

AUS DEM INSTITUT FÜR PATHOLOGIE (DIREKTOR: PROF. DR. MED. C. RÖCKEN),  
SEKTION KINDERPATHOLOGIE (LEITER: PROF. DR. MED. I. LEUSCHNER)  
IM UNIVERSITÄTSKLINIKUM SCHLESWIG-HOLSTEIN, CAMPUS KIEL  
AN DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

**DIE EXPRESSION DER ANAPLASTISCHEN LYMPHOMKINASE  
IN AUSGEWÄHLTEN NEUROBLASTOMEN  
IN KORRELATION MIT DEM KLINISCHEN VERLAUF**

INAUGURALDISSERTATION  
ZUR  
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

VORGELEGT VON

**ANNKATRIN SUSAN BEYER**

AUS ECKERNFÖRDE

KIEL 2014

1. BERICHTERSTATTER: PROF. DR. MED. IVO LEUSCHNER  
2. BERICHTERSTATTER: PROF. DR. MED. HANS-JÜRGEN KLOMP  
TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 31. OKTOBER 2014  
ZUM DRUCK GENEHMIGT, KIEL DEN 31. OKTOBER 2014

GEZ.: PROF. DR. MED. WOLFRAM KLAPPER  
(VORSITZENDER DER PRÜFUNGSKOMMISSION)

# Zusammenfassung

## **DIE EXPRESSION DER ANAPLASTISCHEN LYMPHOMKINASE IN NEUROBLASTOMEN IN KORRELATION MIT DEM KLINISCHEN VERLAUF**

Annkatriin Susan Beyer, Eva Jüttner, Christian Vokuhl, Ivo Leuschner  
Institut für Pathologie, Sektion Kinderpathologie, Uniklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel

**Ziel:** Das Neuroblastom ist der häufigste maligne solide extrakranielle Kindertumor. Der Erkrankungsverlauf kann von Spontanregression bis zum letalen Ausgang variieren und ist bisher noch nicht immer sicher prognostizierbar. Unterschiedliche prognostisch relevante genetische Veränderungen sind für das Neuroblastom bereits bekannt, z.B. die NMYC Amplifikation. Neue prognostische Marker werden benötigt, um die Prognose bei Diagnosestellung bereits sicher bestimmen und die Therapie entsprechend wählen zu können. In den letzten Jahren rückte die Anaplastische Lymphomkinase (ALK) als ein potentieller prognostischer Marker in den Fokus des Interesses. In der folgenden Studie wurde ein Teil der Neuroblastome des Kindertumorregisters Kiel hinsichtlich einer ALK Expression untersucht und folgende Fragestellung beantwortet: Liegt einer Expression eine Amplifikation oder ein Bruch des ALK Genorts zugrunde? Der Expressions- und der Amplifikationstatus wurden mit dem klinischen Verlauf verglichen.

**Material und Methoden:** Es wurden 164 Neuroblastomfälle aller klinischen Stadien und histologischen Differenzierungsgrade untersucht. Die Expression der ALK wurde mittels immunhistochemischer Färbung ermittelt. Die Fallgruppe der ALK exprimierenden Tumoren sowie eine Negativkontrollgruppe wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf Amplifikation und Bruch im ALK Genlokus geprüft.

**Ergebnisse:** Eine Expression der Anaplastischen Lymphomkinase wurde in 10,7% der untersuchten Neuroblastome festgestellt. Das Expressionsniveau variierte stark. Amplifikationen im ALK Genlokus zeigten 12% der ALK exprimierenden Tumoren sowie 9% der Fälle der Negativkontrollgruppe. Ein Bruch im Genlokus wurde in keinem der Tumoren beobachtet. Im klinischen Verlauf zeigte sich für die ALK exprimierenden Tumoren lediglich eine leichte Tendenz zu einer erhöhten Rezidivrate und Mortalität. Das histologische Bild dieser Tumoren war vornehmlich geprägt von einem undifferenzierten Wachstumsmuster mit hohen Proliferationsraten, entsprechend dem eines aggressiven Phänotyps. Alle Neuroblastome mit ALK Amplifikation wiesen einen aggressiven Verlauf mit Tod binnen 5 Jahren auf.

**Zusammenfassung:** Eine Subgruppe der Neuroblastome exprimiert das Protein ALK. Unter den ALK exprimierenden Tumoren tritt eine Amplifikation im ALK Genlokus mit einer Frequenz von 12% auf. Gleichzeitig wurde in der Negativkontrollgruppe eine ALK Amplifikation nachgewiesen. Eine Amplifikation scheint somit nicht zwangsläufig mit einer Überexpression einherzugehen. Bezüglich des klinischen Verlaufs zeigt die ALK exprimierende Fallgruppe lediglich eine leicht erhöhte Rezidiv- und Letalitätsrate gegenüber der Kontrollgruppe ohne ALK Expression. Alle Neuroblastome mit ALK Amplifikation zeigten einen letalen Verlauf. Unter Betrachtung dieser Ergebnisse scheint die Genetik prognostisch relevanter zu sein als das Expressionsmuster.

# **Abstract**

## **THE EXPRESSION OF THE ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE IN NEUROBLASTOMA IN CORRELATION WITH THE CLINICAL COURSE**

Beyer AS, Jüttner E, Vokuhl C, Leuschner I

Department of Paediatric Pathology, University Hospital of Schleswig-Holstein,  
Campus Kiel, Germany

**Aims:** Neuroblastoma is the most frequent solid extracranial cancer of childhood. The clinical course ranges from spontaneous regression to death and is still not always predictable. For neuroblastoma different prognostically relevant genetic alterations are already known, e.g. the NMYC amplification. Yet new prognostic markers are necessary to improve the predictability of the clinical course and the choice of the best therapy. Recently, the detection of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) in neuroblastoma attracted attention. The following study evaluates the expression of ALK as well as structural and numeral ALK gene alterations in neuroblastoma and aims to answer the question: Is ALK expression based on ALK gene amplification or ALK gene translocation? The level of expression and genetic alterations will be compared with the clinical course.

**Methods:** 164 neuroblastoma from the registry of the Institute of Paediatric Pathology Kiel of all clinical stages and histological differentiation grades were assessed. The expression of ALK was determined by immunohistochemical staining. All ALK expressing tumors as well as a control group of non ALK expressing tumors were examined for amplification or translocation of the ALK gene locus using break-apart fluorescence-in-situ-hybridization (FISH).

**Results:** 10.7% of neuroblastoma showed ALK expression. The expression level varied widely. An amplification of the ALK gene locus was detected in 12% of ALK positive and 9% of ALK negative tumors. No translocation could be observed in any tumor. The clinical course in patients suffering from ALK expressing tumors was slightly more unfavourable with regard to recurrence and mortality. Those tumors showed an undifferentiating growth pattern with a lack of maturation and high proliferation rates, indicating an aggressive phenotype. Tumors harbouring an ALK amplification showed a mortality of 100% within 5 years, independent of ALK expression or coexistent NMYC amplification.

**Conclusion:** ALK expression was detected in 10,7% of neuroblastomas. Only a subgroup of neuroblastomas presenting ALK expression harbours an ALK gene amplification. In addition absent ALK expression could be shown in cases with ALK amplification. ALK amplification is not necessarily combined with ALK expression. While ALK expressing tumors were associated with only a slightly elevated risk for recurrence and mortality, all cases harbouring ALK amplification showed a lethal clinical course. Genetic ALK copy number alterations seem to be a more important prognostic marker than the ALK protein expression pattern.

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

**ZUSAMMENFASSUNG**

**ABSTRACT**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>4</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>5</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>6</b>

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
1.1 Das Neuroblastom .....	7
1.2 Einteilungen und Klassifikationen für das Neuroblastom .....	7
1.2.1 International Neuroblastoma Staging System (INSS).....	7
1.2.2 International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) .....	8
1.2.3 International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) .....	9
1.2.4 Der Mitosis-Karyorrhexisindex (MKI).....	11
1.2.5 Histologische Klassifikation des Neuroblastoms nach Hughes .....	11
1.3 Therapie des Neuroblastoms .....	12
1.4 Remissionskriterien des Neuroblastoms .....	12
1.5 Prognose und Langzeitüberlebensrate .....	13
1.6 Genetische Veränderungen der Tumorzellen im Neuroblastom .....	13
1.6.1 NMYC ( v-MYC myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived).....	13
1.6.2 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg .....	14
1.6.3 Anaplastische Lymphomkinase (ALK).....	14
1.6.4 Der JAK/STAT Signalweg.....	15
1.6.5 Die Anaplastische Lymphomkinase im Neuroblastom.....	16
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>19</b>
2.1 Patienten.....	19
2.2 Tumorgewebe.....	19
2.2.1 Tissue Microarray .....	19
2.2.2 Schnitthanfertigung von den Tissue Microarrays.....	20
2.2.3 Schnitthanfertigung von den Paraffinblöcken der zu untersuchenden Neuroblastome .....	20
2.3 Klinische Daten.....	20
2.4 Immunhistochemische Färbungen .....	20

2.4.1	Gewebevorbehandlung.....	20
2.4.2	Antikörperinkubation .....	21
2.4.3	Visualisierung der Antigen-Antikörper-Bindung.....	21
2.4.4	Verwendetes Protokoll: Histofine® Methode .....	24
2.4.5	Verwendete Produkte: Immunhistochemische Färbungen.....	25
2.4.6	Wiederholungsfärbungen am Leica BOND™ Vollautomaten .....	26
2.4.7	Verwendete Antikörper: Immunhistochemische Färbungen.....	26
<b>2.5</b>	<b>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....</b>	<b>27</b>
2.5.1	Grundlagen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	28
2.5.2	Protokoll der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	29
2.5.3	Verwendete Produkte: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	30
2.5.4	Verwendete Sonden: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	31
<b>2.6</b>	<b>Auswertungen.....</b>	<b>33</b>
2.6.1	Auswertung der Immunhistochemischen Färbung .....	33
2.6.2	Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	34
2.6.3	Statistische Auswertung .....	37
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Patienten.....</b>	<b>39</b>
3.1.1	Geschlechterverteilung und Alter: Gesamtkollektiv .....	39
3.1.2	Geschlechterverteilung und Alter: Fallgruppe mit ALK Expression .....	39
3.1.3	Geschlechterverteilung und Alter: Negativkontrollgruppe ohne ALK Expression.....	40
<b>3.2</b>	<b>Makroskopie .....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Tumorlokalisierung und Metastasierungsgrad bei Erstdiagnose: Fallgruppe mit ALK Expression.....	40
3.2.2	Tumorlokalisierung und Metastasierungsgrad bei Erstdiagnose: Negativkontrollgruppe ohne ALK Expression .....	40
<b>3.3</b>	<b>Histomorphologie.....</b>	<b>41</b>
3.3.1	Histomorphologie: Gesamtkollektiv .....	41
3.3.2	Histomorphologie: Fallgruppe mit ALK Expression .....	43
3.3.3	Histomorphologie: Negativkontrollgruppe ohne ALK Expression .....	43
<b>3.4</b>	<b>Immunhistochemie: Untersuchung auf ALK Expression .....</b>	<b>45</b>
3.4.1	Ergebnisse der IHC .....	45
3.4.2	Immunhistochemie: Algorithmus mit Ergebnissen.....	48
<b>3.5</b>	<b>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: Untersuchung auf ALK Amplifikation.....</b>	<b>49</b>
3.5.1	Ergebnisse der FISH: Fallgruppe mit ALK Expression.....	49
3.5.2	Ergebnisse der FISH: Negativkontrollgruppe ohne ALK Expression.....	49

3.5.3	Ergebnisse der FISH: Drei Fälle mit Amplifikation - Vergleich der ALK Amplifikationsrate mit der ALK Expression.....	50
3.6	NMYC Status in den untersuchten Neuroblastomen.....	53
3.7	Überlebensrate und klinischer Verlauf .....	54
3.7.1	Vergleich der Überlebensrate und des klinischen Verlaufs mit der ALK Expression .....	54
3.7.2	Vergleich der Überlebensrate und des klinischen Verlaufs mit der ALK Amplifikation.....	55
3.7.3	Vergleich der Letalität in Bezug auf ALK Amplifikation und ALK Expression .....	56
3.7.4	Vergleich des Einflusses von ALK und NMYC Amplifikation auf die Letalität .....	58
3.7.5	Analyse und Charakteristika der Neuroblastomfälle mit Amplifikation .....	59
3.8	Untersuchung der Signalwege .....	61
3.8.1	Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbung mittels Anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper .....	61
3.8.2	Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbung mittels Anti-pSTAT3-Antikörper.....	61
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>63</b>
4.1	Expression der Anaplastischen Lymphomkinase.....	63
4.1.1	Untersuchung des Einflusses der ALK Expression auf den klinischen Verlauf.....	65
4.1.2	Untersuchung auf Korrelation zwischen ALK Expression und Histologie.....	66
4.2	Amplifikation des ALK Gens .....	67
4.2.1	Koexistenz einer Amplifikation im ALK Gen und NMYC Gen.....	69
4.2.2	Untersuchung des Einflusses der ALK Genamplifikation auf den klinischen Verlauf unter Berücksichtigung des NMYC Genstatus .....	70
4.2.3	Einfluss von ALK und NMYC Genamplifikation auf die ALK Expression.....	71
4.3	Untersuchung der Signalwege Wnt/ $\beta$ -Catenin und JAK/STAT .....	72
4.3.1	Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg .....	72
4.3.2	JAK/STAT Signalweg .....	72
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>77</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>83</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>84</b>



# **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	International Neuroblastoma Staging System .....	8
Tabelle 2	International Neuroblastoma Risk Group Staging System .....	9
Tabelle 3	International Neuroblastoma Pathology Classification .....	9
Tabelle 4	Mitosis-Karyorrhesisindex .....	11
Tabelle 5	Histologische Klassifikation des Neuroblastoms nach Hughes.....	11
Tabelle 6	Remissionskriterien des Neuroblastoms .....	12
Tabelle 7	Prognose und Langzeitüberlebensrate .....	13
Tabelle 8	Verwendete Produkte: Immunhistochemische Färbungen .....	25
Tabelle 9	Verwendete Antikörper: Immunhistochemische Färbungen .....	27
Tabelle 10	Verwendete Produkte: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	30
Tabelle 11	Legende: Scores zur Beurteilung der Farbtintensität in der Immunhistochemie .....	34
Tabelle 12	Fluoreszenzmikroskop: verwendete Filter zur Auswertung.....	34
Tabelle 13	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: Auswertungskriterien .....	36
Tabelle 14	Vergleich von Geschlechterverteilung und Alter bei Erkrankung zwischen dem Gesamtkollektiv und den Tumoren mit ALK Expression .....	39
Tabelle 15	Lokalisation des Primärtumors .....	40
Tabelle 16	Prävalenz von Metastasen bei Erstdiagnose .....	40
Tabelle 17	Gesamtkollektiv: Einteilung nach der International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) .....	41
Tabelle 18	Gesamtkollektiv: Einteilung nach dem Mitosis-Karyorrhesisindex (MKI) .....	42
Tabelle 19	Gesamtkollektiv: Einteilung nach der Hughes Klassifikation.....	42
Tabelle 20	Charakteristika der mittels FISH untersuchten Neuroblastomfälle: INPC .....	44
Tabelle 21	Charakteristika der mittels FISH untersuchten Neuroblastomfälle: MKI .....	44
Tabelle 22	Charakteristika der mittels FISH untersuchten Neuroblastomfälle: Hughes Klassifikation .	44
Tabelle 23	Ergebnisse der Immunhistochemischen Untersuchung auf die Expression der ALK .....	45
Tabelle 24	Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	49
Tabelle 25	Amplifizierte Fälle: ALK Intensität und Amplifikationsgrad .....	50
Tabelle 26	Vergleich der ALK Expression mit dem NMYC und ALK Genstatus.....	53
Tabelle 27	Untersuchung der Neuroblastome mit ALK Amplifikation auf eine NMYC Amplifikation ....	53
Tabelle 28	Vergleich der Überlebensrate zwischen ALK pos und ALK neg Neuroblastomen.....	54
Tabelle 29	Vergleich des klinischen Verlaufs zwischen ALK pos und ALK neg Neuroblastomen.....	54
Tabelle 30	Kontingenztafel: ALK Expression und Langzeitüberleben nach 5 Jahren .....	55
Tabelle 31	Vergleich der Überlebensrate zwischen Neuroblastomen mit und ohne ALK Amplifikation	55
Tabelle 32	Vergleich des klinischen Verlaufs zwischen Neuroblastomen mit und ohne ALK Amplifikation .....	56
Tabelle 33	Kontingenztafel: ALK Amplifikation und Tod nach 5 Jahren .....	56
Tabelle 34	Vergleich der Letalität der Fälle mit und ohne ALK Expression in Abhängigkeit von der ALK Amplifikation .....	57

Tabelle 35 Letalität der Fälle mit und ohne ALK Amplifikation.....	57
Tabelle 36 Letalität der Fälle mit und ohne ALK Expression .....	57
Tabelle 37 Letalitätsanalyse anhand des Amplifikationsstatus im ALK und NMYC Gen.....	58
Tabelle 38 Letalitätsanalyse anhand des Amplifikationsstatus im ALK und NMYC Gen.....	59
Tabelle 39 Analyse und Charakteristika der Neuroblastomfälle mit Amplifikation .....	60

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 JAK/STAT-Signalweg.....	16
Abbildung 2 Prinzip der Immunhistofärbung nach der ABC-Methode .....	21
Abbildung 3 Prinzip der Immunhistofärbung nach Histofine®.....	22
Abbildung 4 Prinzip der Immunhistofärbung nach der EnVision™-Methode .....	23
Abbildung 5 Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	28
Abbildung 6 Prinzip der LSI ALK SpectrumOrange Sonde .....	32
Abbildung 7 Prinzip der LSI ALK Dual Color, Break-Apart Sonde .....	32
Abbildung 8 Beispielbild der LSI ALK Dual Color Break-Apart Sonde im FISH-Präparat.....	33
Abbildung 9 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: Auswertungs-Algorithmus .....	36
Abbildung 10 IHC Intensität 0.....	45
Abbildung 11 IHC Intensität 1.....	46
Abbildung 12 IHC Intensität 1,5.....	46
Abbildung 13 IHC Intensität 2.....	46
Abbildung 14 IHC Intensität 2,5.....	47
Abbildung 15 IHC Intensität 3.....	47
Abbildung 16 IHC Intensität 3.....	47
Abbildung 17 IHC Intensität 3.....	48
Abbildung 18 Immunhistochemie: Algorithmus mit Ergebnissen .....	48
Abbildung 19 FISH: Normalbefund.....	51
Abbildung 20 FISH Amplifikation Fall 1 .....	51
Abbildung 21 FISH Amplifikation Fall 2 .....	51
Abbildung 22 FISH Intratumorale Heterogenität .....	52
Abbildung 23 FISH Intratumorale Heterogenität .....	52
Abbildung 24 FISH Intratumorale Heterogenität .....	52

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ALCL	Anaplastic Large Cell Lymphoma
CGH	Comparative Genomic Hybridization
array CGH	Array Comparativ Genomic Hybridisation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
engl.	englisch
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothyocyanat
GPOH	Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	Heat Induced Epitop Retrieval
ICCC	International Classification of Childhood Cancer
IHC	Immunhistochemie
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
JAK	Janus Kinase
5 JÜR	5 Jahresüberlebensrate
LOH	Loss of Heterozygosity
MIBG	Metaiodbenzylguanidin
MKI	Mitosis-Karyorrhesisindex
mRNA	messenger Ribonucleotid Acid
MYC	myelocytomatosis oncogene
c-MYC	cellular myelocytomatosis oncogene
NMYC	neuroblastoma derived myelocytomatosis related oncogene
v-MYC	viral myelocytomatosis oncogene
NPM	Nucleophosmin
PIER	Proteolytic Induced Epitope Retrieval
rtPCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
pSTAT	phosphoryliertes STAT
TMA	Tissue Microarray
TRITC	Tetramethylrhodamineisothiocyanat
WT	Wildtype

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das Neuroblastom**

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle Tumor des Kindesalters.

Dieser embryonale Tumor des peripheren sympathischen Nervengewebes stellt nach den Hirntumoren den zweithäufigsten malignen, soliden Kindertumor dar. 8% aller Tumorerkrankungen und 15% aller tumorbedingter Todesfälle im Kindes- und Jugendalter entfallen auf das Neuroblastom (National Cancer Institut. Surveillance, Epidemiology and End Results Database).

Eine Neuroblastomerkrankung kann sehr variabel verlaufen.

Bei Säuglingen und Kleinkindern werden häufig Spontanregressionen oder Differenzierungen in gutartige Ganglioneuroblastome beobachtet. Hochmaligne Neuroblastome und bei Diagnose bereits disseminierte Neuroblastome des Kindes- und Jugendalters neigen hingegen zu einem stark progressiven Verlauf.

Obwohl für verschiedene Subtypen des Neuroblastoms in den vergangenen Jahrzehnten deutliche Verbesserungen der Überlebensraten beobachtet werden konnten, hat sich der Verlauf für Kinder mit einem hochmalignen Neuroblastomphänotyp nur leicht verbessert. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt 74,1%, gemittelt auf alle Altersgruppen (Quelle: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2008/res](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/res)).

Das Neuroblastom hat seinen Ursprung im sympathischen Nervengewebe der Neuralleiste. Tumoren können sich an allen Lokalisationen im Körper entwickeln, an denen sympathisches Nervengewebe vorliegt. Die Mehrheit der Tumoren (65%) tritt im Abdomen und Retroperitoneum auf, mindestens 50% von ihnen im Nebennierenmark. Hals, Thorax und Becken sind weitere häufige Orte der Tumorentstehung (Brodeur et al., 2006).

Die Symptomatik bei Erstdiagnose ist sehr variabel und abhängig von der Lokalisation des Tumors, dem Metastasierungsgrad und dem Auftreten von paraneoplastischen Syndromen.

## **1.2 Einteilungen und Klassifikationen für das Neuroblastom**

Verschiedene Staging Systeme und Klassifikationen ermöglichen die Einteilung von Neuroblastomen gemäß ihrer Klinik, ihrer Prognose und Histologie. Im Folgenden werden wichtige Staging Systeme und Klassifikationen vorgestellt.

### **1.2.1 International Neuroblastoma Staging System (INSS)**

Zur klinischen Einteilung wird das International Neuroblastoma Staging System (INSS) verwendet. Beurteilt wird die Art der Resektion (R0, R1, R2), der Lymphknotenbefall, die Ausdehnung über die Mittellinie und Fernmetastasierung.

Eine Sonderform ist das Stadium 4S. Hierzu zählen solide Primärtumoren mit Erstdiagnose im ersten Lebensjahr mit oder ohne auf Haut und Leber begrenzte Metastasierung oder minimaler Invasion des Knochenmarks. Die Prognose des Stadium 4S gilt als gut.

**Tabelle 1 International Neuroblastoma Staging System**

Stadium 1	<ul style="list-style-type: none"><li>• Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter Entfernung (mit oder ohne mikroskopischem Resttumor)</li><li>• repräsentative ipsi- und kontralaterale Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall; lediglich unmittelbar am Tumor adhärenente, chirurgisch entfernte Lymphknoten dürfen positiv sein</li><li>• auch bilaterale Tumoren, die makroskopisch komplett entfernt werden können und keinen regionalen Lymphknotenbefall aufweisen gehören zu Stadium 1</li></ul>
Stadium 2A	<ul style="list-style-type: none"><li>• unilateraler Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung</li><li>• repräsentative ipsi- oder kontralaterale (nicht am Tumor adhärenente) Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall</li></ul>
Stadium 2B	<ul style="list-style-type: none"><li>• unilateraler Tumor</li><li>• regionale, ipsilaterale, nichtadhärenente Lymphknoten zeigen Tumorbefall, kontralaterale Lymphknoten sind histologisch negativ</li></ul>
Stadium 3	<ul style="list-style-type: none"><li>• nicht resektabler unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie mit oder ohne Lymphknotenbefall oder</li><li>• unilateraler lokalisierter Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall oder</li><li>• nicht resektabler Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration oder durch Lymphknotenbefall</li><li>• (Das Überschreiten der Mittellinie ist definiert durch infiltratives Erreichen/Überschreiten der Wirbelkante der Gegenseite)</li></ul>
Stadium 4	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aussaat des Tumors in Knochenmark, Knochen, entfernten Lymphknoten, Leber, Haut und/oder andere Organe</li></ul>
Stadium 4S	<ul style="list-style-type: none"><li>• lokalisierter Primärtumor wie beim Stadium 1, 2A oder 2B und Aussaat nur in Leber, Haut und/ oder Knochenmark</li><li>• nur Säuglinge im 1. Lebensjahr</li><li>• die Knochenmarkinfiltration ist gering (weniger als 10% Tumorzellen im Ausstrich, MIBG-Szintigrafie für Knochenmark negativ)</li></ul>

Quelle: NB2004 Trial Protocol

### **1.2.2 International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS)**

Darüber hinaus existiert das International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS). Mithilfe bildgebender Verfahren werden präoperativ radiologische Charakteristika der Primärtumoren untersucht.

Die Risikostratifizierung des INRGSS betrachtet über die radiologischen Befunde hinaus das Alter (dichotomisiert auf Alter jünger oder älter als 18 Monate), NMYC Amplifikation, unbalancierte 11q Aberration und Polyploidie (Maris et al., 2007; Cohn et al., 2007).

**Tabelle 2 International Neuroblastoma Risk Group Staging System**

Stadium L1	Lokalisierter Tumor ohne Risikofaktoren in der Bildgebung
Stadium L2	Lokalisierter Tumor mit Risikofaktoren in der Bildgebung
Stadium M	Tumor mit Metastasierung
Stadium MS	Tumor mit Metastasierung, aber äquivalent zu Stadium 4S nach INSS

Quelle: NB2004 Trial Protocol

### 1.2.3 International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)

Die histopathologische Einteilung erfolgt nach der International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC). Die INPC ist eine Modifikation der vorher verwendeten Shimada Klassifikation. Beurteilt werden der Reifungsgrad der Neuroblasten, die Differenzierung zu Ganglienzellen sowie der Gehalt des Schwann'schen Stromas.

**Tabelle 3 International Neuroblastoma Pathology Classification**

Neuroblastom (stromaarm)	<u>Neuroblastom, undifferenziert</u>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>ergänzende Untersuchungen notwendig um Diagnose zu sichern (Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie und/oder Zytogenetik)</li> <li>Tumorzellen sind undifferenziert</li> </ul>
	<u>Neuroblastom, wenig differenziert</u>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>die meisten Tumorzellen sind undifferenziert</li> <li>nur <math>\leq 5\%</math> der Tumorzellpopulation hat zytomorphologische Merkmale der Differenzierung zu Ganglienzellen</li> <li>Neuropil vorhanden</li> <li><math>\leq 50\%</math> Schwannzellstroma</li> </ul>
	<u>Neuroblastom, differenzierend</u>
	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>\geq 5\%</math> der Tumorzellen hat zytomorphologische Merkmale der Differenzierung zu Ganglienzellen mit sichtbarem Nukleus (großer exzentrischer Nukleus mit Chromatinmuster und einem einzigen prominenten Nukleolus) und deutlichem, eosinophilen Zytoplasma</li> <li>Neuropil vorhanden</li> <li><math>\leq 50\%</math> Schwannzellstroma</li> </ul>

Ganglioneuroblastom, intermixed	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relation der ganglioneuromatösen Anteile zu den neuroblastischen Anteilen <math>\geq 50\%</math></li> <li>• mikroskopisch sichtbare Nester von Neuroblasten sind im ganglioneuromatösen Gewebe zufällig verteilt</li> <li>• diese Nester enthalten neuroblastische Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstufen, meist dominiert von differenzierenden Neuroblasten und reifenden Ganglienzellen</li> <li>• viel Neuropil vorhanden</li> </ul>
Ganglioneurom (überwiegend Stroma)	<p><u>Ganglioneurom, reifend</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• überwiegend ganglioneuromatöses Stroma</li> <li>• kleiner Anteil von verstreuten differenzierenden Neuroblasten oder reifenden Ganglienzellen, keine Nester</li> </ul> <p><u>Ganglioneurom, reif</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• reifes Schwanzzellstroma und Ganglienzellen</li> <li>• faszikuläres Profil von Neuritenfortsätzen, begleitend Schwanzzellen und perineuritische Zellen</li> </ul>
Ganglioneuroblastom, nodulär (kombiniert stromareich, stromadominant und stromaarm)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorhandensein von makroskopischen, normalerweise hämorrhagischen neuroblastischen Nestern (stromaarmer Anteil) und Ganglioneuroblastom, intermixed (stromareiche Komponente) oder Ganglioneurom (stromadominante Komponente)</li> <li>• beide Anteile sind scharf voneinander abgegrenzt</li> <li>• Verhältnis stromareiche/dominante zu neuroblastischer Komponente ist für Diagnose unbedeutend</li> <li>• stromareiche/dominante Komponente ist häufig in der Peripherie des Tumors gelegen, kann als dünne Septen erscheinen</li> <li>• ist der Tumor ein Ganglioneuroblastom, intermixed oder ein Ganglioneurom und es liegt eine Lymphknotenmetastase mit Neuroblastomgewebe vor, ist dieser Fall als Ganglioneuroblastom, nodulär atypisch einzustufen</li> </ul>
Neuroblastom nicht klassifizierbar	
Neuroblastom, NOS (not otherwise classified)	
Ganglioneuroblastom, NOS	

Quelle: NB2004 Trial Protocol

#### 1.2.4 Der Mitosis-Karyorrhesisindex (MKI)

Der Mitosis-Karyorrhesisindex (MKI) wird für alle Neuroblastome, Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome bestimmt. Er gibt unter anderem Auskunft über die Proliferationsaktivität der Tumorzellen.

**Tabelle 4 Mitosis-Karyorrhesisindex**

MKI	Proliferationsaktivität
niedrig	< 2% (< 100/5000) Zellen in Mitose oder Karyorrhesis
intermediär	2-4% (100-200/5000) Zellen in Mitose oder Karyorrhesis
hoch	> 4% (> 200/5000) Zellen in Mitose oder Karyorrhesis

Quelle: NB2004 Trial Protocol

#### 1.2.5 Histologische Klassifikation des Neuroblastoms nach Hughes

In der Hughes Klassifikation wird der Reifungsgrad der Tumorzellen beurteilt.

**Tabelle 5 Histologische Klassifikation des Neuroblastoms nach Hughes**

Malignitätsgrad	Histologisches Bild
G1	<u>Ganglioneuroblastom</u>
G1a	· Diffuses Ganglioneuroblastom: diffuse Mischung von unreifen, ausreifenden und reifen Zellelementen
G1b	· Ganglioneuroblastom vom Kompositionstyp: Ganglioneurom mit wechselnden Arealen undifferenzierten Neuroblastomgewebes (abrupter Übergang zwischen beiden Tumorkomponenten)
G2	<u>Neuroblastom</u>
	· Mischbild aus undifferenzierten Zellen und mindestens einigen Zellen mit partieller Differenzierung in Ganglienzellen (vesikuläre Kerne mit erkennbaren Nukleolus, Zytoplasma-Kern-Relation angestiegen, zytoplasmatische Fortsätze)
G3	<u>Neuroblastom</u>
	· undifferenziertes, klein- und rundzelliges Tumorgewebe

Quelle: NB2004 Trial Protocol



### 1.3 Therapie des Neuroblastoms

Die Therapie des Neuroblastoms in Deutschland erfolgt nach dem Studienprotokoll der Neuroblastomstudie NB 2004 der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie in Deutschland unter der Leitung von Prof. Dr. Berthold in Köln.

Die Behandlung erfolgt für die INSS-Stadien 1-3 und 4S risikoadaptiert. Angewandt werden die operative Therapie, die Chemotherapie, die Radiotherapie und die autologe Stammzelltransplantation. Bei Patienten ohne bedrohliche Symptomatik wird nach genauer Diagnostik und Stadieneinteilung gegebenenfalls vorerst abgewartet, sogenannte Beobachtungspatienten (Studienprotokoll, NB 2004).

### 1.4 Remissionskriterien des Neuroblastoms

Es werden die Internationalen Remissionskriterien verwendet. Primärtumor und Metastasen sind allerdings getrennt zu beurteilen.

**Tabelle 6 Remissionskriterien des Neuroblastoms**

Remission	Primärtumor	Metastasen
Vollremission (CR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>kein Tumor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>keine Metastasen</li> <li>Katecholamine normal</li> </ul>
Sehr gute Teilremission (VGPR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>verkleinert um 90-99%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>keine Metastasen</li> <li>Katecholamine normal</li> <li>Skelett-Szintigramm darf noch positiv sein</li> </ul>
Teilremission (PR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tumor und alle messbaren Metastasen um &gt; 50% verkleinert</li> <li>Zahl der Knochenläsionen um mehr als 50% vermindert</li> <li>maximal 1 tumorzellhaltiges Knochenmarkaspirat oder Biopsie</li> </ul>	
Gemischte Remission (MR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>keine neuen Tumorherde</li> <li>teils mehr als 50%, teils weniger als 50% Verkleinerung des Primärtumor oder der Metastasen</li> <li>weniger als 25% Zunahme eines Tumorherdes</li> </ul>	
Keine Remission (NR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>keine neuen Tumorherde</li> <li>weniger als 50% Abnahme, jedoch weniger als 25% Zunahme eines Tumorherdes</li> </ul>	
Progression (PROG)	<ul style="list-style-type: none"> <li>jeder neue Tumorherd</li> <li>mehr als 25% Zunahme eines Tumorherdes</li> <li>vorher negatives Knochenmark jetzt tumorzellhaltig</li> </ul>	

Quelle: NB2004 Trial Protocol

## 1.5 Prognose und Langzeitüberlebensrate

Die International Classification of Childhood Cancer (ICCC) hat für die Tumorentität Neuroblastom und Ganglioneuroblastom folgende 5-Jahresüberlebensraten (5 JÜR) zwischen 2001-2007 ermittelt und nach Altersgruppen getrennt veröffentlicht. Die angegebene 5 JÜR beinhaltet Neuroblastome aller Stadien. Besonders gut ist die Prognose bei Erstdiagnose im Neugeborenen- und Säuglingsalter: nach 5 Jahren leben noch 92% der Patienten. Tritt ein Neuroblastom im Alter von 5-9 Jahren auf, beträgt die 5 JÜR nur noch 49,9%.

Die 5-Jahresüberlebensrate für alle Altersgruppen liegt bei 74,1%. Jedes vierte Kind erliegt also innerhalb der ersten fünf Krankheitsjahre dem Neuroblastom.

**Tabelle 7 Prognose und Langzeitüberlebensrate**

Diagnosealter in Jahren	< 1	1-4	5-9	10-14	15-19	0-14	0-19
5-Jahresüberlebensrate	92%	68,5%	49,9%	59,9%	-	74,2%	74,1%

Quelle: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2008/res](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/res)

## 1.6 Genetische Veränderungen der Tumorzellen im Neuroblastom

Bisher sind einige molekularpathologische Veränderungen innerhalb der neuroblastischen Tumorzellen bekannt. Die häufigsten genetischen Veränderungen sind Amplifikationen des Protoonkogens NMYC, Deletionen eines Teilstücks der Chromosomen 1p und 11q, Zugewinn an Chromosom 17q und Triploidie. Vor kurzem wurde entdeckt, dass im Genlokus der Anaplastischen Lymphomkinase (ALK) eine Amplifikation vorhanden sein kann (Carén et al., 2008).

### 1.6.1 NMYC ( v-MYC myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived)

MYC ist ein Protein, das innerhalb der Zelle vielseitige Funktionen besitzt. Als Transkriptionsfaktor nimmt es auf zelluläre Prozesse Einfluss. Besonders Zellteilung, Zellwachstum und Zelltod werden von MYC reguliert (Grandori et al., 2000). Somit ist MYC ein Protoonkogen. Der Genort befindet sich auf Chromosom 2p24.3 (OMIM<sup>®</sup>, 164840). Wird MYC beispielsweise durch Transaktivierung dauerhaft aktiviert, wird es zum Onkogen. Dies kann eine Entartung und Tumorgenese nach sich ziehen (Cole und McMahon, 1999).

1983 beschrieben Kohl et al. erstmals die Amplifikation eines Gens der MYC-Familie im Neuroblastom und nannten es NMYC. NMYC wird physiologisch in neuronalen Zellen exprimiert und reguliert dort Zellteilung, Differenzierung und Apoptose. Eine vermehrte Genaktivierung kann die Entstehung von Neuroblastomen bedingen. Neuroblastome mit NMYC Amplifikation zählen zu den high-risk Neuroblastomen, die sich durch einen aggressiven Verlauf mit schlechtem Langzeitüberleben trotz intensiver Therapie charakterisieren (Matthay et al., 1999).

Jedoch zeigen nicht alle high-risk Neuroblastome eine NMYC Amplifikation. Für diejenigen ohne NMYC Amplifikation gibt es bisher keine eindeutig geklärte Ursache, auf die sich der aggressive Phänotyp zurückführen lässt (Liu et al., 2007).

Fehlgesteuerte Signalkaskaden und Entwicklungsprozesse werden in Erwägung gezogen. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, z.B. Notch, Sonic hedgehog und Wnt/ $\beta$ -Catenin zur malignen Entartung in unterschiedlichen Geweben beiträgt (Taipale und Beachy, 2001; Allenspach et al., 2002; Lee et al., 2004).

### **1.6.2 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg**

$\beta$ -Catenin ist ein Mediator im Wnt-Signalweg. Dieser Signalweg ist beteiligt an der Entstehung von malignen Tumoren, z.B. dem kolorektalen Karzinom. Eine übermäßige Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs wurde in verschiedenen embryonalen Tumoren und Malignomen der Neuralleiste festgestellt (Giles et al., 2003). Liu et al. (2007) konnten zeigen, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg bei der Entstehung von high-risk Neuroblastomen ohne NMYC Amplifikation einen potentiellen Verursacher darstellt. In den entsprechenden Tumoren wurden eine erhöhte  $\beta$ -Catenin Expression und eine anormale nukleäre Lokalisation beobachtet. Eine  $\beta$ -Catenin spezifische Mutation konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Der genaue Mechanismus, durch den der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg in Neuroblastomen aktiviert ist, bleibt unklar.

Dass dieser Signalweg zur Tumorgenese des Neuroblastoms beitragen könnte, ist von hoher klinischer Relevanz, da bereits Therapieansätze entwickelt werden, die diesen Signalweg beeinflussen (Moon et al., 2004).

Im nicht aktivierten Zustand liegt  $\beta$ -Catenin im Zytosol als Komplex mit anderen Proteinen vor. Innerhalb dieser Komplexstruktur ist  $\beta$ -Catenin gut zugänglich und die Phosphorylierung erleichtert. Wird  $\beta$ -Catenin phosphoryliert, ist es zum Abbau im Proteasom verurteilt (Goss und Groden, 2000).

Bei physiologischer Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs hingegen wird die Phosphorylierung verhindert und die Proteinstruktur ist stabiler.  $\beta$ -Catenin wandert in den Zellkern, wo es mit einem weiteren Protein als Heterodimer an die DNA bindet. Dort reguliert  $\beta$ -Catenin die Transkription seiner Zielgene. Ein Zielgen ist MYC (He et al., 1998).

Eine aktivierende Mutation innerhalb des  $\beta$ -Catenin Signalwegs würde zu einer Anreicherung von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und Zellkern führen. Mittels immunhistochemischer Färbung auf  $\beta$ -Catenin wären verstärkte Signal in den beiden Zellkompartimenten sichtbar.

Ebenfalls nachweisbar wären erhöhte Expressionslevel der Zielgene, z.B. MYC.

### **1.6.3 Anaplastische Lymphomkinase (ALK)**

Die ALK (OMIM<sup>®</sup>, 105590) ist eine Rezeptortyrosinkinase, die vornehmlich im Nervengewebe vorkommt. Ihr kodierender Genort befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p23.2) (Morris et al., 1994). Die Anaplastische Lymphomkinase wird vor allem während der Neurogenese in der Fetal- und Neonatalperiode exprimiert und beeinflusst die Entwicklung des Nervensystems. Durch chromosomale Translokation, Inversionen oder Mutationen im ALK Genlokus selbst oder mit Einfluss

auf denselben kann es jedoch auch zu späteren Zeitpunkten zu einer vermehrten Expression und/oder Aktivierung des ALK Proteins kommen.

Onkogene ALK Fusionsproteine, die wachstumsfaktorunabhängig zur konstitutiven Aktivierung der ALK führen, wurden im großzellig anaplastischen Lymphom (Morris et al., 1994), in inflammatorischen myofibroblastischen Tumoren (Griffin et al., 1999), Plattenepithelkarzinomen (Jazii et al., 2006) und im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Soda et al., 2007; Rikova et al 2007) nachgewiesen.

#### **1.6.3.1 Die ALK im großzelligen anaplastischen Lymphom**

Entdeckt wurde die ALK als Teil des Fusionsgens NPM(Nucleophosmin)-ALK, welches aus der Translokation t(2;5) (p23;q35) resultiert und im großzelligen anaplastischen Lymphom (Anaplastic Large Cell Lymphoma, ALCL) nachgewiesen wurde (Morris et al., 1994).

Im NPM-ALK Fusionsprotein, auch p80 genannt, ist der Aminoterminus des Nucleophosmins an die katalytische Domäne der ALK gekoppelt (Morris et al., 1994). Wachstumsfaktorunabhängig liegt NPM-ALK konstitutiv phosphoryliert vor und vermittelt durch Aktivierung intrazellulärer Signalwege, u.a. über das Molekül STAT3, die maligne Transformation von Zellen (Zamo et al., 2002). In den Tumorzellen ist phosphoryliertes STAT3 (pSTAT) vermehrt nachweisbar.

Für das großzellig anaplastische Lymphom wurde dieser Signalweg, der durch NPM-ALK aktiviert, mittels pSTAT vermittelt und zur malignen Transformation führt, bereits entschlüsselt. Für das Neuroblastom ist der Wirkmechanismus der ALK noch nicht eindeutig geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob im Neuroblastom das intrazelluläre Signalmolekül STAT vermehrt phosphoryliert vorliegt und somit Hinweis über den Wirkmechanismus der ALK im Neuroblastom gibt.

#### **1.6.4 Der JAK/STAT Signalweg**

Verschiedenste Mediatoren vermitteln ihre Wirkung über den JAK/STAT Signalweg, beispielsweise Zytokine, z.B. die Interleukine 2 bis 7, und Wachstumsfaktoren, z.B. GM-CSF.

Bindet ein Ligand an die extrazelluläre Domäne des JAK Rezeptors, so fusionieren zwei JAK Moleküle zu einem Dimer. Intrazellulär findet eine Transphosphorylierung statt. Infolge dessen werden am Dimer Bindungsstellen für STAT Proteine freigelegt. STAT steht als Abkürzung für „Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription“. Am JAK Rezeptor werden die STAT Moleküle phosphoryliert, wodurch sie zur Dimerisierung und Translokation in den Zellkern befähigt werden. Dort binden die pSTAT Proteine an die DNA, wo sie die Transkription bestimmter Gene induzieren.

Diejenigen Liganden, die über den JAK/STAT Weg wirken, führen in erster Linie zur Proliferation. Eine aktivierende Mutation, die zur Autophosphorylierung der JAK oder STAT führt, kann für ein Gewebe verheerende Wirkung haben; ebenso die vermehrte Sekretion autokrin/parakrin wirkender Substanzen, die diesen Signaltransduktionsweg aktivieren. Vergleichbar mit JAK agiert die Rezeptortyrosinkinase ALK. Ligandenbindung führt zur Dimerisierung und Transphosphorylierung. Unterschiedliche Second Messenger werden hieraufhin aktiviert, u.a. STAT.

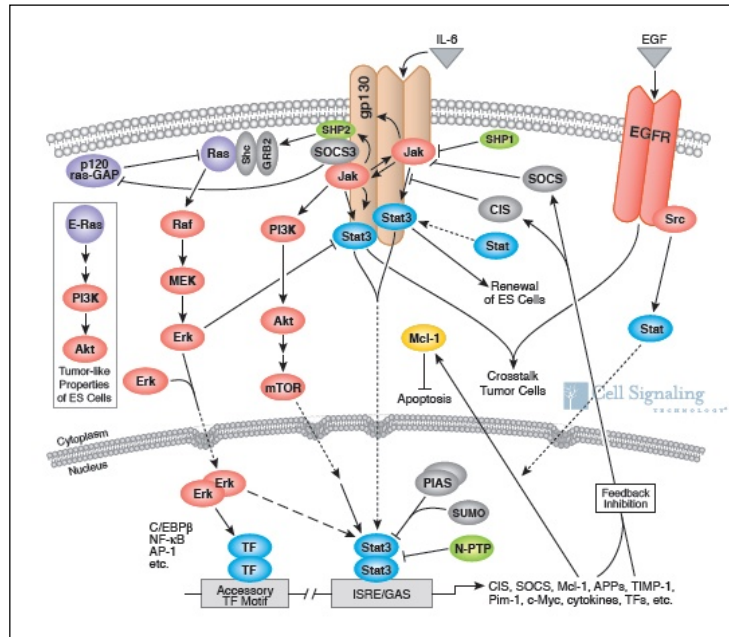


Abbildung 1 JAK/STAT-Signalweg

Quelle: <http://www.cellsignal.com/services/images/multi-pathway/JAK/STAT.jpg>  
mit freundlicher Genehmigung von Cell Signaling Technology

### 1.6.5 Die Anaplastische Lymphomkinase im Neuroblastom

2008 wurden Veränderungen im ALK Gen in Neuroblastomen beschrieben.

Mossé et al. (2008) identifizierten durch Untersuchung 8 familiärer Neuroblastomfälle drei unterschiedliche Keimzellmutationen des ALK Gens. Die Mutationen befinden sich in dem für die Tyrosinkinasedomäne des ALK Proteins codierenden DNA-Abschnitt. Das Vererbungsmuster wurde als autosomal-dominant mit inkompletter Penetranz beschrieben.

Darüber hinaus ergab die Sequenzierung von 194 primären Neuroblastomen, dass 12,4% der Tumoren unterschiedliche potentiell onkogene, somatisch erworbene Mutationen in der kritischen Kinasedomäne tragen. Die Mutationen führten zur konstitutiven Phosphorylierung und somit Aktivierung der ALK. Gezielte Inhibition der ALK mRNA mittels siRNA zeigte eine deutliche Proliferationsinhibition in den betroffenen Zelllinien.

Janoueix-Lerosey et al. (2008) führten eine genomweite CGH Analyse in einem Kollektiv von 592 Neuroblastomen durch. Es fanden sich wiederholt partiell erhöhte Kopiezahlen des Chromosoms 2p. Auf 2p liegen die Loci des NMYC Gens (2p24) und des ALK Gens (2p23). In einem Fall zeigte sich eine ausschließlich auf den ALK Locus begrenzte Amplifikation, wodurch die Vermutung entstand, dass die Anaplastische Lymphomkinase per se zur Entstehung des Neuroblastoms führen kann.

In weiteren Untersuchungen stellten sich die Hotspots F1174L und R1175Q als häufigste Orte von Punktmutationen im ALK Gen heraus.

In familiären Neuroblastomen wurden Keimzellmutationen des ALK Gens nachgewiesen, sodass sich die Vermutung, dass ALK ein Prädispositionsgen für das Neuroblastom sei, erhärtete.

Wie Mossé et al. (2008) konnten auch Janoueix-Lerosey et al. (2008) feststellen, dass mutierte ALK Proteine überexprimiert und hyperphosphoryliert, besonders F1174L und R1175Q Mutationen, vorliegen sowie konstitutive Kinaseaktivität zeigten. Die Inhibition der ALK Expression in ALK mutierten Zellen als auch in Zellen mit Überexpression der Wildtype-ALK zeigte eine deutliche Reduktion der Zellproliferation.

Diese Ergebnisse von 2008 identifizieren ALK als ein kritisches Element in der Entstehung des Neuroblastoms. Die ALK bietet eine interessante therapeutische Zielstruktur dieser oftmals noch fatal verlaufenden Tumorerkrankung.

#### **1.6.5.1 Häufigkeiten der genetischen Veränderungen des ALK Gens im Neuroblastom**

Laut des Artikels „Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene“ (Mossé et al., 2008) liegen in 8,4% der untersuchten Neuroblastome aktivierende Punktmutationen vor. In 22,9% der Neuroblastome ließen sich partielle Trisomien des Chromosomenarms 2p inklusive des ALK Genorts und in 3,3% Amplifikationen des ALK Genorts nachweisen. Fast alle Amplifikationen gingen mit einer NMYC Amplifikation und/oder anderen Regionen auf 2p einher.

#### **1.6.5.2 Verdacht der Korrelation der Anzahl der ALK Genkopien mit dem klinischen Verlauf**

Eine anormale Anzahl von ALK Genkopien (Zugewinn oder Amplifikation) scheint mit einer stark erhöhten ALK Expression und einem besonders aggressiven klinischen Verlauf korreliert zu sein (Schulte et al., 2011).

#### **1.6.5.3 Notwendigkeit weiterer Forschung**

Um in Zukunft die Überlebenschancen der am Neuroblastom erkrankten Kinder zu verbessern, ist eine weitere Forschung an den auslösenden Faktoren und somit potentiellen therapeutischen Angriffspunkten unerlässlich. In dieser Arbeit soll daher ein Teil der Neuroblastome des Kindertumorregisters der GPOH an der Universitätsklinik Kiel untersucht werden.

Ziel der Arbeit ist es, die Expression der Anaplastischen Lymphomkinase in einer großen Zahl von Neuroblastomen zu bestimmen und zu ermitteln, ob einer Überexpression der ALK eine Amplifikation oder ein Bruch des ALK Genorts zugrunde liegt. Der Expressionsstatus und der Amplifikationsstatus sollen mit dem klinischen Verlauf verglichen werden.

Ergänzend sollen die Signalmoleküle  $\beta$ -Catenin und pSTAT betrachtet werden: Liegt im Neuroblastom so wie im anaplastisch großzelligen Lymphom (ALCL) das intrazelluläre Signalmolekül STAT vermehrt phosphoryliert vor und gibt somit Hinweis über den Wirkmechanismus der ALK im Neuroblastom?

Das Expressionsmuster des  $\beta$ -Catenins soll erfasst werden. Kann die Hypothese von Lui et al. (2008) gestützt werden, dass der  $\beta$ -Cateninweg für die Tumorgenese der nicht NMYC amplifizierten high-risk Neuroblastome verantwortlich ist?



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Es wurden 164 Neuroblastome des Kindesalters untersucht.

Das Tumormaterial stammt aus dem Archiv des Kindertumorregisters der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). Die verwendeten Neuroblastome wurden zwischen 1990 und 2000 diagnostiziert.

Aus 164 formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Neuroblastomgewebsblöcken wurden zwei Tissue Microarrays (TMA) erstellt.

Ein Tissue Microarray ist ein Paraffinblock, der viele ausgestanzte Gewebezylinder enthält. Werden Schnitte des TMA angefertigt, können an diesen bei nur einmaliger Applikation eines Antikörpers zahlreiche Gewebeproben untersucht werden.

Am TMA wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem Anti-ALK Antikörper durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Polarisationsmikroskop.

Von 22 Fällen, die eine immunhistochemische Anfärbbarkeit zeigten, wurden die Paraffinblöcke aus dem Archiv der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie herausgesucht und Schnitte angefertigt. An diesen Schnitten wurde die immunhistochemische Färbung mit dem Anti-ALK Antikörper wiederholt. Anhand der immunhistochemisch gefärbten Einzelschnitte wurde die Intensität der zytoplasmatischen immunhistochemischen Anfärbbarkeit semiquantitativ bewertet. Fünf Fälle wurden als nicht eindeutig positiv eingestuft und deshalb aus der folgenden Untersuchung ausgeschlossen. Diejenigen 17 Fälle mit eindeutiger zytoplasmatischer Anfärbbarkeit wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Amplifikation und Bruch im ALK Genort untersucht.

Als Negativkontrolle wurden 11 Fälle, die keine immunhistochemische Anfärbbarkeit des Zytoplasmas aufwiesen, randomisiert ausgewählt und mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung untersucht.

Zur Untersuchung auf Störungen im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg und JAK/STAT-Signalweg wurden an allen 164 Neuroblastomen immunhistochemische Färbungen mit Anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper und Anti-Phospho-STAT3-Antikörper durchgeführt.

Die bereits erfolgte histologische Einteilung der 164 Neuroblastome entsprechend der Hughes Klassifikation und des MKI wurde auf Korrektheit überprüft. Die Tumoren wurden entsprechend der International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) eingestuft.

### **2.2 Tumorgewebe**

#### **2.2.1 Tissue Microarray**

Angefertigt wurden zwei TMA-Blöcke aus 164 zu untersuchenden Neuroblastomfällen. Von jedem Fall wurden aus dem Paraffinblock drei Gewebszylinder herausgestanzt und in den TMA-Block eingebracht. Der Durchmesser der einzelnen Gewebezylinder beträgt 0,6 mm.



### **2.2.2 Schnitthanfertigung von den Tissue Microarrays**

Von den Tissue Microarrays wurden am Rotationsmikrotom (Leica RM 2145, Wetzlar) Schnitte von 2-3 µm Dicke hergestellt und auf SuperFrost®Plus-Objektträger (Fa. Menzel GmbH & Co, Braunschweig) aufgezogen.

### **2.2.3 Schnitthanfertigung von den Paraffinblöcken der zu untersuchenden Neuroblastome**

Von den Paraffinblöcken wurden am Rotationsmikrotom (Leica RM 2145, Wetzlar) jeweils 5 Schnitte von 2-3 µm Dicke hergestellt und auf SuperFrost®Plus-Objektträger (Fa. Menzel GmbH & Co, Braunschweig) aufgezogen. Diese Schnitte wurden in der Folge für die immunhistochemische Färbung und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendet.

Hämatoxylin-Eosin (HE) Schnitte der zu untersuchenden Neuroblastome waren bereits im Rahmen der Erstdiagnose der Tumoren angefertigt worden. Diese wurden für die Überprüfung der Hughes-Klassifikation und des MKI sowie der Bestimmung INPC verwendet.

## **2.3 Klinische Daten**

Die Neuroblastomstudie zur risikoadaptierten Behandlung von Kindern mit Neuroblastom der GPOH verwaltet die klinischen Daten aller Patienten. Sie stellte uns die klinischen Angaben über die in dieser Arbeit untersuchten Patienten bereit.

## **2.4 Immunhistochemische Färbungen**

Eine immunhistochemische Färbung setzt sich aus drei Teilprozessen zusammen: Gewebepreparierung, Antikörperinkubation und Visualisierung der Reaktion. Diese drei Schritte werden im Folgenden erläutert.

### **2.4.1 Gewebepreparierung**

Zuerst werden die Schnittpräparate entparaffiniert und dehydriert. Durch die Formalinfixierung kann es im fixierten Gewebe durch Proteinquervernetzung zur Maskierung der Antigene (engl. Crosslinking) gekommen sein. Um die Antigene zu demaskieren (engl. antigen retrieval), stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

Bei der Hitzebehandlung (engl. „heat induced epitope retrieval“ (HIER)) werden die Schnitte in einem vorgewärmten Puffer, z.B. TEC-Kochpuffer (s.u. Verwendetes Protokoll Histofine® Methode) erhitzt und anschließend langsam abgekühlt. Bei der proteolytischen Behandlung (engl. „proteolytic induced epitope retrieval“ (PIER)) werden durch Vorbehandlung mit einer Proteinase, z.B. Proteinase K, Trypsin oder Pepsin, die Proteinvernetzungen angehaut und die Epitope freigelegt.

In dieser Arbeit wurde die Hitzebehandlung angewandt.

Abhängig von der geplanten Visualisierung der Antikörper-Antigenbindung sind „Blockierschritte“ notwendig, um eine spätere unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Blockiert werden die

endogene Peroxidase (Histofine® und EnVision™ Methode) oder endogenes Biotin (ABC-Methode). Andere unspezifische Proteininteraktionen können ebenfalls reduziert werden.

### **2.4.2 Antikörperinkubation**

Die Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur und Antikörperkonzentration sind voneinander abhängig. Inkubiert wird beispielsweise bei 4°Celsius über Nacht, bei Raumtemperatur für 120 Minuten oder bei 37°Celsius für 30 Minuten.

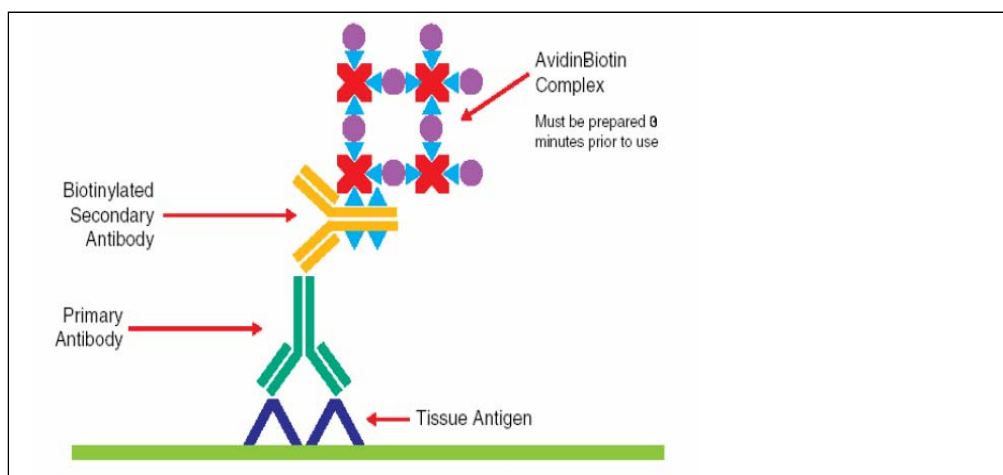
### **2.4.3 Visualisierung der Antigen-Antikörper-Bindung**

#### **2.4.3.1 Grundlagen der Immunhistofärbung nach ABC**

Grundlage der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode ist die hohe Affinität von Avidin bzw. Streptavidin gegenüber dem Vitamin Biotin (Hsu et al., 1981).

Sowohl Avidin (Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß) als auch Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*) verfügen über 4 Bindungsstellen für Biotin. Biotin wiederum ist leicht mit Antikörpern und Enzymen konjugierbar.

Bei der ABC-Methode ist der Fc-Teil des sekundären Antikörpers mit Biotin versetzt. Der biotinylierte Sekundärantikörper wirkt als Brückenglied zwischen dem an das Gewebsantigen gebundenen Primärantikörper und dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, s. Abbildung 2. Bei Zugabe eines geeigneten chromogenen Substrates reagiert die Peroxidase mit diesem Komplex und generiert eine Anfärbung, wodurch indirekt das gesuchte Antigen dargestellt wird.



**Abbildung 2 Prinzip der Immunhistofärbung nach der ABC-Methode**

Quelle: [http://pri.dako.com/08002\\_25may06\\_ihc\\_guide\\_book.pdf](http://pri.dako.com/08002_25may06_ihc_guide_book.pdf)  
mit freundlicher Genehmigung der Fa. DAKO

#### **2.4.3.2 Grundlagen der Immunhistofärbung nach Histofine®**

Bei Histofine® handelt es sich um ein polymerbasiertes Zwei-Schritt-Verfahren

Ein verdünnter primärer Kaninchen- oder Mausantikörper wird auf das Gewebe gegeben und bindet an das Antigen. Im zweiten Schritt wird ein Polymer aus Aminosäuren, Peroxidase-Molekülen und Antikörpern, die auf die Fab'-Fragmenten reduziert sind, aufgetragen, s. Abbildung 3. Bei Zugabe eines geeigneten Chromogens kommt es zu einer verstärkten Anfärbung am Ort des Antigens.

Vorteil dieser Methode ist die Vermeidung einer unspezifischen Hintergrundfärbung durch endogenes Biotin. Ein Nachteil hingegen ist die Molekülgröße des sekundären Antikörper-Aminosäure-Peroxidase-Komplexes. Eine sterischen Behinderung am Bindungsort ist möglich.

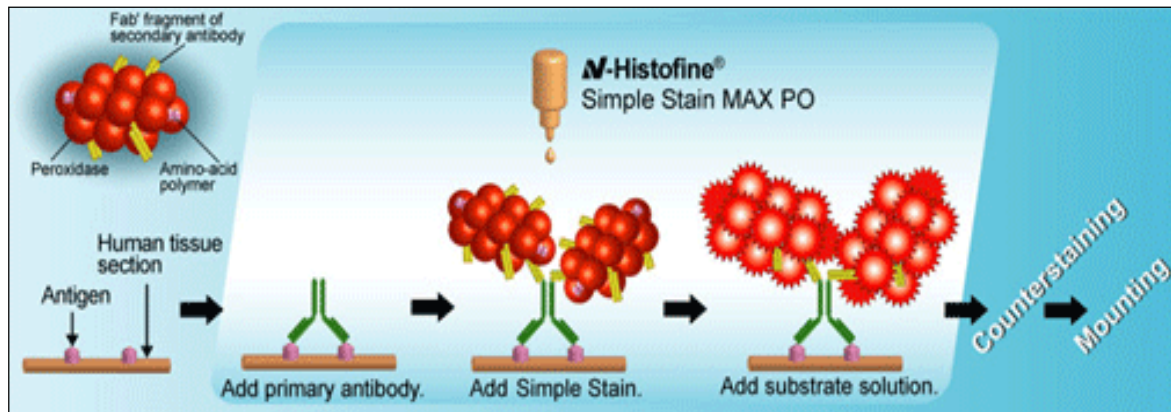


Abbildung 3 Prinzip der Immunhistofärbung nach Histofine®

Quelle: <http://www.cosmobiousa.com/141histofine.html>  
mit freundlicher Genehmigung der Fa. Nichirei Biosciences Inc., Tokio

### 2.4.3.3 Grundlage der Immunhistofärbung nach EnVision™

Die EnVision™ Methode beschreibt ebenso wie Histofine® ein polymerbasiertes Zwei-Schritt-Verfahren.

Der sekundäre Antikörper ist mit einem Dextrangerüst bestückt, das wiederum zahlreichen Peroxidaseenzyme trägt, s. Abbildung 4. Bei Zugabe eines geeigneten Chromogens tritt eine verstärkte Anfärbung am Ort des Antigens auf.

Vor- und Nachteile entsprechen denen der Histofine® Methode.

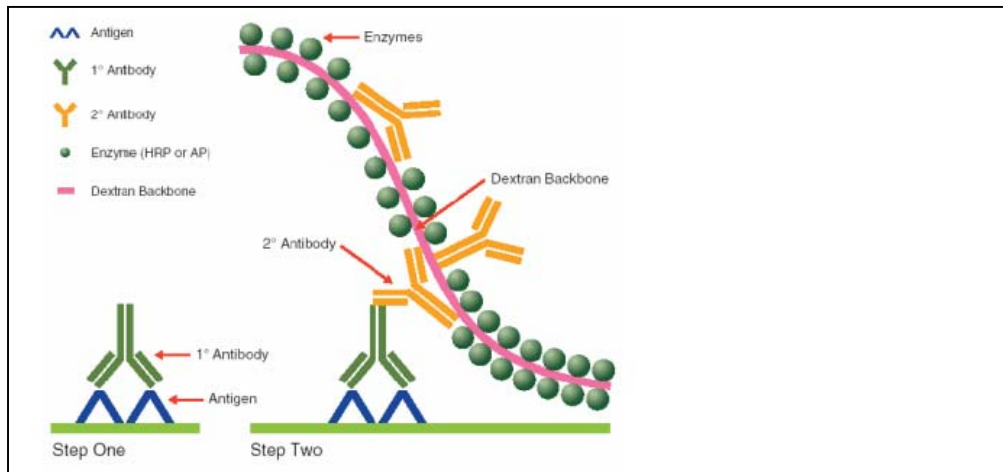


Abbildung 4 Prinzip der Immunhistofärbung nach der EnVision™-Methode

Quelle: [http://pri.dako.com/08002\\_25may06\\_ihc\\_guide\\_book.pdf](http://pri.dako.com/08002_25may06_ihc_guide_book.pdf)  
mit freundlicher Genehmigung der Fa. DAKO

In dieser Arbeit wurden die immunhistochemische Färbung mittels der Histofine® Methode durchgeführt.

#### **2.4.4 Verwendetes Protokoll: Histofine® Methode**

- Vorbereitung der Schnitte:
- Entparaffinieren: 2x 15 Minuten Eintauchen in Xylol
- Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (je 2x100%, 96%, 70%)
- Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser (Aqua dest.)
- Antigenhitzedemaskierung mittels HIER: Erhitzung im Dampfkochtopf mit 1l-TEC-Kochpuffer (pH 7,8) für 3 Minuten auf höchster Stufe (Stammlösung 10fach konzentriert: 2,5g TRIS-Base, 5g EDTA, 3,2g Tri-Na-Citrat-Dihydrat, einstellen mit NaOH auf 1l Aqua dest., pH 6)
- Abkühlung bei Raumtemperatur
- Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser (Aqua dest.)
- Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe vom Aqua dest. bis 96% Ethanol
- Blockierung der endogenen Peroxidase: Inkubation im Methanolbad mit 2%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Anteil für 15 Minuten (4ml Wasserstoffperoxid (30%) in 200ml Methanol)
- Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe vom 96% Ethanol bis zum Aqua dest.
- Spülung im TRIS-Waschpuffer (9g TRIS-Base, 68,5g TRIS-HCl, NaCl auf 10l Aqua dest., pH 7,2-7,4)
- Färbung:
- Inkubation mit dem verdünnten Primär-Antikörper
- Auftragen von entweder a), b) oder c), je nach Färbung
- 2 Tropfen ALK/p80-Antikörper (verdünnt mit Lab Vision Antibody Diluent im Verhältnis 1:100) pro Präparat
- 2 Tropfen  $\beta$ -Catenin-Antikörper (verdünnt im Verhältnis 1:200)
- 2 Tropfen Phospho-STAT3-Antikörper (verdünnt im Verhältnis 1:100)
- Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Spülen mit dem TRIS-Waschpuffer 3x
- Überschüssigen Waschpuffer um die Schnitte mit einem saugfähigen Tuch entfernen
- Applikation des sekundären Antikörpers: 2 Tropfen (je nach Gewebegröße) HISTOFINE® (universelles Immun-Peroxidase Polymer, Anti-Maus und –Kaninchen) für 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Spülen mit dem TRIS-Waschpuffer 3x
- Überschüssigen Waschpuffer um die Schnitte mit einem saugfähigen Tuch entfernen
- Zugabe des Chromogen-/Substrat-Reagenzes: Inkubation mit 3'3 Diaminobenzidin (DAB Substrate Kit for Peroxidase) (je Schnitt: 125  $\mu$ l Aqua dest., 2,5  $\mu$ l Puffer, 2,5  $\mu$ l DAB, 2,5  $\mu$ l Hydrogen-Peroxidase) für 15 Minuten bei Raumtemperatur
- Waschen mit Aqua dest.
- Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (Fa. Merck)
- Spülen mit Aqua dest.
- Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe bis zum Xylol
- Eindeckelung mit Pertex

## 2.4.5 Verwendete Produkte: Immunhistochemische Färbungen

**Tabelle 8 Verwendete Produkte: Immunhistochemische Färbungen**

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer (Cat. No.)</b>
Xylol	Fa. Merck, Darmstadt	1086812500
Ethanol	Fa. Roth, Karlsruhe	5054.2
Dampfdrucktopf	Fa. Silit, Riedlingen	
EDTA	Fa. Merck, Darmstadt	1.08418.1000
Tri-Natrium Citrat	Fa. Merck, Darmstadt	1.06448.1000
Wasserstoffperoxid	Fa. Merck, Darmstadt	1.07210.0250
Methanol	Fa. J.T. Baker, Deventer (Niederlande)	1022310024
Natriumchlorid	Fa. J.T. Baker, Deventer (Niederlande)	0831003029
TRIS-Base (Trizma Base)	Fa. Sigma, St. Louis (USA)	T1503-KG
TRIS-HCl	Fa. Sigma, St. Louis (USA)	T3253-1KG
ALK/p80-Antikörper	Neomarkers, Fremont (USA)	RM-9108-S
β-Catenin-Antikörper	Zymed Laboratories, San Francisco (USA)	[X] 18-0226
Phospho-STAT3-Antikörper	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)	#9145
Hama Elisa	Fa. Medac, Wedel	VIR DIL
N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)	Fa. Nichirei Biosciences, Tokio (Japan)	414152F
DAB Substrate Kit for Peroxidase	Fa. Vector, Burlingame (USA)	SK-4100
Mayers-Hämalaun	Fa. Merck, Darmstadt	1.09249.0500
Pertex	Fa. Medite, Burgdorf	40000
Microscope Cover Glasses 24x50mm	Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig	BB024050A1
Axioskop (Polarisationsmikroskop)	Fa. Zeiss, Jena	
analySIS Image Processing	Fa. I-CUBE, Glen Burnie (USA)	

#### **2.4.6 Wiederholungsfärbungen am Leica BOND™ Vollautomaten**

Nachdem alle Präparate bereits mittels Histofine® gefärbt wurden, fanden einige Wiederholungsfärbungen statt. Zu diesem Zeitpunkt war in der Abteilung Immunhistochemie, Pathologie Kiel auf immunhistochemische Färbung mittels Leica BOND™ Vollautomaten (Fa. Leica) umgestellt worden. Die Wiederholungsfärbungen wurden am Leica BOND™ Vollautomat entsprechend dem Herstellerprotokoll und den Herstellersubstanzen durchgeführt. Der Leica BOND™ Vollautomat (Fa. Leica) verwendet die Methoden der HIER (engl. „heat induced epitop retrieval“) zur Antigendemaskierung und die Histofine® Immunfärbung.

Als Antikörper wurde ALK/p80 (Fa. Neomarkers Fremont, USA) verwendet.

#### **2.4.7 Verwendete Antikörper: Immunhistochemische Färbungen**

##### **2.4.7.1 Antikörper gegen ALK/p80**

Der monoklonale Kaninchenantikörper ALK/p80 richtet sich gegen die ALK und das NPM-ALK Fusionsprotein, p80 genannt. Die Anfärbung wird je nach Lokalisation des Zielproteins intrazytoplasmatisch und ggf. nukleär erwartet.

##### **2.4.7.2 Antikörper gegen $\beta$ -Catenin**

Der monoklonale Anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper ist gegen das Protoonkoprotein  $\beta$ -Catenin gerichtet. Dieser Antikörper stammt aus dem Aszites von Mäusen.

$\beta$ -Catenin wirkt als Signalmolekül im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg und beeinflusst die Regulation der Zellteilung, Zellreifung und Tumorgenese.

In gesunden Zellen ist der  $\beta$ -Catenin-Gehalt in Zytoplasma und Zellkern gleichbleibend niedrig. Eine physiologische Akkumulation von  $\beta$ -Catenin lässt sich nur membrannah feststellen.

In Tumorzellen, die eine  $\beta$ -Catenin-Genmutation beherbergen, akkumuliert das  $\beta$ -Catenin im Intrazellulärraum (Tadjine et al., 2008).

##### **2.4.7.3 Antikörper gegen pSTAT3**

Der monoklonale Anti-Phospho-STAT3-Antikörper des Kaninchens richtet sich gegen phosphoryliertes STAT3 Protein.

Eine konstitutive Phosphorylierung des STAT Proteins mit onkogener, anti-apoptotischer Wirkung wurde für einige Tumoren bereits beschrieben. (Catlett-Falcone et al., 1999; Garcia et al., 1998; Bromberg et al., 1999).

Eine immunhistochemische Anfärbung wird intrazytoplasmatisch und intranukleär erwartet.

**Tabelle 9 Verwendete Antikörper: Immunhistochemische Färbungen**

<u>Antikörper</u>	<u>ALK/p80</u>	<u>β-Catenin</u>	<u>Phospho-STAT3</u>
Firma	Neomarkers, Fremont, USA	Zymed Laboratories, San Francisco, USA	Cell Signaling Technology Inc. , Danvers USA
Spezies	Kaninchen	Maus	Kaninchen
Klon	SP8 monoklonal	CAT-5H 10 monoklonal	D3A7 monoklonal
Vorbehandlung	ER1 = pH6 Citrat	ER1 = pH6 Citrat	ER1 = pH6 Citrat
Verdünnung	01:25	1:300	1:100
Methode	Histofine®, Bondmax (Vollautomat Firma Leica)	Histofine®	Histofine®
Positivkontrolle	ALCL	Mamma (nicht neurales Epithelgewebe)	Tonsille

## 2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine molekularbiologische Methode, mittels derer Nucleinsäuren, sowohl DNA als auch RNA, dargestellt werden können. Hierzu wird eine Sonde aus mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Nucleinsäuren erzeugt und auf das zu untersuchende Gewebe gegeben. Die Sonde hybridisiert „in situ“, d.h. direkt im Gewebe, mittels Basenpaarung an die gewünschte Zielstruktur, s. Abbildung 5. An der entsprechenden Stelle des Präparates erscheint eine fluoreszenzmikroskopisch nachweisbare Markierung.

Grundsätzlich sind zwei Zielstrukturen der FISH-Sonden zu unterscheiden: die chromosomenspezifische Zentromerregion und spezifische Genloci.

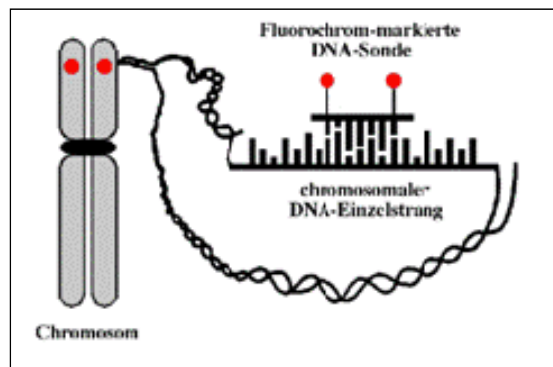
Chromosomenspezifische Zentromersonden, die zentromernah an repetitive DNA-Sequenzen binden, ermöglichen die Identifikation von Chromosomen und geben Aufschluss über ihre Kopiezahl.

Mittels lokusspezifischer Sonden lassen sich strukturelle Veränderungen identifizieren: Duplikationen, Amplifikationen, Deletionen und Translokationen.

Eine Untergruppe der lokusspezifischen Sonden stellen die Break-Apart(Bruch)-Sonden dar. Eine Break-Apart-Sonde besteht aus zwei lokusspezifischen Sonden, deren Zielstrukturen in direkter Nachbarschaft liegen. Mittels Break-Apart-Sonden können chromosomale Rearrangements (Translokation, Inversion, Deletion, Duplikation) nachgewiesen werden. Liegen im untersuchten Gewebe beide Genloci benachbart, erscheinen die Sondensignale direkt nebeneinander. Besteht



zwischen den beiden Zielstrukturen ein Bruch (Break-Apart), befinden die beiden Signale voneinander getrennt.



**Abbildung 5 Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Quelle: [http://www.kompetenznetzleukaemie.de/content/aerzte/diagnostik/zytogenetik/techniken/molekularzytogenetik/index\\_ger.html](http://www.kompetenznetzleukaemie.de/content/aerzte/diagnostik/zytogenetik/techniken/molekularzytogenetik/index_ger.html)  
mit freundlicher Genehmigung des Kompetenznetzwerkes Leukämien

### **2.5.1 Grundlagen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung setzt sich aus drei Schritten zusammen: erstens Gewebepreparation, zweitens Sondenanwendung und Hybridisierung, drittens Waschvorgänge und DAPI-Gegenfärbung. Im Folgenden werden diese Schritte erklärt. Alle Schritte wurden entsprechend dem unten genannten Protokoll durchgeführt.

#### **2.5.1.1 Gewebepreparation**

Im ersten Schritt werden die Präparate entparaffiniert und rehydriert. Um die durch die Paraffinierung entstandenen Proteinquervernetzungen zu lösen und die Zielstrukturen besser zugänglich zu machen, werden die Präparate in der Mikrowelle erhitzt und mit einer Proteinase angedaut.

#### **2.5.1.2 Sondenanwendung und Hybridisierung**

Die Verwendung der lichtempfindlichen fluoreszenzmarkierten Sonden (Vysis LSI ALK Dual Color, Break-Apart Rearrangement Probe (Break-Apart-Sonde) und CEP2 Chromosome Enumeration DNA FISH Probe (Zentromersonde)) erfolgt im Dunkeln. Nach Auftragen der Sonden werden die Gewebeschnitte mit Deckgläsern bedeckt. Die Fixierung der Deckgläser erfolgt mit Rubber Cement. Während der Hybridisierungsdauer von 48 Stunden inkubieren die Präparate bei 37°C.

#### **2.5.1.3 Waschvorgänge und Gegenfärbung mit DAPI**

Weiterhin wird im Dunkeln gearbeitet. An der Unterseite des Objektträgers wird das hybridisierte Gewebe mit einem Securline Marker II umrandet, Fixogum und Deckgläser werden vorsichtig entfernt. Die hybridisierten Präparate werden mit Standard Saline Citrat (Waschpuffer) gewaschen. Anschließend trocknen die Präparate bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zuletzt wird auf die trockenen Präparate DAPI Medium (VECTASHIELD® mounting medium with DAPI) aufgetragen und sie werden mit Deckgläsern bedeckt.

Zur Aufbewahrung werden die Präparate im Dunkeln bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### **2.5.2 Protokoll der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

- Gewebevorbereitung:
- Entparaffinieren: 2x15 Minuten Eintauchen in Xylol
- Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (2x Ethanol 100% für 5 Minuten, 1x Ethanol 96% für 5 Minuten, 1x Ethanol 70% für 5 Minuten, 1x Aqua dest. für 5 Minuten)
- Antigendemaskierung mittels HIER: Erhitzung in der Mikrowelle auf höchster Stufe mit Citratpuffer (pH6) für 20 Minuten (Ansatz für Citratpuffer s.u.)
- Antigendemaskierung mittels PIER: Inkubation in 100ml 0,1molarer HCl-Lösung mit 10µl Proteinase K (Fermentas) mit bei 37°C im Wasserbad
- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (2x Spülen mit Aqua dest. für 5 Minuten, 1x Ethanol 70% für 5 Minuten, 1x Ethanol 96% für 5 Minuten, 3x Ethanol 100% für 5 Minuten)
- Schnitte lufttrocknen lassen
- Sondenanwendung und Hybridisierung:
- Auftragen der nach Angaben des Herstellers verdünnten Abbott Vysis Sonden (7µl Hybridisierungspuffer, 1 µl Sonde, 2 µl Aqua dest.)
- Präparate mit Deckgläsern bedecken
- Deckgläser mit Fixogum auf dem Objektträger fixieren
- Fixogum erstarren lassen: Inkubation für 10 Minuten bei 37°C
- Aufschmelzen der Sonden: Inkubation für 10 Minuten bei 95°C
- Hybridisierung der Sonden: Inkubation bei 37°C für 48 Stunden
- Waschvorgänge und Gegenfärbung mit DAPI
- Gewebelokalstation an der Unterseite des Objektträgers markieren
- Entfernung des Fixogums und der Deckgläser
- Auswaschen überschüssiger Sonde aus dem Gewebe mittels Inkubation in SSC
- 2x SSC (2fach konzentriert) bei Raumtemperatur für je 1 Minute
- 1x SSC (2fach konzentriert) bei 72°C für eine Minute
- 2x SSC (0,5fach konzentriert) bei 72°C für je eine Minute
- 2x SSC (2fach konzentriert) bei Raumtemperatur für 1 Minute
- 2x in deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur für je 1 Minute
- Luftrocknung der Präparate im Dunkeln
- Auftragen von VECTASHIELD® mounting medium with DAPI
- Deckgläser auflegen
- Lagerung im Kühlschrank bei 4°C

### 2.5.3 Verwendete Produkte: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

**Tabelle 10 Verwendete Produkte: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

<u>Verwendete Reagenzien und Produkte</u>	<u>Firma</u>	<u>Bestellnummer (Cat. No.)</u>
Xylol	Fa. Merck, Darmstadt	1.08681.2500
Ethanol	Fa. Roth, Karlsruhe	5054.2
Citronensäure-Monohydrat	Fa. Merck, Darmstadt	1.00244.1000
EDTA Tritriplex®	Fa. Merck, Darmstadt	1.08418.1000
Natronlauge TitriPUR®	Fa. Merck, Darmstadt	1.09136.1000
Mikrowelle Sharp R7180	Fa. Sharp, Mahwah (USA)	
Proteinase K	Fa. Fermentas, St. Leon- Rot	E 00492
CEP2 (α-Satellite) Spectrum Orange	Fa. Abbott Inc., Des Plaines (USA)	32-130002
Vysis LSI ALK Dual Color, Break-Apart Rearrangement Probe	Fa. Abbott Inc., Des Plaines (USA)	32-190069
Hybridisierungspuffer	Fa. Abbott Inc., Des Plaines (USA)	06J67-011
Microscope Cover Glasses 18x18mm	Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig	BB018018A1
Fixogum Rubber Cement	Fa. Marabu, Tamm	290110000
Hybridisierungsschlitten: Molecular ThermoBrite StatSpin™	Fa. Abbott Inc., Des Plaines (USA)	
Ultra Pure™ 20X SSC	Fa. Invitrogen	15557-036
Vectashield® Mounting Medium with DAPI	Fa. Vector, Burlingame	H-1200
Microscope Cover Glasses 25x50mm	Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig	BB024050A1
Immersionsöl für die Mikroskopie	Fa. Merck, Darmstadt	3824 90 97
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging	Fa. Zeiss, Jena	
Objektiv 100x/1.4 oil Plan-Apochromat	Fa. Zeiss, Jena	

<u>Verwendete Reagenzien und Produkte</u>	<u>Firma</u>	<u>Bestellnummer (Cat. No.)</u>
Mikroskopleuchte: Microscope Illuminating System HBO100	Fa. Zeiss, Jena	
Vorschaltgerät ebq 100 isolated für Quecksilberleuchten	Fa. Zeiss, Jena	
Computer	TSP IT Systems	
Desktop	Fujitsu Siemens	
Software VisiView 1.7.2.	Fa. Visitron Systems, Puchheim	
Kühlschrank Premium no-frost	Fa. Liebherr	
Aufnahmeschrank für Wasservollentsalzungs- patronen: Aqua purification G7749	Fa. Miele	
Patrone für Deionisierung des Wassers	Fa. Walter, Augsburg	

### **2.5.3.1 Citratpuffer**

Der verwendete Citratpuffer wird folgendermaßen hergestellt:

Ansatz für einen Liter Citratpuffer: 2,1 Citronensäure-Monohydrat und 0,1g EDTA werden in 850ml Aqua dest. gelöst. Mittels 2 molarer Natronlauge(NaOH)-Lösung wird pH6 eingestellt. Anschließend wird der Puffer mit Aqua dest. auf einen Liter aufgefüllt.

### **2.5.4 Verwendete Sonden: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

#### **2.5.4.1 Vysis LSI ALK Dual Color, Break-Apart Rearrangement Probe**

Die Vysis LSI ALK Dual Color, Break-Apart Rearrangement Probe der Firma Abbott Molecular Inc., Des Plaines (USA) bindet an Chromosom 2p23, s. Abbildung 6. In dieser Region befindet sich der Genlocus der Anaplastischen Lymphomkinase. Dieser besteht aus 29 Exons und beinhaltet ~749kb. Das ALK Gen codiert für eine extrazelluläre Domäne, eine transmembranäre Domäne, eine Tyrosin-Kinase-Domäne und eine C-terminale intrazytoplasmatische Domäne (Iwahara et al., 1997).

Ausgehend von der im anaplastisch großzelligen Lymphom (ALCL) häufig beobachteten Translokation t(2;5)(p23;q35) wurde entdeckt, dass innerhalb des ALK Genlocus 2p23 eine Bruchneigung besteht. Die genomischen Bruchpunkte befinden sich fast ausnahmslos in demjenigen Intron, das von den Exons 16 und 17 flankiert wird. Die Exons 17-26 codieren für die intrazytoplasmatische Domäne von ALK. (Ladanyi et al., 1996). Um chromosomale Veränderungen, die mit einem Bruch im ALK Gen einhergehen, ermitteln zu können, werden Break-Apart-Sonden verwendet.

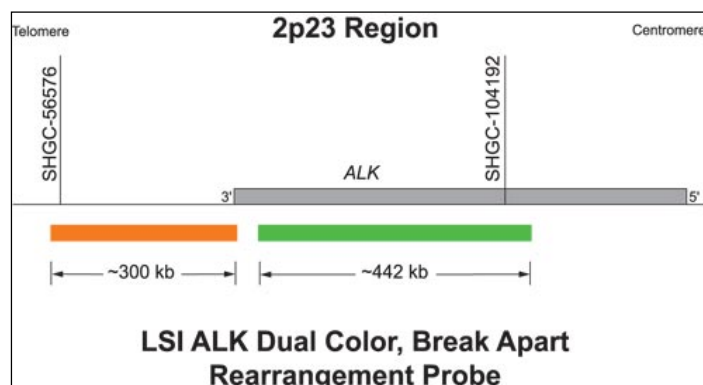
Die Vysis LSI ALK Dual Color, Break-Apart Rearrangement Probe setzt sich aus zwei Sonden zusammen. Eine etwa 300kb lange Sonde bindet telomerwärts der Bruchneigungsstelle und ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff SpectrumOrange versehen. Zentromerwärts der Bruchneigungsstelle hybridisiert eine etwa 442kb lange, mit SpectrumGreen markierte Sonde, s. Abbildung 7.

Nach erfolgter Hybridisierung sind am intakten ALK Gen ein orangefarbenes und ein grünes Signal direkt nebeneinander, oder fusioniert zu einem gelben Signal detektierbar, s. Abbildung 8. Im Falle eines Bruchs innerhalb des ALK Genlokus liegen beiden Signale voneinander getrennt (Product Description. Abbott Moleculars Inc., Des Plaines, USA). Die Sonde stellt den ALK Locus sowohl in Inter- als auch in Metaphasezellkernen dar.



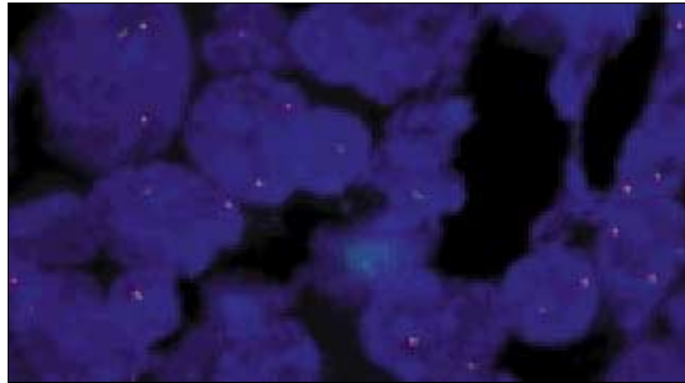
**Abbildung 6 Prinzip der LSI ALK SpectrumOrange Sonde**

Quelle: <http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagents/fish/vysis-lsi-probes.html>  
 Permission requested bei der Firma Abbott



**Abbildung 7 Prinzip der LSI ALK Dual Color, Break-Apart Sonde**

Quelle: <http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagents/fish/vysis-lsi-probes.html>  
 Permission requested bei der Firma Abbott



**Abbildung 8 Beispielbild der LSI ALK Dual Color Break-Apart Sonde im FISH-Präparat**

Quelle: <http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagents/fish/vysis-lsi-probes.html>  
Permission requested bei der Firma Abbott

#### **2.5.4.2 CEP-2 ( $\alpha$ -Satellite) SpectrumOrange**

Die Sonde CEP-2 ( $\alpha$ -Satellite) SpectrumOrange der Firma Abbott Molecular Inc., Des Plaines (USA) hybridisiert an die für Chromosom 2 spezifische  $\alpha$ -Satellitensequenz 2p11.1-q11.1. Die Sonde fluoresziert in orange. Angewendet werden kann die Sonde in Interphase- und Metaphasenucleoli. Abhängig vom Zellzyklus und DNA Kondensationszustand kann das Signal gelegentlich gespalten vorkommen.

In der Folge wird die CEP-2 ( $\alpha$ -Satellite) SpectrumOrange Sonde als CEP2-Sonde bezeichnet.

## **2.6 Auswertungen**

### **2.6.1 Auswertung der Immunhistochemischen Färbung**

Die immunhistochemisch gefärbten Präparate werden am Lichtmikroskop Sm-Lux, Fa. Leitz Wetzlar ausgewertet. Hierfür werden die Präparate meanderförmig durchgesehen. Die Intensität der intrazytoplasmatischen Färbung der Tumorzellen wird semiquantitativ bewertet und in einem Score vermerkt, s. Tabelle 11.

Die in der Immunhistochemie positiven Fälle sowie die Fälle der Negativkontrolle werden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung weiteruntersucht.

**Tabelle 11 Legende: Scores zur Beurteilung der Farbintensität in der Immunhistochemie**

<u>Färbescore</u>	<u>Farbintensität innerhalb der Tumorzellen</u>
3	sehr stark positiv
2,5	stark bis sehr stark positiv
2	stark positiv
1,5	positiv
1	schwach positiv
0,5	fraglich positiv
0	alle Zellen negativ

### **2.6.2 Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Mithilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung soll festgestellt werden, ob in den ALK positiven Neuroblastomfällen am ALK Genlokus eine Amplifikation oder ein Bruch vorliegt. Die Auswertung der FISH-Präparate erfolgt am Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Fa. Zeiss, Jena). Die Präparate werden bei 100facher Vergrößerung (Objektiv 100x/1.4 oil Plan-Apochromat) beurteilt. Verwendet werden die Filter DAPI, FITC und TRITC, s. Tabelle 12.

Mittels des DAPI-Filters sind Aussagen über die Zellkernmorphologie möglich. Anhand des FITC (Fluoresceinisothiocyanat) -Filters werden die SpectrumGreen Signale detektiert, anhand des TRITC (Tetramethylrhodamineisothiocyanat) -Filters die SpectrumOrange Signale. Es werden jeweils 100 Zellen in 2 bis 4 Gesichtsfeldern bewertet.

**Tabelle 12 Fluoreszenzmikroskop: verwendete Filter zur Auswertung**

<u>Filter</u>	<u>Wellenlänge in nm</u>	
	Anregung	Emission
DAPI	358	463
FITC	495	517
TRITC	550	573

Quelle: Herstellerangaben Fa. Zeiss

### **2.6.2.1 Auswertung FISH: CEP2-Sonde**

Präparate mit CEP2-Sonde werden unter Verwendung des DAPI- und des TRITC-Filter beurteilt. Hierzu wird zuerst anhand des DAPI-Filters eine Region im Präparat ausgewählt, in der die Tumorzellen möglichst überlappungsfrei vorliegen und die Zellkerngrenzen sichtbar sind. Anschließend wird auf den TRITC-Filter umgestellt und innerhalb von 100 Zellen werden die CEP2 Centromer Signale gezählt. Die Anzahl der CEP2-Signale pro Zelle entspricht der Anzahl der Chromosomen 2 pro Zelle. Diese wird benötigt, um bei Abweichungen der Genkopiezahl des ALK Gens eine Polyploidie/Polysomie von einer Amplifikation unterscheiden zu können.

Liegt eine erhöhte Anzahl von ALK Genkopien bei Euploidie vor, handelt es sich um eine Amplifikation. Sind sowohl Anzahl der Chromosom 2-Zentromere als auch der ALK Genkopien erhöht, liegt eine Polyploidie oder Polysomie vor.

### **2.6.2.2 Auswertung FISH: Vysis LSI ALK Dual Color Sonde**

Präparate mit Vysis LSI ALK Dual Color, Break-Apart Rearrangement Probe werden mit dem DAPI-, FITC und TRITC-Filter beurteilt. Hierzu wird zuerst anhand des DAPI-Filters eine Region im Präparat ausgewählt, in der die Tumorzellen möglichst überlappungsfrei vorliegen und die Zellkerngrenzen sichtbar sind. In dieser Region werden mittels der Feinocussierung alle Ebenen der Zellen auf SpectrumGreen Signale im FITC-Filter und SpectrumOrange Signale im TRITC-Filter untersucht. Es wird ermittelt, ob jeweils ein orangefarbenes und ein grünes Signal mit weniger als einem Signal Abstand nebeneinander lokalisiert sind. Diese Signale werden ausgezählt, wobei jeweils ein orangefarbenes und ein grünes benachbartes Signal als ein Signal bewertet werden.

#### **2.6.2.2.1 Untersuchung auf Break-Apart (Bruch)**

Fall- und Kontrollgruppe werden auf Bruch im ALK Genlokus untersucht. Diesbezüglich wird definiert, dass ein Bruch vorliegt, wenn der Abstand zwischen dem orangefarbenen und dem grünen Signal in mehr als 50% der Zellen größer als ein Signal ist (Verwendung der Vysis LSI ALK Dual Color, Break-Apart Rearrangement Probe).

#### **2.6.2.2.2 Untersuchung auf Amplifikation**

Es werden jeweils 100 Zellen in 2 bis 4 Gesichtsfeldern bewertet. Liegen innerhalb der Tumorzellpopulation einheitlich mehr als 8 ALK Genkopien pro Zelle bei Euploidie (zwei CEP2-Signale pro Zelle) vor, wird nicht weiter ausgezählt. Diese Fälle werden als hoch amplifiziert eingestuft.

Für alle anderen Fälle wird eine Ratio berechnet: 
$$Ratio = \frac{\Sigma \text{Alk-Signale} / 100 \text{ Zellen}}{\Sigma \text{CEP2-Signale} / 100 \text{ Zellen}}$$

Fälle mit einer Ratio von > 4 werden als Amplifikation, Fälle mit einer Ratio von < 1,4 als nicht amplifiziert gewertet. Fälle mit einer Ratio von 1,4 - 4 sind nicht sicher einstuftbar und werden weiter untersucht. Hierzu werden weitere 100 Tumorzellen ausgewertet und eine Ratio aus den insgesamt 200 ausgewerteten Zellen gebildet, s. Abbildung 9 und Tabelle 13.

Fälle mit einer Ratio von > 2,2 werden als Amplifikation, Fälle mit einer Ratio von < 1,8 als nicht amplifiziert gewertet. Fälle mit einer Ratio von 1,8 – 2,2 sind nicht einstuftbar, s. Abbildung 9 und Tabelle 13.



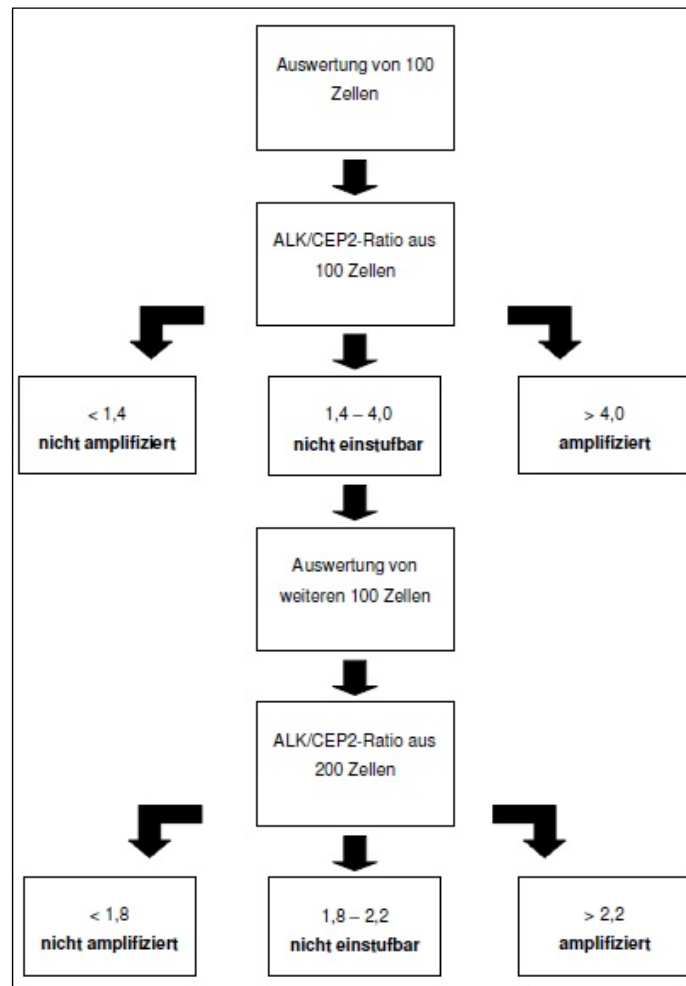


Abbildung 9 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: Auswertungs-Algorithmus

Tabelle 13 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: Auswertungskriterien

<u>ALK/CEP2-Ratio (100 Zellen ausgezählt)</u>	<u>ALK/CEP2-Ratio (200 Zellen ausgezählt)</u>	<u>Beurteilung</u>
< 1,4		nicht amplifiziert
1,4 – 4,0	< 1,8	nicht amplifiziert
	1,8 -2,2	fraglich amplifiziert
	> 2,2	amplifiziert
> 4,0		amplifiziert
> 8,0		hoch amplifiziert

### **2.6.3 Statistische Auswertung**

In dieser Arbeit soll die Letalität zwischen den Neuroblastomen mit ALK Expression und ohne ALK Expression verglichen werden. Es wird eine Überlebenszeitbetrachtung der Fallgruppe und der Negativkontrollgruppe durchgeführt.

Des Weiteren wird betrachtet, ob erstens die ALK Expression und zweitens die ALK Amplifikation einen Einfluss auf die Letalität zeigen. Hierzu wird als statistischer Test der Exakte Test nach Fisher, ein Chi-Quadrat-Test, angewendet. Es wird auf ein Signifikanzniveau von  $p=0,05$  getestet.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patienten

##### 3.1.1 Geschlechterverteilung und Alter: Gesamtkollektiv

Es werden 164 Neuroblastomfälle des Tissue Microarrays untersucht.

Unter den 164 Fällen befinden sich 65 Patientinnen (39,6%) und 99 Patienten (60,4%). Das Durchschnittsalter bei Erkrankung liegt bei 2,64 Jahren (weiblich: 2,98 Jahre, männlich: 2,41 Jahre) Median 1,42 Jahre , Spannweite 0,08 Jahre bis 16,25 Jahre, s. Tabelle 14.

In der immunhistochemischen Färbung der Anaplastischen Lymphomkinase zeigen 17 der 164 Neuroblastomfälle eine eindeutige Anfärbbarkeit. 5 Fälle zeigen eine sehr schwache, diffuse Färbung im Zytoplasma und Neuropil. Die Färbung wird für diese 5 Fälle wiederholt, um eventuelle Fehler in der Durchführung auszuschließen. Diese 5 Fälle können nicht sicher als positiv gewertet werden und werden für die weitere Untersuchung ausgeschlossen.

##### 3.1.2 Geschlechterverteilung und Alter: Fallgruppe mit ALK Expression

Unter den 17 eindeutig positiven Fällen befinden sich 3 Patientinnen (17,6%) und 14 Patienten (82,4%). Das Durchschnittserkrankungsalter der 17 Patienten liegt bei 2,21 Jahren (weiblich: 1,4 Jahre, männlich: 2,4 Jahre), Median 1,83 Jahre, Spannweite 0,42 Jahre bis 6,22 Jahre.

Im Vergleich zum Gesamtkollektiv (60,4% männlich) ist in der Fallgruppe (82,4% männlich) der Anteil an Jungen höher. Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose liegt im Gesamtkollektiv und in der Fallgruppe zwischen ein bis drei Jahren, s. Tabelle 14.

**Tabelle 14 Vergleich von Geschlechterverteilung und Alter bei Erkrankung zwischen dem Gesamtkollektiv und den Tumoren mit ALK Expression**

		Gesamtkollektiv n=164	Tumoren mit ALK Expression n=17
Geschlecht	weiblich	64/164 (39,6%)	3/17 (17,6%)
	männlich	99/164 (60,4%)	14/17 (82,4%)
Durchschnittsalter bei Erkrankung in Jahren	weiblich	2,98	1,4
	männlich	2,4	2,4
	gesamt	2,6	2,2

### 3.1.3 Geschlechterverteilung und Alter: Negativkontrollgruppe ohne ALK Expression

Die Negativkontrolle setzt sich aus 3 Patientinnen (27%) und 8 Patienten (73%) zusammen. Das Durchschnittsalter der 11 Patienten beträgt 1,95 Jahren (weiblich: 2,52 Jahre, männlich: 1,74 Jahre), Median 1,33 Jahre, Spannweite 0,08 Jahre bis 5,50 Jahre.

## 3.2 Makroskopie

### 3.2.1 Tumorlokalisation und Metastasierungsgrad bei Erstdiagnose:

#### Fallgruppe mit ALK Expression

Zum Diagnosezeitpunkt war die Mehrheit der Tumoren mit ALK Expression retroperitoneal an oder in der Nebenniere lokalisiert (76%), s. Tabelle 15. Nur jeweils ein Tumor befand sich abdominal, cervical, mediastinal und axillär.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wurden in 35% der Fälle bereits Metastasen nachgewiesen, s. Tabelle 16.

### 3.2.2 Tumorlokalisation und Metastasierungsgrad bei Erstdiagnose:

#### Negativkontrollgruppe ohne ALK Expression

In der Negativkontrollgruppe ohne ALK Expression dominiert ebenfalls die Lokalisation des Primärtumors an/in der Nebenniere (91%). s. Tabelle 15. Ein Tumor befand sich bei Erstdiagnose abdominal.

Eine Metastasierung lag bei Erstdiagnose in 64% der Fälle der Kontrollgruppe vor, s. Tabelle 16.

**Tabelle 15 Lokalisation des Primärtumors**

Immunhistochemie ALK	Lokalisation des Primärtumors	
	retroperitoneal/ suprarenal	andere
positiv n=17	13 (76%)	4 (24%)
negativ n=11	10 (91%)	1 (9%)

**Tabelle 16 Prävalenz von Metastasen bei Erstdiagnose**

Immunhistochemie ALK	Metastasen bei Diagnose	
	ja	nein
positiv n=17	6 (35%)	11 (65%)
negativ n=11	7 (64%)	4 (36%)

### 3.3 Histomorphologie

#### 3.3.1 Histomorphologie: Gesamtkollektiv

In den folgenden Tabellen wird anhand der Klassifikation nach International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC), Mitosis-Karyorrhexisindex (MKI) und Hughes Klassifikation dargestellt, welche histomorphologischen Eigenschaften die 164 Tumoren aufweisen.

Bei den untersuchten Tumoren handelt es sich entsprechend der INPC vorwiegend um Neuroblastome (86,6%), s. Tabelle 17. Die Subtypen undifferenziert, wenig differenziert und differenzierend liegen mit zunehmenden Differenzierungsgrad in absteigender Häufigkeit vor. Ein kleiner Teil des untersuchten Kollektivs entfällt auf Ganglioneuroblastome (intermixed) (8,5%) und Ganglioneuroblastome (nodulär) (4,3%).

**Tabelle 17 Gesamtkollektiv: Einteilung nach der International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)**

INPC		n	%
Neuroblastoma (stromaarm)	undifferenziert	59	36,0%
	gering differenziert	48	29,3%
	differenzierend	35	21,3%
Ganglioneuroblastoma intermixed		14	8,5%
Ganglioneuroma (überwiegend Stroma)	reifend	1	0,6%
	reif	0	0,0%
Ganglioneuroblastoma nodulär (kombiniert stromareich, stromadominant und stromaarm)		7	4,3%
Σ		164	100,0%

In den untersuchten Tumoren zeigt sich überwiegend (57,7%) eine geringe Proliferationsrate, entsprechend eines niedrigen MKI, s. Tabelle 18. Des Weiteren liegt in 26,9% der Fälle ein intermediärer MKI vor, eine Minderheit der Tumoren präsentiert hohe Proliferationsraten, entsprechend eines hohen MKI (12,3%). Nur fokal gesteigerte Proliferationsraten können in 3,1% der Tumoren entdeckt werden.

Für Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome wird der MKI nicht ermittelt. Somit liegt für 34 Tumoren der MKI nicht vor.

**Tabelle 18 Gesamtkollektiv: Einteilung nach dem Mitosis-Karyorrhexisindex (MKI)**

MKI	n	%
niedrig	75	57,7%
intermediär	35	26,9%
fokal hoch	4	3,1%
hoch	16	12,3%

Entsprechend der Hughes Klassifikation liegen im untersuchten Kollektiv mit absteigender Häufigkeit undifferenzierte Neuroblastome (G3, 39,6%), Neuroblastome (G2, 34,8%) und Ganglioneuroblastome (G1, 25%) vor, s. Tabelle 19.

**Tabelle 19 Gesamtkollektiv: Einteilung nach der Hughes Klassifikation**

Hughes Klas.	n	%
3	65	39,6%
2	57	34,8%
1a	30	18,3%
1b	11	6,7%
unbekannt	1	0,6%
$\Sigma$	164	100,0%

### **3.3.2 Histomorphologie: Fallgruppe mit ALK Expression**

Entsprechend der International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) sind alle Tumoren, die eine Expression der ALK aufweisen, stromaarme Neuroblastome, s. Tabelle 20. Ganglioneurome oder Ganglioneuroblastome sind nicht vertreten. Dies entspricht der Verteilung im Gesamtkollektiv, in dem zu 86,6% stromaarme Neuroblastome vorliegen. Während in der ALK exprimierenden Tumorgruppe in 82% der Tumoren der Differenzierungsgrad als gering angegeben wird, zeigt sich im Gesamtkollektiv eine andere Verteilung: 36% undifferenziert, 29,3% gering differenziert, 21,3% differenzierend, s. Tabelle 17.

Der Mitosis-Karyorrhexis Index (MKI) wird für 8 Fälle (47%) als hoch, für 3 Fälle (18%) als intermediär und für 6 Fälle als niedrig (35%) eingestuft, s. Tabelle 20. Während im Gesamtkollektiv der MKI in 57,7% der Fälle als niedrig und nur für 12,3% eine hohe Proliferationsaktivität und somit ein hoher MKI angegeben wird, zeigt sich in den ALK exprimierenden Tumoren die Tendenz zu einer erhöhten Proliferationsrate.

10 der Neuroblastome (58,8%) präsentieren undifferenzierte Tumorzellen gemäß Hughes Klassifikation G3, 7 der Neuroblastome (41,2%) zeigen sowohl undifferenzierte Tumorzellen sowie einige partiell differenzierte Zellen gemäß Hughes Klassifikation G2. Ganglioneuroblastome sind nicht vorhanden. Hier zeigt sich im Vergleich zum Gesamtkollektiv (39,6% G3, 34,8% G2 und 25,6% G1) eine Verschiebung des Differenzierungsgrades in Richtung der undifferenzierten, unreifen Tumorzellen.

### **3.3.3 Histomorphologie: Negativkontrollgruppe ohne ALK Expression**

In der Negativkontrollgruppe befinden sich 10 Fälle (91%), die entsprechend INPC als geringdifferenziert., stromaarm bewertet werden, Ein Fall (9%) wird als differenzierend stromaarm eingestuft, s. Tabelle 20. Dies entspricht dem Differenzierungsmuster in der Gruppe der ALK exprimierenden Tumoren (82% geringdifferenziert, stromaarm).

Der MKI wird für drei Fälle (27%) als hoch, für einen Fall (9%) als intermediär und für 7 Fälle (64%) als niedrig eingestuft, s. Tabelle 21. Im Vergleich zeigt sich in der Gruppe der ALK exprimierenden Tumoren eine deutlich höhere Proliferationsaktivität.

Gemäß der Hughes Klassifikation werden 7 Tumoren (64%) als G3, 4 Tumoren (36%) als G2 klassifiziert, s. Tabelle 22.



**Tabelle 20 Charakteristika der mittels FISH untersuchten Neuroblastomfälle: INPC**

IHC ALK	INPC		
	undiff., stromaarm	geringdiff., stromaarm	diff., stromaarm
positiv n=17	1 (6%)	14 (82%)	2 (12%)
negativ n=11	0 (0%)	10 (91%)	1 (9%)
Gesamtkollektiv n=164	59 (36,0%)	48 (29,3%)	35 (21,3%)

**Tabelle 21 Charakteristika der mittels FISH untersuchten Neuroblastomfälle: MKI**

IHC ALK	MKI		
	hoch	intermed.	niedrig
positiv n=17	8 (47%)	3 (18%)	6 (35%)
negativ n=11	3 (27%)	1 (9%)	7 (64%)
Gesamtkollektiv n=164	16 (12,3%)	39 (30%)	75 (57,7%)

**Tabelle 22 Charakteristika der mittels FISH untersuchten Neuroblastomfälle: Hughes Klassifikation**

IHC ALK	Hughes Klassifikation	
	G3	G2
positiv n=17	10 (58,8%)	7 (41,2%)
negativ n=11	7 (64%)	4 (36%)
Gesamtkollektiv n=164	65 (39,6%)	57 (34,8%)

### 3.4 Immunhistochemie: Untersuchung auf ALK Expression

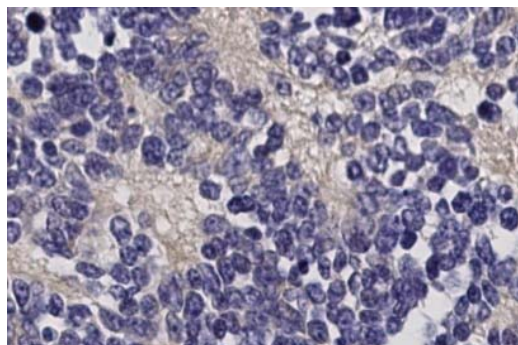
#### 3.4.1 Ergebnisse der IHC

In 17 Fällen kann mittels immunhistochemischer Färbung die Anaplastische Lymphomkinase im Zytoplasma der Neuroblastomzellen nachgewiesen werden. Die Anfärbbarkeit und somit das daraus gefolgerte Expressionsniveau der ALK variiert stark.

Jeweils ein Tumor zeigt eine sehr starke, bzw. stark bis sehr starke Färbung. In weiteren 15 Tumoren wurde eine starke bis schwache Färbung nachgewiesen, s. Tabelle 23.

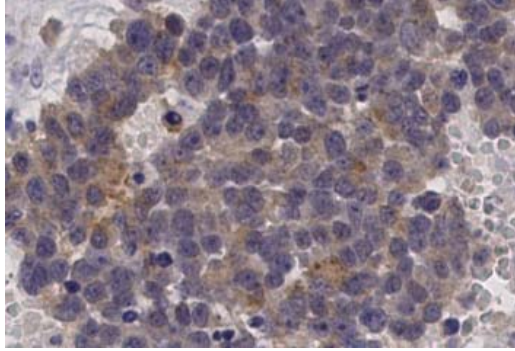
**Tabelle 23 Ergebnisse der Immunhistochemischen Untersuchung auf die Expression der ALK**

ALK Intensität	Farbintensität	Anzahl	
		absolut	prozentual
3	sehr stark positiv	1/17	6%
2,5	stark bis sehr stark positiv	1/17	6%
2	stark positiv	4/17	24%
1,5	positiv	3/17	18%
1	schwach positiv	8/17	47%



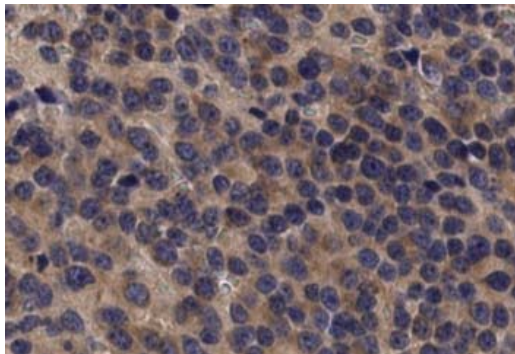
**Abbildung 10 IHC Intensität 0**

Axioskop Polarisationsmikroskop (Fa. Zeiss, Jena), 20fache Vergrößerung



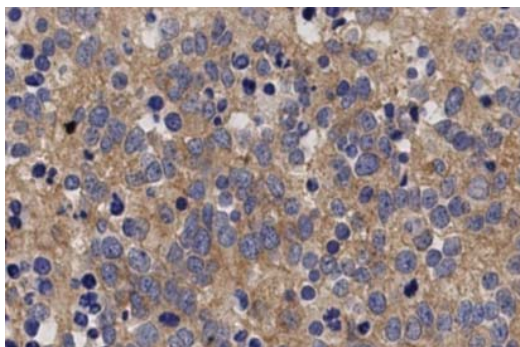
**Abbildung 11 IHC Intensität 1**

**Axioskop Polarisationsmikroskop (Fa. Zeiss, Jena), 20fache Vergrößerung**



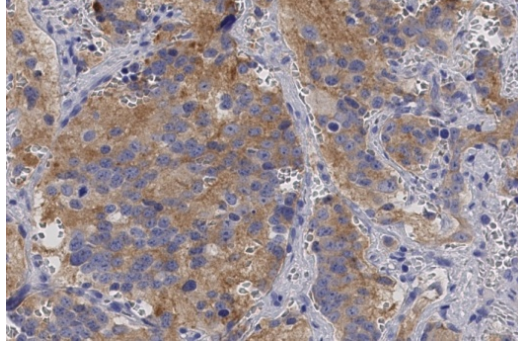
**Abbildung 12 IHC Intensität 1,5**

**Axioskop Polarisationsmikroskop (Fa. Zeiss, Jena) 20fache Vergrößerung**



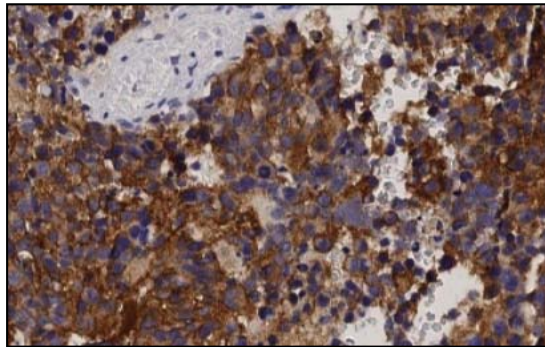
**Abbildung 13 IHC Intensität 2**

**Axioskop Polarisationsmikroskop (Fa. Zeiss, Jena) 20fache Vergrößerung**



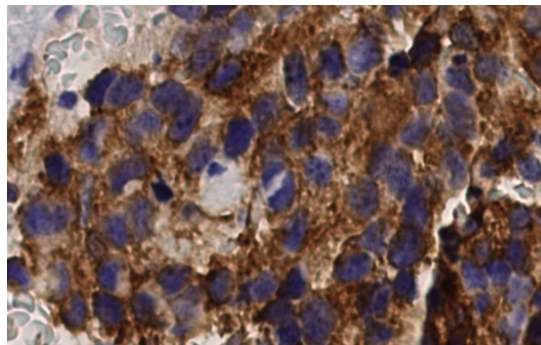
**Abbildung 14 IHC Intensität 2,5**

**Axioskop Polarisationsmikroskop (Fa. Zeiss, Jena), 20fache Vergrößerung**



**Abbildung 15 IHC Intensität 3**

**Axioskop Polarisationsmikroskop (Fa. Zeiss, Jena), 20fache Vergrößerung**



**Abbildung 16 IHC Intensität 3**

**Axioskop Polarisationsmikroskop (Fa. Zeiss, Jena), 62fache Vergrößerung**

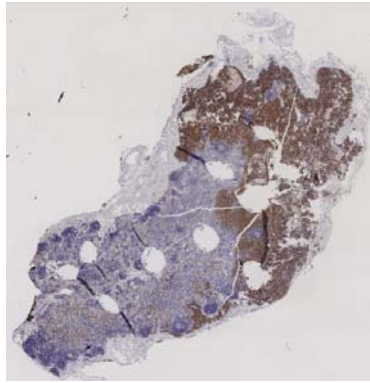


Abbildung 17 IHC Intensität 3

Axioskop Polarisationsmikroskop (Fa. Zeiss, Jena), 5fache Vergrößerung

### 3.4.2 Immunhistochemie: Algorithmus mit Ergebnissen

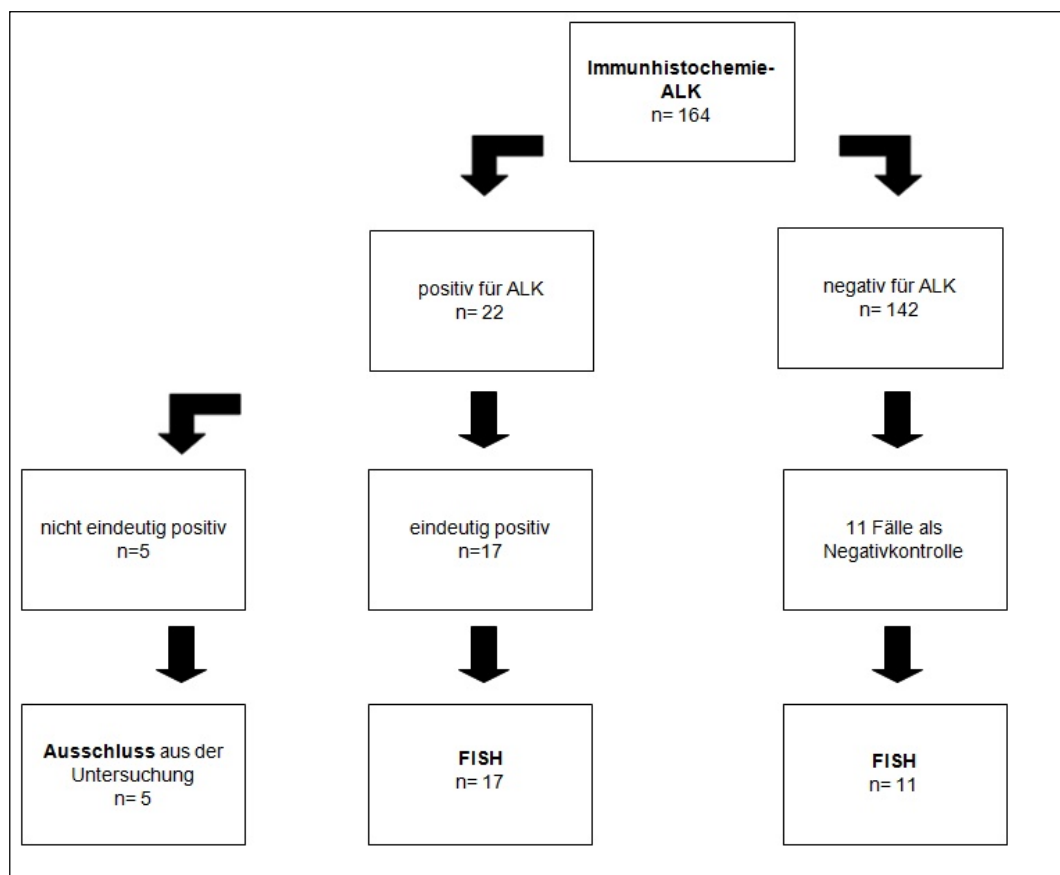


Abbildung 18 Immunhistochemie: Algorithmus mit Ergebnissen

### **3.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: Untersuchung auf ALK Amplifikation**

#### **3.5.1 Ergebnisse der FISH: Fallgruppe mit ALK Expression**

##### **3.5.1.1 Amplifikation und intratumorale Heterogenität**

In der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigen 2 (12%) der ALK exprimierenden Neuroblastome eine Amplifikation des ALK Gens, ein Bruch wird nicht beobachtet, s. Tabelle 24.

Als Nebenbefund lässt sich in einem Tumor eine intratumorale Heterogenität feststellen, s.

Abbildung 22 . Es zeigen sich innerhalb dieses Tumors sowohl Zellen mit zwei Allelen, als auch Zellen mit Amplifikation. Die ermittelte FISH-Ratio beträgt 1,12. Somit ist dieser Fall nach den zugrunde gelegten Kriterien, s. Tabelle 13, nicht als Amplifikation zu werten. In der Immunhistochemie zeigt sich hier eine schwache Färbung, ALK Intensität 1. Es handelt sich um ein gering differenziertes, stromaarmes Neuroblastom nach INPC mit einem hohen MKI. Das undifferenzierte, klein- und rundzellige Tumorgewebe wird als G3 der Hughes Klassifikation bewertet. Auf genetischer Ebene sind keine Amplifikation des NMYC Gens oder eine 1p Deletionen feststellbar. Der Tumor stammt aus der linken Nebenniere eines 13 Monate alten Jungen. Metastasen zeigten sich weder bei Diagnose noch im Verlauf der folgenden 10 Jahre. Bis zum letzten Follow-up zeigte sich der Patient rezidivfrei.

#### **3.5.2 Ergebnisse der FISH: Negativkontrollgruppe ohne ALK Expression**

In der Kontrollgruppe weist einer der 11 Tumoren (9%) eine Amplifikation des ALK Gens auf. Ein Bruch stellt sich nicht dar, s. Tabelle 24.

**Tabelle 24 Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Immunhistochemie ALK	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	
	Amplifikation	Bruch
positiv n=17	2 (12%)	0 (0%)
negativ n=11	1 (9%)	0 (0%)

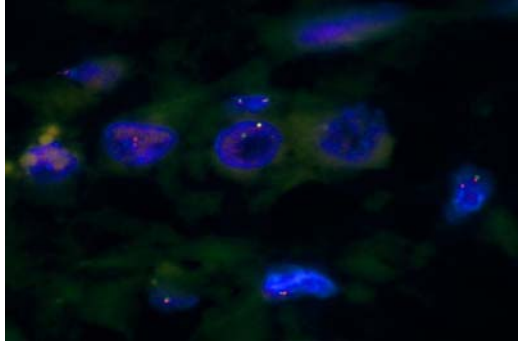
### **3.5.3 Ergebnisse der FISH: Drei Fälle mit Amplifikation -**

#### **Vergleich der ALK Amplifikationsrate mit der ALK Expression**

Die ermittelte Anzahl der ALK Genkopien unterscheidet sich zwischen den Tumoren mit Amplifikation, s. Tabelle 25. Die höchste Amplifikationsrate mit einer Ratio von 9,34 zeige derjenige Tumor mit der stärksten Farbintensität in der Immunhistochemie. Das Ergebnis der Immunhistochemischen Färbung dieses Tumors ist auf Abbildung 15 zu sehen, Abbildung 20 zeigt den Blick durch das Fluoreszenzmikroskop auf diesen Tumor.

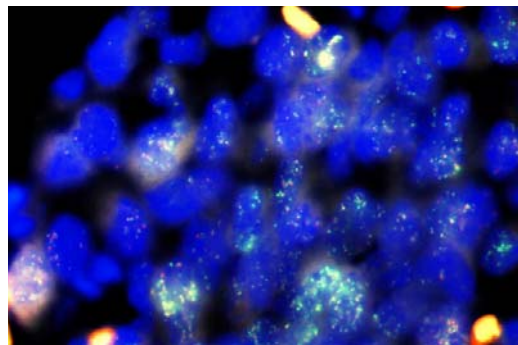
**Tabelle 25 Amplifizierte Fälle: ALK Intensität und Amplifikationsgrad**

Fall	ALK Intensität	FISH-Ratio
1	3	9,34
2	1,5	5,63
3	0	7,24



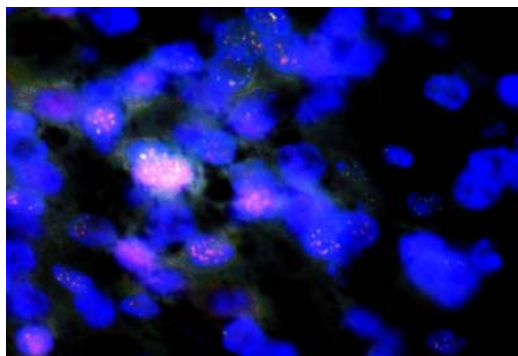
**Abbildung 19 FISH: Normalbefund**

Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Fa. Zeiss, Jena), 100fache Vergrößerung



**Abbildung 20 FISH Amplifikation Fall 1**

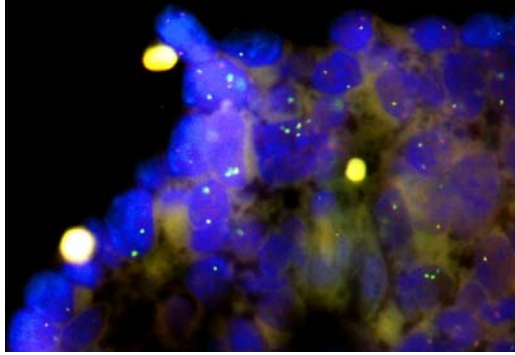
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Fa. Zeiss, Jena), 100fache Vergrößerung



**Abbildung 21 FISH Amplifikation Fall 2**

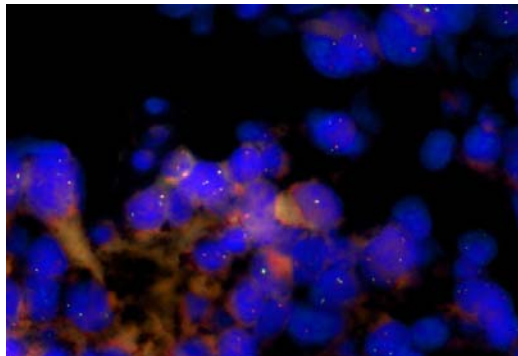
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Fa. Zeiss, Jena), 100fache Vergrößerung





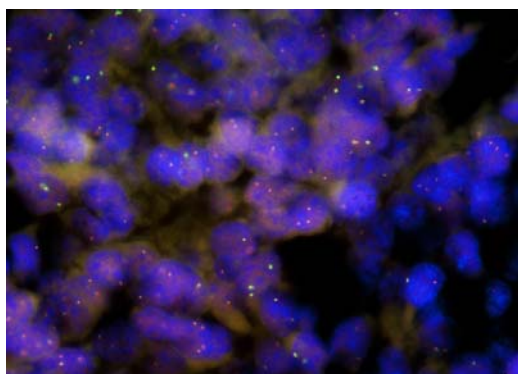
**Abbildung 22 FISH Intratumorale Heterogenität**

Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Fa. Zeiss, Jena), 100fache Vergrößerung



**Abbildung 23 FISH Intratumorale Heterogenität**

Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Fa. Zeiss, Jena), 100fache Vergrößerung



**Abbildung 24 FISH Intratumorale Heterogenität**

Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Fa. Zeiss, Jena), 100fache Vergrößerung

### 3.6 NMYC Status in den untersuchten Neuroblastomen

In 6/16 (37,5%) der untersuchten ALK exprimierenden Neuroblastome und 2/11 (18%) der untersuchten Neuroblastome ohne ALK Expression liegt eine Amplifikation des NMYC Genlokus vor, Tabelle 26. Für einen Tumor aus der ALK exprimierenden Gruppe ist der NMYC Status nicht bekannt. Bei der Untersuchung der drei ALK Amplifikation aufweisenden Neuroblastome hinsichtlich einer NMYC Amplifikation zeigt sich, dass nur zwei dieser Tumoren ebenfalls eine NMYC Amplifikation aufweisen. In diesem beiden Tumoren liegt neben der NMYC Amplifikation auch eine ALK Expression von. Dasjenige Neuroblastom mit ALK Amplifikation, aber ohne ALK Expression, weist keine numerische NMYC Veränderung auf.

In Tabelle 27 werden die Charakteristika der drei Neuroblastome mit ALK Amplifikation zusammengefasst.

**Tabelle 26 Vergleich der ALK Expression mit dem NMYC und ALK Genstatus**

	Amplifikation		
	im NMYC Gen	im ALK Gen	im ALK und NMYC Gen
IHC ALK positiv n=17	6/16 (37,5%)	2/17 (11,7%)	2/17 (11,7%)
IHC ALK negativ n=11	2/11 (18%)	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)
insgesamt	8/27 (19,6%) *	3/28 (10,7%)	2/27 (7,4%)*

\* NMYC Genstatus von einem Fall nicht bekannt

**Tabelle 27 Untersuchung der Neuroblastome mit ALK Amplifikation auf eine NMYC Amplifikation**

Fall	1	2	3
ALK Intensität in der IHC	3	1,5	0
Genkopien ALK	9,34	5,63	7,24
Genkopien NMYC	10	10	nicht amplifiziert

## 3.7 Überlebensrate und klinischer Verlauf

### 3.7.1 Vergleich der Überlebensrate und des klinischen Verlaufs mit der ALK Expression

Es werden die Gesamtüberlebensraten der Patienten nach einem Jahr, nach fünf Jahren sowie die Fünfjahresüberlebensrate ohne Zwischenfall (Rezidiv, Metastasen, Zweitmalignom) betrachtet, s. Tabelle 28.

Für den klinischen Verlauf werden die Kategorien Rezidivfreiheit, Rezidiv und Letalität analysiert, s. Tabelle 29.

Sowohl in den Überlebensraten als auch im klinischen Verlauf zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumoren mit und ohne ALK Expression, s. Statistische Betrachtung Tabelle 30. Es zeigt sich allerdings eine Tendenz, dass die Rezidivrate und Letalität in der Gruppe der Tumoren mit Expression höher ist, s. Tabelle 29.

**Tabelle 28 Vergleich der Überlebensrate zwischen ALK pos und ALK neg Neuroblastomen**

Immunhistochemie ALK	1-year survival	5-year event free survival	5-year overall survival
positiv n=17	15/17 (88,2%)	9/17 (52,9%)	11/17 (64,7%)
negativ n=11	10/11 (90,9%)	8/11 (72,7%)	8/11 (72,7%)

**Tabelle 29 Vergleich des klinischen Verlaufs zwischen ALK pos und ALK neg Neuroblastomen**

Immunhistochemie ALK	lebt ohne Ereignis*	lebt mit Rezidiv*	verstorben*
positiv n=17	9/17 (52,9%)	2/17 (11,8%)	6/17 (35,3%)
negativ n=11	8/11 (72,7%)	0/11 (0%)	3/11 (27,3%)

\* 5 Jahre nach Erstdiagnose

#### 3.7.1.1 Statistische Betrachtung

Bezüglich einer signifikanten Abhängigkeit zwischen ALK Expression und Langzeitüberleben nach 5 Jahren (verstorben/lebt) wird der Exakte Test nach Fisher angewandt. Der p-Wert beträgt 1,000. Die Nullhypothese „ALK Expression und 5-Jahresüberleben sind unabhängig“ kann mit  $p = 1,000$  nicht verworfen werden. Das Langzeitüberleben nach 5 Jahren (verstorben/lebt) zeigt sich somit in diesen Untersuchungen als nicht signifikant abhängig vom ALK Amplifikationsstatus, s. Tabelle 30.

**Tabelle 30 Kontingenztafel: ALK Expression und Langzeitüberleben nach 5 Jahren**

	verstorben	lebt	insgesamt
ALK Expression positiv	6	11	17
ALK Expression negativ	3	8	11
	9	19	28

Exakter Test nach Fisher:  $p=1,000$ , nicht signifikant, Nullhypothese kann nicht abgelehnt werden

### **3.7.2 Vergleich der Überlebensrate und des klinischen Verlaufs mit der ALK Amplifikation**

Es werden die Gesamtüberlebensraten der Patienten nach einem Jahr, nach fünf Jahren sowie die Fünfjahresüberlebensrate ohne Zwischenfall (Rezidiv, Metastasen, Zweitmalignom) betrachtet, s. Tabelle 31.

Alle Fälle mit ALK Amplifikation zeigen einen letalen Verlauf, s. Tabelle 31. Wie bereits erwähnt weist unter den amplifizierten Fällen ein Tumor keine ALK Expression auf. Während in der Gruppe der Tumoren mit ALK Amplifikation die Letalität 3/3 (100%) beträgt, waren nach 5 Jahren in der Gruppe ohne ALK Amplifikation nur 6/25 (24%) der Patienten verstorben, s. Tabelle 32. In ALK Amplifikation aufweisenden Neuroblastomen zeigt sich in dieser Arbeit also eine deutlich erhöhte Letalität. Unter Anwendung des Exakten Tests nach Fisher ergibt sich eine signifikante Abhängigkeit von ALK Amplifikation und 5 Jahresüberlebensrate,  $p=0,026$ , s. Statistische Betrachtung Tabelle 33.

Für den klinischen Verlauf werden die Kategorien Rezidivfreiheit, Rezidiv und Letalität analysiert, s. Tabelle 32. Die Ergebnisse zeigen, dass bei normalem Allelstatus des ALK Gens der klinische Verlauf als günstiger einzustufen ist.

**Tabelle 31 Vergleich der Überlebensrate zwischen Neuroblastomen mit und ohne ALK Amplifikation**

Amplifikation ALK	1-year survival	5-year event free survival	5-year overall survival
positiv n=3	2/3 (66%)	0 (0%)	0 (0%)
negativ n=25	23/25 (92%)	17/25 (68%)	19/25 (76%)

**Tabelle 32 Vergleich des klinischen Verlaufs zwischen Neuroblastomen mit und ohne ALK Amplifikation**

Amplifikation ALK	lebt ohne Ereignis*	lebt mit Rezidiv*	verstorben*
positiv n=3	0/3 (0%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)
negativ n=25	17/25 (68%)	2/25 (8%)	6/25 (24%)

\* 5 Jahre nach Erstdiagnose

### 3.7.2.1 Statistische Betrachtung

Bezüglich einer signifikanten Abhängigkeit zwischen ALK Amplifikation und Langzeitüberleben nach 5 Jahren (verstorben/lebt) wird der Exakte Test nach Fisher angewandt. Der p-Wert beträgt 0,026. Die Nullhypothese „ALK Amplifikation und 5-Jahresüberleben sind unabhängig“ kann mit Signifikanz von  $p < 0,05$  verworfen werden. Das Langzeitüberleben nach 5 Jahren (verstorben/lebt) zeigt sich in den untersuchten Fällen somit signifikant vom ALK Amplifikationsstatus abhängig (Exakter Test nach Fisher  $p=0,026$ ), s. Tabelle 33.

**Tabelle 33 Kontingenztafel: ALK Amplifikation und Tod nach 5 Jahren**

	verstorben	lebt	insgesamt
ALK Amplifikation positiv	3	0	3
ALK Amplifikation negativ	6	19	25
	9	19	28

Exakter Test nach Fisher:  $p= 0,026 (< 0,05)$ , also signifikant, Nullhypothese kann abgelehnt werden

### 3.7.3 Vergleich der Letalität in Bezug auf ALK Amplifikation und ALK Expression

Während in ALK amplifizierten Fällen die Letalität signifikant erhöht ist, s. Tabelle 33 und Tabelle 35, ergibt sich kein Unterschied zwischen der Letalität für ALK exprimierende (35%) und nicht exprimierende Tumoren (27%), s. Tabelle 34 und Tabelle 36.

**Tabelle 34 Vergleich der Letalität der Fälle mit und ohne ALK Expression in Abhängigkeit von der ALK Amplifikation**

		verstorben	lebt	insgesamt
ALK Amplifikation positiv	ALK Expression positiv	2	0	2
	ALK Expression negativ	1	0	1
ALK Amplifikation negativ	ALK Expression positiv	4	11	15
	ALK Expression negativ	2	8	10
insgesamt		9	19	28

**Tabelle 35 Letalität der Fälle mit und ohne ALK Amplifikation**

ALK Amplifikation	Letalität
ALK Amplifikation positiv	3/3 (100%)
ALK Amplifikation negativ	6/25 (24%)
insgesamt	9/28 (32,1%)

**Tabelle 36 Letalität der Fälle mit und ohne ALK Expression**

ALK Expression	Letalität
ALK Expression positiv	6/17 (35,3%)
ALK Expression negativ	3/11 (27,3%)
insgesamt	9/28 (32,1%)

### 3.7.4 Vergleich des Einflusses von ALK und NMYC Amplifikation auf die Letalität

Unter den 9 letal verlaufenden Fällen ist in einem Fall der NMYC Status nicht bekannt. 4 Fälle beherbergen eine NMYC Amplifikation, s Tabelle 37. Die NMYC Amplifikation liegt in 2 Fällen zugleich mit der ALK Amplifikation und in 2 Fällen ohne ALK Amplifikation vor. Anhand von Tabelle 37 und Tabelle 38 wird die Letalität in Bezug auf Amplifikationen im ALK und NMYC Gen analysiert. Liegt in keinem der beiden Genloci eine Amplifikation vor, beträgt die Letalität 3/18 (16,6%). Bei alleiniger Amplifikation des NMYC Gens zeigt sich die Letalität auf 2/6 (33,3%) erhöht. Eine Amplifikation im ALK Gen geht im untersuchten Patientenkollektiv, sowohl mit als auch ohne begleitende NMYC Amplifikation, in allen 3 Fällen mit einem letalen Verlauf einher.

Liegt eine ALK Amplifikation vor, ergibt sich anhand dieser Ergebnisse Anhalt darauf, dass die Letalität gegenüber derjenigen der NMYC amplifizierten Neuroblastome (bisheriger prognostisch relevanter Marker, s. Einleitung S. 13) sogar noch erhöht ist.

**Tabelle 37 Letalitätsanalyse anhand des Amplifikationsstatus im ALK und NMYC Gen**

NMYC Ampli.	ALK Ampli.	verstorben	lebt	insgesamt
NMYC Amplifikation positiv	ALK Amplifikation positiv	2	0	2
	ALK Amplifikation negativ	2	4	6
NMYC Amplifikation negativ	ALK Amplifikation positiv	1	0	1
	ALK Amplifikation negativ	3	15	18
insgesamt		8 *	19	27

\*von den 9 letalen Fällen ist für 8 der NMYC Status bekannt, weshalb in dieser Tabelle lediglich 8 letale Fälle betrachtet werden und sich als Gesamtsumme der untersuchten Fälle somit 27 statt 28 ergibt

**Tabelle 38 Letalitätsanalyse anhand des Amplifikationsstatus im ALK und NMYC Gen**

NMYC Amplifikation	ALK Amplifikation	Letalität
NMYC Amplifikation positiv n=8	ALK Amplifikation positiv	2/2 (100%)
	ALK Amplifikation negativ	2/6 (33,3%)
	insgesamt	4/8 (50%)
NMYC Amplifikation negativ n=19	ALK Amplifikation positiv	1/1 (100%)
	ALK Amplifikation negativ	3/18 (16,6%)
	insgesamt	4/19 (21%)
NMYC Status unbekannt n=1		1/1
insgesamt		9/28 (32,1%)

### **3.7.5 Analyse und Charakteristika der Neuroblastomfälle mit Amplifikation**

Im Folgenden werden die drei ALK Amplifikation tragenden Fälle betrachtet, s. Tabelle 39. Zwischen den drei Fällen variiert sowohl der aus der Intensität der immunhistochemischen Färbung gefolgerte Expressionsgrad der ALK als auch die Anzahl der Genkopien.

Fall 1 mit der stärksten Expression der ALK zeigt die höchste Amplifikationsrate und beherbergt eine NMYC Amplifikation. Fall 3 trägt eine ALK Amplifikation, während eine ALK Expression, eine numerische Aberration des NMYC Gens oder eine strukturelle 1p Veränderung nicht nachweisbar sind.

Der Primärtumor war in allen drei Fällen retroperitoneal, bzw. an der Nebenniere lokalisiert. Bei Fall 1 und Fall 3 lagen bereits bei Diagnosestellung Metastasen vor. Histologisch werden die drei Fälle als stromaarme Neuroblastome eingeteilt. Der Differenzierungsgrad unterscheidet sich. Die Tumorzellen im Gewebe von Fall 1 und Fall 3 zeigen ein undifferenziertes, bzw. geringdifferenziertes Muster mit einer hohen Proliferationsaktivität (hoher MKI). In Fall 2 hingegen liegen differenzierende Tumorzellen bei einem niedrigen MKI vor.

Alle drei Fälle verliefen letal. Die Überlebensdauer variierte zwischen 92 Tage (Fall 2), 624 Tagen (Fall 1) und 1374 Tagen (Fall 3).

Die beiden Fälle mit ALK Amplifikation und ALK Expression zeigten einen deutlich aggressiveren Verlauf als Fall 3 ohne ALK Expression. Die Histologie scheint in den drei betrachteten Fällen unabhängig vom Genstatus zu sein. Über den Einfluss der Histologie in Kombination mit dem Genstatus auf die Überlebensdauer kann keine Vermutung angestellt werden, da die Zellteilungsrate, das Ansprechen auf eine zytostatische Therapie und die Überlebensdauer voneinander abhängen. Das Therapieschema dieser drei Fälle wurde nicht weiter betrachtet.



Fall 2 zeigt die günstigste Histologie, bei kürzester Überlebensrate. Bei Diagnosestellung lag keine Metastasierung vor.

Es ist zu vermerken, dass derjenige Fall (Fall 3) ohne ALK Expression und ohne NMYC Amplifikation eine deutlich längere Überlebenszeit zeigt als die Fälle mit ALK Expression und NMYC Amplifikation.

**Tabelle 39 Analyse und Charakteristika der Neuroblastomfälle mit Amplifikation**

Fall	1	2	3
ALK Intensität in der IHC	3	1,5	0
Genkopien ALK Gen	9,34	5,63	7,24
Genkopien NMYC	10	10	nicht amplifiziert
1p Status *	nicht bekannt	nicht bekannt	keine Deletion, kein LOH
Alter bei Diagnose in Jahre	1,83	0,42	5,42
Lokalisation Primärtumor	Retroperitoneum	Nebenniere rechts	Nebenniere links
Metastasen bei Diagnose	ja	nein	ja
INPC	Neuroblastom stromaarm, undifferenzierend	Neuroblastom stromaarm, differenzierend	Neuroblastom stromaarm, geringdifferenzierend
MKI	hoch	niedrig	hoch
Hughes	G3	G2	G3
Zeit Diagnose bis erstes Ereignis (in Tagen)	489	90	804
Überlebensdauer (in Tagen)	624	92	1374
Geschlecht	m	m	m

\* 1p-Untersuchung zur Einteilung in eine Risikogruppe, wenn keine NMYC Amplifikation vorliegt

## **3.8 Untersuchung der Signalwege**

### **3.8.1 Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbung mittels Anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper**

Alle 164 untersuchten Neuroblastomfälle zeigen in der immunhistochemischen Färbung mit dem Anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper keine Anfärbbarkeit. Diejenigen Neuroblastomfälle mit NMYC Amplifikation zeigen ebenfalls keine verstärkte  $\beta$ -Catenin Expression.

### **3.8.2 Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbung mittels Anti-pSTAT3-Antikörper**

Mittels der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper Anti-Phospho-STAT3 konnte keine Anfärbbarkeit und somit vermehrte Akkumulation des pSTAT Proteins nachgewiesen werden.



## **4 Diskussion**

Im vergangenen Jahrzehnt durchgeführte Studien zum Neuroblastom zeigten Keimzellmutationen (Mossé et al., 2008), somatische Mutationen (ebenfalls Mossé et al., 2008) und Amplifikationen (Schulte et al., 2011; De Brouwer et al., 2010; Mossé et al., 2008; Janoueix-Lerosey et al., 2008, Chen et al., 2008) des Gens der Anaplastischen Lymphomkinase. Mutierte ALK Proteine lagen überexprimiert und hyperphosphoryliert vor. Sie wiesen eine konstitutive Kinaseaktivität auf. Die Inhibition der ALK Expression sowohl in ALK mutierten Zellen als auch in Zellen mit Überexpression der Wildtyp-ALK zeigte eine deutliche Reduktion der Zellproliferation (George et al., 2008). Diese Ergebnisse identifizieren ALK als ein kritisches Element in der Entstehung des Neuroblastoms und als eine interessante therapeutische Zielstruktur dieser sehr häufig fatal verlaufenden Tumorerkrankung. In den vergangenen Jahren wurden immer potentere ALK Inhibitoren entdeckt und in der Literatur beschrieben (Li et al., 2008, Webb et al., 2009, Cheng et al., 2010, Ardini et al., 2010).

Die Expression der Anaplastischen Lymphomkinase in Neuroblastomen wurde bereits des Öfteren beschrieben (Lamant et al., 2000; Osajima-Hakomori et al., 2005). Ob ein Zusammenhang zwischen der ALK Expression und der Prognose besteht, bleibt jedoch umstritten. Bisher wird die Prognose einer Neuroblastomerkrankung anhand histologischer und bestimmter genetischer Kriterien bestimmt (s. Einleitung). In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse der Untersuchung von 164 Neuroblastomfällen auf einen Zusammenhang zwischen der ALK Expression und dem ALK Genstatus, der Histologie sowie dem klinischen Verlauf untersucht, um weitere Erkenntnisse über die Prognose ALK exprimierender Tumoren zu gewinnen.

### **4.1 Expression der Anaplastischen Lymphomkinase**

Die Expression der Anaplastischen Lymphomkinase wurde in 17 der 164 untersuchten Neuroblastome immunhistochemisch nachgewiesen. Es fiel auf, dass die Tumoren mit ALK Expression in 82,4% von männlichen Patienten stammten, während im Gesamtkollektiv der Anteil an männlichen Patienten 60,4% betrug, s. Tabelle 14 S. 39. Unter den in dieser Arbeit untersuchten Neuroblastomen tritt folglich die ALK Expression bei männlichen Patienten häufiger auf als bei weiblichen Patienten.

Während den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zufolge die Frequenz der ALK Expression im untersuchten Kollektiv der Neuroblastome des Kindertumorregisters in Kiel bei 10,7% (17 von 159 Tumoren) liegt, beschrieben die Studien von Lamant et al. (2000) und Osajima-Hakomori et al. (2005) eine quantifizierbare ALK Menge in der Mehrheit der untersuchten Neuroblastome (91,7% und 87,5%). Des Weiteren wurde in der Literatur bereits eine signifikant gesteigerte ALK Expression in fortgeschrittenen, metastasierten Tumoren im Vergleich zu lokalisierten Neuroblastomen beschrieben (Passoni et al., 2009): Neuroblastome der Stadien 1-2 wiesen in 23,5% der Fälle eine ALK Expression auf, im Stadium 3-4 waren es hingegen 77%.

Es stellt sich die Frage, worin die Ursache der in dieser Arbeit niedrigeren Frequenz der ALK Expression liegt.

In der Studie von Lamant et al. (2000) wurden mittels rtPCR, Western Blotting und Immunhistochemie sowohl ALK mRNA als auch ALK Protein nachgewiesen. Die Kombination dieser drei Methoden und insbesondere der Nachweis der mRNA ist zur Untersuchung der ALK Expression sensitiver als die solitäre Immunhistochemie, die lediglich das Protein nachweist. Die Studiengruppe von Lamant et al. (2000) führte zuerst den mRNA Nachweis durch. An vier Neuroblastomen, in deren Zellen bereits mittlere bis hohe ALK mRNA Level detektiert wurde, schloss sich die Immunhistochemische Färbung mit anti ALK Antikörper an. Hierbei konnte jedoch lediglich in einem dieser vier Neuroblastome immunhistochemisch ALK Protein nachgewiesen werden. Insofern ergibt sich unter ausschließlicher Betrachtung der immunhistochemischen Ergebnisse auch bei Lamant et al. (2000) eine deutlich niedrigere Frequenz der ALK Expression.

Es muss unterschieden werden zwischen der immunhistochemisch nachweisbaren ALK Expressionsrate und derjenigen Rate, die durch niedermolekulare, sensitivere Methoden ermittelt wird. Möglicherweise wurden durch die alleinige immunhistochemische Untersuchung in der vorliegenden Arbeit einige ALK exprimierende Tumoren nicht detektiert, z.B. aufgrund eines niedrigen Expressionslevels. Mittels einer rtPCR oder eines Western Blot könnte man diese gegebenenfalls erfassen. Somit wäre es möglich, dass die wahre Rate der ALK exprimierenden Neuroblastome im untersuchten Kollektiv höher ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich bewusst für die Methode der Immunhistochemie entschieden. Diese Arbeit beabsichtigt im explorativen Stil die im Kindertumorregister Kiel enthaltenen Neuroblastome auf Ihre immunhistochemische ALK Expression zu untersuchen.

In der Arbeit von Osajima-Hakomori et al. (2005) liegt lediglich die Immunhistochemie zum ALK Expressionsnachweis zugrunde. In 14 von 16 Fällen wurde das ALK Protein nachgewiesen. Als Antikörper wurde hier ein anti ALK Antikörper verwendet. Wir verwendeten hingegen den anti ALK/p80 Antikörper. Ob der von Osajima-Hakomori verwendete anti ALK Antikörper eine höhere Sensitivität aufweist oder unter den von ihm untersuchten Neuroblastomen eine deutliche höhere Frequenz von ALK exprimierenden Neuroblastomen vorliegt, bleibt zu hinterfragen.

Als weiteren Einflussfaktor für die unterschiedlichen Ergebnisse wäre denkbar, dass im untersuchten Tumorkollektiv nicht ausschließlich Neuroblastome sondern auch Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome eingeschlossen sind. Für keines der 22 Ganglioneuroblastome oder Ganglioneurome konnte eine ALK Expression ermittelt werden. Unter Ausschluss der Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome ergibt sich eine Frequenz der ALK Expression im Kollektiv der Neuroblastome des Kindertumorregisters in Kiel von 12,4% (17 von 137).

Insgesamt ist der Umfang der untersuchten Tumoren in dieser Arbeit mit 164 Fällen höher als in den Studien von Lamant et al. (2000) mit 24 untersuchten Tumoren und Osajima-Hakomori et al. (2005) mit 16 untersuchten Fällen. Die Tumorgewebe in der Studie von Lamant et al. (2000) stammten aus

der Neuroblastom Datenbank der Pediatric Oncology Group sowie einer Gewebebank einer der Studiengruppenmitglieder und repräsentierten alle Neuroblastomsubtypen angesichts klinischen Stadiums, Alters, NMYC Kopiezahl und DNA Polyploidie. Die Auswahl erfolgte anhand einer stratifizierten Stichprobe. Für die Untersuchung von Osajima-Hakomori et al. (2005) wurden gezielt 16 Neuroblastome entsprechend ihrer Histologie und ihres NMYC Status ausgewählt. Die untersuchten Tumoren setzen sich zusammen aus 9 Tumoren günstiger histologischer Prognose mit normalem NMYC Status sowie aus 7 Tumoren mit ungünstiger histologischer Prognose, darunter 2 mit NMYC Amplifikation.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Kollektiv der zwischen 1990 und 2000 diagnostizierten Neuroblastome untersucht.

Die bereits beschriebene signifikant erhöhte ALK Expression in fortgeschrittenen, metastasierten Neuroblastomen im Vergleich zu lokalisierten Neuroblastomen konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Von unseren 17 Fällen mit ALK Expression wiesen 6 Tumoren eine NMYC Amplifikation auf. Für einen dieser Tumore war der NMYC Status nicht bekannt. Unter den ALK exprimierenden Tumoren beträgt die Häufigkeit einer NMYC Amplifikation 37,5% (6/16). In der Negativkontrollgruppe ergibt sich eine Frequenz von 18% (2/11). Diesen Ergebnissen zufolge scheint in ALK exprimierenden Tumoren eine NMYC Amplifikation häufiger vorzuliegen als in denjenigen Tumoren ohne ALK Expression.

Wir können bilanzieren: Es wurde eine ALK Expression in 10,7% der untersuchten Neuroblastome festgestellt. Möglicherweise liegt die wahrhaftige Rate höher. Dies könnte in Folgeuntersuchungen mittels rtPCR und Western Blotting untersucht werden. Es wurde ein großes Kollektiv untersucht, in das auch Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome eingeschlossen waren, die keine ALK Expression zeigten. ALK exprimierende Tumoren beherbergen scheinbar häufiger eine NMYC Amplifikation als nicht exprimierende Tumoren.

#### **4.1.1 Untersuchung des Einflusses der ALK Expression auf den klinischen Verlauf**

In Hinblick auf die 1 Jahresüberlebensrate, die 5 Jahresüberlebensrate und den klinischen Verlauf (Rezidiv und Letalität) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumoren mit und ohne ALK Expression. Es zeigt sich lediglich eine leichte Tendenz, dass die Rezidivrate und Letalität bei vorliegender ALK Expression höher ist, s. Tabelle 29 S. 54. In der Fallgruppe mit ALK Expression lebten 5 Jahre nach Erstdiagnose 64,7% (11/17) der Patienten rezidivfrei. In der Kontrollgruppe betrug die Rate ereignisfreien Überlebens 72,7% (8/11). Das rezidivfreie 5 Jahresüberleben war in der Kontrollgruppe somit 8% höher. Die Letalität in den ersten 5 Jahren nach Erstdiagnose entsprach in der Fallgruppe 35,3% (6/17), in der Kontrollgruppe 27,3% (3/11). In der Fallgruppe wurde somit eine 8% höhere Letalität beobachtet.

Andere Studien belegen diese Tendenz. Im Jahr 2010 untersuchten De Brouwer et al. (2010) 440 Neuroblastome auf eine Korrelation von ALK Expression und Überleben. Die ALK mRNA Expression konnte als unabhängiger, prognostischer Marker bestätigt werden.

In der Untersuchung von Schulte et al. (2011) zeigte sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen hohen ALK Expressionsleveln und einem ungünstigen klinischen Phänotyp und auch Mossé et al. (2008) wiesen hohe ALK Expressionlevel in Tumoren mit klinisch aggressivem Verlauf nach.

Wie bereits erwähnt, beschrieb die Studiengruppe von Passoni et al. (2009) eine signifikant häufigere ALK Expression in fortgeschrittenen, metastasierten Neuroblastomen als in lokalisierten Tumoren.

Zusammenfassend können wir feststellen, dass mit einer ALK Expression die Tendenz zu einer erhöhten Rezidivrate und Letalität einherzugehen scheint. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen somit den bisherigen Stand der Forschung.

#### **4.1.2 Untersuchung auf Korrelation zwischen ALK Expression und Histologie**

Im Folgenden werden Unterschiede in der Verteilung der histologischen Eigenschaften zwischen dem Gesamtkollektiv und den ALK exprimierenden Tumoren diskutiert, s. Tabelle 20 S. 44. Die für das Gesamtkollektiv der Neuroblastome ermittelten Differenzierungsgrade gemäß INPC entsprechen folgender Verteilung: undifferenziert (36%), gering differenziert (29,3%), differenziert (21,3%). In den ALK exprimierenden Tumoren liegt nur zu 6% ein undifferenziertes Muster und hingegen in 82% ein geringer Differenzierungsgrad vor. Somit erscheint die Gruppe der ALK exprimierenden Tumore bezüglich des Differenzierungsgrades deutlich verschieden vom Gesamtkollektiv. ALK exprimierenden Tumoren zeigen sehr viel häufiger ein gering differenziertes Wachstumsmuster.

Wird die Einteilung nach Hughes angewandt, entsprechen unter den ALK exprimierenden Tumoren 53% einem G3 Tumor mit undifferenzierten Tumorzellen, s. Tabelle 22 S.44. Die übrigen Tumoren wurden als G2 mit sowohl undifferenzierte Tumorzellen als auch einigen partiell differenzierten Zellen klassifiziert. Ganglioneuroblastome, G1, treten unter den ALK exprimierenden Tumoren nicht auf. Im Gesamtkollektiv entfallen nur 39,6% auf G3 und 25,6% der Tumoren werden als Ganglioneuroblastom, G1, eingestuft. Während im Gesamtkollektiv sowohl undifferenzierte Tumoren (G3) als auch Ganglioneuroblastome (G1) auftreten, überwiegen unter den ALK exprimierenden Tumoren die undifferenzierten (G3) Tumoren.

Bezüglich des MKI bestehen deutliche Unterschiede zwischen dem Gesamtkollektiv und der Fallgruppe, s. Tabelle 21 S.44. Im Gesamtkollektiv überwiegt in 57,7% der Fälle ein niedriger Mitosis-Karyorrhexisindex (MKI), nur 12,3% der Tumoren weisen einen hohen MKI und somit starke Proliferationsaktivität auf. Die ALK exprimierenden Tumoren zeigen in 47% der Fälle einen hohen MKI nur in 35% der Fälle eine niedrige. Die Proliferations-tendenz ist dadurch erklärbar, dass die Anaplastische Lymphomkinase als Rezeptortyrosinkinase Wachstumsimpulse weiterleitet. Dies entspricht ihrer physiologischen Funktion während der Neurogenese in der Fetal- und Neonatalperiode. Die abnormale und über die Neonatalperiode hinausreichende Expression führt zur Tumorgenese.

Unter Betrachtung dieser Ergebnisse lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen: Die Fallgruppe der ALK exprimierenden Neuroblastome kennzeichnet sich durch ein gering differenziertes histologisches Bild und hohe Proliferationsraten. Eine ALK Expression geht anscheinend mit einem unreifen Wachstumsmuster einher, eine Ausdifferenzierung der Tumorzellen findet meist nicht statt, der MKI ist erhöht.

Zwei Studiengruppen betrachteten bisher die Fragestellung, ob zwischen ALK Expression und histologischen Erscheinungsbild ein Zusammenhang bestehe. Osajima-Hakomori et al. (2005) konnten eine solche Tendenz nicht belegen. Sie untersuchten 16 Neuroblastome, 9 darunter mit günstiger histologischer Prognose, 7 mit ungünstiger histologischer Prognose, hinsichtlich ihrer ALK Expression. Die Mehrheit der Neuroblastome (14 von 16) zeigte eine ALK Expression. Somit konnte keine Korrelation zwischen Frequenz oder Intensität der immunhistochemischen Färbung und Histologie des Neuroblastomgewebes festgestellt werden. Diese Ergebnisse von Osajima-Hakomori et al. (2005) müssen jedoch unter dem Vorbehalt betrachtet werden, dass ein anderer Antikörper für den immunhistochemischen Proteinnachweis verwendet wurde (s.o.). Lamant et al. (2000) fanden ebenfalls keine Korrelation zwischen der ALK Expression und den bekannten histologischen Prognosefaktoren des Neuroblastoms. 24 Tumoren wurden wie oben angeführt mittels rtPCR, Western Blotting und Immunhistochemie untersucht.

Somit wird durch die Beobachtung des gering differenzierten und proliferationsaktiven histologischen Bildes in dieser Arbeit ein bisher nicht bekanntes Merkmal der ALK exprimierenden Tumoren beschrieben.

## **4.2 Amplifikation des ALK Gens**

Im Anschluss an die immunhistochemische Untersuchung der ALK Expression schloss sich die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an. Es sollte geprüft werden, ob einer ALK Expression eine Amplifikation des ALK Genorts zugrunde liegt.

Durchgeführt wurde die FISH an den 17 ALK exprimierenden Fällen und 11 Negativkontrollfällen. Insgesamt zeigte sich eine hochgradige Amplifikation in 3 der 28 untersuchten Neuroblastome. 2 dieser 3 Neuroblastome waren immunhistochemisch ALK positiv, einer überraschenderweise ALK negativ. Die Häufigkeit der ALK Amplifikation beträgt in der ALK exprimierenden Fallgruppe somit 11,7% (2/17) und in der Negativkontrollgruppe 9,1% (1/11).

Dies spricht gegen die Vermutung, dass ALK Amplifikationen ausschließlich in der Gruppe der ALK exprimierenden Neuroblastome vorkommen.

In der Literatur wurden ALK Amplifikationen in 0,7–4,4% der Neuroblastome (Schulte et al., 2011 (0,7%); De Brouwer et al., 2010 (1,7%); Mossé et al., 2008 (3,3%); Janoueix-Lerosey et al., 2008 (4,4%)) sowie eine Korrelation zwischen der ALK Genkopieanzahl und dem ALK Expressionsniveau beschrieben (Schulte et al., 2011; De Brouwer et al., 2010). Bisher wurden allerdings keine Fälle beschrieben, in denen eine ALK Amplifikation ohne ALK Expression vorliegt. Wie zuvor ausgeführt trat



in der Negativkontrollgruppe ein solcher Fall auf. In diesem besonderen Fall ist unklar, welchen Einfluss die bestehende ALK Amplifikation auf die Tumorgenese hat. Eine NMYC Amplifikation ist in diesem Neuroblastom nicht nachweisbar, der Genlocus 1p weist keine Deletion und keinen Loss of Heterozygosity auf. Es handelt sich um ein gering differenziertes, stromaarmes Neuroblastom, Hughes G3 mit einem hohen MKI. Das Diagnosealter betrug 5,4 Jahre, die Überlebenszeit nach Diagnosestellung 1474 Tage.

In einem Fall wurde eine intratumorale Heterogenität des ALK Genstatus beobachtet. Diese ging nicht mit einer vermehrten Genexpression einher. Wie häufig eine intratumorale Heterogenität des ALK Genlocus in Neuroblastomen vorliegt und wie sie sich auf Genexpression und klinischen Verlauf auswirkt, wurde bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit stellt sich eine Frequenz von 1/28 (3,6%) dar. Allerdings sollte die Schlussfolgerung aus einem singulären Ereignis vorsichtig erfolgen, trotz wiederholter Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit identischem Ergebnis kann ein Artefakt nicht sicher ausgeschlossen werden. Dennoch erscheint es denkbar, dass innerhalb eines Neuroblastoms unterschiedliche Tumorzellklone vorliegen, die zur der genetischen Heterogenität innerhalb des Tumors führen.

Ein Bruchereignis innerhalb des ALK Genlocus wurde nicht beobachtet. Somit kann diesen Ergebnissen zufolge ein Bruch innerhalb des ALK Gens mit folgender Translokation unter Entstehung eines Fusionsgens, analog zum NPM-ALK Fusionsproteins im ALCL, nicht als Ursache für eine ALK Expression und Neuroblastomentstehung vermutet werden.

Wenn auch nicht im ALK Gen selbst, so sind Bruchereignisse auf Chromosom 2p bereits beschrieben worden (Van Roy et al., 2001). Die Bruchstellen liegen zentromerwärts des ALK Gens. Infolge eines Bruchereignisses kann eine partielle Trisomie 2p entstehen. Tumoren mit dieser genetischen Aberration weisen meist eine vermehrte ALK Expression auf, die auf die erhöhte ALK Genkopieanzahl zurückgeführt wird.

Neben Amplifikationen im ALK Gen wurden in der Literatur Zugewinne des kurzen Arms von Chromosom 2 oder des gesamten Chromosoms 2 beschrieben. Die Studiengruppe von De Brouwer et al. (2008) konnte in 19,3% von 254 Neuroblastomen Zugewinne im Bereich des kurzen Arms von Chromosom 2 oder des gesamten Chromosoms 2 mittels array CGH nachweisen. Unter diesen Fällen befanden sich keine fokalen ALK Amplifikationen.

In Bezug auf diese Ergebnisse von De Brouwer et al. (2008) ist kein Vergleich mit den in dieser Studie erhobenen Ergebnisse möglich. Die in dieser Arbeit verwendete Methodik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung lässt keine Rückschlüsse auf Zugewinne außerhalb des ALK Locus im Bereich 2p zu. Als explorative Arbeit, ob einer ALK Expression eine ALK Amplifikation zugrunde liegt, wurde vorerst die Diskriminierung zwischen Amplifikation (ALK/CEP2-Ratio  $> 4$  für 100 ausgewertete Tumorzellen, bzw. ALK/CEP2-Ratio  $> 2,2$  für 200 ausgewertete Tumorzellen) und Normalbefund in den Fokus gestellt.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Untersuchung des ALK Gens auf Amplifikation in dieser Stichprobe die Häufigkeit einer Amplifikation von 10,7% ergab. Dieses Ergebnis liegt höher als die bisherigen Beobachtungen von 0,7–4,4% (Schulte et al., 2011; De Brouwer et al., 2010; Mossé et al., 2008; Janoueix-Lerosey et al., 2008). In zwei der drei Fälle mit ALK Amplifikation lässt sich begleitend eine NMYC Amplifikation nachweisen. Die in dieser Arbeit in einem Tumor beobachtete intratumorale Heterogenität wurde bisher zwar nicht beschrieben, erscheint jedoch im Rahmen eines Entartungsvorgangs eines Tumorzellklons denkbar. Ein Bruchereignis innerhalb des ALK Gens wurde nicht entdeckt. Die bisher beschriebenen Bruchstellen des Chromosoms 2p liegen zentromerwärts des ALK Gens (Van Roy et al., 2001).

#### **4.2.1 Koexistenz einer Amplifikation im ALK Gen und NMYC Gen**

ALK Amplifikationen liegen häufig gemeinsam mit NMYC Amplifikationen vor. Die Genloci für ALK und NMYC liegen nah beieinander auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (ALK 2p23.2 (Morris et al., 1994) und NMYC 2p24.3 (OMIM<sup>®</sup>, 164840)). Literaturangaben zufolge weisen 7-15% der primären Neuroblastome mit NMYC Amplifikation darüber hinaus eine ALK Amplifikation auf (George et al., 2008; De Brouwer et al., 2010). Eine ALK Amplifikation liegt in der Regel nicht gemeinsam mit einer ALK Mutation in demselben Tumor vor (Janoueix-Lerosey et al., 2008; De Brouwer et al., 2010).

Neuroblastome mit NMYC Amplifikation zählen zu den high-risk Neuroblastomen, die sich durch einen aggressiven Verlauf mit schlechtem Langzeitüberleben kennzeichnen (Matthay et al., 1999). Alleine schon wegen ihrer NMYC Amplifikation gelten daher Neuroblastome mit koexistenter ALK Amplifikation und NMYC Amplifikation zu den high-risk Neuroblastomen. Ob die ALK Amplifikation zur Tumorgenese beiträgt oder nur ein Begleitphänomen darstellt, ist bisher unklar.

Die Studiengruppe von Chen et al. (2008) ermittelte unter 215 primären Neuroblastomen 6 Fälle mit Amplifikation des ALK Genlokus (2,8%). 5 dieser 6 Fälle beherbergten darüber hinaus eine NMYC Amplifikation. In der Studie von De Brouwer et al. (2010) wiesen 11 der 12 Fälle mit ALK Amplifikation ebenfalls eine NMYC Amplifikation auf. Mossé et al. (2008) detektierten ebenfalls einen Fall mit solitärer ALK Amplifikation sowie 15 Fälle mit kombinierter ALK Amplifikation und NMYC Amplifikation in einem Kollektiv von 491 Neuroblastomen.

Neben dem in dieser Arbeit beobachteten Fall mit ALK Amplifikation ohne NMYC Amplifikation, detektierten also Chen et al. (2008), De Brouwer et al. (2010) und Mossé et al. (2008) ebenfalls jeweils einen solchen Neuroblastomfall. Hieraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass die ALK Amplifikation per se schon zur Pathogenese eines Neuroblastoms führen könnte. Neuroblastome mit amplifizierten ALK Gen bei normalem NMYC Gen scheinen selten zu sein. Um die Bedeutung der ALK Amplifikation in der Pathogenese zu ergründen, ist weitere Forschung und genaue Betrachtung der Fälle notwendig.

#### **4.2.2 Untersuchung des Einflusses der ALK Genamplifikation auf den klinischen Verlauf unter Berücksichtigung des NMYC Genstatus**

Anhand der erhobenen Ergebnisse kann ein Einfluss der ALK Genamplifikation auf den klinischen Verlauf vermutet werden. Während die Letalität unter den Fällen ohne ALK Amplifikation in den ersten 5 Jahren nach Diagnose 24% betrug, zeigten alle Neuroblastomfälle mit nachgewiesener ALK Amplifikation (3/3) einen letalen Verlauf, s. Tabelle 35, S. 57. Für das Langzeitüberleben nach 5 Jahren (verstorben/lebt) konnte mittels des Exakten Tests nach Fisher ein signifikanter Unterschied zwischen ALK amplifizierten und nicht ALK amplifizierten Neuroblastomen ermittelt werden ( $p=0,026$ ), s. Tabelle 33, S. 56.

Es kam in den entsprechenden Fällen mit Amplifikation 92, 624 bzw. 1374 Tage nach Erstdiagnose zum Tod. In 2 der 3 Fälle lagen bereits bei Diagnosestellung Metastasen vor. Eine NMYC Amplifikation und eine ALK Expression wurden in Fall 1 und 2 nachgewiesen, Fall 3 zeigte weder eine NMYC Genveränderung noch eine ALK Expression, s. Tabelle 39, S. 60.

Unter besonderer Beachtung von Fall 3 könnte eine Amplifikation im ALK Gen schon per se auf eine schlechte Prognose hinweisen.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer NMYC Amplifikation auf den klinischen Verlauf analysiert. Lagen weder ALK noch NMYC Amplifikation vor, betrug die Letalität 16,6%, s. Tabelle 38, S. 59. Bei alleiniger NMYC Amplifikation zeigte sich die Letalität auf 33,3% erhöht. Bei Vorliegen einer ALK Amplifikation erlagen 100% der Patienten der Erkrankung, s. Tabelle 38, S. 59.

In der Literatur wird die Letalität der Patienten mit NMYC Amplifikation (ohne ALK Mutation) mit 32% angegeben (De Brouwer et al., 2010). Genaue Daten bezüglich der Letalitätsrate bei gleichzeitigem Vorliegen von ALK und NMYC Amplifikation wurden bisher nicht in der Literatur beschrieben. Bei gleichzeitiger Expression von ALK und NMYC ist eine hohe Letalitätsrate jedoch bereits bekannt (Azarova et al., 2011; Zhu et al., 2012). Kürzlich beschrieb die Studiengruppe Azarova et al. (2011), dass die Prognose von Neuroblastomerkrankungen mit koexistenter NMYC Amplifikation und Mutation F1174L im ALK Gen gegenüber der alleinigen NMYC Amplifikation deutlich ungünstiger sei. Es wurde die Vermutung eines synergistischen Effekts der Proteine ALK und NMYC in der Tumorgenese geäußert. Diesen Verdacht erhärtete die Studie von Zhu et al. (2012), in der am Zebrafischmodell gezeigt werden konnte, dass bei simultaner Expression von ALK und NMYC die Penetranz der Neuroblastomerkrankung 3fach erhöht und die Pathogenese deutlich beschleunigt ist im Vergleich zur solitären NMYC Expression.

Die Fälle 1 und 2 dieser Arbeit wiesen beide eine ALK Amplifikation, ALK Expression sowie eine NMYC Amplifikation auf und nahmen einen letalen Verlauf. Anhand dieser Fälle lässt sich vermuten, dass nicht nur die ALK Mutation F1174L sondern offenbar auch die ALK Amplifikation in Kombination mit der NMYC Amplifikation zu einem klinischen ungünstigen Verlauf führen.

Darüber hinaus lässt sich, wie bereits oben erwähnt, anhand von Fall 3 die Vermutung anstellen, dass eine Amplifikation im ALK Gen unabhängig von einer NMYC Amplifikation Hinweis auf eine ungünstige Prognose geben könnte. Alleinige ALK Amplifikation bei fehlender NMYC Amplifikation

wurden in Einzelfällen beschrieben (Mossé et al., 2010; Chen et al. 2008; De Brouwer et al. 2010), eine Korrelation mit einem aggressiven Phänotyp konnte bisher nicht belegt werden.

Der Zusammenhang zwischen ALK Amplifikation, ALK Mutation und ALK Expression und dem klinischen Phänotyp wird in der Literatur nach wie vor widersprüchlich diskutiert. Einige Autoren vermuten einen Zusammenhang zwischen ALK Mutation, erhöhter Expression und einem aggressiven Phänotyp (George et al., 2008, Mossé et al., 2008). Andere beschreiben, dass ALK Mutationen im gesamten Spektrum der Neuroblastome auftreten (Janoueix-Lerosey et al., 2008; De Brouwer et al., 2010). ALK Mutation und ALK Amplifikation stellten sich in der Untersuchung von De Brouwer et al. (2010) nicht als statistisch signifikanter unabhängiger Faktor für das Überleben dar.

Kürzlich veröffentlichten Schulte et al. (2011), dass ALK mutierte Neuroblastome einen signifikant schlechteren klinischen Verlauf zeigten als Patienten mit WT ALK Gen. Zwischen den unterschiedlichen beobachteten Mutationen unterscheidet sich der klinische Verlauf jedoch nicht. Zu beachten sei, dass eine erhöhte ALK Expression unabhängig davon, ob mutiertes ALK oder WT ALK vorliegt, mit demselben aggressiven klinischen Phänotyp einhergeht.

Zusammenfassend lässt sich sagen: Die Letalität unter den ALK amplifizierten Fällen beträgt in der vorliegenden Arbeit 100%. Somit zeigt sich die Letalität bei vorliegender ALK Amplifikation höher als bei der bisher als prognostisch ungünstig bekannten NMYC Amplifikation (33,3% in dieser Arbeit (Fälle mit NMYC Amplifikation, ohne ALK Amplifikation), 32% laut De Brouwer et al., 2010). Auch derjenige Fall mit ALK Amplifikation ohne begleitende NMYC Amplifikation verlief letal.

Es lässt sich folgern: Eine ALK Amplifikation per se könnte ein Hinweis auf eine ungünstige Prognose sein. Neben dem in der Literatur bereits beschriebenen vermuteten Synergismus von NMYC Amplifikation und ALK Mutation F1174L (Azarova et al., 2011) in der Neuroblastompathogenese, kann auch ein Synergismus von NMYC Amplifikation und ALK Amplifikation vermutet werden.

Die Genetik des ALK Locus scheint für die Prognosebestimmung hinweisender als die ALK Expression.

#### **4.2.3 Einfluss von ALK und NMYC Genamplifikation auf die ALK Expression**

Wie bereits oben diskutiert kann die Vermutung, dass eine ALK Amplifikation ausschließlich in ALK exprimierenden Neuroblastomen auftritt, unseren Ergebnissen zufolge nicht bestätigt werden.

Trotzdem stellt sich die Frage: Welchen Einfluss hat eine ALK und/ oder NMYC Amplifikation auf die ALK Expression? Hierzu wurde die Häufigkeit der ALK Expression unter den Tumoren mit Amplifikation betrachtet.

In 75% der Tumoren (6 von 8) mit NMYC Amplifikation konnte eine ALK Expression nachgewiesen werden, Tabelle 26, S. 53. Folglich scheint eine NMYC Amplifikation überdurchschnittlich häufig mit einer ALK Expression einherzugehen, bzw. diese zu beeinflussen.

Zwei der drei Tumoren mit ALK Amplifikation wiesen eine ALK Expression auf, wobei derjenige Fall mit der höchsten Genkopieanzahl die stärkste Expression zeigte. Ebendiese 2 Fälle wiesen außerdem

eine NMYC Amplifikation auf. Derjenige Fall mit solitärer ALK Amplifikation wies keine ALK Expression auf.

Es lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen: Koexistenz von NMYC Amplifikation und ALK Amplifikation geht diesen Ergebnissen zufolge mit ALK Expression einher. Ein Einfluss der ALK Genkopieanzahl auf das Expressionsniveau erscheint möglich. Es bleibt unklar, ob eine alleinige ALK Amplifikation eine ALK Expression bedingen kann.

### **4.3 Untersuchung der Signalwege Wnt/ $\beta$ -Catenin und JAK/STAT**

#### **4.3.1 Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg**

Da einige high-risk Neuroblastome ohne NMYC Amplifikation hohe Level von MYC exprimieren, stellten Lui et al. (2008) die Hypothese auf, dass die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs zur Pathogenese dieser high-risk Neuroblastome beitragen könnte. MYC ist ein Zielgen des Signalmoleküls  $\beta$ -Catenin (He et al., 1998). Die Ergebnisse der entsprechenden Untersuchung belegten diese Hypothese: Erhöhte  $\beta$ -Catenin Expressionslevel wurden sowohl insgesamt als auch intranukleär in den Tumorzellen nachgewiesen (Lui et al., 2008).

Kann durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten die Hypothese von Lui et al. (2008) gestützt werden, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg für die Tumorgenese der nicht NMYC amplifizierten high-risk Neuroblastome verantwortlich sein könnte?

In dieser Arbeit wurden 164 Neuroblastomfälle mittels Immunhistochemie auf  $\beta$ -Catenin untersucht.

Sowohl die Neuroblastomfälle mit als auch diejenigen ohne NMYC Amplifikation zeigten keine verstärkte  $\beta$ -Catenin Expression in Form einer intrazytoplasmatischen oder intranukleären Akkumulation des  $\beta$ -Catenins.  $\beta$ -Catenin Signale stellten sich lediglich membranständig dar. Dies gilt als physiologisch.

Diesen Ergebnissen zufolge scheint der Wnt/ $\beta$ -Cateninweg in den Neuroblastomzellen nicht vermehrt aktiviert und somit in der Pathogenese ursächlich zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit können somit die Annahme von Lui et al. (2008) nicht untermauern.

#### **4.3.2 JAK/STAT Signalweg**

Für das großzellig anaplastische Lymphom wurde bereits eine Beteiligung des Signalmoleküls pSTAT in der Tumorphagenese beschrieben (Zamo et al., 2002). Phosphoryliertes STAT Protein wurde in den Lymphomzellen vermehrt nachgewiesen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob im Neuroblastom das intrazelluläre Signalmolekül STAT vermehrt phosphoryliert vorliegt und somit Hinweis über den Wirkmechanismus der ALK im Neuroblastom gibt.

Mittels immunhistochemischer Färbung wurden 164 Neuroblastome auf ein vermehrtes Vorliegen von pSTAT untersucht. In keinem der Tumoren konnten intrazytoplasmatische oder intranukleäre Signale festgestellt werden. Eine positive Färbung zeigte das gesunde Nebennierengewebe von 4 Tumoren.

Häufig präsentierten Endothelzellen intrazelluläre pSTAT-Signale. Dies gilt als physiologisch (Herstellerangaben: Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, USA).

Anhand der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse, kann nicht bestätigt werden, dass im Neuroblastom eine verstärkte Signaltransduktion mittels pSTAT vorliegt.



## **5 Zusammenfassung**

Das Neuroblastom ist der häufigste maligne solide extrakranielle Kindertumor. Die Erkrankung kann von Spontanregression bis Tod sehr variabel verlaufen und der Verlauf ist bisher noch nicht immer sicher prognostizierbar. Unterschiedliche prognostisch relevante genetische Veränderungen sind für das Neuroblastom bereits bekannt, z.B. die NMYC Amplifikation. Neue prognostische Marker werden benötigt um die Prognose besser bestimmen und die Therapie entsprechend wählen zu können. In den letzten Jahren rückte die Anaplastische Lymphomkinase (ALK) als ein potentieller prognostischer Marker in den Fokus des Interesses. In der vorliegenden Studie wurde ein Teil des Kollektivs der Neuroblastome des Kindertumorregisters in Kiel auf ihre ALK Expression untersucht. Es sollte ermittelt werden, ob einer Expression eine Amplifikation oder ein Bruch des ALK Genorts zugrunde liegt. Der Expressions- und der Amplifikationstatus sollten mit dem klinischen Verlauf verglichen werden.

Des Weiteren wurden die vorliegenden Neuroblastomfälle auf die verstärkte Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin und JAK/STAT Signalwegs untersucht, um weitere Erkenntnisse über die Pathogenese des Neuroblastomes zu erlangen.

Es wurden 164 Neuroblastomfälle aller klinischen Stadien und histologischen Differenzierungsgrade untersucht. Die Expression der ALK wurde mittels immunhistochemischer Färbung ermittelt. Die Fallgruppe der ALK exprimierenden Tumoren sowie eine Negativkontrollgruppe wurden unter Verwendung von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf Amplifikation und Bruch im ALK Genlokus geprüft. Expressionsmuster und Genotyp wurden mit dem klinischen Verlauf verglichen.

Zur Untersuchung der Aktivität der Signalwege wurden immunhistochemische Färbungen gegen  $\beta$ -Catenin und phosphoryliertes STAT3 Protein durchgeführt.

Eine Expression der Anaplastischen Lymphomkinase wurde in 10,7% der untersuchten Neuroblastome festgestellt. Das Expressionsniveau variierte stark. Im klinischen Verlauf zeigte sich für die ALK exprimierenden Tumoren lediglich eine leichte Tendenz zu einer erhöhten Rezidivrate und Mortalität. Das histologische Bild dieser Tumoren war vornehmlich geprägt von einem undifferenzierten Wachstumsmuster mit hohen Proliferationsraten, entsprechend dem eines aggressiven Phänotyps. Eine Expression der ALK wurde bei männlichen Patienten häufiger als bei weiblichen Patientinnen nachgewiesen. In der Gruppe der ALK exprimierenden Tumoren lagen zudem NMYC Amplifikationen zweimal häufiger vor als in der Kontrollgruppe. ALK Amplifikationen wurden in 3 von 28 Tumoren detektiert: davon 2 in der Gruppe der ALK exprimierenden Tumoren sowie eine in der Negativkontrollgruppe. Ein Bruch im Genlokus wurde in keinem der Neuroblastome beobachtet. Alle Neuroblastome mit ALK Amplifikation wiesen einen aggressiven Verlauf mit Tod binnen 5 Jahren auf. Eine verstärkte Aktivierung der untersuchten Signalwege Wnt/ $\beta$ -Catenin und JAK/STAT wurde mittels immunhistochemischer Färbung nicht nachgewiesen.



Eine Subgruppe der Neuroblastome (17/159, 10,7%) exprimiert das Protein ALK. Unter den ALK exprimierenden Tumoren tritt eine Amplifikation im ALK Genlokus mit einer Frequenz von 11,8% (2/17) auf. Gleichzeitig wurde in der Negativkontrollgruppe eine ALK Amplifikation (1/11) nachgewiesen. Eine Amplifikation scheint nicht zwangsläufig mit einer Expression einherzugehen. Ob eine ALK Amplifikation per se eine ALK Expression bedingen kann, bleibt unklar. Jedoch scheint ein Einfluss der Genkopieanzahl auf das Expressionsniveau möglich. NMYC Amplifikationen gehen überdurchschnittlich häufig mit einer ALK Expression einher. Bezüglich des klinischen Verlaufs zeigt die ALK exprimierende Fallgruppe lediglich eine leicht erhöhte Rezidiv- und Letalitätsrate gegenüber der Kontrollgruppe ohne ALK Expression. Alle Neuroblastome mit ALK Amplifikation zeigten einen letalen Verlauf. Da in einem Fall zwar eine ALK Amplifikation jedoch keine NMYC Amplifikation auftrat, könnte diesen Ergebnissen zufolge bereits die ALK Amplifikation per se ein Marker für einen ungünstigen klinischen Verlauf sein.

Die Signalwege Wnt/ $\beta$ -Catenin und JAK/STAT sind den Ergebnissen dieser Studie zufolge in Neuroblastomen nicht vermehrt aktiviert.

## 6 Literaturverzeichnis

Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. (2002). Notch signaling in cancer. *Cancer Biol Ther.* 1(5), 466-76. Review.

Ardini, E., Magnaghi, P., Orsini, P., Galvani, A., & Menichincheri, M. (2010). Anaplastic lymphoma kinase: role in specific tumours, and development of small molecule inhibitors for cancer therapy. *Cancer letters*, 299(2), 81-94.

Azarova, A. M., Gautam, G., & George, R. E. (2011, October). Emerging importance of ALK in neuroblastoma. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 21, No. 4, pp. 267-275). Academic Press.

Bischof, D., Pulford, K., Mason, D. Y., & Morris, S. W. (1997). Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 17(4), 2312-2325.

Brodeur GM, Marris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, eds. *Principles and practice of pediatric oncology*, 5th edn. Philadelphia: J B Lippincott Company, 2006: 933-970.

Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., & Darnell Jr, J. E. (1999). Stat3 as an Oncogene. *Cell*, 98(3), 295-303.

Carén, H., Abel, F., Kogner, P., & Martinsson, T. (2008). High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem. J.* 416, 153-159.

Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., ... & Jove, R. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10(1), 105-115.

Chan, P. K., & Chan, F. Y. (1995). Nucleophosmin/B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1262(1), 37-42.

Chen, Y., Takita, J., Choi, Y. L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., ... & Ogawa, S. (2008). Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*, 455(7215), 971-974.

Cheng, M., & R Ott, G. (2010). Anaplastic lymphoma kinase as a therapeutic target in anaplastic large cell lymphoma, non-small cell lung cancer and neuroblastoma. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 10(3), 236-249.

Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R., & Inghirami, G. (2008). The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(1), 11-23.

Cohn, SL, London, WB, Monclair, T, Matthay, KK, Ambros, PF, Pearson, AD. (2007) Update on the development of the international neuroblastoma risk group (INRG) classification schema. *Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings Part 1 25 (18S)*.

Cole, MD, & McMahon, SB. (1999) The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene*; 18(19): 2916-24.

De Brouwer, S., De Preter, K., Kumps, C., Zabrocki, P., Porcu, M., Westerhout, E. M., ... & Speleman, F. (2010). Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clinical Cancer Research*, 16(17), 4353-4362.

Garcia, R., & Jove, R. (1998). Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *Journal of biomedical science*, 5(2), 79-85.

George, R. E., Sanda, T., Hanna, M., Fröhling, S., Luther II, W., Zhang, J., ... & Look, A. T. (2008). Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*, 455(7215), 975-978.

Giles, R. H., van Es, J. H., & Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1653(1), 1-24.

Goss, K. H., & Groden, J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *Journal of Clinical Oncology*, 18(9), 1967-1979.

Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., & Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*, 16(1), 653-699.

Griffin, C. A., Hawkins, A. L., Dvorak, C., Henkle, C., Ellingham, T., & Perlman, E. J. (1999). Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Research*, 59(12), 2776-2780.

Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., & Pandolfi, P. P. (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(7), 493-505.

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., ... & Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281(5382), 1509-1512.

Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29(4), 577-580.

Internet:

[http://www.abcam.com/framework/popups/popup\\_printable\\_dx.cfm](http://www.abcam.com/framework/popups/popup_printable_dx.cfm), letzter Zugriff am 27.07.2011

[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2008/res](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/res), letzter Zugriff am 27.07.2011

<http://www.cellsignal.com/services/images/multi-pathway/JAK/STAT.jpg>, letzter Zugriff am 01.04.2013

[http://pri.dako.com/08002\\_25may06\\_ihc\\_guide\\_book.pdf](http://pri.dako.com/08002_25may06_ihc_guide_book.pdf), letzter Zugriff am 27.07.2011

<http://www.cosmobioussa.com/141histofine.html>, letzter Zugriff 01.04.2013

[http://www.kompetenznetzleukaemie.de/content/aerzte/diagnostik/zytogenetik/techniken/molekularzytogenetik/index\\_ger.html](http://www.kompetenznetzleukaemie.de/content/aerzte/diagnostik/zytogenetik/techniken/molekularzytogenetik/index_ger.html), letzter Zugriff 01.04.2013

<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagents/fish/vysis-lsi-probes.html>, letzter Zugriff 01.04.2013

Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D., Cupples, R., Bucay, N., Arakawa, T., ... & Yamamoto, T. (1997). Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*, 14(4), 439-449.

Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Vardiman, J.W. (2008). *World Health Classification of Tumors: Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. International Agency for Research on Cancer 2001, Lyon. *Nature*, 455(7215): 967-70.

Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugières, L., Ribeiro, A., de Pontual, L., Combaret, V., ... & Delattre, O. (2008). Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*, 455(7215), 967-970.

Jazii, F. R., Najafi, Z., Malekzadeh, R., Conrads, T. P., Ziaee, A. A., Abnet, C., ... & Salekdeh, G. H. (2006). Identification of squamous cell carcinoma associated proteins by proteomics and loss of beta tropomyosin expression in esophageal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 12(44), 7104.

Kohl, N. E., Kanda, N., Schreck, R. R., Bruns, G., Latt, S. A., Gilbert, F., & Alt, F. W. (1983). Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell*, 35(2), 359-367.

Lamant, L., Pulford, K., Bischof, D., Morris, S. W., Mason, D. Y., Delsol, G., & Mariamé, B. (2000). Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *The American journal of pathology*, 156(5), 1711-1721.

Landynyi, M., Cavalchire, G. (1996). Molecular variant of the NPM-ALK rearrangement of Ki-1 lymphoma involving a cryptic ALK splice site. *Genes Chromosomes Cancer*, 15(3), 173-177.

Lee, H. Y., Kléber, M., Hari, L., Brault, V., Suter, U., Taketo, M. M., ... & Sommer, L. (2004). Instructive role of Wnt/ $\beta$ -catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science*, 303(5660), 1020-1023.

Liu, Q. R., & Chan, P. K. (1991). Formation of nucleophosmin/B23 oligomers requires both the amino-and the carboxyl-terminal domains of the protein. *European Journal of Biochemistry*, 200(3), 715-721.

Li, R., & Morris, S. W. (2008). Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) small-molecule inhibitors for cancer therapy. *Medicinal research reviews*, 28(3), 372-412.

Liu, X., Mazanek, P., Dam, V., Wang, Q., Zhao, H., Guo, R., ... & Hogarty, M. D. (2007). Deregulated Wnt/ $\beta$ -catenin program in high-risk neuroblastomas without MYCN amplification. *Oncogene*, 27(10), 1478-1488.

Maris, J.M., Hogarty, M.D., Bagatell, R., Cohn, S.L. (2007). Neuroblastoma. *Lancet*, 369(9579): 2106-2120.

Matthay, K. K., Villablanca, J. G., Seeger, R. C., Stram, D. O., Harris, R. E., Ramsay, N. K., ... & Reynolds, C. P. (1999). Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *New England Journal of Medicine*, 341(16), 1165-1173.

Morris, S. W., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L., & Look, A. T. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 263(5151), 1281-1284.

Mossé, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A., Attiyeh, E. F., ... & Maris, J. M. (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*, 455(7215), 930-935.

National Cancer Institut, Surveillance, Epidemiology and End Results Database (Childhood Cancer by the ICC, CSR 1975-2008). <http://seer.cancer.gov>

OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man®. An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. <http://omim.org>

- Osajima-Hakomori, Y., Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A., Nakagawa, A., & Sakai, R. (2005). Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *The American journal of pathology*, 167(1), 213-222.
- Passoni, L., Longo, L., Collini, P., Coluccia, A. M. L., Bozzi, F., Podda, M., ... & Luksch, R. (2009). Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer research*, 69(18), 7338-7346.
- Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., ... & Comb, M. J. (2007). Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*, 131(6), 1190-1203.
- Schulte, J. H., Bachmann, H. S., Brockmeyer, B., DePreter, K., Oberthür, A., Ackermann, S., ... & Fischer, M. (2011). High ALK receptor tyrosine kinase expression supersedes ALK mutation as a determining factor of an unfavorable phenotype in primary neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, 17(15), 5082-5092.
- Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., ... & Mano, H. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153), 561-566.
- Taipale, J., & Beachy, P. A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, 411(6835), 349-354.
- Tadjine, M., Lampron, A., Ouadi, L., & Bourdeau, I. (2008). Frequent mutations of  $\beta$ -catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas\*. *Clinical endocrinology*, 68(2), 264-270.
- Van Roy, N., Van Limbergen, H., Vandesompele, J., Van Gele, M., Poppe, B., Salwen, H., ... & Speleman, F. (2001). Combined M-FISH and CGH analysis allows comprehensive description of genetic alterations in neuroblastoma cell lines. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 32(2), 126-135.
- Webb, T. R., Slavish, J., George, R. E., Look, A. T., Xue, L., Jiang, Q., ... & Morris, S. W. (2009). Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 9(3): 331-56. Review.
- Zamo, A., Chiarle, R., Piva, R., Howes, J., Fan, Y., Chilosì, M., ... & Inghirami, G. (2002). Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene*, 21(7), 1038-1047.

Zhang, Q., Wang, H. Y., Liu, X., & Wasik, M. A. (2007). STAT5A is epigenetically silenced by the tyrosine kinase NPM1-ALK and acts as a tumor suppressor by reciprocally inhibiting NPM1-ALK expression. *Nature medicine*, 13(11), 1341-1348.

Zhu, S., Lee, J. S., Guo, F., Shin, J., Perez-Atayde, A. R., Kutok, J. L., ... & Look, A. T. (2012). Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer cell*, 21(3), 362-373.

## Danksagung

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an Prof. Dr. Günter Klöppel richten, der mich frühzeitig im Studium für die tiefgreifenden Zusammenhänge in der Medizin begeisterte und mir diese Dissertation vermittelte. Meine Bewunderung gilt seiner Gabe, Brücken zu schlagen zwischen Pathologie, Kunst und Kultur!

Einen Einstieg in die Forschung zu finden, ist nur mit Unterstützung und Hilfe möglich. Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Ivo Leuschner, Leiter der Sektion Kinderpathologie des Uniklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Kiel, und Frau Oberärztin Dr. med. Eva Jüttner. Sie stellten mir das Dissertationsthema, Arbeitspatz und Materialien zur Verfügung und begleiteten die Entstehung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes, die mich bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit jederzeit hilfsbereit und freundlich unterstützten. Mein Dank gilt Herrn Dr. med. Christian Vokuhl, Frau Olivera Batic, Frau Silvia Holz und Frau Sabine Roggenbrodt sowie Herrn Hans-Michael Behrens für Hilfe bei technischen Fragestellungen und Frau Corinna Pahl für die tatkräftige Unterstützung bei den täglichen Angelegenheiten jeglicher Art. Den Doktorandinnen der Sektion Kinderpathologie danke ich für das angenehme Miteinander. Herrn Oliver Vollrath, Institut für Medizinische Informatik und Statistik, danke ich für die statistische Beratung.

Mein Dank gilt Frau Dr. Barbara Hero von der Neuroblastomstudienzentrale an der Uniklinik Köln für die Bereitstellung der klinischen Daten.

Meinen Freunden Jessica, Maren, Flo und Sara danke ich für die wunderbare gemeinsame Studienzeit und gegenseitige Unterstützung. Meinen Mitbewohnern Katharina, Matthias und Lars danke ich die einmalige, sehr schöne WG-Zeit und die Entspannung neben Uni und Doktorarbeit. Cara danke ich für die sprachwissenschaftliche Hilfe. Nico danke ich für alles.

Ausdrücklich möchte ich meinen Dank an Henning Voigt richten. Danke für dein Vertrauen in meine Fähigkeiten, deine Vorbildfunktion und deine menschliche Kompetenz!

Zuletzt möchte ich mich an meine Eltern richten. Von ganzem Herzen danke ich euch, dass ihr mir das Medizinstudium und diese Promotion ermöglicht habt. Danke für euer grenzenloses Vertrauen und eure Unterstützung. Euch ist diese Arbeit gewidmet.



# Lebenslauf

## ZUR PERSON

Name Annkatrin Susan Beyer  
geboren 27.09.1984 in Eckernförde  
Eltern Renate Berendt-Beyer und Thomas Beyer

## SCHULBILDUNG

1991 - 1995 Grundschule Dänischenhagen, Schleswig-Holstein  
1995 - 2004 Gymnasium Altenholz, Schleswig-Holstein  
28.05.2004 Allgemeine Hochschulreife

## HOCHSCHULBILDUNG

10/2005 - 11/2012 Studium der Humanmedizin an der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
08/2007 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
09/2010 - 03/2011 Auslandssemester an der Universidade de Coimbra, Portugal  
03/2011 – 08/2011 Forschungssemester für die vorliegende Dissertation  
08/2011 - 07/2012 Praktisches Jahr  
Innere Medizin, Städtische Krankenhaus Kiel  
Chirurgie, Diako Flensburg/ Kantonsspital St. Gallen (Schweiz)  
Pädiatrie und Humangenetik, UKSH, Campus Kiel  
21.11.2012 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## PROMOTION

03/2009- 05/2013 Experimentelle Arbeit an der vorliegenden Dissertation  
**„DIE EXPRESSION DER ANAPLASTISCHEN LYMPHOMKINASE IN AUSGEWÄHLTEN  
NEUROBLASTOMEN IN KORRELATION MIT DEM KLINISCHEN VERLAUF“**  
bei Prof. Dr. med. Ivo Leuschner, Institut für Pathologie, Sektion  
Kinderpathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
31.10.2014 Mündliche Promotionsprüfung

## VERÖFFENTLICHUNG

19.11.2011 **VORTRAG**  
Arbeitsgespräch deutschsprachiger Kinderpathologen 2011, Charité Berlin  
12.05.2012 **POSTERVORSTELLUNG**  
61. Jahrestagung der Norddeutschen Gesellschaft für  
Kinder- und Jugendmedizin, Kiel