, bei denen der LOH-Status bekannt war.

Auf genetischer Ebene sind für die T-ALL einige Kandidatengene bekannt, die in Zusammenhang mit Tumorgenese und -verlauf der ALL stehen. Darunter fallen Vertreter der Homeobox-Gene (HOX11/ TLX1 und HOX11L2/TLX3), LYL1, Tal1/SCL, LMO 1 und 2, sowie zahlreiche Aberrationen des Gens MLL (Ferrando et al. 2003). Insbesondere letzteres ist bei der Frage nach dem Zusammenhang zwischen T-ALL und T-LBL vielversprechend.

Das Gen „*myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia*“ (MLL) ist in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert, insbesondere die frühe Entwicklung des menschlichen Organismus und die Hämatopoese. Es wirkt sowohl aktivierend als auch supprimierend auf die Regulation des Zellyklus (Liu et al. 2009). Bekannt ist das Gen (Region 11q23) vor allem durch eine Vielzahl an Aberrationen, die durch verschiedene Translokationen mit mehr als 60 Translokationspartnern (engl.: Translocation partner genes) zustande kommen. Ein Teil dieser Translokationen steht in engem Zusammenhang mit dem Auftreten akuter lymphatischer und myeloischer Leukämien (Meyer et al. 2009). Neoplastische Zellen, die positiv für MLL-Abberationen sind, exprimieren oft Marker der myeloischen und lymphatischen Zellreihe gleichzeitig. Leukämien mit MLL-Aberrationen kommen besonders häufig bei Kleinkindern vor, zeigen eine hohe Tumorlast und sind mit einer schlechteren Prognose behaftet. (Prasad et al. 1994). Interessanterweise zeigen auch NHL, inklusive der T-LBLs besonders im frühen Kindesalter ein insgesamt schlechteres Outcome (Mann et al. 2007). Ob hier ein Zusammenhang zum MLL-Gen besteht, ist bislang ungeklärt.

Bei vergleichender Betrachtung der T-LBL-Expressionsanalysen (nicht supervidiert: relapse vs. non relapse, Signifikanz  $p \leq 0,05$ , siehe Abb. 13) fielen in diesem Zusammenhang die Gene MLLT1/ENL und MLLT6/AF17 auf. Beide gehören zu den im Rahmen der ALL oben erwähnten Translokations-Partnern für MLL (Meyer et al. 2009). Für einen Großteil dieser Partner sind die genaue Funktion und Rolle unbekannt. MLLT1/ENL konnte mit Enzymen assoziiert werden, die in den Elongationsprozess während der Transkription, sowie die Modifikation von Histonen involviert sind (Mueller et al. 2007). Die Funktion von MLLT6/AF17 konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden.

Neben diesen Transfusionspartnern von MLL fand sich unter den differentiell exprimierten Genen auch MLL2, Mitglied der MLL-Familie. Es handelt sich um eine Methyltransferase, die im Rahmen inaktivierender Mutationen beschrieben worden ist und vermutlich Tumor suppressierend wirkt (Parsons et al. 2011). Auch im diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom konnten Aberrationen mit einer MLL2-Beteiligung nachgewiesen werden (Pasqualucci et al. 2011).

Ebenfalls unter den Genen, die in fraglichem Zusammenhang mit denjenigen der T-ALL stehen ist ein Vertreter der Homeobox-Gene, HOXD9. Diese Gen-Gruppe ist vielfältig in die Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen u.a. in der Hämatopoese und Embryogenese involviert. In aberranter Form treten HomeoBox-Gene außer in Leukämien auch in verschiedenen anderen Tumoren auf (z.B. Neuroblastom, Ovarial-, Bronchial-, Prostata-, Zervikal- und Mammakarzinom). Untersuchungen an Gliomen lassen eine verstärkte Proliferation von u.a. sogenannten Krebs-Stammzellen (Cancer Stem Cells, CSC) als Folge vermuten (Tabuse et al. 2011).

Zusammenfassend konnten beim Vergleich der T-LBL-Expressionsanalysen (relapse vs. non relapse, Signifikanz  $p \leq 0,05$ , siehe Abb. 13) mit den Kandidatengenen für die Entstehung und den Verlauf einer T-ALL keine direkten Übereinstimmungen festgestellt werden. Es fand sich jedoch eine kleine Auswahl an Genen, die auf Zusammenhänge zwischen beiden Krankheitsformen hindeuten: Mit den MLL- und HOX-Genen existieren zwei Gruppen, an denen sich die genetischen Profile von T-ALL und T-LBL einander nähern. Damit besteht ein erster, konkreter Ansatz für eine mögliche Prognosefähigkeit auch bei den T-LBL. Zukünftige Untersuchungen müssen jetzt klären, inwieweit dieser Ansatz zu einer tragfähigen Basis ausgebaut werden kann, und ob sich hinter diesem eventuell auch neue Erkenntnisse zur Frage der Verwandtschaft beider Erkrankungen gewinnen lassen können.

## 6 Zusammenfassung

T-LBL sind aggressive NHL, die bevorzugt im Kindesalter auftreten. Die Entwicklung eines Rezidivs nach Therapie ist nahezu immer mit einer infausten Prognose verknüpft. Daher ist es absolut notwendig, T-LBL mit erhöhtem Rezidiv-Risiko herausfiltern zu können und dementsprechend geeignete Therapie-Strategien zu entwickeln. Ziel der Arbeit war es, Genexpressionsprofile auf Unterschiede zwischen Lymphomen mit und ohne späteres Rezidiv, aber auch zwischen den verschiedenen Subtypen/Ausreifungsstadien zu untersuchen.

Insgesamt wurden Biopsien von 28 Fällen immunhistochemisch charakterisiert. Anschließend erfolgte die Erstellung von Genexpressionprofilen mit Hilfe von *Affymetrix GeneChip Arrays*. Die Daten wurden analysiert und in Form von *Heat Maps* dargestellt. Es schloss sich die immunhistochemische Färbung des Proteins MLC1 auf TMA's an einem unabhängigen Set von T- und B-LBLs an.

Die Genexpressionsprofile zeigten signifikante Unterschiede zwischen T-LBL mit und ohne später aufgetretenes Rezidiv. Unter den verschieden exprimierten Genen mit einem P-Wert bis zu 0,002 finden sich einige, die in Regulationsmechanismen des Zellzyklus als auch die Pathogenese unterschiedlicher Tumorerkrankungen involviert sind. Beispiele dafür sind insbesondere HIPK2, SSX1 oder CTAGE5.

Überraschenderweise zeigte die Subgruppe der kortikalen T-LBL, welche durch Expression des Oberflächenantigens CD1a definiert ist, nur wenige Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zu nicht kortikalen T-LBL. Die Durchführung einer IHC für MLC1, eines der differentiell exprimierten Gene, konnte die unterschiedliche mRNA-Expression zwischen kortikalen und nicht-kortikalem T-LBL in der Färbung nicht reproduzieren.

Prognostische Biomarker zur Identifikation pädiatrischer T-LBL mit erhöhtem Risiko für das Auftreten von Rezidiven werden dringend benötigt. Die hier aufgezeigten Unterschiede in den Genexpressionsprofilen zwischen T-LBL mit und ohne späteres Rezidiv können als Anhaltspunkt für die Entwicklung solcher Marker in der Routinediagnostik per IHC oder quantitativer *Real Time-PCR* fungieren. Darüber hinaus könnten weitere detaillierte Untersuchungen der differenziell exprimierten Gene dazu beitragen, das Verständnis um die

Pathomechanismen der Rezidiventwicklung zu erweitern und neue Einblicke in diese zu erhalten.

Der Vergleich ausgewählter Gene aus der *Heat Map* mit bekannten Risikogenen der T-ALL brachte zwar keine direkten Übereinstimmungen hervor, wohl aber Zugehörigkeit zu gleichartigen Gengruppierungen (MLL- und HOX-Gene), die in ihrer Struktur und Funktion deutliche Gemeinsamkeiten aufweisen und mit der Entstehung von Neoplasien in Zusammenhang gebracht werden können. Interessant ist dieser Bezug zur leukämischen Form vor dem Hintergrund der zurzeit andauernden Diskussion um die fragliche Verwandtschaft oder Unabhängigkeit beider Neoplasien mit-/voneinander.

Derzeit werden T-LBL immunhistochemisch anhand des Markers CD1a in einen kortikalen und nicht kortikalen Subtyp unterteilt, ausgehend von der Annahme, dass diese Klassifikation Unterschiede im Ausreifungsgrad entsprechend der gesunden „Originalzelle“ darstellt. Sie entstand in Anlehnung an die EGIL-Klassifikation für T-ALL. Die sehr begrenzte Anzahl differentiell exprimierter Gene zwischen beiden Subtypen in der vorliegenden Analyse führt jedoch zur Annahme, dass diese Klassifikation entgegen bisheriger Erkenntnisse keine biologisch relevanten Subgruppen der T-LBL voneinander trennt. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Frage der Klassifikation abschließend zu klären.

## **7 Publikation der Ergebnisse**

Mai 2012, 96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V.:

E. Niendorf, M. Szczepanowski, I. Salaverria, B. Burkhardt, W. Klapper:  
*Molekulare Charakterisierung pädiatrischer T-Zell-Lymphoblastischer Lymphome durch  
Genexpressionsanalysen*



## 8 Literaturverzeichnis

Baleyrier F, Decouvelaere AV, Bergeron J, Gaulard P, Canioni D, Bertrand Y, Lepretre S, Petit B, Dombret H, Beldjord K, Molina T, Asnafi V, Macintyre E. (2008 Feb). *T cell receptor genotyping and HOXA/TLX1 expression define three T lymphoblastic lymphoma subsets which might affect clinical outcome*. Clin Cancer Res. 14(3):692-700.

Boor PK, de Groot K, Waisfisz Q, Kamphorst W, Oudejans CB, Powers JM, Pronk JC, Scheper GC, van der Knaap MS. (2005 May). *MLC1: a novel protein in distal astroglial processes*. J Neuropathol Exp Neurol. 64(5):412-9.

Brignone MS, Lanciotti A, Macioce P, Macchia G, Gaetani M, Aloisi F, Petrucci TC, Ambrosini E. (2011 Jan). *The beta1 subunit of the Na,K-ATPase pump interacts with megalencephalic leucoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 (MLC1) in brain astrocytes: new insights into MLC pathogenesis*. Hum Mol Genet. 20(1):90-103. Epub 2010 Oct 6.

Burkhardt B, Zimmermann M, Oschlies I, Niggli F, Mann G, Parwaresch R, Riehm H, Schrappe M, Reiter A; BFM Group. (2005 Oct). *The impact of age and gender on biology, clinical features and treatment outcome of non-Hodgkin lymphoma in childhood and adolescence*. Br J Haematol. 131(1):39-49.

Burkhardt B, Woessmann W, Zimmermann M, Kontny U, Vormoor J, Doerffel W, Mann G, Henze G, Niggli F, Ludwig WD, Janssen D, Riehm H, Schrappe M, Reiter A. (2006 Jan). *Impact of cranial radiotherapy on central nervous system prophylaxis in children and adolescents with central nervous system-negative stage III or IV lymphoblastic lymphoma*. J Clin Oncol. 24(3):491-9

Burkhardt B, Bruch J, Zimmermann M, Strauch K, Parwaresch R, Ludwig WD, Harder L, Schlegelberger B, Mueller F, Harbott J, Reiter A. (2006 Aug). *Loss of heterozygosity on chromosome 6q14-q24 is associated with poor outcome in children and adolescents with T-cell lymphoblastic lymphoma*. Leukemia. 20(8):1422-9. Epub 2006 Jun 1.

Burkhardt B, Moericke A, Klapper W, Greene F, Salzburg J, Damm-Welk C, Zimmermann M, Strauch K, Ludwig WD, Schrappe M, Reiter A. (2008 Mar) *Pediatric precursor T lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma: Differences in the common regions with loss of heterozygosity at chromosome 6q and their prognostic impact*. Leuk Lymphoma. 49(3):451-61.

Burkhardt B, Reiter A, Landmann E, Lang P, Lassay L, Dickerhoff R, Lakomek M, Henze G, von Stackelberg A. (2009 Feb). *Poor outcome for children and adolescents with progressive disease or relapse of lymphoblastic lymphoma: a report from the berlin-frankfurt-muenster group*. J Clin Oncol. 27(20):3363-9. Epub 2009 May 11.

Burkhardt B. (2010 Jun) *Paediatric lymphoblastic T-cell leukaemia and lymphoma: one or two diseases?* Br J Haematol. 149(5):653-68. Epub 2009 Nov 24.

Burkhardt B, Oschlies I, Klapper W, Zimmermann M, Woessmann W, Meinhardt A, Landmann E, Attarbaschi A, Niggli F, Schrappe M, Reiter A. (2011 Jan). *Non-Hodgkin's lymphoma in adolescents: experiences in 378 adolescent NHL patients treated according to pediatric NHL-BFM protocols*. *Leukemia*. 25(1):153-60. Epub 2010 Oct 29.

Colleoni GW, Capodiceci P, Tickoo S, Cossman J, Filippa DA, Ladanyi M. (2002 May). *Expression of SSX genes in the neoplastic cells of Hodgkin's lymphoma*. *Hum Pathol*. 33(5):496-502.

Ferrando AA, Look AT. (2003 Oct). *Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Semin Hematol*. 40(4):274-80

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008 Feb). *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* *Nat Rev Genet*. 9(2):102-14.

Gallo O, Bianchi S, Giovannucci-Uzzielli ML, Santoro R, Lenzi S, Salimbeni C, Abbruzzese M, Alajmo E. (1995 May). *p53 oncoprotein overexpression correlates with mutagen-induced chromosome fragility in head and neck cancer patients with multiple malignancies*. *Br J Cancer*. 71(5):1008-12.

Guan N, Yu LX, Wu GH, Xing Y, Ding J. (2008 Nov). *Antigen retrieval with protease digestion applied in immunohistochemical diagnosis of Alport syndrome*. *Nephrol Dial Transplant*. 23(11):3509-13.

Güre AO, Wei IJ, Old LJ, Chen YT. (2002 Oct). *The SSX gene family: characterization of 9 complete genes*. *Int J Cancer*. 101(5):448-53.

Hiddemann W., Dreyling M., Stein H. (2005). *Lymphome –Neue Erkenntnisse und Therapiestrategien*, Georg Thieme Verlag

Hoelzer D, Gökbüget N, Digel W, Faak T, Kneba M, Reutzel R, Romejko-Jarosinska J, Zwolinski J, Walewski J. (2002 Jun). *Outcome of adult patients with T-lymphoblastic lymphoma treated according to protocols for acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*. 99(12):4379-85.

Jadali F, Sayadpour D, Rakhshan M, Karimi A, Rouzrokh M, Shamsian BS, Shamshiri AR. (2011 Jul). *Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic factor in Wilms tumor*. *Iran J Kidney Dis*. 5(3):149-53.

Kaatsch P., Spix C.: *Jahresbericht des deutschen Kinderkrebsregisters 2003*. Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2004

Kaatsch P., Spix C.: Jahresbericht des deutschen Kinderkrebsregisters 2006/07. Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2008

Kaatsch P., Spix C.: Jahresbericht des deutschen Kinderkrebsregisters 2010. Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2011

Lee DS, Kim SH, Suh YJ, Kim S, Kim HK, Shim BY. (2011 Jul). *Clinical implication of p53 overexpression in breast cancer patients younger than 50 years with a triple-negative subtype who undergo a modified radical mastectomy.* Jpn J Clin Oncol. 41(7):854-66.

Liu H, Cheng EH, Hsieh JJ. (2009 Jul). *MLL fusions: pathways to leukemia.* Cancer Biol Ther. 8(13):1204-11.

Mack JT, Brown CB, Tew KD. (2008 Apr). *ABCA2 as a therapeutic target in cancer and nervous system disorders.* Expert Opin Ther Targets. 12(4):491-504.

Mann G, Attarbaschi A, Burkhardt B, Niggli F, Klapper W, Ludwig WD, Schrappe M, Zimmermann M, Gadner H, Reiter A; Berlin-Frankfurt-Münster Group. (2007 Nov). *Clinical characteristics and treatment outcome of infants with non-Hodgkin lymphoma.* Br J Haematol. 139(3):443-9. Epub 2007 Sep 14.

Meklat F, Li Z, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Jewell A, Lim SH. (2007 Mar). *Cancer-testis antigens in haematological malignancies.* Br J Haematol. 136(6):769-76.

Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, Ben Abdelali R, Macintyre E, De Braekeleer E, De Braekeleer M, Delabesse E, de Oliveira MP, Cavé H, Clappier E, van Dongen JJ, Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, Beverloo HB, Panzer-Grümayer R, Teigler-Schlegel A, Harbott J, Kjeldsen E, Schnittger S, Koehl U, Gruhn B, Heidenreich O, Chan LC, Yip SF, Krzywinski M, Eckert C, Möricke A, Schrappe M, Alonso CN, Schäfer BW, Krauter J, Lee DA, Zur Stadt U, Te Kronnie G, Sutton R, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Lo Nigro L, Tsaour G, Fechina L, Szczepanski T, Strehl S, Ilencikova D, Molkentin M, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R. (2009 Aug). *New insights to the MLL recombinome of acute leukemias.* Leukemia. 23(8):1490-9. Epub 2009 Mar 5.

Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. (2011 Aug). *Enhancement of native and phosphorylated TDP-43 immunoreactivity by proteinase K treatment following autoclave heating.* Neuropathology. 31(4):401-4.

Mueller D, Bach C, Zeisig D, Garcia-Cuellar MP, Monroe S, Sreekumar A, Zhou R, Nesvizhskii A, Chinnaiyan A, Hess JL, Slany RK. (2007 Dec). *A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification.* Blood. 110(13):4445-54. Epub 2007 Sep 12.

Murphy SB. (1980 Sep). *Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults.* Semin Oncol. 7(3):332-9.

Nardinocchi L, Puca R, Sacchi A, D'Orazi G. (2009 Jan). *Inhibition of HIF-1 $\alpha$  activity by homeodomain-interacting protein kinase-2 correlates with sensitization of chemoresistant cells to undergo apoptosis*. Mol Cancer. 8:1.

Naresh KN, Banavali SD, Bhatia KG, Magrath I, Soman CS, Advani SH. (2002 Feb). *Expression of P53 and bcl-2 proteins in T-cell lymphoblastic lymphoma: prognostic implications*. Leuk Lymphoma. 43(2):333-7.

Niemeyer P, Türeci O, Eberle T, Graf N, Pfreundschuh M, Sahin U. (2003 Jul). *Expression of serologically identified tumor antigens in acute leukemias*. Leuk Res. 27(7):655-60.

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. (2010 Jan). *TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2(1):a001008.

Oschlies I, Burkhardt B, Chassagne-Clement C, d'Amore ES, Hansson U, Hebeda K, Mc Carthy K, Kodet R, Maldyk J, Müllauer L, Porwit A, Schmatz AI, Tinguely M, Abramov D, Wotherspoon A, Zimmermann M, Reiter A, Klapper W. (June 2011). *Diagnosis and immunophenotype of 188 pediatric lymphoblastic lymphomas treated within a randomized prospective trial: experiences and preliminary recommendations from the European childhood lymphoma pathology panel*. Am J Surg Pathol. 35(6), 836-44.

Parsons DW, Li M, Zhang X, Jones S, Leary RJ, Lin JC, Boca SM, Carter H, Samayoa J, Bettegowda C, Gallia GL, Jallo GI, Binder ZA, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Gerhard DS, Fuhs DW, VandenBerg S, Berger MS, Marie SK, Shinjo SM, Clara C, Phillips PC, Minturn JE, Biegel JA, Judkins AR, Resnick AC, Storm PB, Curran T, He Y, Rasheed BA, Friedman HS, Keir ST, McLendon R, Northcott PA, Taylor MD, Burger PC, Riggins GJ, Karchin R, Parmigiani G, Bigner DD, Yan H, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. (2011 Jan). *The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma*. Science. 331(6016):435-9. Epub 2010 Dec 16

Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, Wells VA, Grunn A, Messina M, Elliot O, Chan J, Bhagat G, Chadburn A, Gaidano G, Mullighan CG, Rabadan R, Dalla-Favera R. (2011 Jul). *Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma*. Nat Genet. 43(9):830-7. doi: 10.1038/ng.892.

Prasad R, Leshkowitz D, Gu Y, Alder H, Nakamura T, Saito H, Huebner K, Berger R, Croce CM, Canaani E. (1994 Aug). *Leucine-zipper dimerization motif encoded by the AF17 gene fused to ALL-1 (MLL) in acute leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A. 91(17):8107-11.

Przybyl J, Jurkowska M, Rutkowski P, Debiec-Rychter M, Siedlecki JA. (2012). *Downstream and intermediate interactions of synovial sarcoma-associated fusion oncoproteins and their implication for targeted therapy*. Sarcoma. 2012:249219. Epub 2012 Mar 25.

Puca R, Nardinocchi L, D'Orazi G. (2008 Jul). *Regulation of vascular endothelial growth factor expression by homeodomain-interacting protein kinase-2*. J Exp Clin Cancer Res. 27:22.

Puca R, Nardinocchi L, Sacchi A, Rechavi G, Givol D, D'Orazi G. (2009 Oct). *HIPK2 modulates p53 activity towards pro-apoptotic transcription*. Mol Cancer 8:85.

Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Tiemann M, Parwaresch R, Zimmermann M, Schirg E, Henze G, Schellong G, Gadner H, Riehm H. (2000 Jan). *Intensive ALL-type therapy without local radiotherapy provides a 90% event-free survival for children with T-cell lymphoblastic lymphoma: a BFM group report*. Blood. 95(2):416-21.

Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. (2002 Oct) *Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy*. Immunol Rev. 188:22-32.

Shi SR, Key ME, Kalra KL. (1991 Jun). *Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections*. J Histochem Cytochem. 39(6):741-8.

Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. (1997 Mar). *Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future*. J Histochem Cytochem. 45(3):327-43.

Smith HA, McNeel DG. (2010). *The SSX family of cancer-testis antigens as target proteins for tumor therapy*. Clin Dev Immunol. 2010:150591. Epub 2010 Oct 11.

Smock KJ, Nelson M, Tripp SR, Sanger WG, Abromowitch M, Cairo MS, Perkins SL; Children's Oncology Group. (2008 Oct). *Characterization of childhood precursor T-lymphoblastic lymphoma by immunophenotyping and fluorescent in situ hybridization: a report from the Children's Oncology Group*. Pediatr Blood Cancer. 51(4):489-94.

Tabuse M, Ohta S, Ohashi Y, Fukaya R, Misawa A, Yoshida K, Kawase T, Saya H, Thirant C, Chneiweiss H, Matsuzaki Y, Okano H, Kawakami Y, Toda M. (2011 May). *Functional analysis of HOXD9 in human gliomas and glioma cancer stem cells*. Mol Cancer. 10:60.

Taylor BJ, Reiman T, Pittman JA, Keats JJ, de Bruijn DR, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM. (2005 Nov-Dec). *SSX cancer testis antigens are expressed in most multiple myeloma patients: co-expression of SSX1, 2, 4, and 5 correlates with adverse prognosis and high frequencies of SSX-positive PCs*. J Immunother. 28(6):564-75.

Tejjido O, Martínez A, Pusch M, Zorzano A, Soriano E, Del Río JA, Palacín M, Estévez R. (2004 Nov). *Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts*. Hum Mol Genet. 13(21):2581-94; Epub 2004 Sep 14.

Tejjido O, Casaroli-Marano R, Kharkovets T, Aguado F, Zorzano A, Palacín M, Soriano E, Martínez A, Estévez R. (2007 Jun) *Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems*. Neurobiol Dis. 26(3):532-45. Epub 2007 Feb 23.

Usener D, Schadendorf D, Koch J, Dübel S, Eichmüller S. (2003 Jul). *cTAGE: a cutaneous T cell lymphoma associated antigen family with tumor-specific splicing*. J Invest Dermatol. 121(1):198-206.

Vogetseder M, Gengler C, Reineke T, Tinguely M, Institut für klinische Pathologie, UniversitätsSpital Zürich. (2011) CURRICULUM. *Pädiatrische Lymphomdiagnostik. Aktuelles aus der Sicht der Pathologen*. Schweiz Med Forum 11(5):73–78.

Vousden KH, Prives C. (2009 May). *Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53*. Cell. 1;137(3):413-31.

Wu Z, Jia X, de la Cruz L, Su XC, Marzolf B, Troisch P, Zak D, Hamilton A, Whittle B, Yu D, Sheahan D, Bertram E, Aderem A, Otting G, Goodnow CC, Hoyne GF. (2008 Dec). *Memory T cell RNA rearrangement programmed by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hnRNPLL*. Immunity. 29(6):863-75.

Wu Z, Yates AL, Hoyne GF, Goodnow CC. (2010 Jul). *Consequences of increased CD45RA and RC isoforms for TCR signaling and peripheral T cell deficiency resulting from heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like mutation*. J Immunol. 185(1):231-8. Epub 2010 May 26.

Xie X, Wacker HH, Huang S, Regitz E, Preuss KD, Romeike B, Parwaresch R, Tiemann M, Pfreundschuh M. (2003 Jan). *Differential expression of cancer testis genes in histological subtypes of non-Hodgkin's lymphomas*. Clin Cancer Res. 9(1):167-73.

Yabas M, Godfrey DI, Goodnow CC, Hoyne GF. (2011). *Differential Requirement for the CD45 Splicing Regulator hnRNPLL for Accumulation of NKT and Conventional T Cells*. PLoS One. 6(11):e26440. Epub 2011 Nov 4.

### **Sonstige:**

AWMF- Leitlinien- Register, Nr. 025/013, Entwicklungsstufe 1+ IDA (letzte Überarbeitung 01/2009): *Interdisziplinäre Leitlinie der deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie*

<http://www.kinderkrebsregister.de/extern/veroeffentlichungen/auswertungen-im-detail/lymphome/nhl/index.html> --> 14.10.2011, 14:00 Uhr

*A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project*. (1993 Sep). N Engl J Med. 329(14):987-94.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

ALL	<u>A</u> kute <u>L</u> ymphatische <u>L</u> eukämie
ABC	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette
ABCA2	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette, sub-family A (ABC1), member <u>2</u> (Gen)
Amplif.	amplifiziert
aRNA	amplifizierte <u>R</u> NA
AWMF	<u>A</u> rbeitsgemeinschaft der <u>W</u> issenschaftlichen <u>M</u> edizinischen <u>F</u> achgesellschaften
BFM	<u>B</u> erlin- <u>F</u> rankfurt- <u>M</u> ünster- Group
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
cDNA	<u>c</u> opy <u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid
cRNA	<u>c</u> opy <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
CSC	<u>C</u> ancer <u>S</u> tem <u>C</u> ells
CTA	<u>C</u> ancer <u>T</u> estis <u>A</u> ntigene
CTAGE5	<u>C</u> utaneous <u>T</u> -cell lymphoma-associated <u>a</u> ntigen <u>5</u> (Gen)
CTCL	<u>C</u> utaneous <u>T</u> - <u>C</u> ell <u>L</u> ymphoma
DAB	3,3'- <u>D</u> iaminobenzidin
EGIL	<u>E</u> uropean <u>G</u> roup for the <u>I</u> mmuno logical Characterization of <u>L</u> eukemias
FFPE	<u>f</u> ormalin- <u>f</u> ixed <u>p</u> araffin- <u>e</u> embedded material
GCOS	<u>G</u> ene <u>C</u> hip® <u>O</u> perating <u>S</u> oftware (Affymetrix)
HIER	<u>H</u> eat- <u>i</u> nduced <u>E</u> pitope <u>R</u> etrieval
HIPK2	<u>h</u> omeodomain <u>i</u> nteracting <u>p</u> rotein <u>k</u> inase <u>2</u> (Gen)
HNRPLL	<u>H</u> eterogeneous <u>n</u> uclear <u>r</u> ibonucleoprotein <u>L</u> -like (Gen)
HRP	<u>H</u> oresradish- <u>P</u> eroxidase (= Meerrettich- Peroxidase)
HSF	<u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>F</u> actor
HSF5	<u>h</u> eat <u>s</u> hock transcription <u>f</u> actor family member <u>5</u> (Gen)
ID	<u>I</u> dentify
Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IHC	<u>I</u> mmun <u>h</u> istochemie
Insges.	Insgesamt
IVT	<u>i</u> n <u>V</u> itro <u>T</u> ranskription
KM	<u>K</u> nochen <u>m</u> ark
LOH	<u>L</u> oss of <u>H</u> eterozygosity
MLC1	<u>M</u> egalencephalic <u>l</u> eukoencephalopathy with subcortical <u>c</u> ysts <u>1</u> (Gen)
MLL	<u>M</u> yeloid/ <u>L</u> ymphoid or <u>M</u> ixed- <u>L</u> ineage <u>L</u> eukemia
MPO	<u>M</u> yeloperoxidase
MRD	<u>M</u> inimal <u>R</u> esidual <u>D</u> isease

mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
miRNA	<u>M</u> icro <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
N/A	<u>N</u> ot <u>A</u> vailable
NHL	<u>N</u> on <u>H</u> odgkin <u>L</u> ymphom
NOS	<u>N</u> ot <u>O</u> therwise Specified
nt	<u>N</u> ukleotid
OD	<u>O</u> ptical <u>D</u> ensity/ <u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
RBP	<u>R</u> NA <u>b</u> inding protein
REAL	<u>R</u> evised <u>E</u> uropean <u>A</u> merican <u>L</u> ymphoma Classification
RIN	<u>R</u> NA <u>I</u> ntegrity <u>N</u> umber
rpm	<u>R</u> evolutions per <u>M</u> inute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	<u>r</u> ibosomale <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase
RT-PCR	<u>R</u> eal <u>T</u> ime <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
SAPe	<u>S</u> treptavidin <u>P</u> hycoerythrin
SSX1	<a href="#">synovial sarcoma, X breakpoint 1 (Gen)</a>
TCR	<u>T</u> <u>C</u> ell <u>R</u> eceptor (=T-Zell-Rezeptor)
TdT	<u>T</u> erminal <u>d</u> eoxynucleotidyl <u>T</u> ransferase
T-ALL	<u>T</u> -Zell <u>A</u> kute <u>L</u> ymphatische <u>L</u> eukämie
T-LBL	<u>T</u> -Zell <u>L</u> ymphoblastisches <u>L</u> ymphom
TMA	<u>T</u> issue <u>M</u> icro <u>A</u> rray
Tot.	total
TP53	<u>T</u> umorprotein p53
tRNA	<u>t</u> ransport <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation
ZMAT3	<u>Z</u> inc finger, <u>M</u> atrin-type 3
ZNS	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervensystem



## 10 Anhang

Tabelle A1: identifizierte Gene der nicht supervidierten Clustering (Abb. 13, Seite 30)  $p \leq 0,05$

A2LD1	AKAP11	ARG1	BCAS3	C15orf29	C4orf49
A4GALT	AKAP12	ARGLU1	BCAT2	C15orf43	C5orf51
AASDHPPT	AKAP13	ARHGAP22	BCL2L1	C16orf11	C6orf112
ABCA1	AKAP2/PALM2/P ALM2-AKAP2	ARHGAP27	BCL2L11	C16orf35	C6orf125
ABCC10	AKAP3	ARHGDIG	BCL2L14	C16orf81	C6orf142
ABCC11	AKR1C3	ARHGEF4	BCL2L15	C16orf82	C6orf35
ABCC5	AKR1D1	ARHGEF7	BCL9L	C17orf45	C6orf52
ABCC6	ALB	ARHGEF9	BLK	C17orf51	C6orf54
ABCD4	ALG13	ARIH2	BMP4	C17orf52	C6orf66
ABHD12	ALKBH7	ARL17 / ARL17P1	BMP8A	C17orf56	C6orf99
ABI3	ALOX15	ARL4C	BNC2	C17orf99	C7orf13
ABL2	ALOX5AP	ARMC9	BOK	C18orf10	C7orf28A /28B
ABO	ALPI	ARSB	BOLA3	C18orf15	C7orf30
ABRA	ALPL	ARSD	BOLL	C18orf50	C7orf31
ACAD11 / NPHP3	ALPP / ALPPL2	ART1	BOP1	C18orf8	C7orf34
ACAP1	AMACR	ARTN	BPESC1	C19orf25	C7orf49
ACMSD	AMZ1	ARX	BRD4	C19orf29	C7orf50
ACOT11	ANAPC13	ASB1	BREA2	C19orf55	C8G
ACOX1	ANAPC5	ASB15	BRUNOL5	C1orf204 / VSIG8	C8orf30A
ACOXL	ANGPTL6	ASH1L	BRWD1	C1orf211	C8orf74
ACP1	ANK1	ASPHD1	BTD	C1orf225	C8orf79
ACRC	ANKRA2	ASTN1	BTG3	C1orf61	C9orf117
ACRV1	ANKRD10	ASXL3	BTRC	C1orf67	C9orf144B
ACSL6	ANKRD19	ATF5	BXDC1	C1orf9	C9orf44
ACSS1	ANKRD23	ATG12	BZRAP1	C1QBP	C9orf71
ACTL7A	ANKRD42	ATG5	C10orf12	C20orf132	C9orf72
ACTL7B	ANKRD49	ATP2A2	C10orf136	C20orf135	C9orf85
ACTN1	ANKRD5	ATP2B3	C10orf59	C20orf141	CA7
ACTR2	ANKRD6	ATP5H	C10orf62	C20orf173	CABIN1
ACYP2	ANO2	ATP6V0E2	C10orf71	C20orf74	CABP7
ADAM12	ANTXR1	ATP6V1B1	C10orf72	C21orf62	CACNA1I
ADAM19	ANXA6	ATP9B	C10orf79	C21orf66	CACNG5
ADAM28	ANXA9	ATXN7L1	C10orf84	C21orf7	CACNG6
ADAT3	AOF2	B3GALNT2	C10orf92	C21orf84	CACYBP
ADCY1	AP3M2	B3GALT6	C11orf31	C21orf88	CALCA
ADCY3	AP4E1	B3GNT4	C11orf87	C21orf89	CALML6
ADCYAP1	APC	B3GNT6	C11orf9	C21orf94	CALR3
ADH4	APC2	B3GNT7	C12orf12	C22orf23	CAMK2B
ADH6	API5	B4GALNT4	C12orf54	C2CD2	CAMLG
ADO	APOA2	B9D1	C14orf101	C2orf50	CAMSAP1
AFAP1L1	APOBEC3F	B9D2	C14orf105	C2orf63	CAPN9
AGAP11	APOC3	BAG4	C14orf106	C3orf16	CAPRIN2
AGAP11/6/7/8/CTGLF1	APOC4	BAIAP3	C14orf118	C3orf22	CARD14
AGAP2	APOD	BAT2D1	C14orf145	C3orf35	CARD8
AGBL3	APOH	BAT2L	C14orf153	C3orf45	CARKD
AGRN	APOLD1	BBS1	C14orf166B	C4orf8	CASD1
AHSA1	AQP2	BCAN	C14orf28	C4orf10	CASKIN1
AIG1	AQP6	BCAR4	C14orf68	C4orf36	CASP10
AIM1L	ARAP2	BCAS2	C15orf17	C4orf38	CASR

CATSPER2	CGN	COX6B1	DDX49	DYRK4	FAM111A
CBLN2	CHCHD6	CPNE1	DDX51	ECH1	FAM118B
CBLN4	CHD2	CRAMP1L	DEDD2	ECHDC1	FAM122B
CBX1	CHIA	CREBZF	DEF8	EEPDP1	FAM123C
CBY3	CHIC1	CREM	DEFB105A/B	EFHB	FAM125B
CCBL1	CHKB	CROCCL1	DEFB107A/B	EFHC1	FAM13A1OS
CCBP2	CHMP4B	CROCCL2	DEFB108B/P1	EFNA5	FAM156A / FAM156B
CCDC101	CHP	CROP	DEFB126	EHD3	FAM171B
CCDC111	CHRD1	CRX	DENND4B	EIF2S1	FAM173B
CCDC123	CHRM3	CRY2	DEPDC7	EIF3G	FAM179A
CCDC124	CHRNA4	CRYAA	DGCR5	EIF3J	FAM27E1/E2/E3
CCDC132	CHST1	CRYBA4	DGKI	ELAVL2	FAM47A
CCDC136	CIB3	CRYGC	DHX8	ELOF1	FAM5B
CCDC14	CINP	CRYZ	DIAPH1	ELP2P	FAM66C
CCDC149	CIP29	CSGLCA-T	DIP2B	ELP3	FAM71A
CCDC22	CIR	CSH1 / CSH2 / GH1	DKFZP43410714		
CCDC40	CIRBP	CSH2			
CCDC44	CLASP2	CSMD2	DKFZp686L14188		
CCDC52	CLCA2	CSPP1	DKK2	ELP4	FAM71C
CCDC58	CLDN1	CTA-221G9.4	DLGAP2	EMD	FAM84A
CCDC59	CLDN11	CTAGE5	DMKN	EML2	FAM84B
CCDC61	CLDN17	CTBP1	DMRT3	EML3	FARP2
CCDC74B	CLDN6	CTNBL1	DMRTA1	EML4	FASTKD2
CCKAR	CLEC4A	CTNND2	DMRTA2	EML6	FBLN2
CCL17	CLEC4D	CTSC	DMTF1	ENAH	FBN2
CCL26	CLEC7A	CTSO	DNAH3	ENC1	FBXL12
CCNA1	CLIP1	CUGBP2	DNAH5	ENTPD2	FBXL16
CCNC	CLIP3	CWF19L1	DNAH7	ENTPD6	FBXL18
CCNL2	CLK2	CXCL3	DNAJB1	ENY2	FBXO21
CD160	CLPB	CXorf39	DNAJB12	EPB41L1	FBXO31
CD244	CLTA	CYB561D1	DNAJB13	EPHA10	FBXO39
CD58	CMC1	CYB5A	DNAJB6	EPHA5	FBXO42
CD79B	CMTM3	CYCS / CYCSP52	DNAJB8	EPM2AIP1	FBXO44
CDC20B	CMTM4	CYHR1	DNAJC7	EPS8L1	FBXW7
CDC25C	CNIH2	CYP11B1	DNASE1	ERBB4	FCAR
CDC27	CNOT4	CYP17A1	DNM1	ERGIC1	FDX1L
CDC42BPG	COG1	CYP1A2	DNM3	ESD	
CDC42EP3	COG6	CYP2A7P1	DNMBP	ESPMP	
CDH24	COL11A1	CYP4A11	DNMT3L	ESR1	
CDH9	COL13A1	CYTH2	DOCK2	ESR2	FERMT1
CDK10	COL27A1	CYTH3	DOCK6	ESRRB	FETUB
CDK5R1	COL28A1	DAPK3	DOHH	EVI5L	FGA
CDK5R2	COL29A1	DBC1	DOK3	EXOC3L	
CDK5RAP2	COL2A1	DBH	DPY19L1	EXOC3L / KIAA0895L	
CEL	COL6A6	DCC	DPY19L1P1	EXOC6	
CEP152	COPS2	DCDC2B	DPY30	EXOC6B	FGF17
CEP170	COQ3	DCTD	DSG3	F11	FH
CES2	COX17	DDA1	DSTN	F12	FHDC1
CES4	COX5B	DDX17	DYDC1	FABP3	FKBP6
CFC1 / CFC1B	COX6A1	DDX26B	DYRK3	FAM102A	FKSG43 / FRMD8

FLCN	GALNT1	GRIA2	HERC2P7	HSPA8	ITFG2
FLJ12078	GALNT2	GRIK4	HERC5	HSPB11	ITGAM
FLJ12825	GALR2	GRIN1	HES7	HSPD1 / HSPD1P4	ITPK1
FLJ20674	GALT	GRIN2C	HEXDC	HSPH1	ITSN2
FLJ21865	GAMT	GRWD1	HEXIM2	HTATIP2	IVNS1ABP
FLJ22662	GART	GSDMC	HFE	HTR3A	JAK3
FLJ25770	GAS2L1	GSG1L	HFE2	HTR6	JCLN
FLJ30375	GATM	GSTA4	HGSNAT	HTR7	JMJD2C
FLJ30594	GBX1	GSTTP1	HHIP	HTT	JMJD7/JMJD7-PLA2G4B/PLA2G4B
FLJ31306	GDEP	GTF2A2	HHLA3	HUWE1	JPH3
FLJ33534	GDF15	GTPBP1	HIATL1	HYALP1	JRK
FLJ35816	GDI1	GTPBP10	HIGD2A	HYPK	JTV1
FLJ35934	GDPD3	GTPBP5	HIP1	IBSP	KAL1
FLJ37078			HIPK2	ICA1	KALRN
FLJ40113			HIST1H1B		
FLJ40142			HIST1H2AD / HIST1H3A/B/C/D/E/F/G/H/I/J		
FLJ40176	GFM1	GTSE1			
FLJ43390	GFOD1	GUCA1B	HIST1H2BC/E/F/G/I		
FLJ43663	GGA2	GUCA2B	HIST1H2BJ		
FLJ44606	GGT7	GUSBL2	HIST1H3I		KARS
FLRT3	GJD2	H1FX	HIST1H4A/B/C/D/E/F/H/I/J/K/L/ HIST2H4A/HIST2H4B/ HIST4H4		
FLT4	GLE1	H6PD			
FMNL2	GLMN	HAMP		ICA1L	KBTBD5
FMNL3	GLRX3	HAPLN4 / TM6SF2		ICAM5	KCNA10
FMO9P	GLS	HARS		ICOSLG	
FNBP1	GNA15	HAS3	HIVEP1	IFFO2	KCNE1
FNBP4	GNB1L	HBM	HLA-DOA	IFNA16	KCNF1
FNDC8	GNG3	HBZ	HM13	IFNK	KCNG2
FOXH1	GNG5	HCCS	HMCN2	IGFL1	KCNH4
FOXJ2	GNGT2	hCG_17324	HMGA2	IGHG1	KCNIP2
FOXL1	GNRH1	hCG_1771830	HMGB4	IGSF9B	KCNIP3
FOXN3	GOLGA1	hCG_1814936	HMHB1	IHH	KCNJ5
FOXO1	GOLGA8A		HMX1	IKBKB	KCNK1
FRY	GOLGA8A / GOLGA8B		HNF1A	IKZF1	KCNK17
FSCN2	GORASP1		HNF4A	IL11RA	KCNK4
FSD1	GP9	hCG_1990547	HNRNPA2B1	IL1RN	KCNMB1
FSD1L	GPD1	hCG_2019139		IL13RA2	KCNQ10T1
FTCD	GPHB5	hCG_2024410 / RPE		IL17F	KCNT1
FUCA1	GPR150	HCG2P7			KCTD15
FUT9	GPR157	HCN2	HNRNPC / HNRNPCL1		KCTD7
FUZ	GPR17	HCN4	HNRNPUL2		
FYN	GPR173	HCRTR2	HNRPDL	IL25	KERA
FZD3	GPR19	HDAC8	HOXD9	IL27RA	KIAA0020
FZR1	GPR22	HDLBP	HPCAL1	IL31RA	KIAA0195
G3BP1	GPR27	HECTD1	HPS6	ING5	KIAA0226
GABBR2	GPR6	HECW2	HRK	INPP5B	KIAA0368
GABRA5	GPR68	HEG1	HS3ST1	INPP5F	KIAA0467
GABRA6	GPR78		HS6ST1	INSR	KIAA0892
GADD45B	GPR89A/B/C		HSF5	IQCF2	KIAA0999
GADD45GIP1	GPRC5B		HSPA1L	IQCF6	KIAA1107
GAGE1	GRAMD3	HERC2		IQCH	KIAA1147
GALE	GRHPR	HERC2P2 / HERC2P3		ISLR2	KIAA1244

			LOC348817	LOC728730	
KIAA1245/NBPF1/NBPF10/NBPF11/NBPF12/NBPF14/NBPF15/NBPF16/NBPF20/NBPF8/NBPF9/RP11-94I2.2					
KIAA1245 / NBPF1 / NBPF10 / NBPF11 / NBPF14 / NBPF16 / NBPF20 / NBPF8 / NBPF9 / RP11-94I2.2					
KIAA1274			LOC386597	LOC728944/ THAP4	
KIAA1468	LOC100129550	LOC201229	LOC387895	LOC729723	MAP1LC3B2
KIAA1549	LOC100129890	LOC202051	LOC388503	LOC730051	MAP2
KIAA1654	LOC100130212	LOC220594	LOC399491	LOC730184	MAP3K7IP3
KIAA2018	LOC100130219	LOC220906	LOC399884	LOC730496	MAP4K5
KIDINS220	LOC100130315	LOC221122	LOC399904	LOC731109	MAP6
KIF12	LOC100130389	LOC221442	LOC400655	LOC732096	MAPK8IP3
KIF1A	LOC100130426	LOC253805	LOC401320	LOC791120	MAPRE2
KIF21A	LOC100130998	LOC255411	LOC401321	LOC90246	MAPRE3
KIF6	LOC100131112	LOC283038	LOC401351	LOC91316	MARCH8
KIR2DL4	LOC100131117	LOC283214	LOC404266	LOC92659	MARCH9
KIR3DX1	LOC100131144	LOC283501	LOC415056	LONP2	MARS
KLF7	LOC100131298	LOC283674	LOC440330	LONRF1	MARVELD3
KLHDC5	LOC100131496	LOC283738	LOC440350	LOXHD1	MATN1
KLHL3	LOC100131509	LOC283745	LOC440900	LPIN1	MATR3
KLHL36	LOC100131637	LOC283867	LOC440934	LPP	MBD2
KLK15	LOC100131683	LOC284067	LOC440944	LRCH3	MBD3L2
KNDC1	LOC100132319		LOC440981	LRP1	MBD4
KRT15	LOC100132540 / LOC100132620 / LOC339047 / NPIP			LRRC16A	MBNL2
KRTDAP	LOC100132739 / ZIC1		LOC442240	LRRC28	MBP
KSR1	LOC100132740 / LOC100134711 / STAG3L1 / STAG3L2 / STAG3L3				MCC
KSR2	LOC100132798		LOC442421/LOC728539/LOC728683		MCCC2
KY	LOC100132810 / LOC441179			LRRC59	MCF2
LAMA3	LOC100132853			LRRC6	MCF2L
LAMB2L	LOC100132911	LOC284244	LOC51233	LRRC66	MCPH1
LASS5	LOC100132971	LOC284513	LOC51336	LRRC7	MCTS1
LAYN	LOC100133142	LOC284801	LOC553103	LRRFIP1	MDS2
LCAT	LOC100133229	LOC285147	LOC554203	LRTM2	
LCN1	LOC100133233 / TRAF3IP3		LOC554235	LST-3TM12 / SLCO1B1 / SLCO1B3	
LDB2	LOC100133311 / LOC100134764 / LOC285944			LTB4R	MECP2
LDB3	LOC100133461		LOC641467	LTBR	MED16
LECT2	LOC100133471 / LOC285103		LOC642031	LUZP1	MEF2D
LENG1	LOC100134363 / LOC100134366 / PLGLA / PLGLB1 / PLGLB2			LUZPP1	MEFV
LGR4	LOC100134498		LOC642587	LYAR	MEG3
LHX1	LOC100190986	LOC285181	LOC642852	LYZL1 / LYZL2	MEGF9
LHX5	LOC100192379	LOC285281	LOC642864	MACF1	MEIG1
LHX9	LOC126661	LOC285812	LOC644096	MAGEA10	MEIS1
LIMS2	LOC143678	LOC285965	LOC644165 / LOC728216	MAGEA5	MEP1B
LL22NC03-75B3.6	LOC145845	LOC286071	LOC644213	MALAT1	METRNL
LLGL1	LOC150005	LOC286083	LOC644222		METTL11A
LOC100128074	LOC151658	LOC339047	LOC647946	MALT1	MFS8
LOC100128325	LOC154822	LOC339166	LOC650656	MAML3	MGAT4C
LOC100128434	LOC157740	LOC339260	LOC727924 / OR4N4	MAN1B1	MGC10814
LOC100128484	LOC158381	LOC339400		MAN2A2	MGC12935
LOC100128727	LOC171220	LOC340037	LOC728137 / LOC728395 / LOC728412 / TSPY1		
LOC100128977	LOC197350	LOC340094	LOC728361		MGC15613
LOC100129386	LOC200261	LOC341912	LOC728377 / OR2A4 / OR2A7		MGC23284
LOC100129427	LOC200830	LOC348120	LOC728431		MGC24103

MGC42157	MYH14	NOL4	OSGIN1	PEX14	PMPCB
MGP	MYH16	NOL7	OSGIN2	PEX16	PNKP
MIB2	MYH6	NOMO1 / NOMO2 / NOMO3		PFDN1	PNPLA3
MICAL1	MYLK4	NOP16		PFDN6	PNPLA4
MICAL2	MYO15B	NPAS2		PFKM	PNPLA5
MICALL1	MYO18B	NPAS3	P2RY6	PGLS	POFUT1
MINK1	MYSM1	NPIP	PA2G4 / PA2G4P4		POLDIP3
MKKS	N4BP2L1	NPLOC4	PABPC1L	PHACTR2	POLI
MKL1	NAALAD2	NPR2	PABPC4L	PHACTR3	POLN
MLL2	NAB1	NRG1	PABPN1	PHACTR4	POLR1D
MLLT1	NACC2	NRSN1	PACSIN2	PHC1 /// PHC1B	POLR2A
MLLT6	NADK	NRXN1	PAIP2	PHC2	POLR2C
MMAA	NADSYN1	NSFL1C	PALLD	PHC3	POLR2E
MMEL1	NAG	NSMCE2	PAPOLA	PHEX	POLR2F
MMP11	NANOS3	NSMCE4A	PAPPA	PHF6	POLR2J4
MMP12	NAPA	NSUN7	PARD3B	PHF7	POLR2L
MMP16	NAT8L	NT5C3L	PAX3	PHKG2	POLR3G
MMP17	NAV1	NTN3	PAX4	PI4KA	POM121L1 / POM121L3 / POM121L4P
MNAT1	NBEAL1	NTNG2	PAX5	PI4KA / PI4KAP1 / PI4KAP2 / PI4KAP2	
MNT	NCAM1	NTRK2	PAX8	PI4KB	
MOBK2A	NCF4	NTRK3	PBOV1	PIF1	POTED
MORG1	NCKIPSD	NTSR1	PCA3	PIGF	POU2F2
MPP4	NCR2	NUAK1	PCDH10	PIGG	POU3F4
MPPE1	NCRNA00112	NUBP1	PCDH11Y	PIK3R2	PPFIA1
MPZL3	NCRNA00158	NUDT10	PCDH21	PIK3R3	PPIAL4A/PPIAL4B/PPI AL4C/PPIAL4G
MREG	NDST2	NUDT4P1	PCDH7	PILRB	PPID
MRGPRX1	NDUFA2	NUDT5	PCDHA2	PINX1	PPIL2
MRPL18	NDUFA4	NUDT6	PCDHGA1	PIP5K1B	PPP1R10
MRPL19	NDUFA8	NUDT9	PCDHGB6	PIP5K3	PPP1R11
MRPL22	NDUFB7	NUP210	PCDHGB8P	PITRM1	PPP1R16B
MRPL23	NDUFS7	NXF3	PCGF3	PITX3	PPP1R1C
MRPL35	NEFM	NXPH1	PCGF5	PKD1	PPP1R7
MRPL54	NEK3	ODZ3	PCSK6	PKD2	PPP2R5A
MRPS15	NEUROD2	OIT3	PCYT1B	PKD2L1	PPP3CC
MRPS17	NEUROG1	OLIG3	PDAP1	PLA2G12B	PPP3R2
MRPS18B	NF1	ONECUT1	PDCD5	PLA2G4C	PPP4R4
MRPS22	NFAT5	ONECUT2	PDE10A	PLA2G4D	PPP5C
MRPS25	NFATC2	ONECUT3	PDE4A	PLAC2	PPY2
MRPS9	NFATC2IP	OPCML	PDE4D	PLAC4	PQBP1
MSH4	NFE2L2	OPLAH	PDHA1	PLAGL1	PRAMEF11
MSL1	NFIL3	OPN5	PDIA2	PLCB3	PRDM7
MSRB3	NFX1	OPRD1	PDILT	PLCE1	PRDM8
MT3	NFYC	OPRK1	PDK2	PLCZ1	PREP
MTHFR	NGB	OPRL1	PDPR	PLEK2	PRKAA1
MTL5	NIN	OR10D1P	PDX1	PLEKHA5	PRKAB2
MTMR15	NISCH	OR1J4	PDZD2	PLEKHA6	PRKD1
MUC17	NKG7	OR2A20P / OR2A9P		PLEKHG3	PRO1880
MUM1L1	NKTR	OR2F1 / OR2F2		PLEKHN1	PRODH2
MUSK	NKX2-5	OR2H1	PDZD3	PLK5P	PRPF40B
MXD4	NLGN2	OR2L2	PDZRN3	PLXNA2	PRPF4B
MYCBPAP	NLRP1	OR51J1	PDZRN4	PLXNB1	PRR17

MYH13	NOL12	OSBPL10	PEX6	PLXNB2	PRSS12
PRSS22	RCOR1	RUFY2	SFTPC	SLIT2	STX2
PRSS33	RCOR3	RUNX1	SFXN1	SMAD6	SUCLG1
PRSS7	RDH8	RUNX1/SH3D19	SFXN4	SMARCA4	SUGT1
PSEN1	REG1A	RUNX2	SFXN5	SMARCD3	SULT1C2
PSENEEN	RELA	S100A7A	SGSM2	SMG7	SULT1E1
PSG6	REPIN1	SALL3	SH2D1B	SMOX	SVIL
PSMB2	RET	SAMD3	SH3GL3	SMTNL1	SYCP1
PSMB7	REV1	SAMD5	SH3PXD2A	SNHG10	SYNCRIP
PSMC4	RFX4	SAP30BP	SH3PXD2B	SNIP	SYT11
PSMF1	RGL2	SAPS2	SHB	SNORA71A	SYT12
PTCD3	RGL3	SARDH	SHOX2	SNORA74A	TACR1
PTCH1	RGPD1 / RGPD2		SIGLEC10	SNRPC	TAF1C
PTEN	RGPD5 / RGPD6 / RGPD8		SIGMAR1	SNTB2	tAKR
PTGER1	RGS11		SIPA1L3	SNX1	TAP2
PTPN1	RGS12	SARS2	SIRPG	SNX15	TARSL2
PTPN21	RGS3	SBF1	SIRT5	SNX22	TBC1D14
PTPN9	RHCE	SCEL	SIRT6	SNX29	TBC1D21
PTPRN	RHOB	SCG3	SIX1	SORBS2	TBC1D26 / ZNF286A
PTPRZ1	RHOBTB2	SCML1	SLAIN2	SOX1	TBC1D28
PTS	RILPL2	SCN2B	SLC13A1	SOX2	TBC1D2B
PTTG2	RIMKLB	SDC3	SLC14A1	SPAG11A	TBCA
PVR	RIT1	SDCCAG3	SLC16A3	SPAG4L	TBCD
PVT1	RMND5B	SDCCAG8	SLC19A1	SPAG8	TBRG1
PWP2	RMST	SDHALP2	SLC1A6	SPATA13	TBX2
PXMP4	RNF144A	SEC16A	SLC1A7	SPATA20	TBX6
QRSL1	RNF215	SEC16B	SLC22A11	SPATA21	TCEB1P3
RAB11A	RNF24	SEC24D	SLC22A18AS	SPATA9	TCEB3
RAB35	RNF31	SEL1L2	SLC22A7	SPEF1	TCF3
RAB38	RNF34	SEMA4D	SLC24A1	SPEF2	TCP11L1
RAB40C	RNF5	SEPT11	SLC25A24	SPEG	TCP11L2
RABGAP1	ROBLD3	SEPT2	SLC25A27	SPEN	TEAD1
RABL4	RP11-165H20.1		SLC28A1	SPG7	TECTA
RADIL	RP11-345P4.4 / SLC35E2		SLC29A2	SPINT1	TEKT5
RAG1	RP4-692D3.1		SLC2A11	SPIRE2	TESC
RAG2	RP5-1022P6.2	SEPW1	SLC2A4	SPOCD1	TET3
RALGPS1	RP5-886K2.1	SERBP1	SLC2A5	SPOCK2	TEX9
RANBP2			SLC30A2	SPRY2	TEX13B
RANBP2 / RGPD1 / RGPD2 / RGPD3 / RGPD4 / RGPD5 / RGPD6 / RGPD7 / RGPD8			SLC44A2	SPSB3	TFG
RAPGEF2			SLC4A1	SPTBN4	TGFBR1
RAPGEF4	RPAIN	SERINC3	SLC4A10	SRC	TGM4
RARA	RPE	SERP2	SLC4A11	SRGAP2	TGOLN2
RASA3	RPL32P3	SERPINB5	SLC4A3	SRPK3	THADA
RASAL2	RPLP1	SERPIND1	SLC5A3	SSX1	THAP11
RAX2	RPRD1A	SESN2	SLC5A7	ST3GAL1	THAP3
RBBP6	RREB1	SETD5	SLC5A8	ST3GAL4	THAP8
RBKS	RRM1	SETD7	SLC6A11	ST8SIA3	THEM2
RBM25	RSRC1	SF3B14	SLC6A18	STAT3	THOC5
RBM33	RTN4IP1	SFRS4	SLC6A19	STAT6	THRA
RBM39	RTP1	SFRS5	SLC6A4	STC1	THRB
RBM5	RTP3	SFT2D1	SLC9A5	STMN4	TIA1
RBM6	RUFY1	SFTPB	SLCO6A1	STRBP	TIAM1

TIAM2	TTC17	VPS53	ZCRB1	ZNF831	
	TTC19	VRK3	ZDHHC19	ZNF844	
TKTL2	TTC22	VSIG2	ZDHHC21	ZNF846	
TLE1	TTC23	VSTM1	ZDHHC4	ZNF862	
TLE6	TTC25	VSX1	ZDHHC8P	ZNF90	
TLL2	TTC3	VT11A	ZFAND5	ZPLD1	
TMC1	TTC36	VWA3A		ZSCAN10	
TMC8	TTC38	WASH1/WASH2P/WASH3P/WASH5P			
TMED5	TTC39C	WASH2P /WASH3P /WASH5P			
TMEM108	TTLL2	WASH3P			
TMEM131	TTLL9	WDR20	ZFP36L1		
TMEM165	TTN	WDR22	ZFP41		
TMEM184A	TTY10	WDR26	ZFPL1		
TMEM196	TUBB4Q	WDR33	ZFPM1		
TMEM37	TUBGCP2	WDR42A	ZFR2		
TMEM41B	TULP2	WDR52	ZFYVE20		
TMEM59L	TUT1	WDR5B	ZMAT1		
TMEM91	TYR	WDR64	ZMAT3		
TMEM95	UBAC2	WDR72	ZMAT5		
TNFRSF10B	UBE2H	WDR74	ZNF160		
TNIP3	UBE2J1	WDR78	ZNF174		
TNNI2	UBE3B	WDR91	ZNF20 / ZNF625		
TNR	UBL5	WFDC10A	ZNF207		
TNRC18	UBQLNL	WFDC9	ZNF215		
TNRC6A	UBR3	WIPF1	ZNF24		
TOP1P2	UBXN2B	WIPI2	ZNF302		
TOX3	UFSP2		ZNF318		
TPST1	UGT1A10 / UGT1A6 / UGT1A7 / UGT1A8		ZNF330		
TRA@	UGT2B4		ZNF34		
TRAF1	UNC84A	WIZ	ZNF391		
TRAF3IP1	UNKL	WNK4	ZNF397		
TRAF5	UQCC	WNT7B	ZNF436		
TRAF7	UQCR	WNT8B	ZNF449		
TRAPPC4		WSB1	ZNF462		
TRBC1 / TRBC2 / TRBV7-4 / TRBV7-6 / RBV7-7 / TRBV7-8		WWTR1	ZNF469		
TRDN		XAGE3	ZNF500		
TRGV5	UQCRB	XCL1	ZNF540		
TRIM14	USE1	XCL1 / XCL2	ZNF551		
TRIM31	USMG5	XIRP2	ZNF587		
TRPC7	USP12	XRCC4	ZNF589		
TRPM3	USP22	XRRA1	ZNF626		
TRUB1	USP28	YPEL2	ZNF641		
TSC22D3	USP34	ZADH2	ZNF688		
TSGA10IP	USP6	ZAN	ZNF763		
TSHR	VAMP4	ZBED1	ZNF775		
TSHZ1	VAMP5	ZBTB10	ZNF777		
TSPAN18	VASH1	ZBTB12	ZNF778		
TSSK6	VDAC3	ZBTB7A	ZNF785		
TTBK2	VENTXP1	ZBTB8OS	ZNF789		
TTC13	VPS13B	ZC3H11A	ZNF79		
TTC14	VPS37C	ZCCHC2	ZNF81		

Tabelle A2: Genes p=0.002 104 probesets

Column	Probeset	Gene title	Gene Symbol	P-value( relapse or not)	F(relapse or not)
39980	230718_at	heat shock transcription factor family member 5	HSF5	1,68E-06	37,0508
52430	243173_at	calcium binding protein 7	CABP7	3,42E-05	24,5665
9252	1569478_s_at	---	---	8,04E-05	21,5181
46785	237528_at	---	---	0,000104561	20,6199
41657	232395_x_at	ATP/GTP binding protein-like 3	AGBL3	0,000111436	20,4049
46607	237350_at	tetratricopeptide repeat domain 36	TTC36	0,000143323	19,5654
51534	242277_at	---	---	0,000154658	19,3147
50156	240899_at	---	---	0,000171058	18,985
19611	210199_at	crystallin, alpha A	CRYAA	0,00020052	18,4704
31883	222596_s_at	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4	LGR4	0,000206277	18,3794
44881	235624_at	High density lipoprotein binding protein (vigilin), mRNA (cDNA clone IMAGE:39209	HDLBP	0,000241237	17,8798
23765	214458_at	TNF receptor-associated factor 3 interacting protein 1	TRAF3IP1	0,000283296	17,3732
5556	1560776_at	---	---	0,000285982	17,3436
13854	204399_s_at	echinoderm microtubule associated protein like 2	EML2	0,000286096	17,3424
39591	230329_s_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6	NUDT6	0,000313025	17,0618
29475	220183_s_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6	NUDT6	0,000315642	17,0359
43367	234109_x_at	one cut homeobox 3	ONECUT3	0,000361257	16,6189
19301	209887_at	SMAD family member 6	SMAD6	0,000381535	16,4514
5205	1560151_x_at	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	SLC29A2	0,000436498	16,0418
53873	244615_x_at	threonyl-tRNA synthetase-like 2	TARSL2	0,000443549	15,9933
33125	223841_s_at	spermatogenesis associated 9	SPATA9	0,000445402	15,9807
9273	1569512_at	---	---	0,000459332	15,8877
21388	212074_at	unc-84 homolog A (C. elegans)	UNC84A	0,000539478	15,4059
17715	208283_at	G antigen 1	GAGE1	0,000545679	15,3718
18061	208636_at	actinin, alpha 1	ACTN1	0,000580344	15,1891
46684	237427_at	---	---	0,000603356	15,0742
912	1553502_a_at	A kinase (PRKA) anchor protein 2 /// paralemmin 2 /// PALM2-AKAP2 readthrough tr	AKAP2	0,000606176	15,0604
20594	211227_s_at	protocadherin 11 Y-linked	PCDH11Y	0,000651749	14,8472
43489	234231_at	hypothetical protein LOC197350	LOC197350	0,000659326	14,8133
2866	1556211_a_at	---	---	0,000672945	14,7535
9685	1570169_at	CUB and Sushi multiple domains 2	CSMD2	0,00067311	14,7528
41685	232423_at	arylsulfatase D	ARSD	0,000683582	14,7076



46970	237713_at	---	---	0,000688098	14,6884
1805	1554745_at	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 1	RALGPS1	0,000691929	14,6722
15275	205820_s_at	apolipoprotein C-III	APOC3	0,000695023	14,6592
26838	217545_at	myosin, heavy chain 14	MYH14	0,000695286	14,6581
39886	230624_at	solute carrier family 25, member 27	SLC25A27	0,000705046	14,6174
18694	209272_at	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	NAB1	0,000705998	14,6135
29790	220498_at	actin-like 7B	ACTL7B	0,00072937	14,5187
48582	239325_at	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC729723 (LOC729723), mRNA	LOC729723	0,000735436	14,4947
16795	207344_at	A kinase (PRKA) anchor protein 3 intermediate filament family orphan 2	AKAP3	0,000751334	14,4326
34880	225615_at	intermediate filament family orphan 2	IFFO2	0,000752818	14,4269
16081	206627_s_at	synovial sarcoma, X breakpoint 1 oligodendrocyte transcription factor 3	SSX1	0,000757019	14,4107
2971	1556371_at	oligodendrocyte transcription factor 3	OLIG3	0,000758976	14,4033
8810	1568687_s_at	ATPase, Class I, type 8B family pseudogene	LOC158381	0,000768623	14,3667
34083	224817_at	SH3 and PX domains 2A	SH3PXD2A	0,000770475	14,3597
4267	1558530_at	leucine-rich repeats and transmembrane domains 2	LRTM2	0,000787915	14,295
7096	1563181_a_at	---	---	0,000795317	14,268
6483	1562250_at	---	---	0,000799907	14,2514
20750	211407_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7, 18kDa	NDUFB7	0,000805523	14,2312
50050	240793_at	Titin	TTN	0,00080692	14,2262
38901	229639_s_at	RFC1=reduced folate carrier {coding region} [human, testis, mRNA Partial, 1776 n	SLC19A1	0,000829789	14,1458
20544	211174_s_at	cholecystokinin A receptor	CCKAR	0,000836437	14,1228
18062	208637_x_at	actinin, alpha 1	ACTN1	0,000901932	13,9068
7686	1564591_a_at	transmembrane channel-like 1	TMC1	0,000904053	13,9001
13510	204055_s_at	CTAGE family, member 5	CTAGE5	0,000906945	13,8909
52109	242852_at	hypothetical protein LOC285147	LOC285147	0,000911258	13,8774
31120	221832_s_at	leucine zipper protein 1	LUZP1	0,000928385	13,8243
38944	229682_at	RP3 gene	MAPRE3	0,000943435	13,7785
26210	216912_at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	ARHGEF4	0,000950784	13,7564
47349	238092_at	---	---	0,000954579	13,745
34362	225097_at	homeodomain interacting protein kinase 2	HIPK2	0,000962576	13,7213
31951	222664_at	potassium channel tetramerisation domain containing 15	KCTD15	0,00104541	13,4875
21382	212068_s_at	HLA-B associated transcript 2-like zona pellucida-like domain containing 1	BAT2L	0,00106361	13,4388
6336	1561969_at	zeta pellucida-like domain containing 1	ZPLD1	0,00107318	13,4135
41988	232726_at	---	---	0,00108437	13,3843
29582	220290_at	absent in melanoma 1-like	AIM1L	0,00109215	13,3642
6147	1561611_at	---	---	0,00110217	13,3385

44909	235652_at	---	---	0,00112767	13,2743
22134	212821_at	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 3	PLEKHG3	0,00116142	13,1916
29794	220502_s_at	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 1	SLC13A1	0,00117662	13,1552
34381	225116_at	homeodomain interacting protein kinase 2	HIPK2	0,00119408	13,1141
7903	1565603_at	Periodic tryptophan protein 2 (PWP2)	PWP2	0,00122909	13,0335
32733	223448_x_at	mitochondrial ribosomal protein S22	MRPS22	0,0012566	12,9718
31955	222668_at	potassium channel tetramerisation domain containing 15	KCTD15	0,00127521	12,931
27944	218652_s_at	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class G	PIGG	0,00130095	12,8755
36764	227502_at	KIAA1147	KIAA1147	0,00133314	12,8078
16980	207531_at	crystallin, gamma C	CRYGC	0,00136373	12,745
23048	213740_s_at	hypothetical LOC399904	LOC399904	0,00140851	12,6559
41375	232113_at	---	---	0,00141552	12,6422
31380	222092_at	Protein-tyrosine-phosphatase D1	PTPN21	0,00147149	12,5356
37209	227947_at	phosphatase and actin regulator 2	PHACTR2	0,00147532	12,5284
43600	234342_at	---	---	0,00151453	12,4565
27632	218339_at	mitochondrial ribosomal protein L22	MRPL22	0,00151531	12,4551
42675	233416_at	---	---	0,00158218	12,337
833	1553401_at	MAS-related GPR, member X1	MRGPRX1	0,00163299	12,2508
39470	230208_at	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4	HCN4	0,00163647	12,245
46448	237191_x_at	---	---	0,00175425	12,0564
40697	231435_at	chromosome 7 open reading frame 34	C7orf34	0,0017586	12,0497
25346	216046_at	---	---	0,00176056	12,0467
49001	239744_at	---	---	0,0017692	12,0334
20656	211305_x_at	Fc fragment of IgA, receptor for	FCAR	0,00177138	12,0301
3478	1557155_a_at	CDNA clone IMAGE:5301781	FLJ30375	0,00180401	11,9808
39685	230423_at	---	---	0,0018165	11,9622
4637	1559149_at	---	---	0,00182136	11,9549
41830	232568_at	hypothetical protein MGC24103	MGC24103	0,00183021	11,9419
34380	225115_at	homeodomain interacting protein kinase 2	HIPK2	0,00184045	11,9268
28920	219628_at	zinc finger, matrin type 3	ZMAT3	0,00185204	11,9099
39464	230202_at	NF-kappa-B transcription factor p65 subunit	RELA	0,00187651	11,8746
13504	204049_s_at	phosphatase and actin regulator 2	PHACTR2	0,00190816	11,8296
48946	239689_at	---	---	0,00191193	11,8243
2633	1555856_s_at	---	---	0,00195361	11,7664
48585	239328_at	---	---	0,00196234	11,7544
40338	231076_at	chromosome 16 open reading frame 82	C16orf82	0,00197475	11,7375

Tabelle A3: Expressionsanalyse nach CD 1A (nur signifikante p- Werte < 0,05)

Column	Probeset ID	Gene Title	Gene Symbol	p-value(cd1a)	F(cd1a)
16204	206749_at	CD1b molecule	CD1B	5,89E-09	71,8391
25086	215784_at	CD1e molecule	CD1E	9,49E-09	68,3521
19733	210325_at	CD1a molecule	CD1A	2,74E-08	61,0541
18019	208592_s_at	CD1e molecule	CD1E	3,47E-08	59,5159
3348	1556945_a_at	Homo sapiens cDNA FLJ32992 fis, clone THYMU1000098 chr1:156710869-156731300	---	1,89E-07	49,2393
1587	1554453_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	HNRPLL	5,40E-07	43,4919
3347	1556944_at	Homo sapiens cDNA FLJ32992 fis, clone THYMU1000098 chr1:156710869-156731300	---	1,50E-06	38,3578
22705	213395_at	megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1	MLC1	3,30E-06	34,6484
22086	212772_s_at	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	ABCA2	6,79E-06	31,463
15184	205728_at	Part of 60s acidic Ribosomal protein 1 (RLP1) like gene		7,65E-06	30,948

## 11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfram Klapper möchte ich herzlich danken für die Vergabe des Themas und die wissenschaftliche Betreuung, sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und Untersuchungsguts.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Monika Szczepanowski, die mir die in meiner Arbeit angewandten molekularbiologischen Techniken beibrachte, mehrmalig meine Arbeiten durchsah und korrigierte und mir darüber hinaus in allen Hinsichten beratend und helfend zur Seite stand.

Ebenfalls besonders danken möchte ich Frau Charlotte Botz-von Drathen, die mir die Technik immunhistochemischer Färbungen beibrachte und mich mit vielerlei Ideen bei der Etablierung des Antikörpers unterstützte und beriet.

Frau Edda Sevecke-Wessel möchte ich für die zügige Bearbeitung und Bereitstellung der kryokonservierten Tumorproben danken.

Frau Itziar Salaverria danke ich für die kompetente Unterstützung im Umgang mit der Software, für die Durchführung und Auswertung, sowie die Visualisierung und Darstellung der Expressionsanalysen in Form der Heat Maps.

Frau Dr. Ilske Oschlies und PD Dr. Birgit Burkhardt möchte ich für die Bereitstellung der klinischen Daten und Verlaufsinformationen danken.

Außerdem danke ich Frau Monika Hauberg für die zusätzliche Hilfe bei der Erlernung der Grundtechniken der Immunhistochemie und Olivera Batic für den Umgang mit Zellkulturen, die ich für Probedurchläufe meiner ersten RNA-Isolation und In vitro Transkription nutzte.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des pathologischen Institutes Kiel, die auch im weiteren Sinne am Vorankommen meiner Dissertation beteiligt waren.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meiner Familie für ihren jahrelangen Rückhalt und die Unterstützung von der Entscheidung zu dieser Dissertation bis hin zu ihrer Fertigstellung ganz besonders danken.

## 12 Lebenslauf

Eva Niendorf

Auf der Höhe 79  
21339 Lüneburg  
Tel.: 0174-2170032

---

### Persönliche Daten

---

Geburtsdatum: 20. Februar 1984  
Geburtsort: Greifswald  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

---

### Schulbildung

---

07/1990-06/1996 *Käthe- Kollwitz Grund- und Realschule, Greifswald*  
07/1996 - 06/2003 *Friedrich- Ludwig- Jahn Gymnasium, Greifswald*  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

---

### Studium

---

03/2005 - 03/2007 Humanmedizin, Vorklinik *Justus- Liebig- Universität, Gießen*  
04/2007 - 05/2011 Humanmedizin, Klinik *Christian- Albrechts- Universität, Kiel*  
Abschluss: Staatsexamen

---

### Praktisches Jahr

---

02/2010 - 06/2010 Innere Medizin: *UK S-H, Campus Kiel*  
06/2010 - 10/2010 Chirurgie: *Westküstenklinikum Heide*  
10/2010 - 01/2011 Allgemeinmedizin: *akademische Lehrpraxis der Universität Kiel*

---

### Dissertation

---

Seit 2008 Experimentelle Dissertationsarbeit am *Institut für Pathologie, UK S-H, Campus Kiel* unter der Leitung von PD Dr. med. W. Klapper  
Thematik: T-Lymphoblastische Lymphome im Kindesalter

---

### Assistenzärztin

---

Seit 01/2012 Assistenzärztin für die Ausbildung zur Chirurgie im Common Trunk am Städtischen Klinikum Lüneburg