

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. M.-L. Hansmann

**Bestimmung des molekularen Burkitt Lymphoms auf der Basis von
Paraffinblockmaterial**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Anne Ria Winkelmann

aus Frankenberg

Frankfurt am Main, 03.04.2013

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. M.-L. Hansmann

**Bestimmung des molekularen Burkitt Lymphoms auf der Basis von
Paraffinblockmaterial**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Anne Ria Winkelmann

aus Frankenberg

Frankfurt am Main, 03.04.2013

Dekan: Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. Hansmann

Korreferent: Prof. Dr. Bergmann

ggf 2.Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2013

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit am Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Aufrichtiger Dank gilt dem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Hansmann für die interessante Aufgabenstellung, die Betreuung der Arbeit und die Unterstützung bei der Lösung wissenschaftlicher Fragen.

Großer Dank gilt dem gesamten Team des Dr. Senckenbergischen Institutes für Pathologie für die hilfreiche Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der umfangreichen Versuche.

Abbildungsverzeichnis.....	III
Diagramme	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Lymphome.....	1
1.2 Non-Hodgkin-Lymphome.....	1
1.3 Einteilungen.....	2
1.4 Das Burkitt Lymphom	3
1.5 Das Diffus großzellige B-Zell Lymphom	8
1.6 B-Zell Lymphom, nicht klassifizierbar, intermediär zwischen Diffus großzelligem B-Zell Lymphom und Burkitt Lymphom	11
1.7 Genchip-Klassifikator.....	12
1.8 qPCR.....	13
1.9 Ziel.....	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.2 Fallauswahl	21
2.3 Methoden	24
2.3.1 Auswahl der Gene	24
2.3.2 Primer	25
2.3.3 RNA-Extraktion	26
2.3.4 Überprüfung der RNA Quantität und Qualität.....	27
2.3.5 Synthese komplementärer DNA.....	28
2.3.6 qPCR – Allgemeine Vorbemerkungen	28
2.3.7 qPCR-Durchführung	29

2.3.8	Statistische Auswertung der Ct-Werte	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Wahl der RNA-Extraktionsmethode.....	31
3.2	RNA-Extraktion.....	33
3.3	Charakterisierung der Assays.....	36
3.4	Messergebnisse der qPCR.....	37
3.5	Expression der Gene.....	38
3.6	qPCR Klassifikator.....	39
4	Diskussion.....	43
4.1	Voraussetzungen.....	43
4.2	Ursachen fehlender Messwerte	44
4.2.1	Fixierung und Lagerung	44
4.2.2	Konzentration der extrahierbaren RNA	44
4.2.3	Fragmentierungszustand der RNA.....	45
4.2.4	cDNA Synthese.....	45
4.2.5	Primer	46
4.3	Einflussgröße Probenalter am Beispiel des Referenzgens.....	46
4.4	Intermediäre Fälle.....	47
4.5	Einordnung im Vergleich zu anderen Klassifikatoren	48
4.6	Schlussfolgerungen	49
5	Zusammenfassung.....	51
6	Summary.....	53
	Literaturverzeichnis	A
	Lebenslauf.....	E
	Schriftliche Erklärung.....	G

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Burkitt Lymphom, Giemsa, Vergrößerung 40x.....	5
Abbildung 2: Burkitt Lymphom, Giemsa, Vergrößerung 400x.....	5
Abbildung 3: Burkitt Lymphom, CD20, Vergrößerung 400x, Übersicht.....	6
Abbildung 4: Burkitt Lymphom, CD10, Vergrößerung 400x, Übersicht.....	6
Abbildung 5: Burkitt Lymphom, Ki67, Vergrößerung 400x, Übersicht.....	7
Abbildung 6: Burkitt Lymphom, Bcl-2, Vergrößerung 400x, Übersicht.....	7
Abbildung 7: Burkitt Lymphom, myc CISH, Vergrößerung 400x	8
Abbildung 8: DLBCL, Giemsa, Vergrößerung 40 x	9
Abbildung 9: DLBCL, Giemsa, Vergrößerung 400 x	10
Abbildung 10: DLBCL, CD20, Vergrößerung 400 x, Übersicht	10
Abbildung 11: DLBCL, CD10, Vergrößerung 400 x, Übersicht	11
Abbildung 12: DLBCL, Ki67, Vergrößerung 400 x, Übersicht	11
Abbildung 13: Fluss-Diagramm qPCR beginnend vom Paraffinblock bis hin zur Detektion des Produktes.....	14
Abbildung 14: Ein Zyklus der qPCR (modifiziert nach [29])	16
Abbildung 15: 7900HT Sequence Detection System und angeschlossener Rechner	30

Diagramme

Diagramm 1: Bioanalyser Messung Probe 1	32
Diagramm 2: Bioanalyser Messung Probe 2	33
Diagramm 3: Box-Plot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen Probenalter in Jahren und RNA-Konzentration.....	35
Diagramm 4: Zusammenhang zwischen RIN und Probenalter	36
Diagramm 5: Anzahl valider Messungen pro Gen	38
Diagramm 6: Probenalter in Jahren in Bezug zum Ct-Wert des Referenzgens	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial	18
Tabelle 2: Chemikalien	19
Tabelle 3: Kits	20
Tabelle 4: Geräte	20
Tabelle 5: Software	21
Tabelle 6: Referenzpathologische Diagnosen der mBL, intermediate und non-mBL Fälle	22
Tabelle 7: Ausgewählte Eigenschaften der zu untersuchenden Proben	23
Tabelle 8: Primersequenzen und Amplikonlänge	25
Tabelle 9: Ergebnisse der NanoDrop® Messungen der Proben 1 und 2	31
Tabelle 10: Effektivität der Assays	37
Tabelle 11: Regulation der Gene	39
Tabelle 12: Vierfeldertafel, Sensitivität, Spezifität	40
Tabelle 13: Unterschiedlich klassifizierte Proben	42

Abkürzungen

a	Jahr
ABC	Aktivierter B-Zell Subtyp
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATAC-PCR	Adapter-markierte konkurrierende PCR
BL	Burkitt Lymphom
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CD	Cluster of differentiation
CISH	Chromogene in situ Hybridisierung
Ct	Treshhold cycle
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Eppstein-Barr-Virus
FL	Folikuläres Lymphom
FFPE	formalinfixiert und in Paraffin eingebettet
GCB	Keimzentrums B-Zell Subtyp
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

Kryo-konserviert	Schockgefrieren von Material nach der Entnahme
mBL	molekulares Burkitt Lymphom
MMML	Molekulare Mechanismen der Malignen Lymphome
neg	negativ
non-mBL	nicht molekulares Burkitt Lymphom
no RT	Probe ohne Reverse Transkriptase (no Reverse Transkriptase)
NOS	nicht anderweitig spezifiziert
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pos	positiv
qPCR, synonym: qRT-PCR	quantitative Echtzeit – Polymerase Kettenreaktion
REAL-Klassifikation	Revised European American Lymphoma Klassifikation
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonukleinsäure
t	Translokation
u. a.	unter anderem
USA	United States of America
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Lymphome

Der Begriff Lymphom stellt eine Sammelbezeichnung für ätiologisch unterschiedliche Lymphknotenvergrößerungen dar. Diese können benigne – z. B. entzündlich bedingt – oder maligne [1] sein.

Historisch wurde dieser Begriff erstmals von Rudolf Virchow 1858 gebraucht [2].

Eine grobe Einteilung maligner Lymphome gelingt in Hodgkin-Lymphome und Non-Hodgkin-Lymphome. Morphologisch können sich beide Entitäten in der Anzahl der Tumorzellen unterscheiden. Während das dominierende Infiltrat bei Hodgkin Lymphomen meist aus reaktivem Begleitinfiltrat besteht, erkennt man häufig bei Non-Hodgkin-Lymphomen ein Überwiegen von neoplastischen Zellen.

1.2 Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome sind neoplastische Proliferationen von Zellen des Immunsystems, die von arretierten Differenzierungsstufen der jeweiligen normalen Ausgangszellpopulation abstammen [2]. In 80% bis 85% der Fälle handelt es sich um eine Neoplasie, die sich aus B-Zellen entwickelt hat. 15% bis 20% der Non-Hodgkin-Lymphome sind T-Zell-Ursprungs. Sie können nodal, extranodal und leukämisch auftreten [2].

Die altersstandardisierte¹ Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland belief sich im Jahr 2004 auf 6800 Männer und 6100 Frauen. Betroffen waren vor allem die höheren Altersgruppen (über 70 Jahre). Das mittlere Erkrankungsalter lag im Jahr 2004 bei Frauen bei 70 Jahren und bei Männern bei 65 Jahren. Die ebenfalls im Jahr 2004 ermittelten mittleren 5-Jahres-Überlebensraten in Deutschland lagen bei 66% für Frauen und 62% für Männer [4].

Die Genese von Non-Hodgkin-Lymphomen wird auf mehreren Ebenen der physiologischen Immunantwort vermutet. Transformierende Mutationen können bereits während der B-Zell Entwicklung im Knochenmark auftreten. Die hier stattfindende Immunglobulin-Gen-Umlagerung geht mit DNA-Strangbrüchen und

¹ Standardisierung der Altersstruktur der Bezugsbevölkerung mit einer Standardbevölkerung [3. *Indikatorenkatalog zum Hessischen Gesundheitsbericht 2001*. Forschungs- und Entwicklungsgesellschaft Hessen; Hessisches Sozialministerium: Wiesbaden.]

Reparaturvorgängen einher, die chromosomale Translokationen in Non-Hodgkin-Lymphomen zur Folge haben können [5]. Daneben ist auch das Keimzentrum ein bevorzugter Ort der Genese von Lymphomen. Hier kommt es zu Immunglobulin-Klassenwechseln von IgM zu IgG, IgA oder IgE und somatischer Hypermutation, die Veränderungen der variablen Region des B-Zell Rezeptors bedingt. Diese Veränderungen führen zu Modifikationen der B-Zell DNA und sind somit auch Ursache für Schäden, die neoplastische Veränderungen hervorrufen können [5].

1.3 Einteilungen

Zahlreiche Kategorisierungssysteme für Lymphome kamen in den letzten Jahren zur Anwendung. Als beispielhaft für eine Einteilung, die im europäischen Raum bis zur Einführung der WHO (World Health Organisation) – Klassifikation 2001 gültig war, ist die Kiel-Klassifikation zu nennen. Diese berücksichtigt Lymphome, die vom Lymphknoten ausgehen. Sie teilt in B- und T-Zell Lymphome ein und kategorisiert nach hoch und niedrig malignen Neoplasien. Dabei werden niedrig maligne Lymphome mit geringer Proliferationsrate als „zytisch“, reifzellig bezeichnet und hochmaligne Lymphome mit hoher Proliferationsrate als „blastär“ [6].

Um eine einheitliche, dem Stand des Wissens entsprechende, Klassifizierung maligner Lymphome zu entwerfen, die sowohl in Europa als auch in Amerika standardmäßig genutzt werden kann, wurde 1994 die REAL-Klassifikation (Revised European American Lymphoma Classification) - basierend auf der Kiel-Klassifikation - eingeführt. Eine Grundlage dieser Klassifikation ist die Immunhistochemie. Außerdem werden der klinische Verlauf und die Lokalisation eines Tumors mit bewertet [7].

Seit 2001 erfolgt die Einteilung dieser Erkrankungen nach der WHO-Klassifikation. Diese berücksichtigt neben histopathologischen und immunhistochemischen Eigenschaften der Lymphome auch molekulargenetische Daten [8]. In der aktuellen Klassifikation von 2008 wurden Grauzonen als provisorische Entitäten eingefügt [9].

Zu den Non-Hodgkin Lymphomen gehört das Burkitt Lymphom (BL) und das Diffus großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL).

1.4 Das Burkitt Lymphom

Eines der aggressivsten B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome ist das Burkitt Lymphom. Es wurde nach einem irischen Chirurgen Denis Burkitt benannt, der symmetrische Schwellungen der Ober- und Unterkiefer bei Kindern in Afrika beschrieb [10].

Das Burkitt Lymphom ist eine maligne Proliferation von B-Zellen, deren Ursprung im Keimzentrum vermutet wird [11].

Die WHO Klassifikation in ihrer Fassung von 2008 beschreibt drei klinische Varianten dieses Tumors: Endemisch, sporadisch und immundefizienz-assoziiert [9].

Das endemische Burkitt Lymphom tritt gehäuft in Gebieten Afrikas auf, in denen auch die Malaria-Erkrankung vermehrt zu finden ist. Kinder im Alter zwischen 4 und 7 Jahren sind typischerweise betroffen.

Das sporadische Burkitt Lymphom tritt ohne bekannte geografische Präferenz auf. Es ist ein seltener Tumor, der in Westeuropa und den USA 1% bis 2% der Lymphomerkrankungen ausmacht. Häufig sind Kinder und junge Erwachsene betroffen. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 30 Jahre.

Immundefizienz-assoziierte Burkitt Lymphome treten im Zusammenhang mit HIV-Erkrankungen auf. Hierbei stellen sie häufig eine Erstmanifestation von AIDS dar [9].

Obwohl die erwähnten Lymphom-Subentitäten histologisch ähnlich sind, ist die klinische Präsentation unterschiedlich - abhängig von der jeweiligen klinischen Variante dieses Tumors.

In endemischen Gebieten kommt es häufig zu Manifestationen im Bereich des Gesichtsschädels. Eine Assoziation mit einer Epstein-Barr-Virus (EBV) Infektion wird ebenfalls beobachtet. Man geht davon aus, dass ein Zusammenhang zwischen der Dysregulation des Immunsystems und der mikrobiellen Erkrankungssituation besteht.

Die sporadische Form tritt bevorzugt im lymphatischen Gewebe des Darmes und des oberen Respirationstraktes auf. Eine Assoziation mit dem Epstein-Barr-Virus lässt sich hier nur in einem Drittel der Fälle nachweisen [12].

Das Burkitt Lymphom ist ein aggressives Non-Hodgkin-Lymphom. Anhand eines Falles aus dem Archiv des Dr. Senckenbergischen Instituts für Pathologie sollen

nachfolgend morphologische und immunhistochemische Eigenschaften dieses Tumors dargestellt werden.

Die Bilder 1 bis 12 wurden mit einem Scanner aufgenommen (ScanScope XT™, Aperio, Vista, California, USA).

Histologisch präsentiert sich das BL mit dem sprichwörtlichen Bild eines Sternenhimmels. Häufig zeigen sich die mittelgroßen Tumorzellen (im Vergleich mit der Größe von Histiozyten) als rasenartiges Proliferat, das die Lymphknotenarchitektur zerstört. Die Zellen wachsen häufig kohäsiv und weisen ein basophiles Zytoplasma, teils mit Vakuolen, auf. Ihre Kerne sind rund und besitzen Nukleoli [9]. Ihre Beurteilung gelingt mit Hilfe der Giemsa-Färbung (Abbildung 1 und 2).

Immunhistochemisch exprimieren die Tumorzellen u.a. CD20 (Abbildung 3), CD10 (Abbildung 4) und Ki-67 (Abbildung 5). Die Abbildungen bestätigen die Angaben in [9]. CD20 ist ein Oberflächenmarker, der auf B-Zellen exprimiert wird [13]. CD10 ist ein Marker für unreife B-Zellen [14]. Ki-67, als Marker für die Proliferation [15], ist in mehr als 95% der Tumorzellen positiv. Die Zellen sind meistens negativ für bcl-2 (Abbildung 6). Bcl-2 ist ein Protein, das den programmierten Zelltod blockiert [16].

In circa 80% der Burkitt Lymphome liegt eine myc-Translokation als Folge von somatischer Hypermutation vor [17]. Hierbei kommt es zu Bruchpunkten am 3'- beziehungsweise 5'-Ende des myc Gens auf Chromosom 8 und nachfolgender Translokation zum Immunglobulin-Schwerkettenloкус (t(8;14)), zum κ -Leichtketten-Gen (t(8;2)) oder zum λ -Leichtketten-Gen (t(8;22)). Eine myc-Translokation ((t(8;14))) lässt sich u.a. durch eine chromogene in situ Hybridisierung (CISH) lichtmikroskopisch darstellen. Hierbei erkennt man entweder ein rot-blaues Mischsignal oder zwei separate Signale als Hinweis auf einen Bruchpunkt. Exemplarisch werden die Bruchpunkte mit einem Pfeil markiert (Abbildung 7).

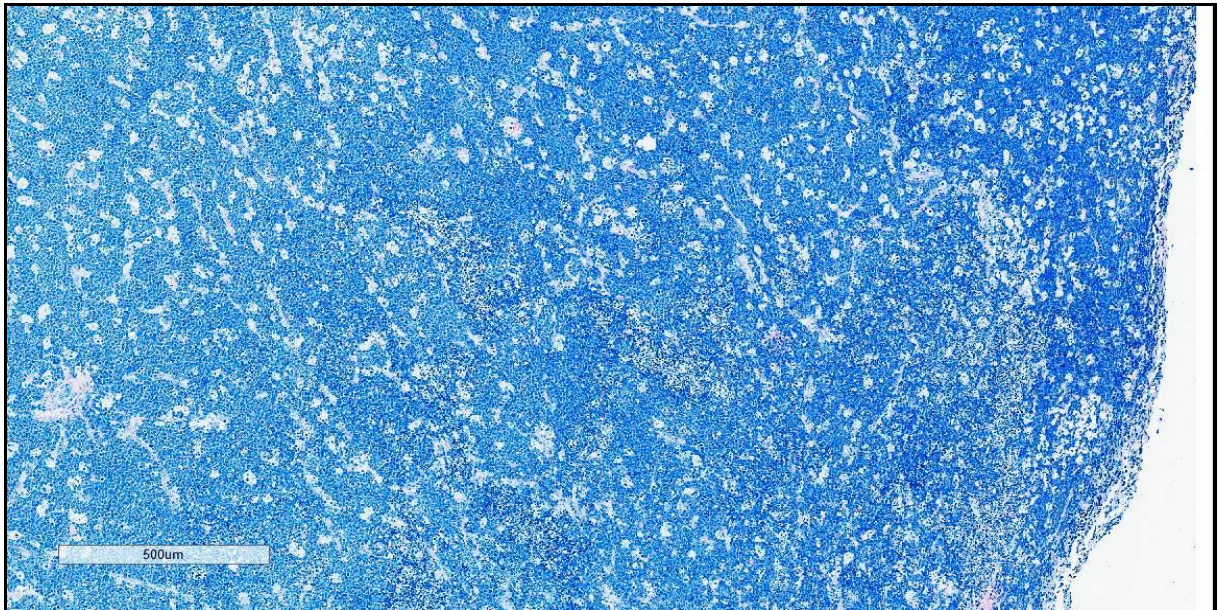


Abbildung 1: Burkitt Lymphom, Giemsa, Vergrößerung 40x

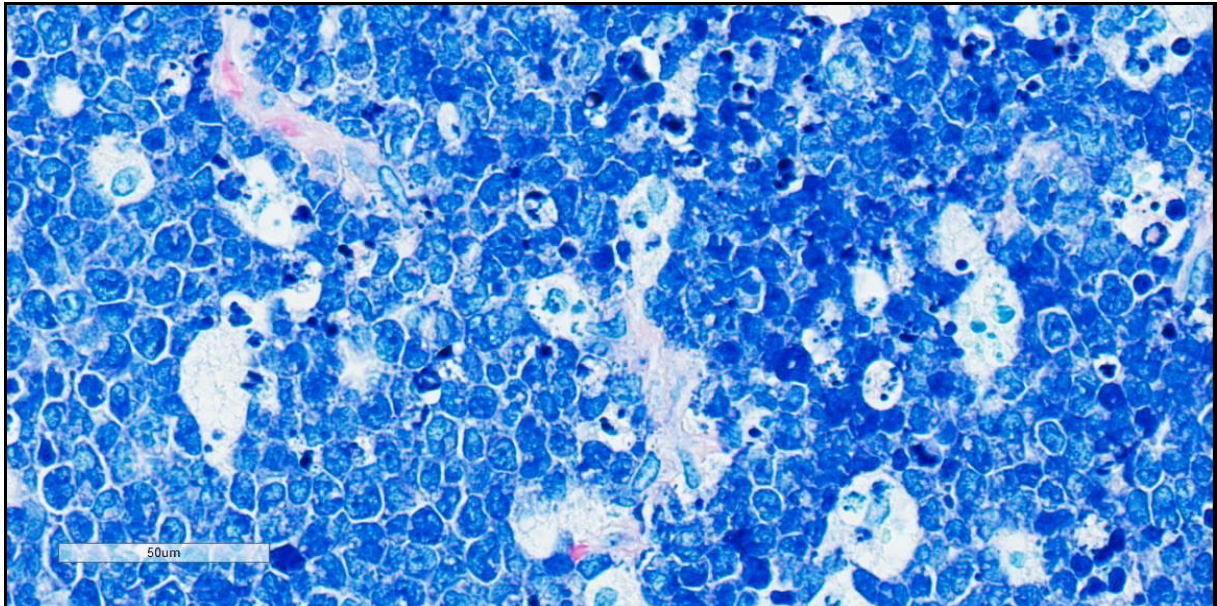


Abbildung 2: Burkitt Lymphom, Giemsa, Vergrößerung 400x

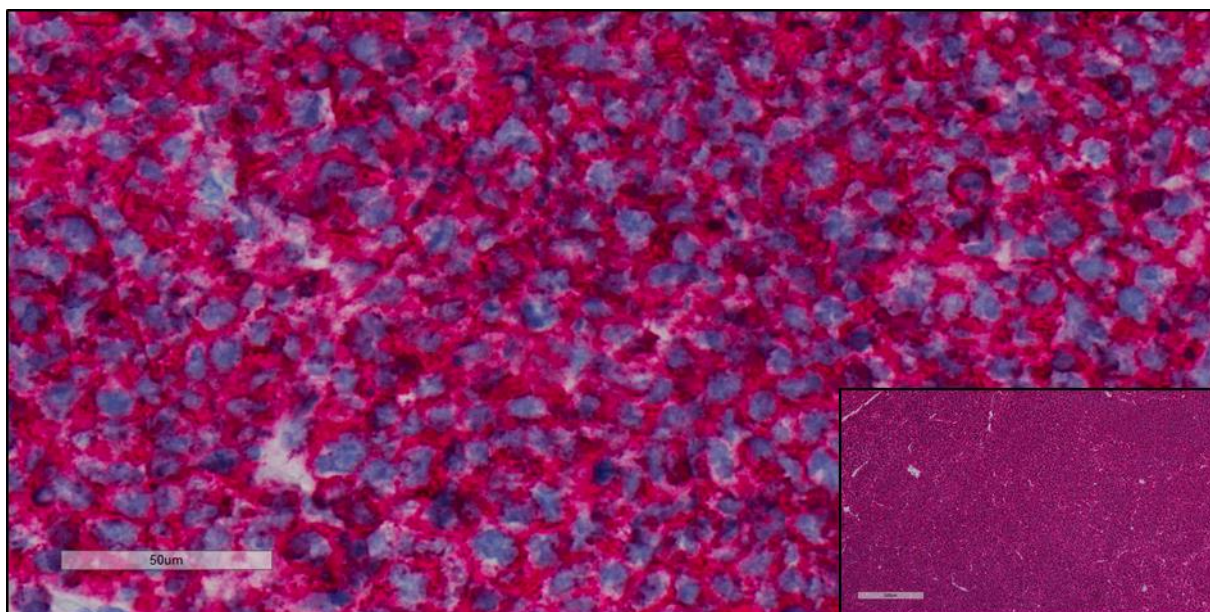


Abbildung 3: Burkitt Lymphom, CD20, Vergrößerung 400x, Übersicht

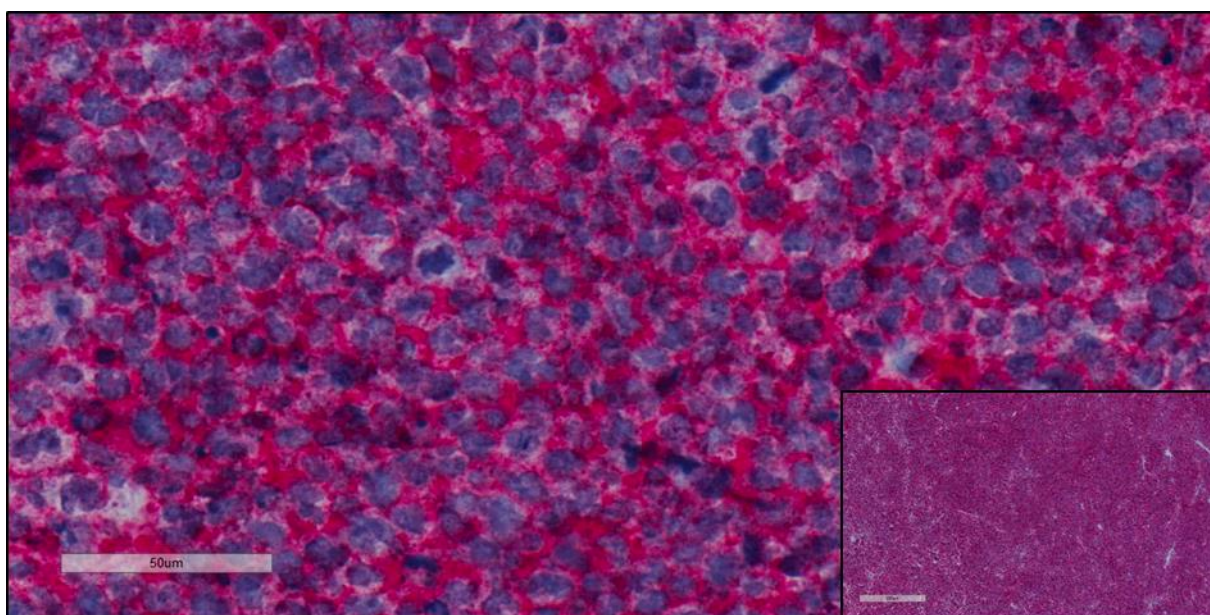


Abbildung 4: Burkitt Lymphom, CD10, Vergrößerung 400x, Übersicht

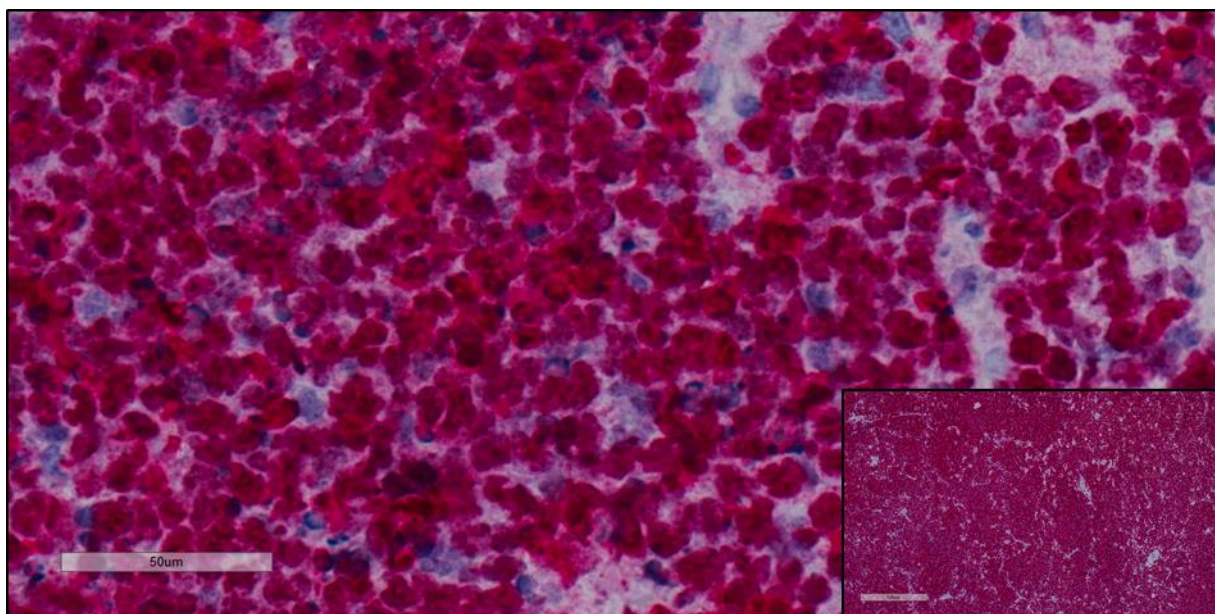


Abbildung 5: Burkitt Lymphom, Ki67, Vergrößerung 400x, Übersicht

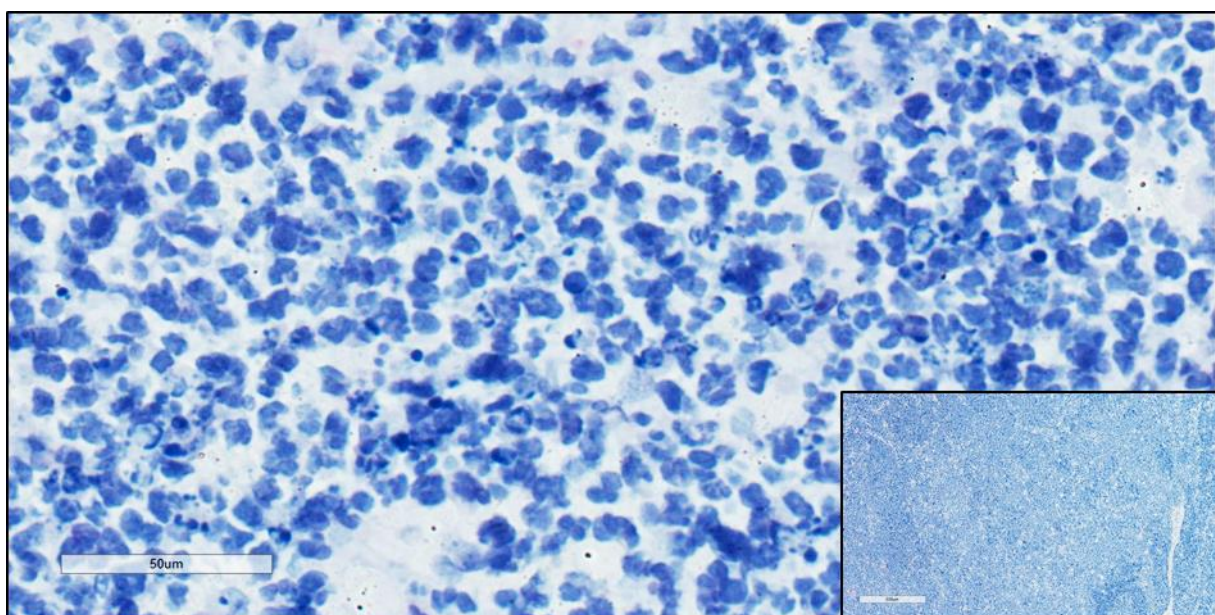


Abbildung 6: Burkitt Lymphom, Bcl-2, Vergrößerung 400x, Übersicht

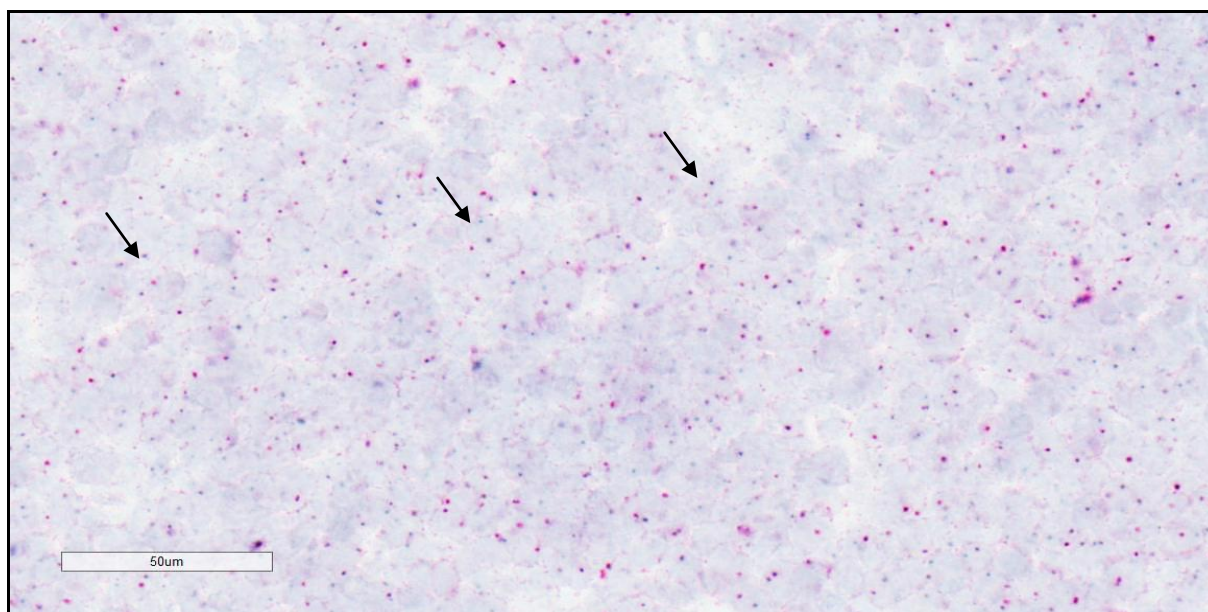


Abbildung 7: Burkitt Lymphom, myc CISH, Vergrößerung 400x

1.5 Das Diffus großzellige B-Zell Lymphom

Das DLBCL gehört zu den reifzelligem lymphatischen Neoplasien. Es stellt 25% bis 30% der Non-Hodgkin Lymphome Erwachsener in westlichen Ländern dar. Es ist eine Erkrankung, die gehäuft in der 7. Lebensdekade auftritt [9].

Eine Eingruppierung in Subentitäten, u. a. an Hand von morphologischen und immunhistochemischen Eigenschaften, ist möglich. Diffus großzellige B-Zell Lymphome sind biologisch und klinisch heterogen. Auch hier können Translokationen, die das myc-Gen involvieren, auftreten [18].

Auch die Lokalisation von DLBCLs stellt ein Differenzierungskriterium dar. So wird u. a. zwischen primären mediastinalen großzelligem B-Zell Lymphomen, großzelligem Lymphomen des zentralen Nervensystems sowie primär kutanen großzelligem B-Zell Lymphomen des Bein-Typs unterschieden [9]. Die Mehrzahl der Fälle von DLBCLs wird nicht weiter spezifiziert - als (NOS) bezeichnet [19].

Durch Genexpressionsuntersuchungen von DLBCLs ist es gelungen, zwei molekulare Subtypen zu definieren: den Keimzentrums B-Zell- (GCB) und den aktivierten B-Zell (ABC)- Subtyp. Diese weisen neben Genexpressionsunterschieden auch verschiedene Signalwege und ein differierendes klinisches Outcome auf [20]. Eine immunhistochemische Differenzierung wird in der täglichen klinischen Praxis auf

Grund von mangelnder Reproduzierbarkeit bei Abwesenheit von Genexpressionsuntersuchungen von der WHO nicht verlangt [19].

Beispielhaft wird ein DLBCL, plasmoblastische Variante, in den nachfolgenden Abbildungen morphologisch und immunhistochemisch dargestellt. Auch hier wird die Lymphknotenarchitektur durch die Tumorzellen zerstört. Eine Giemsa Färbung dient der Beurteilung der Tumorzellen (Abbildung 8 und 9). Die Tumorzellen exprimieren CD20 (Abbildung 10). Die Expression von CD10 variiert (Abbildung 11). Ebenso variiert die Proliferationsfraktion, die mit Ki67 darstellbar ist (Abbildung 12).

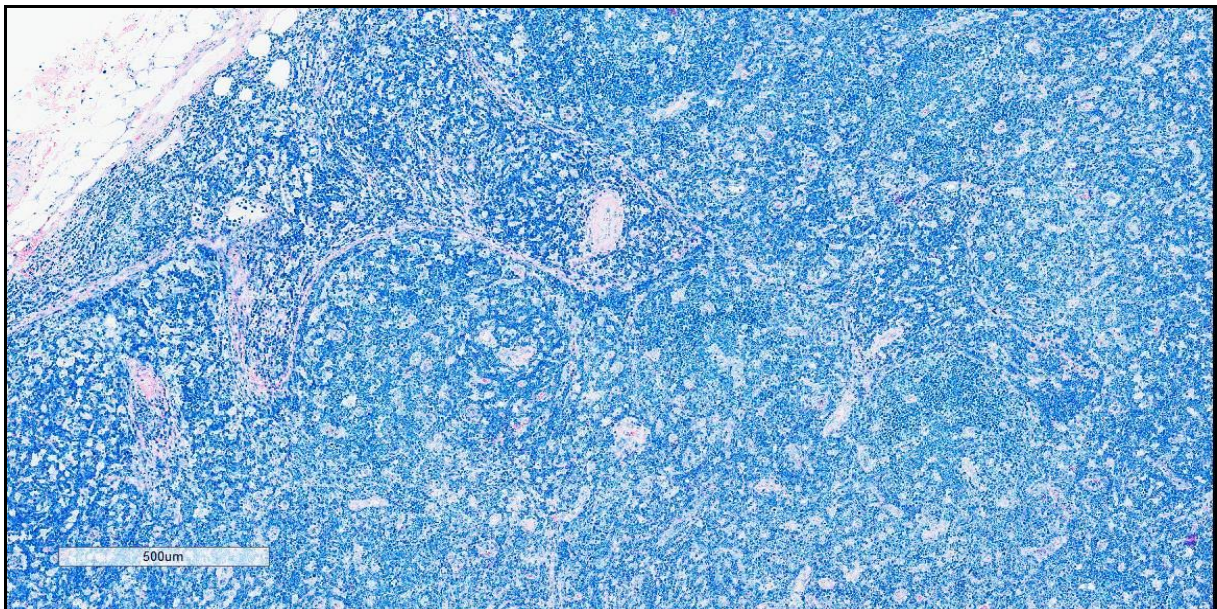


Abbildung 8: DLBCL, Giemsa, Vergrößerung 40 x

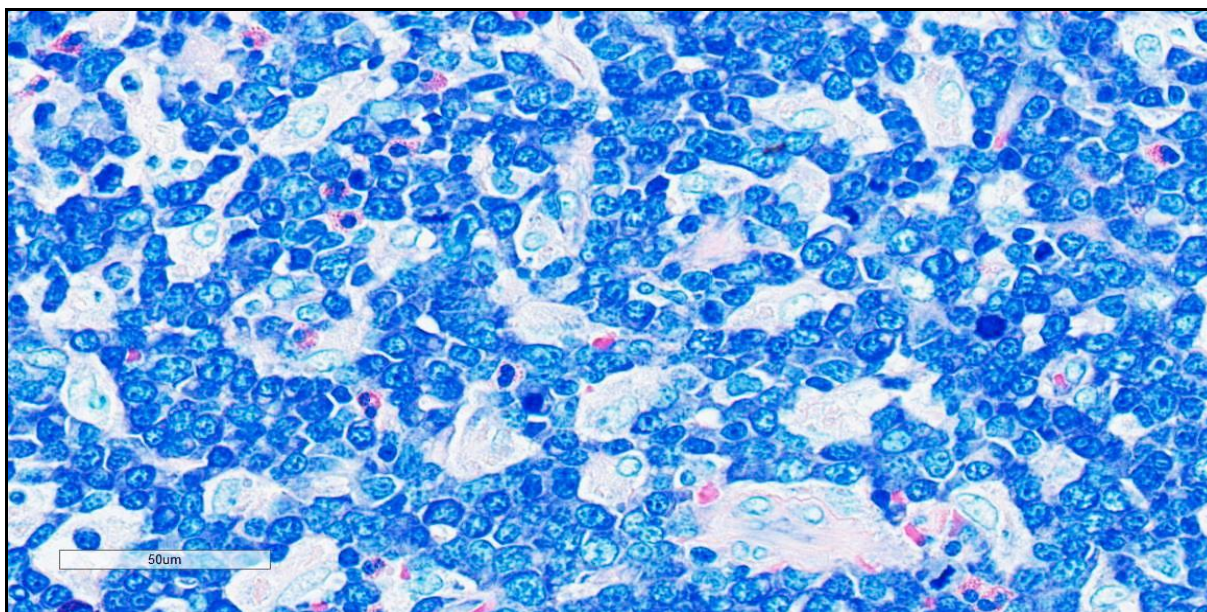


Abbildung 9: DLBCL, Giemsa, Vergrößerung 400 x

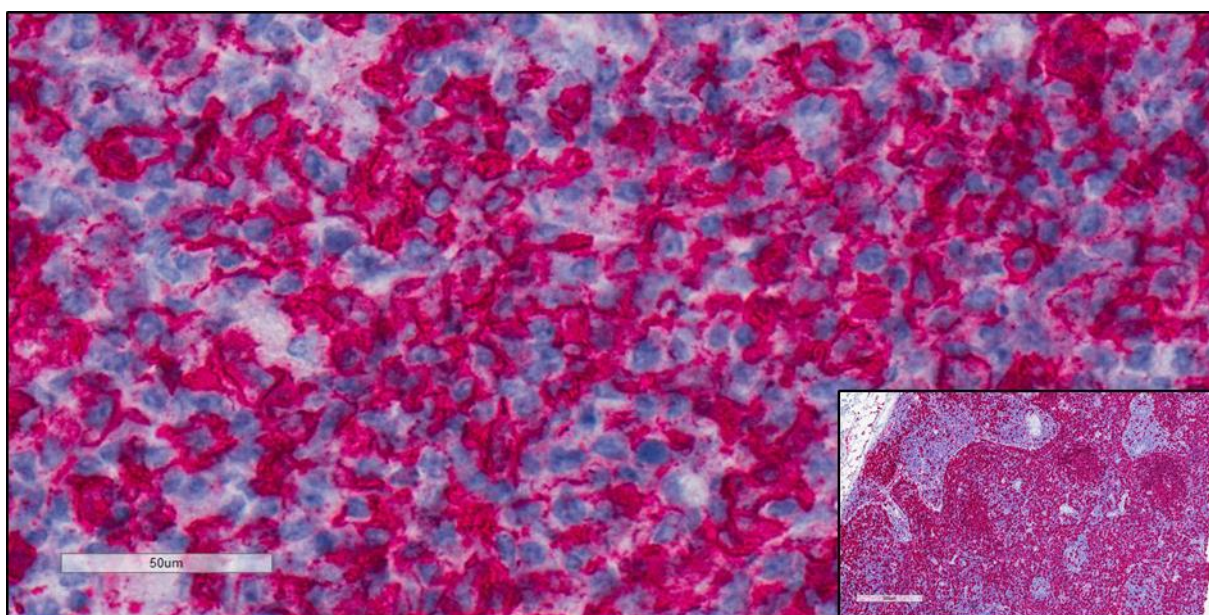


Abbildung 10: DLBCL, CD20, Vergrößerung 400 x, Übersicht

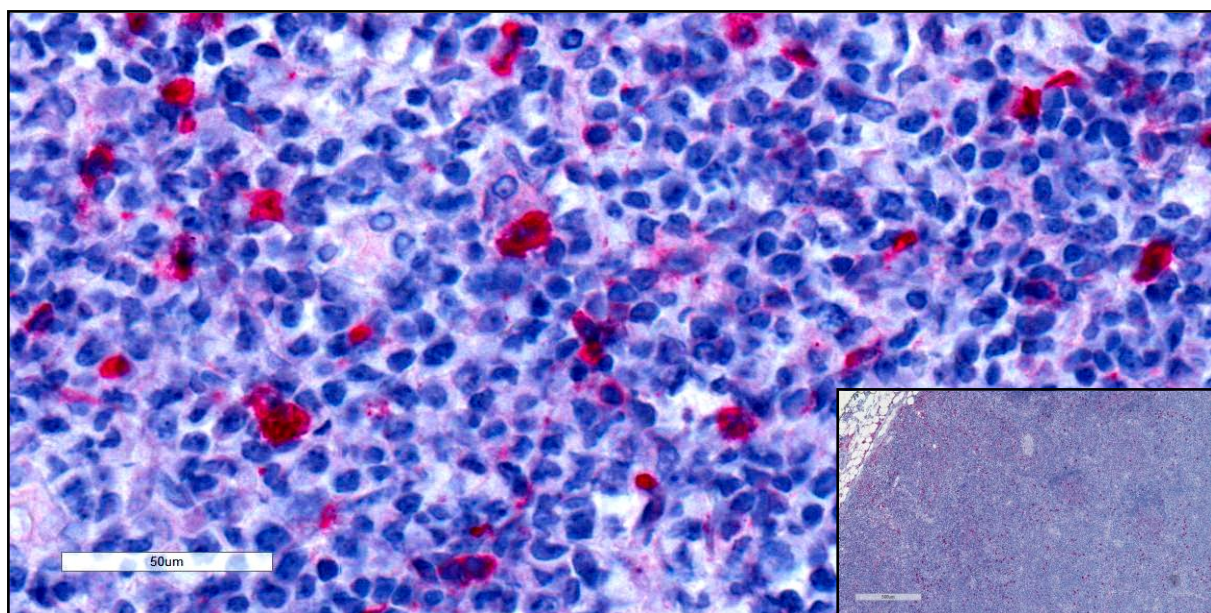


Abbildung 11: DLBCL, CD10, Vergrößerung 400 x, Übersicht

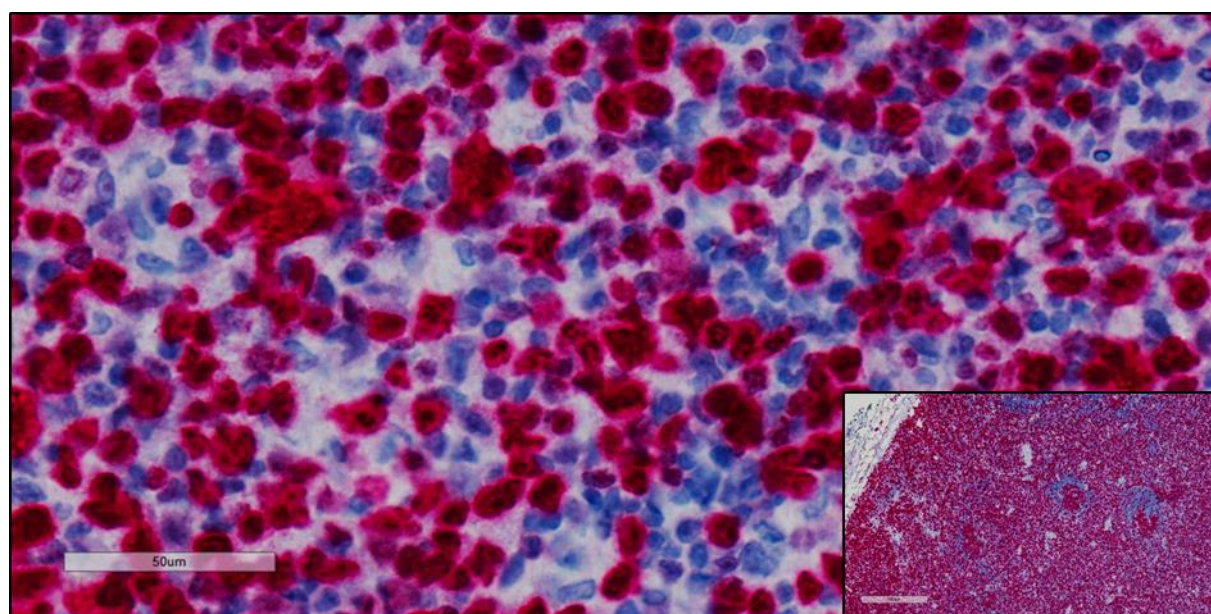


Abbildung 12: DLBCL, Ki67, Vergrößerung 400 x, Übersicht

1.6 B-Zell Lymphom, nicht klassifizierbar, intermediär zwischen Diffus großzelligem B-Zell Lymphom und Burkitt Lymphom

Zwischen Burkitt Lymphomen und DLBCLs gibt es heute noch nicht exakt definierbare Arten, in denen eine sichere Differenzierung zwischen beiden Entitäten mit morphologischen und immunhistochemischen Mitteln nicht gegeben ist [9, 18, 19, 21]. Zur Differenzierung dieser Entitäten wurden Genexpressionsanalysen

durchgeführt [18, 22]. Hierbei wurden Fälle identifiziert, die Eigenschaften beider Entitäten aufweisen können und zumeist einen komplexen Karyotyp besitzen. Gleichzeitig konnte hierbei eine burkitt-spezifische Gensignatur generiert werden.

In der WHO Klassifikation von 2008 werden diese Lymphome einer intermediären Gruppe zugeordnet, die keine eigene Entität darstellt [19].

Es handelt sich hierbei um seltene Lymphome mit einem Keimzentrumsphänotyp, myc-Translokationen und einer hohen Proliferationsrate neben z.B. einer BCL2 Expression, was für Burkitt Lymphome nicht typisch ist [9]. Es sind molekulare Untersuchungen erforderlich, die eine Differenzierung für den klinischen Gebrauch praktikabel gestalten. In diesem Zusammenhang wurden bereits Genexpressionsanalysen zur molekularen Definition des BL durchgeführt [18, 22]. Limitierend bei diesen Untersuchungen ist die Notwendigkeit des Vorhandenseins von kryo-konserviertem Gewebe. In dieser Arbeit soll daher ein Klassifikator erstellt werden, der an formalinfixiertem, in Paraffin eingebetteten (FFPE)-Gewebe anwendbar ist und somit eine Unterstützung in der Differenzierung morphologisch und immunhistochemisch herausfordernder Fälle darstellt.

1.7 Genchip-Klassifikator

Das Konsortium Molekulare Mechanismen der Malignen Lymphome (MMML) ist ein Verbund aus Grundlagenwissenschaftlern, Klinikern und Pathologen, gefördert durch die Deutsche Krebshilfe. Eine Aufgabe dieses Konsortiums ist die Generierung einer Verbunddatenbank genetischer Daten von Lymphomen. In diesem Zusammenhang wurden an 220 Fällen reifzelliger aggressiver B-Zell Lymphome Genexpressionsanalysen sowie eine Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen [18] war es, eine molekulare Definition des Burkitt Lymphoms sowie eine weitere Subkategorisierung des Diffus großzelligen B-Zell Lymphoms vorzunehmen. Hierfür wurde aus kryo-konserviertem Gewebe RNA extrahiert und mit Genchips prozessiert. Auf dieser Grundlage wurde die Expression von ca. 33000 Genen der Proben bestimmt.

Unter den Proben fanden sich, nach einer Paneldiagnostik durch die beteiligten Pathologen, acht Fälle, die alle Kriterien eines Burkitt Lymphoms gemäß den WHO-Kriterien aufwiesen. Diese wurden als Kerngruppe („core-group“) bezeichnet.

Durch einen überwachten Klassifizierungsalgorithmus („core-group extension“) wurden weitere Fälle erkannt, die ein ähnliches Genexpressionsprofil aufweisen. Es wurden 58 Gene errechnet, deren Expression die molekulare Signatur eines Burkitt Lymphoms bilden. Zusätzlich dazu wurde jedem Fall ein Wert zwischen null und eins zugeordnet. Fälle mit einem Wert von über 0,95 wurden als molekulares Burkitt Lymphom (mBL) klassifiziert, wohingegen Fälle mit einem Wert von unter 0,05 als nicht molekulares Burkitt Lymphom (non-mBL) kategorisiert wurden. Die verbleibenden Fälle wurden als „intermediate“ bezeichnet und bilden eine Übergangsgruppe zwischen mBL und non-mBL.

Die mBL-Fälle weisen eine heterogene Morphologie auf. Hier wurden auch Fälle eingruppiert, die im Rahmen von Experten Panel Sitzungen von Hämatopathologen als diffus großzellig diagnostiziert worden waren [18].

Die Anwendung des Genchip-Klassifikators erfordert die Nutzung kryo-konservierten Gewebes. Dieses steht nur begrenzt zur Verfügung. In den Archiven der Pathologien weltweit existiert dagegen eine große Anzahl von Paraffinblöcken. Die Lagerung von Gewebeproben in Paraffin ist die gebräuchlichste Methode der Archivierung. Eine Möglichkeit, dieses Material für Genexpressionsanalysen zu benutzen, ist die quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qPCR), die eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR (Polymerase Kettenreaktion) darstellt [23].

1.8 qPCR

Die qPCR ist limitiert auf einzelne Gene. Klinisch finden qPCR Assays ihren Einsatz bei der Diagnose und prognostischen Einschätzung von Erkrankungen sowie der Verlaufsbeobachtung einer Krankheit, in der Transplantationsmedizin und der Detektion von Pathogenen [24].

Eine Herausforderung für die vorliegenden Untersuchungen stellt die Extraktion qualitativ ausreichender Ribonukleinsäure (RNA) dar. Durch die Ischämiezeit nach der Entnahme sowie der Fixierung des Gewebes in Formalin kommt es zur Degradierung der RNA. Dies führt zur Ausbildung von Verbindungen zwischen Ribonukleinsäure und Proteinen sowie zum Anhang von Monomethylol. Diese Modifikationen können derzeit nur teilweise entfernt werden [25-28].

Für die nachfolgende qPCR muss die RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden. Hierfür wird mittels eines u.a. aus Primern und Nukleinsäuren bestehenden Gemisches ein komplementärer Strang synthetisiert. Dieser ist Ausgangspunkt für die nachfolgende qPCR. Hierfür können bereits produkt-spezifische Primer verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Random hexamer Primer genutzt, da mit diesen ein breites Spektrum an Sequenzen transkribiert werden kann. Diese Erststrangsynthese kann mit kommerziell erwerbbaaren Kits erfolgen.

Anschließend folgt die eigentliche PCR. Hier werden spezielle Primer in einer enzymatisch unterstützten Reaktion eingesetzt, die eine Vervielfältigung des anvisierten Gens in Zyklen, bestehend aus Erwärmung und Abkühlung des Reaktionsansatzes, bedingen. Die Vermehrung des Produktes kann bei der Real Time PCR in Echtzeit begutachtet werden. Sie stellt somit eine Weiterentwicklung der End-Point PCR dar, bei der das nachfolgende Produkt mittels eines Agarosegels bezüglich seiner Länge analysiert wird. Anschließend ist eine Schmelzpunktanalyse durchzuführen, bei der durch die schrittweise Erwärmung des PCR-Produktes eine Schmelzkurve bestimmt werden kann, Hiermit wird geprüft, ob es sich um ein spezifisches Produkt handelt (Abbildung 13).

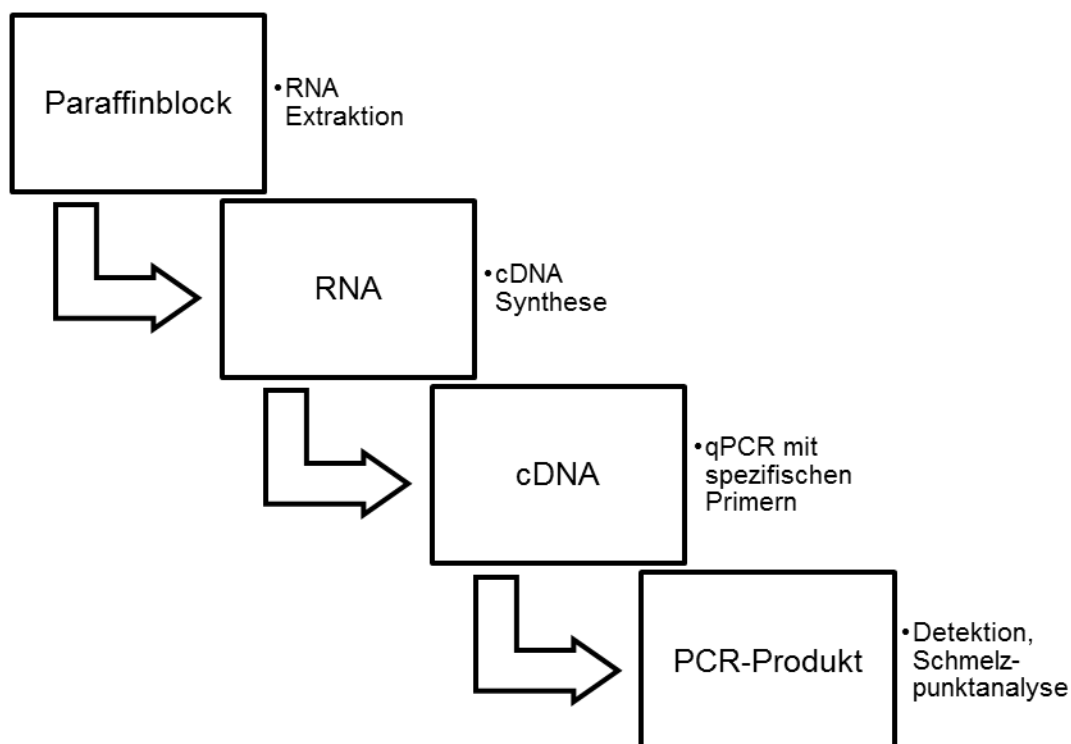


Abbildung 13: Fluss-Diagramm qPCR beginnend vom Paraffinblock bis hin zur Detektion des Produktes.

Gebräuchlich für die qPCR sind zwei Detektionssysteme: TaqMan[®] und das kostengünstigere SYBR[®] Green I.

TaqMan benötigt als Grundlage eine fluoreszenz-markierte Sonde neben den beiden Primern.

SYBR[®] Green I ist ein Farbstoff, der doppelsträngige DNA detektiert.

Im Lauf eines Zyklus wird doppelsträngige cDNA durch Erwärmung separiert (Denaturierungsphase). In der darauffolgenden Annealingphase werden spezifische Primer angelagert. In der anschließenden Extensionsphase werden Nukleotide angelagert, um den Strang zu verlängern. An die hierbei entstehende doppelsträngige DNA lagert sich der Farbstoff an und fluoresziert. Die Zunahme des Reaktionsproduktes führt demzufolge zu einer Zunahme an detektierbarer Fluoreszenz, die am Ende eines Zyklus gemessen wird. Ob es sich hierbei um ein spezifisches Reaktionsprodukt oder um Primer Dimere handelt, wird mit der anschließenden Schmelzpunktanalyse getestet (Abbildung 14, modifiziert nach [29]).

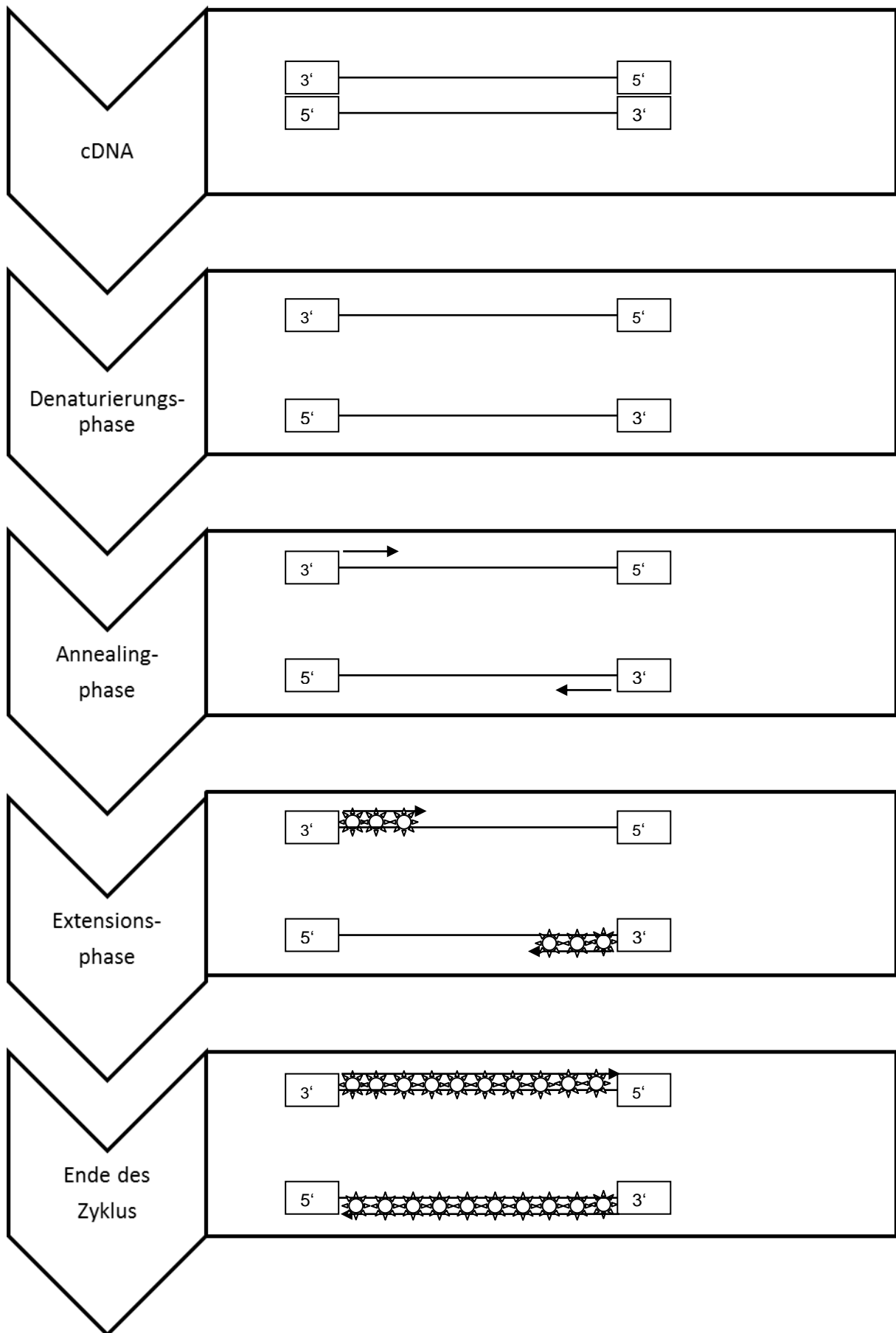


Abbildung 14: Ein Zyklus der qPCR (modifiziert nach [29])

1.9 Ziel

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit ist der mBL Klassifikator (Genchip-Klassifikator), der auf Grund von Genchipdaten anhand von kryo-konserviertem Gewebe generiert wurde [18]. Der Klassifikator besteht aus 58 Genen. In der Arbeitsgruppe (AG) Spang (Regensburg) wurden diese Gene erneut einem Ranking unterzogen [30]. Hierbei wurden Sets von Genen generiert, die robust mBL-Fälle von non-mBL Fällen diskriminieren. Die begrenzte Anzahl kryo-konservierter Gewebeproben und die sich daraus ergebende geringe Anzahl auswertbarer Daten ist Anlass dafür, Untersuchungen mit dem Ziel vorzunehmen, Informationen aus den in Paraffin gelagerten Gewebeproben zu generieren. Mit Hilfe der qPCR sollen Gene an FFPE-Gewebe nachgewiesen werden. Auf dieser Basis ist ein qPCR-Klassifikator zu erarbeiten. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind zu vergleichen mit dem bekannten Genchip-Klassifikator. Es ist zu prüfen, ob der Genchip-Klassifikator auf in Paraffin archiviertem Material angewendet werden kann. Der zu erarbeitende qPCR-Klassifikator kann im Rahmen retrospektiver Analysen sowie zur Unterstützung der Diagnostik genutzt werden.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Ziele:

1. Austestung verschiedener Methoden der RNA Extraktion aus Paraffinmaterial, um optimale Ausgangsbedingungen für die qPCR zu schaffen.
2. Generierung von Primern für vorgegebene Gene, die robust an Paraffinmaterial funktionieren.
3. qPCR Untersuchungen an Probenmaterial, das bereits mit dem bestehenden mBL Klassifikator analysiert wurde und von dem somit kryo-konserviertes Gewebe und FFPE-Gewebe vorhanden ist.
4. Statistische Auswertung der Untersuchungen in Zusammenarbeit mit der AG Spang aus Regensburg, die den mBL Klassifikator, der auf Grund von Genchipdaten generiert wurde, auf die Messergebnisse der qPCR überträgt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Verbrauchsmaterial (Tabelle 1), Chemikalien (Tabelle 2), Kits (Tabelle 3), Geräte (Tabelle 4) Software (Tabelle 5) werden nachfolgend tabellarisch aufgelistet.

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Reaktionsgefäße Safe-Lock (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Destilliertes Wasser, DNase/RNase frei	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Xylol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Guanidinthiocyanat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumzitat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sarkosyl	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Proteinase K (20mg/ml in H ₂ O)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Natriumacetat pH 7,2	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phenol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Chlorophorm	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glykogen	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Tabelle 3: Kits

Kit	Hersteller
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
PureLink™ FFPE Total RNA Isolation Kit	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
RNeasy® FFPE Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
High Pure FFPE RNA Micro Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
First strand cDNA-Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent, Böblingen, Deutschland

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Hersteller
ABI Prism 7900HT Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA USA
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
NanoDrop ND1000 UV/VIS Spektralphotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe KS	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau, Deutschland
TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Schüttler MS 2	IKA®, Staufen, Deutschland

Tabelle 5: Software

Software	Hersteller/Publication
Relative Expression Software Tool (REST)	[31]
Sequence Detection System (SDS) Software	Applied Biosystems, Foster City, CA USA
Primer 3	[32]
Eurofins MWG Operon online PCR primer design tool	Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland
Primer Express®	Applied Biosystems, Foster City, CA USA
2100 Expert Software	Agilent, Böblingen, Deutschland
BLAST®	[33]

2.2 Fallauswahl

Die Fallauswahl erfolgte gemeinsam mit den Vertretern des Instituts für medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) in Leipzig. Grundlage war ein Kollektiv von Fällen, die im MMML-Verbund registriert sind. Bekannt sind von diesen u.a. eine referenzpathologisch gestellte Diagnose, eine molekulare Diagnose, die mittels Genchip Technologie erstellt wurde, sowie weitere Daten bezüglich der klinischen Behandlung der Patienten und der Überlebensrate. Es wurden nur die Proben integriert, bei denen es sich um eine Erstdiagnose handelte, eine Vortherapie nicht erfolgt und eine HIV-Infektion nicht bekannt war.

Publikationen auf Grund dieser Kohorte sind bereits vorhanden [18, 34, 35].

Weiterhin war die Verfügbarkeit von kryo-konserviertem und FFPE-Material von demselben Fall als wichtiges Einschlußkriterium zu beachten.

Untersucht wurden 116 Fälle. Diese wurden molekularpathologisch mit dem bereits beschriebenen Algorithmus (vgl. 1.7) in die Kategorien mBL, non-mBL und intermediate eingeteilt. Zur Verfügung standen 15 mBL, 26 intermediate und 75 non-mBL - Fälle. Eine referenzpathologische Diagnose ist zu allen Fällen bekannt und wurde durch ein Panel von Hämatopathologen gestellt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Referenzpathologische Diagnosen der mBL, intermediate und non-mBL Fälle

Paneldiagnose	mBL	inter- mediate	non-mBL	Summe
BL, atypisch (Burkitt-like)	5	1		6
BL, sporadisch	6			6
B-Zell Lymphom, hochmaligne	1			1
DLBCL	1	3	15	19
DLBCL, anaplastisch			1	1
DLBCL, immunoblastisch		3	3	6
DLBCL, plasmoblastisch		1	1	2
DLBCL, T-Zell reich			1	1
DLBCL, zentroblastisch	2	17	53	72
Follikuläres Lymphom, Grad 3			1	1
Follikuläres Lymphom, Grad 3b		1		1
Summe	15	26	75	116

Ein Ethikvotum für die durchzuführenden Untersuchungen wurde im Rahmen des MMML Netzwerkes als Teil der Deutschen Krebshilfe gewährt [18, 34, 35].

Eine Aufstellung ausgewählter Eigenschaften der Proben ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Ausgewählte Eigenschaften der zu untersuchenden Proben

Eigenschaften	mBL	non-mBL	Intermediate	Gesamtergebnis
Geschlecht				
Männlich	12	35	14	61
Weiblich	3	40	12	55
Alter der Patienten (a)				
Mittelwert	28	63	60	58
Min-Max	5 – 63	0 - 89	26 - 80	0 – 89
myc-Status				
IG-MYC	14	3	6	23
non-IG-MYC	0	1	6	7
Negativ	1	70	13	84
nicht bekannt	0	1	1	2
t(14;18)				
Positiv	0	4	8	12
Negativ	14	45	13	72
nicht bekannt	1	26	5	32
ABC/GCB				
ABC	0	30	5	35
GCB	14	27	16	57
nicht bekannt	1	18	5	24
Alter der Probe (a)				
Mittelwert	15	15	17	15
Min-Max	10 – 24	6 – 25	7 - 27	6 – 27

Für Vorversuche und Testung der Extraktionstechnologie wurde Gewebe von Tonsillen genutzt, die dem Archiv des Dr. Senckenbergischen Institutes für Pathologie, Frankfurt am Main entnommen wurden. Hierfür liegt ein lokales Ethikvotum vor.

Histopathologisch wurde eine chronische Tonsillitis diagnostiziert. Eine Infiltration durch Tumoren ist nicht bekannt. Neben der Diagnose stellte die Verfügbarkeit von kryo-konserviertem Material und FFPE-Material ein Hauptauswahlkriterium dar.

2.3 Methoden

2.3.1 Auswahl der Gene

Die Auswahl der zu untersuchenden Gene erfolgte gemeinsam mit Vertretern des Institutes of Functional Genomics, Regensburg. Basierend auf der bereits etablierten molekularen Definition des Burkitt Lymphoms (mBL) [36] wurde von den Vertretern des Instituts ein Set von vier bis acht Genen errechnet, welches die Unterscheidung zwischen mBL und non-mBL erlauben sollte. Zur Anwendung kam ein gewichtetes Ranking, das zu einer Reduktion der 58 ursprünglich vorhandenen Gene (Genchip-Klassifikator) führte [30].

Da ein suffizientes Primer Design nicht bei allen Genen gelang, wurde die Liste der zu untersuchenden Gene abweichend von den bioinformatischen Vorgaben gewählt. Untersucht wurden die Gene ARHGAP25, CD40, CD44, CFLAR, SMARCA4 und SSBP2.

Ein Primerpaar wurde von der weiteren Analyse ausgeschlossen, wenn sich Dimere ausbildeten, ein unspezifisches Produkt amplifizierte oder die Expression so gering war, dass sich ein Threshold Cycle (Ct) von über 40 bei Probetonsillen sowie wenigen ausgewählten Proben des Kollektivs zeigte.

Auf Grund dieser Kriterien wurden untersucht: ARHGAP25, das eine Rolle im Actin remodeling, der Zellpolarität und der Zellmigration spielt [37], CD44, das in der Matrix Adhäsion sowie der Lymphozytenaktivierung involviert ist [38] und CD40, ein Zelloberflächenrezeptor, der zur Tumor necrosis factor R Familie gehört, verantwortlich für die Mediation von Immunreaktionen [39]. Außerdem CFLAR, das eine regulierende Rolle bei der Apoptose spielt [40], SMARCA4 als transkriptioneller Modulator [41] und SSBP2 als einzelsträngiges DNA-bindendes Protein [42].

Die Auswahl des Kontrollgenes wurde an Hand der vorliegenden Genchipdaten durchgeführt. Hierbei wurde die minimale Varianz in der Expression über alle Proben berechnet. Ausgeschlossen wurden jene Gene, deren Expressionshöhe zu gering war. Beta-2 microglobulin (B2M, assoziiert mit dem Major Histocompatibility Komplex

(MHC) Klasse I Schwerketten auf der Oberfläche von nahezu allen kernhaltigen Zellen [43]) stellt sich hierbei als robustes Gen heraus und wurde in den nachfolgenden Analysen berücksichtigt.

2.3.2 Primer

Die Primer wurden mittels Primer 3 [32], Primer Blast, Eurofins MWG Operon's online PCR primer design tool und Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA) ausgewählt. Ein Primerpaar wurde ausgewählt, wenn mindestens zwei der Programme dieses als akzeptabel angegeben haben. Design Guidelines oben genannter Programme wurden befolgt. Jedes Primerpaar wurde separiert durch ein Intron. Eine Blast® [33] Recherche wurde an den Design Prozess angeschlossen. Jeder Primer und jedes Primerpaar wurde auf seine/ihre Spezifität hin untersucht. Das zu generierende Amplikon hatte eine Länge von weniger als 100 Basenpaaren (bp) (Tabelle 8).

Tabelle 8: Primersequenzen und Amplikonlänge

Gen	Vorwärts Primer (5'->3')	Rückwärts Primer (5'->3')	Amplikon Länge
ARHGAP25	AGTACGAAGGGTTCCTGC TCTGTG	GAGCTGCTTCATCAACT CCTGCTG	80
CD44	GACGAGGTCATCAAGCA GGAAGAAG	TGGATTTGCAGTAGGCT GAAGCG	77
CD40	CTGAGAGCCCTGGTGGT GAT	CTTGGCCACCTTTTTGA TAAAGAC	87
CFLAR	CCTAGGAATCTGCCTGAT AATCG	ATAGCCCAGGGAAGTGA AGGT	79
SMARCA4	TGGAGGGCTCCCTGAT	CTGTCATCCTCCTTCTC GATTT	88
SSBP2	TTTCTTAAATCCTTTTCAG AGTGAGAGTT	TTCATGAGGAGACTTGG TAATGGA	82
B2M	TCGCGCTACTCTCTCTTT CTG	TCTCTGCTGGATGACGT GAG	81

2.3.3 RNA-Extraktion

Um den besonderen Anforderungen von in Paraffin eingebettetem Gewebe Rechnung tragen zu können, wurden für die RNA Extraktion vier kommerziell erwerbbar Kits sowie eine der Literatur entnommene Methode - modifizierte Methode nach Chomczyski und Sacchi [44] (nachfolgend als Methode 5 beschrieben) - getestet. FFPE-Material zeigt häufig eine Degradation der extrahierbaren RNA. Diese Veränderungen können nach dem derzeitigen Kenntnisstand nur partiell rückgängig gemacht werden [25-28].

Es kamen zur Anwendung High Pure FFPE RNA Micro Kit (nachfolgend als Methode 1 beschrieben), PureLink™ FFPE Total RNA Isolation Kit (nachfolgend als Methode 2 beschrieben), RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (nachfolgend als Methode 3 beschrieben) und RNeasy® FFPE Kit (nachfolgend als Methode 4 beschrieben).

Die Anweisungen der mitgelieferten Protokolle wurden eingehalten:

Schnitte in der vorgegebenen Menge wurden von vorliegenden Paraffin-Blöcken in ein Reaktionsgefäß überführt. Eine Auflösung des Paraffins erfolgte in Xylol beziehungsweise einem mitgelieferten Puffer (Melting Buffer, Invitrogen). Mittels 100% Ethanol wurden verbliebene Xylol-Rückstände entfernt. Anschließend wurde ein Verdau durchgeführt. Die nachfolgenden Waschschriffe erfolgten durch eine Säulenauftrennung. Jedes der verwendeten Kits beinhaltet einen Verdau mit DNase oder einen ähnlichen Schritt zum Entfernen von DNA (gDNA eliminator spin column, Qiagen). RNA wurde mit RNase und DNase freiem Wasser eluiert.

Zusätzlich hierzu wurde eine modifizierte Methode nach Chomczyski und Sacchi [44] getestet (Methode 5). Dazu wurde eine Denaturierungslösung aus 4M Guanidinthiocyanat, 25mM Natriumzitat, 0,5% Sarkosyl und 0,1M 2-Mercaptoethanol hergestellt. Die Probe wurde darin bei 55°C über Nacht zusammen mit Proteinase K inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe zentrifugiert und das Paraffin, das nun in einer soliden Schicht erschien, entfernt. Anschließend wurde die Probe in einer Lösung aus Natriumacetat pH 7,2, phenolgesättigtem Wasser und Chlorophorm auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase des Produktes mit Glykogen und Isopropanol bei -20°C über Nacht gelagert. Nach

erneuter Zentrifugation wurde das Produkt mit 70% Ethanol gewaschen und mit Wasser eluiert.

2.3.4 Überprüfung der RNA Quantität und Qualität

Die Konzentration der resultierenden RNA wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND 1000 bestimmt. Hierbei wurden jeweils 1,5 µl der Probe unverdünnt bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren), 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) und 230 nm (Absorptionsmaximum für Salze) gemessen. Zur Anwendung wird hier das modifizierte Lambert-Beersche Gesetz (Gleichung 1) gebracht:

$$c = (A * e)/b \quad (1)$$

Hierbei bedeuten

c Konzentration der Nukleinsäuren in ng/µl,

A Absorption in Absorptionseinheiten,

e wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient in ng-cm/µl – für RNA 40ng-cm/µl - und

b Pfadlänge in cm.

Neben der Ermittlung der Konzentration der RNA kann hiermit auch ein Maß für ihre Reinheit errechnet werden. Diese wird angegeben durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm bzw. 260 nm und 230 nm. Erstrebenswert ist ein Wert von ~2 für den Quotienten 260nm/280nm und 1,8 – 2,2 für den Quotienten 260nm/230nm [45].

Die Qualität der RNA wird mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer bestimmt. Dazu wurde nach dem Protokoll für das zu verwendende Agilent RNA 6000 Nano Kit (vgl. Tabelle 3) vorgegangen. Es handelt sich hierbei um ein kapillarelektrophoretisches System. Eine Probe wird mit einem Farbstoff versetzt und gegen eine interne Kontrolle verglichen. Dabei wird eine Probe aufgetrennt auf Chips [46]. Hiermit kann eine RNA Integrity Number (RIN) bestimmt werden. Diese stellt eine Zahl zwischen 1 und 10 dar, wobei 10 intakte RNA und 1 degradierte RNA darstellt [47].

2.3.5 Synthese komplementärer DNA

Komplementäre DNA (cDNA) dient als Ausgangsprodukt zur Durchführung der anschließenden qPCR. Das hierfür benötigte Enzym ist die Reverse Transkriptase. Diese stellt in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Primern komplementäre DNA her.

Um den Voraussetzungen des Ausgangsmaterials gerecht zu werden, wurden drei kommerziell erwerbbar Kits getestet: First strand cDNA-Synthesis Kit for qPCR (AMV), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit und High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (vgl. Tabelle 3). cDNA wurde nach den Maßgaben des jeweils beiliegenden Protokolls synthetisiert. Die hierfür genutzten Primer waren random hexamer Primer. Es handelt sich hierbei um Primer, die aus sechs Basen, die in zufälliger Reihenfolge angeordnet sind, bestehen. Diese Art des Primings verlangt weder das Vorhandensein einer spezifischen Sequenz noch die Anwesenheit eines Poly-A-Schwanzes der RNA. Als Maß für die Qualität der cDNA Synthese dient der Ct-Wert, der in der darauffolgenden qPCR erstellt wird. Die geringsten Werte wurden mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit erzielt (Daten werden nicht gezeigt). Somit wurde dieses Kit für die Untersuchungen verwendet.

Ausgangsmaterial für die cDNA Synthese stellen 5µg RNA dar. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer bestimmt (vgl. 2.3.4)

Eine Kontrollreaktion ohne Reverse Transkriptase (RT) und eine Kontrollreaktion ohne die Zugabe von RNA wurde für jede Probe durchgeführt. Die Qualitätskontrolle dieser Reaktionen ist die nachfolgende qPCR.

2.3.6 qPCR – Allgemeine Vorbemerkungen

Während der qPCR wird ein Fluoreszenz-Signal gemessen, das exponentiell während des PCR-Zyklus zunimmt (vgl. hierzu Abbildung 14). Während der ersten 3 bis 15 Zyklen wird eine Hintergrundfluoreszenzintensität bestimmt. Dieses Level wird als cut-off genutzt, um den Threshold cycle (Ct) für jede Probe zu bestimmen. Dies ist der Zyklus, in dem die Fluoreszenzintensität einer Probe die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Dieser Wert ist proportional zur Menge an Zielsequenz im Reaktionsansatz. Der Unterschied zwischen einer nicht verdünnten Probe und einer zehnfach verdünnten Probe sollte 3,3 betragen [48].

Wird eine Standardgerade benutzt, sollte ihr Anstieg - 3,3 erreichen, wenn man eine 10log-Skala der Verdünnungen anlegt [48]. Hiermit gelingt ebenfalls die Bestimmung der Effizienz eines Assays, die primerpaarabhängig ist. Mit dieser Geraden ist es zudem möglich, die Menge an Zielsequenz in einer unbekanntem Probe zu ermitteln.

Positiv- und Negativproben sind mitzuführen.

Um zu differenzieren, wurde eine no-template Kontrolle auf jeder Platte für jedes Gen durchgeführt. Ein Ct-Wert soll dabei nicht messbar sein.

Weiterhin wurde eine no-RT-Kontrolle auf jeder Platte für jedes Gen mitgeführt, die den gesamten Reaktionsansatz bis auf die Polymerase beinhaltet. Auch hier soll kein Ct-Wert messbar sein.

2.3.7 qPCR-Durchführung

Ausgangsmaterial war die synthetisierte cDNA. Genutzt wurde das ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Abbildung 15) und 96 well plates verschlossen mit MicroAmp® Optical Adhesive Film. Als Template wurden 10ng cDNA pro Assay in einem Reaktionsvolumen von 20µl eingesetzt. Die Primer wurden jeweils in einer Konzentration von 300µM eingesetzt. Die Festlegung der optimalen Primer-Input Konzentration erfolgte auf Grund einer Primer-Matrix.

Als PCR Master Mix wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) verwendet. Sowohl die Proben als auch die Positiv- und Negativkontrollen wurden in Triplikaten untersucht.

Für die PCR wurden Standard-Konditionen für alle Gene genutzt:

50°C für 2 Minuten, 95°C für 15 Minuten gefolgt von 45 Zyklen. Ein Zyklus besteht aus folgendem Ablauf: 95°C für 15 Sekunden, 60°C für 30 Sekunden und 72°C für 30 Sekunden.

Nach diesen 45 Zyklen folgt eine Erwärmung des Reaktionsansatzes auf 95°C. Damit wird eine Schmelzkurve erstellt, um die Spezifität des PCR-Produktes zu dokumentieren. Die Ausgabe der Ct Werte erfolgte mit der Sequence Detection System (SDS) Software.

Um die Effizienz der Assays zu bestimmen, wurden Standardgeraden für alle Assays mit einer Input Konzentration von 100, 10, 1, 0,1 und 0,01ng cDNA einer Probetonsille in Triplikaten (vgl. Tabelle 10) erstellt.



Abbildung 15: 7900HT Sequence Detection System und angeschlossener Rechner

2.3.8 Statistische Auswertung der Ct-Werte

Die ermittelten Ct Werte wurden an die Arbeitsgruppe Spang, Institut für Funktionelle Genomik Biopark I, Regensburg, gesandt. Mittels dieser Daten wurde auf Grund der vorliegenden Genchipdaten und Eingruppierung in die bereits festgelegten Gruppen mBL, intermediate und non-mBL ein qPCR Klassifikator erstellt.

Die Effizienz der Assays wurde mit dem Relative Expression Software Tool (REST) [31], bestimmt. Diese Daten flossen in die Erstellung des qPCR Klassifikators ein.

3 Ergebnisse

3.1 Wahl der RNA-Extraktionsmethode

Die Auswahl der RNA-Extraktionsmethode ist eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der qPCR. Die extrahierte RNA sollte in hoher Konzentration vorliegen, frei von Verunreinigung, z.B. durch Proteine, sein und möglichst lange Fragmente aufweisen. Getestet hierfür wurden vier kommerziell erwerbbar Kits sowie eine der Literatur entlehnte Methode [44]. Als Testmaterial hierfür fungierten zwei Proben aus dem Archiv des Dr. Senckenbergischen Institutes für Pathologie, Frankfurt am Main. Probe 1 wurde im Institut als Burkitt Lymphom diagnostiziert - die andere Probe als Diffus großzelliges B-Zell Lymphom (Probe 2).

Die Extraktion (siehe 2.3.3) erfolgte durch zwei verschiedene Untersucher. Nach der RNA Extraktion folgte die Messung der Konzentration mittels NanoDrop® (Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse der NanoDrop® Messungen der Proben 1 und 2

Methode	Probe 1		Probe 2	
	RNA ng/µl	260nm/280nm	RNA ng/µl	260nm/280nm
1	514,8	1,7	682,4	1,8
2	501,6	1,8	459,4	1,8
3	638,9	1,7	839,5	1,8
4	1108,8	1,8	896,3	1,8
5	2451,2	1,3	2509,3	1,3

Methode 4 und 5 fielen beide durch eine außergewöhnlich hohe Konzentration an extrahierbarer RNA auf. Bei der Methode 5 ist dies auf eine Verunreinigung zurückzuführen (Quotient 260nm/280nm).

Der Fragmentierungszustand wurde mittels einer Bioanalyzer®-Messung überprüft. Die RNA ist in beiden Fällen fragmentiert. In Diagramm 1 (Probe 1) und 2 (Probe 2) sind die gemessenen Fluoreszenzeinheiten (y-Achse) als Funktion der Länge der RNA-Fragmente (x-Achse) dargestellt. Von den 5 getesteten Methoden erreicht man mit zwei Methoden (4 und 5) sehr kurze Fragmente, während die drei weiteren Methoden eine breitere Streuung der Fragmentlängen erkennen lassen (Diagramm 1).

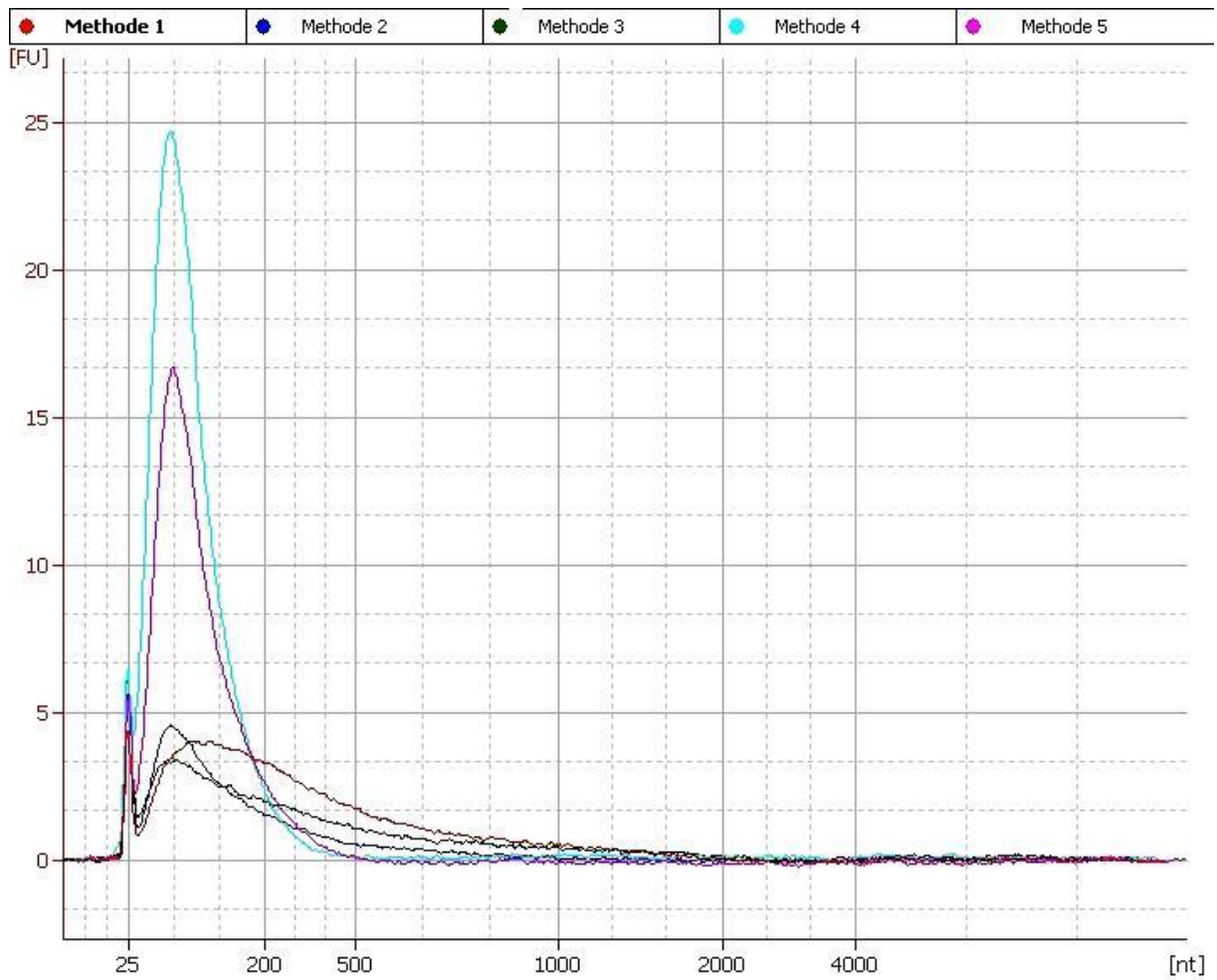


Diagramm 1: Bioanalyser Messung Probe 1

Die Ergebnisse der Messung an der Probe 2 (Diagramm 2) sind ähnlich. Auch hier extrahiert man mit den Methoden 4 und 5 kurze Fragmente. Die restlichen Methoden zeigen eine breitere Streuung der RNA-Fragmentlängen.

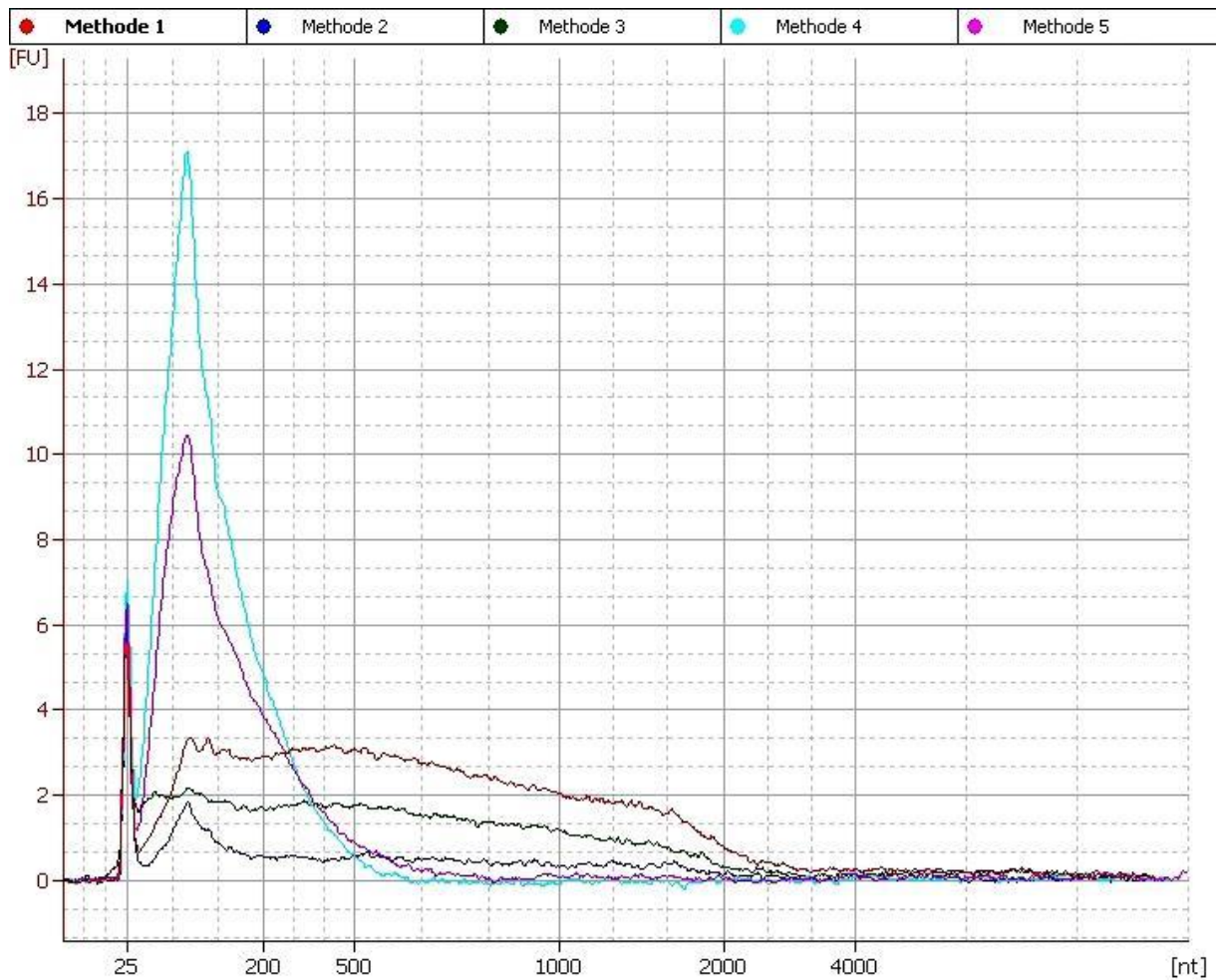


Diagramm 2: Bioanalyser Messung Probe 2

Zusammenfassend sind folgende Schlussfolgerungen abzuleiten:

1. Methode 5 war verunreinigt,
2. Methode 4 lieferte in der Bioanalyser® Messung eine hohe Fraktion kurzer Stränge.
3. Methoden 1 bis 3 sind anwendbar.
4. Die höchste Konzentration an RNA lieferte die Methode 3. Diese Methode wurde in den weiteren Untersuchungen angewendet.

3.2 RNA-Extraktion

Entsprechen der Ergebnisse der Voruntersuchungen wurde als Extraktionsmethode für alle Proben das RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit verwendet (Methode 3).

3 Ergebnisse

Die Proben wurden - nachdem sie im Institut für Pathologie, Lübeck, extrahiert wurden - auf Trockeneis an das Dr. Senckenbergische Institut für Pathologie geliefert. Das Alter der in Paraffin gelagerten Proben betrug entsprechend den Angaben der Vertreter des Instituts für medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) in Leipzig 5 bis 27 Jahre. Nach ihrer Ankunft wurde die RNA Konzentration mittels NanoDrop® und mit dem Bioanalyzer bestimmt. .

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Untersuchungen enthält das Diagramm 3.

Die RNA Konzentration (y-Achse) bezogen auf das Alter der Probe in Jahren (x-Achse) wird mittels eines Box Plots dargestellt (Diagramm 3). Die Box repräsentiert den Bereich, in dem sich 50% der Daten befinden. Der Strich innerhalb der Box markiert den Median und der Punkt den arithmetischen Mittelwert. Die anhängigen Whisker verdeutlichen den größten bzw. kleinsten gemessenen Wert der Konzentration.

Die Gruppe der Proben mit einem Probenalter zwischen 5 und 10 Jahren besteht aus 27 Fällen. Es wurde eine mittlere RNA Konzentration von 376,24 ng/µl (Standardabweichung: 140,62) gemessen.

Die Gruppe zwischen 11 und 15 Jahren besteht aus 28 Fällen. Es ist eine mittlere RNA-Konzentration von 373,39 ng/µl (Standardabweichung 219,69) gemessen worden.

Die größte Gruppe, mit 37 Fällen ist die Gruppe der 16 bis 20 Jahre alten Proben mit einer mittleren RNA Konzentration von 438,64 ng/µl (Standardabweichung 244,43).

Die kleinste Gruppe mit 24 Fällen besteht aus den Proben mit einem Alter zwischen 21 und 27 Jahren. Registriert wurde in dieser Gruppe eine mittlere RNA-Konzentration von 284,39 ng/µl RNA (Standardabweichung 123,66).

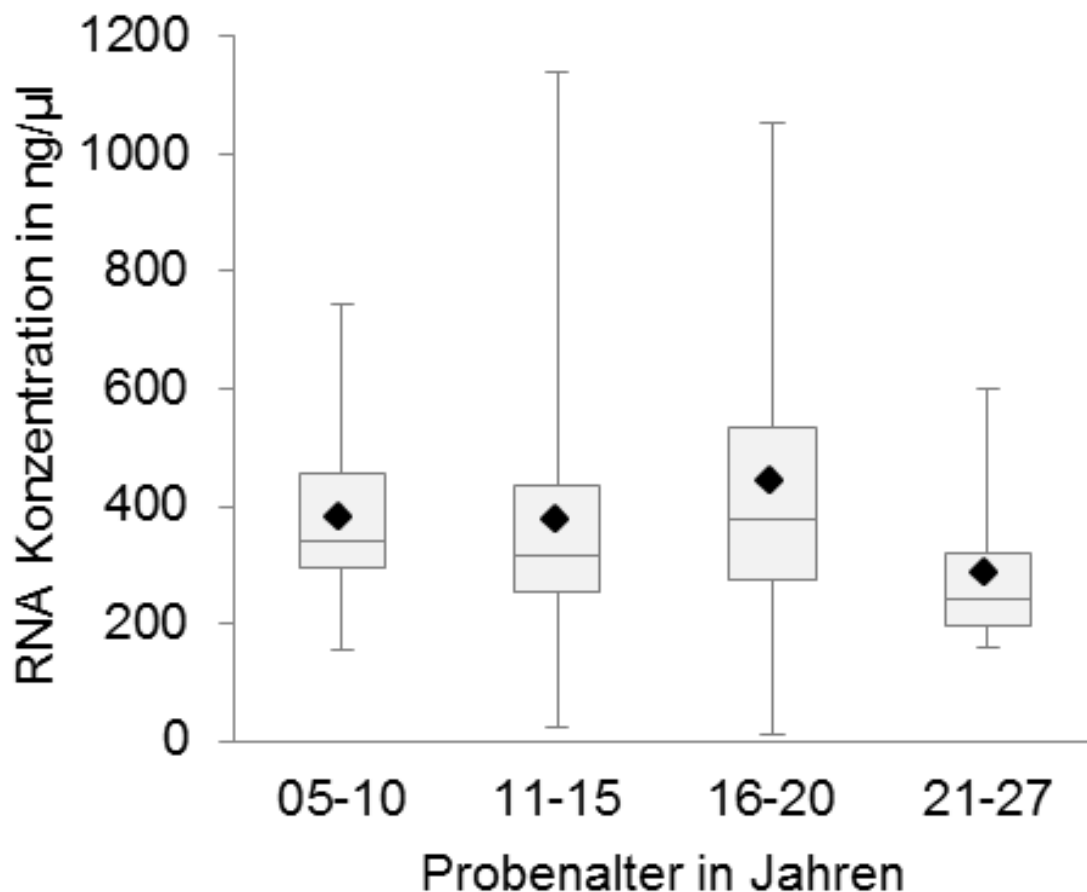


Diagramm 3: Box-Plot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen Probenalter in Jahren und RNA-Konzentration

Der Grad der Degradierung wurde mit dem Bioanalyzer bestimmt. Es wurde eine RIN gemessen.

In der Gruppe 5 – 10 konnte in 22/27, also in 81% der untersuchten Proben eine Messung durchgeführt werden. In der Gruppe 11 – 15 konnten 82%, in der Gruppe 16-20 70% und in der Gruppe 21-27 67% der Proben registriert werden, bei denen eine RIN bestimmbar war.

Die Gründe für eine fehlende Auswertbarkeit der RIN sind Kontaminationen, unerwartete Ausschläge und wellige Basislinien. Hinweise hierzu sind auch [47] zu entnehmen.

Mittels einfaktorieller ANOVA Analyse konnten signifikante Unterschiede in der RNA Qualität, gemessen mit der RIN, zwischen den Klassen nicht bestätigt werden

($p=0,69$). Die Messwerte sind als Diagramm 4 dargestellt. Es liegen somit über alle betrachteten Altersklassen hinweg homogen degradierte Proben vor.

Die x-Achse stellt das Probenalter in Gruppen von 5 bis 10, 11 bis 15, 16 bis 20 und 21 bis 27 Jahren dar. Die y-Achse definiert die RIN. Die Beschreibung der Box Plot Darstellung ist analog zu Diagramm 3 (s.o.).

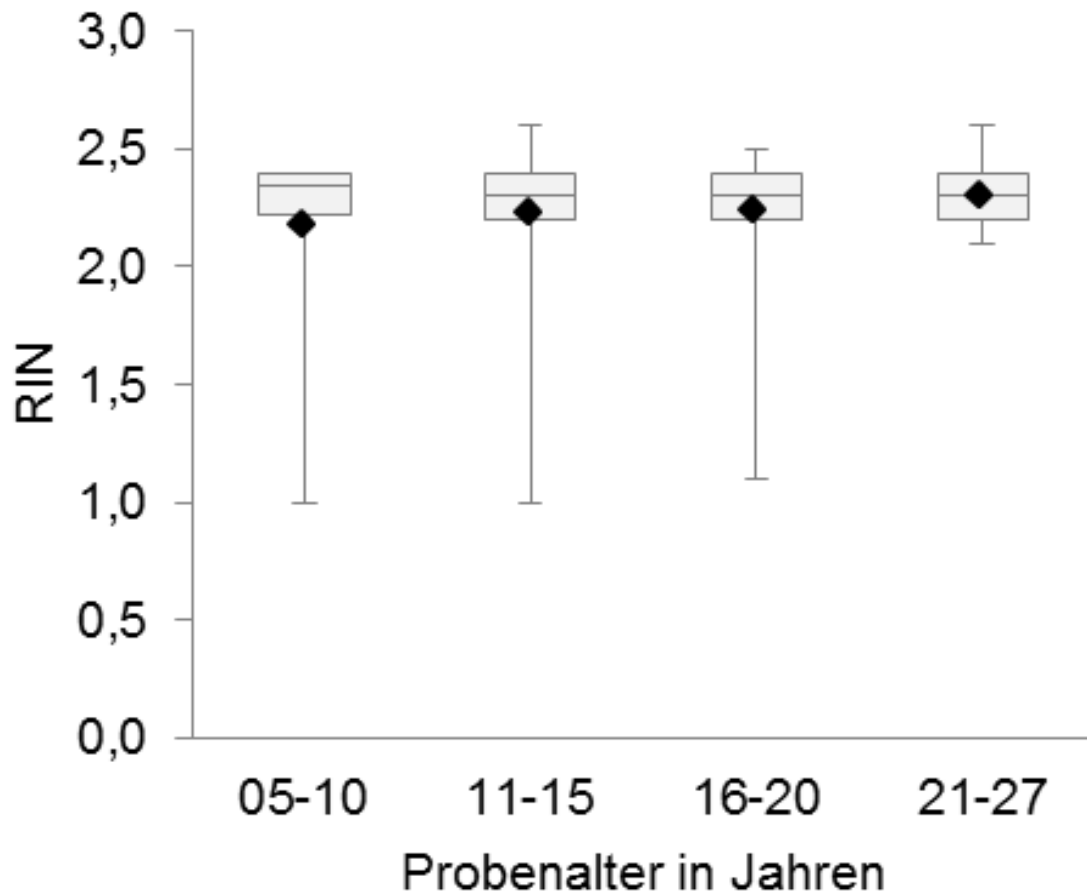


Diagramm 4: Zusammenhang zwischen RIN und Probenalter

3.3 Charakterisierung der Assays

Um die Assays hinsichtlich ihrer Effektivität zu beurteilen, wurden Verdünnungsreihen einer Probe mit bekannten Konzentrationen gemessen. Hierfür wurde für jedes Gen eine Probe in unterschiedlichen Konzentrationen gemessen (z.B. 100ng, 10ng, 1ng, 0,1ng, 0,01ng). Über diese Werte wurde eine Standardgerade gelegt. Der Anstieg der Standardgerade dient der Berechnung der Reaktionseffektivität. Hierfür wurde REST genutzt [49, 50]. Die Werte sind in Tabelle

10 aufgeführt. Ihnen ist zu entnehmen, dass es z.B. bei ARHGAP25 nicht nach jedem Zyklus zu einer Verdopplung des Reaktionsansatzes kommt sondern nur in 95,44% der Zyklen.

Tabelle 10: Effektivität der Assays

Gen	Effektivität
ARHGAP25	0,9544
CD40	0,9607
CD44	0,9257
CFLAR	0,9277
SMARCA4	0,9203
SSBP2	0,9657
B2M	0,968

3.4 Messergebnisse der qPCR

116 Proben wurden in Triplikaten mit den charakterisierten Assays gemessen. Dabei konnte nicht für jedes Gen jeder Probe ein Messwert erzielt (Diagramm 5) werden. Die x-Achse stellt die absolute Anzahl der Fälle dar, die y-Achse bezeichnet das Gen.

Ein Messwert wurde akzeptiert, wenn die Standardabweichung der Triplikate kleiner als 1 war. Positiv- und Negativkontrollen wurden mit jeder Messung durchgeführt. Somit wurde für jede der 116 Proben ein Wert für B2M gemessen, hingegen in 91 Fällen ein Wert für CD44. An 94 Proben konnten valide Ergebnisse für drei Gene und das dazugehörige Referenzgen nachgewiesen werden.

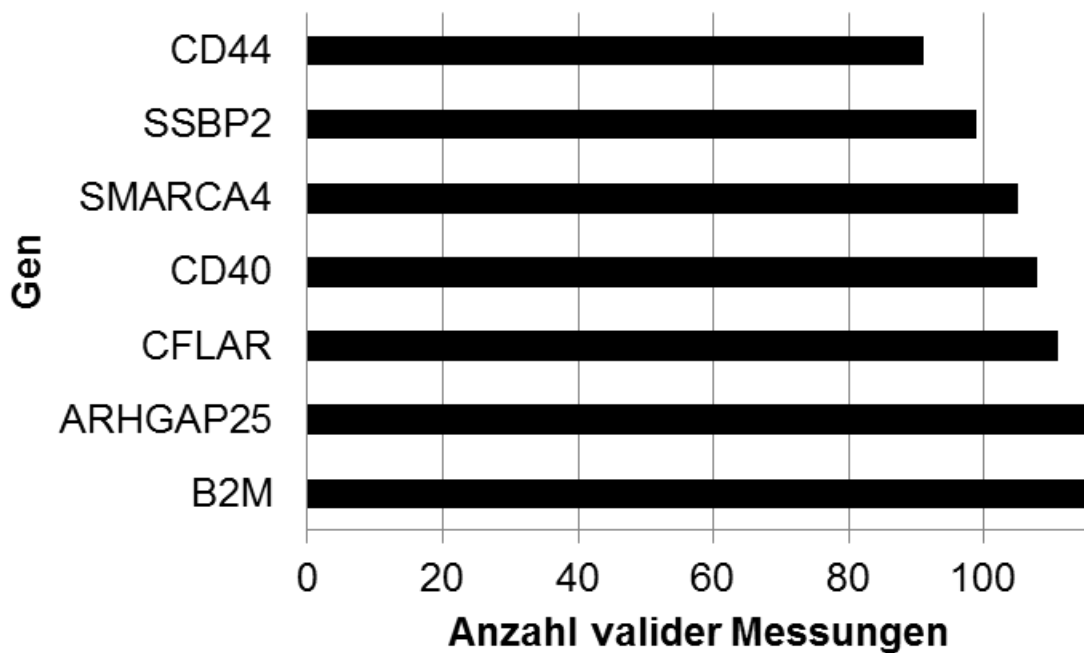


Diagramm 5: Anzahl valider Messungen pro Gen

3.5 Expression der Gene

Die Regulation der Gene ist im Verhältnis zum Referenzgen anzugeben. Betrachtet man nur die Fälle bestehend aus mBL und non-mBL ist festzustellen, dass SMARCA4 um den mittleren Faktor von 3,6 und SSBP2 um den mittleren Faktor 4,9 in mBL im Vergleich zum Referenzgen B2M hochreguliert ist .

Demgegenüber stehen CFLAR, ARHGAP25, CD44 und CD40. Diese sind in mBL herunterreguliert im Bezug zum Referenzgen im Vergleich zu non-mBL.

Die Berechnung erfolgte mittels REST. Dargestellt sind die Ergebnisse in der Tabelle 11. Hierin bedeutet $P(H1)$ die Wahrscheinlichkeit der alternativen Hypothese. Dem Programm liegt ein Randomisierungstest zu Grunde [31].

Tabelle 11: Regulation der Gene

Gen	Expression	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	P(H1)
SMARCA4	3,635	0,397 - 34,937	0,060 - 218,937	0,016
SSBP2	4,916	0,506 - 40,998	0,089 - 304,149	0,003
ARHGAP25	0,348	0,046 - 3,297	0,012 - 33,426	0,028
CD44	0,267	0,037 - 2,531	0,001 - 17,482	0,047
CD40	0,190	0,017 - 2,083	0,003 - 18,215	0,004
CFLAR	0,190	0,025 - 1,443	0,002 - 9,273	0,001

3.6 qPCR Klassifikator

Die Proben, in denen mindestens drei Gene ein valides Messergebnis zusätzlich zu dem Kontrollgen erreichten, flossen in die Berechnung des qPCR Klassifikators ein. Hierbei kann es sich um jedes der sechs untersuchten Gene handeln. Die Berechnungen wurden von der AG Spang, Institut für Funktionelle Genomik Biopark I, Regensburg, durchgeführt. Grundlage stellten die Daten des zuvor generierten Genchip-Klassifikators dar, der mittels Genchips an kryo-konserviertem Gewebe generiert wurde [18]. Genutzt wurde eine multivariate Regressionsanalyse. Die Daten der Genchip-Klassifikators wurden in eine Ebene gebracht, indem ein linearer Klassifikator trainiert wurde. Die qPCR-Daten wurden nun auf diesen projiziert [51].

22 von 116 Fällen konnten auf Grund fehlender Ct-Werte für ≥ 4 Gene nicht klassifiziert werden. 11 dieser Fälle waren ebenfalls mit der RIN nicht charakterisierbar. Dennoch wurde ein Ergebnis für das Gen B2M erzielt. Somit stellen sich diese Fälle als zu stark degradiert dar, sodass eine Messung von Ct-Werten mit den vorliegenden Assays nicht möglich ist.

In 94 von 116 Fällen konnte der Genchip-Klassifikator mit qPCR-Daten verglichen werden. Diese 94 Fälle weisen neben einem Messergebnis für das Referenzgen drei weitere Messwerte auf. Im Ergebnis der Berechnungen wurden vier intermediate-Fälle nach einem Projektions-Schritt ausgeschlossen. Grund dafür war, dass der Genchip-Klassifikator nun nicht mehr exakt nachvollziehbar war [51]. Somit wurden 90 Fälle klassifiziert.

Die Korrelation beider Klassifikatoren (Genchip und qPCR) beläuft sich auf 0,8.

In 89% (80/90) der untersuchten Fälle stimmt der qPCR - mit dem Genchip-Klassifikator überein. Hierbei wurden 13 von 14 mBL-Fällen (Sensitivität: 0,93; Spezifität: 1) und 59 von 61 non-mBL Fällen gleich klassifiziert (Sensitivität: 0,97; Spezifität: 0,97). 8 von 15 intermediates (Sensitivität: 0,53; Spezifität: 0,97) wurden identisch eingeordnet (Tabelle 12).

Tabelle 12: Vierfeldertafel, Sensitivität, Spezifität

		Genchip-Diagnose		
		mBL	nicht mBL	Summe
qPCR	mBL	13	0	13
	nicht mBL	1	76	77
Summe		14	76	90
Genchip-Diagnose				
		non-mBL	nicht non-mBL	Summe
qPCR	non-mBL	59	1	60
	nicht non-mBL	2	28	30
Summe		61	29	90
Genchip-Diagnose				
		intermediate	nicht intermediate	Summe
qPCR	Intermediate	8	2	10
	nicht intermediate	7	73	80
Summe		15	75	90

Differenzen in der Klassifikation traten in 10 Fällen auf. In 9 dieser 10 Fälle wurden nach beiden Klassifikationen die Beurteilung intermediate vergeben. Es handelt sich somit offensichtlich um ein Problem der Grenzwertdefinition. Außerdem handelt es sich bei diesen Fällen um Proben, die als DLBCL von einem Expertenpanel diagnostiziert wurden. Fünf der Fälle weisen einen myc-Bruchpunkt auf. Das Alter der Proben variiert zwischen 7 und 23 Jahren (Tabelle 13). In einem Fall (383, vgl. Tabelle 13), definiert der Genchip-Klassifikator non-mBL und der qPCR-Klassifikator hingegen mBL. Diese Probe konnte mit 5 Genen zusätzlich zu dem Referenzgen klassifiziert werden. Die RIN dieses Falles liegt bei 2,4, es konnten 302 ng RNA

extrahiert werden. Morphologisch handelt es sich um einen Fall mit einer hohen Proliferationsfraktion (gemessen mit Ki67), die bei 90% liegt. Zusätzlich dazu exprimiert der Fall kräftig CD20 und Bcl-2. Das Färbeergebnis für CD10 ist nicht bekannt. Es handelt sich hier also um ein DLBCL mit hoher Proliferationsfraktion. Eine erneute Betrachtung dieses Falles unter dem Gesichtspunkt, dass er mit dem qPCR-Klassifikator als mBL klassifiziert worden ist, sollte durchgeführt werden.

Betrachtet man isoliert mBL und non-mBL - zeigt sich eine differenziert klassifizierte Probe in den mBL-Fällen sowie zwei unterschiedlich klassifizierte Proben bei den non-mBL-Fällen. Folglich wurden 93% der mBL-Fälle und 97% der non-mBL-Fälle identisch klassifiziert. Demgegenüber stehen 7 Proben, also 47% der intermediären Proben, die unterschiedlich eingruppiert wurden.

Intermediäre Fälle sind diejenigen Proben, die von dem Genchip-Klassifikator weder als mBL noch als non-mBL klassifiziert worden sind. Das morphologische Korrelat zu diesen Fällen ist heterogen. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass Differenzen in der Einordnung dieser Fälle mit beiden Klassifikatoren bestehen. Weitere Untersuchungen dieser Fälle sind notwendig.

Tabelle 13: Unterschiedlich klassifizierte Proben²

Fall	Probenalter (a)	Patientenalter (a)	Geschlecht	Paneldiagnose	myc Status	GCB/ABC	t(14;18)	Genchip-Klassifikator	qPCR Klassifikator
44	12	13	Männlich	BL, atypisch (Burkitt-like)	IG-MYC	GCB	Neg	mBL	intermediate
223	9	78	Männlich	DLBCL	neg	GCB	Neg	non-mBL	intermediate
383	7	54	männlich	DLBCL, zentroblastisch	neg	GCB	*	non-mBL	mBL
36	20	70	Weiblich	DLBCL, zentroblastisch	IG-MYC	GCB	Pos	intermediate	mBL
38	18	57	Männlich	DLBCL, immunoblastisch	IG-MYC	*	Neg	intermediate	mBL
104	15	54	Weiblich	DLBCL, zentroblastisch	non-IG-MYC	GCB	Pos	intermediate	mBL
120	21	45	Männlich	DLBCL	IG-MYC	GCB	Pos	intermediate	non-mBL
162	7	73	Männlich	DLBCL, zentroblastisch	Neg	GCB	Pos	intermediate	mBL
294	19	59	Männlich	DLBCL, zentroblastisch	Neg	*	Neg	intermediate	non-mBL
308	23	65	Weiblich	DLBCL, zentroblastisch	Neg	GCB	Pos	intermediate	non-mBL

² * Diese Angaben sind nicht vorhanden.

4 Diskussion

Molekulare Analysen werden häufig mit kryo-Material durchgeführt, da hier von ausreichender Qualität der Erbsubstanz für die Analysen ausgegangen wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Konkordanz zwischen kryo und FFPE-Material besteht [52].

Die zu dieser Erkenntnis führenden Untersuchungen basieren allerdings auf einem kleinen und altersmäßig beschränkten Probenkollektiv. Mit der vorliegenden Arbeit konnte nunmehr an einem größeren und altersmäßig fortgeschrittenen Kollektiv gezeigt werden, dass es für die mBL Beurteilung auch möglich ist, dieses Material mit kryo-Gewebe zu vergleichen.

4.1 Voraussetzungen

qPCR ist eine verlässliche und reproduzierbare Technik zur Genexpressionsanalyse aus FFPE-Material. Sie ist kosteneffizient, objektiv und weithin anwendbar. In der vorliegenden Arbeit wird diese Technik zur Differenzierung zweier Lymphomentitäten, dem Diffus großzelligen B-Zell Lymphom und dem Burkitt Lymphom auf molekularer Ebene qualifiziert. Diese Lymphome können morphologisch ähnliche Eigenschaften aufweisen. Die Unterscheidung zwischen beiden Entitäten hat unmittelbare Konsequenzen für die Behandlung der betroffenen Patienten [18, 22].

Die derzeit vorliegenden Kriterien der WHO in der Fassung von 2008 tragen dem Umstand Rechnung, dass es Grauzonen zwischen DLBCL und BL gibt [53].

Auf molekularer Ebene wurde eine burkittspezifische Gensignatur mit Hilfe von Genchips bestimmt. Damit existiert eine Definition des molekularen Burkitt Lymphoms [18, 22]. Die Signatur - basierend auf den Ergebnissen des Kollektivs des MMML-Projektes [18] - wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem verkleinerten Set an Genen validiert. Die Ermittlung der dafür geeigneten Gene erfolgte auf Grund von Berechnungen. Es erfolgte hierbei keine Beachtung der biologischen Signifikanz.

Das kleinere Set an Genen war einer qPCR-Analyse zugänglich. Expressionsdaten konnten an einem ausgewählten Kollektiv bestimmt werden.

Eine Herausforderung bei diesen Untersuchungen stellt die Analyse des Ausgangsmaterials - FFPE-Material - dar. Das Material wurde bis zu 27 Jahre an unterschiedlichen Orten gelagert. Zu den Umständen der Entnahme und der Ischämiezeit der Proben sind keine Angaben vorhanden. Eine Messung aller Gene in allen Proben war nicht möglich.

4.2 Ursachen fehlender Messwerte

Von 116 konnten 90 Proben ausgewertet werden. Berechnet wurde ein qPCR-Klassifikator. 22 der untersuchten Proben konnten aufgrund fehlender Messwerte nicht berücksichtigt werden. Die Ursachen für fehlende Messwerte sind dem Ausgangsmaterial und der darauffolgenden Prozessierung geschuldet. 4 Fälle wurden im Ergebnis bioinformatischer Berechnungen ausgeschlossen (vgl. 3.6).

Nachfolgend werden die Ursachen fehlender Messwerte erläutert.

4.2.1 Fixierung und Lagerung

Durch Fixierung von Präparaten in Formalin sowie durch Einbettungsvorgänge ist die vorliegende RNA fragmentiert und chemisch modifiziert [27]. Zusätzlich dazu stellt der Zeitraum der Lagerung eine Ursache für RNA Degradation dar [54]. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die Angaben der Literatur.

Um trotzdem RNA zu extrahieren, wurden fünf Möglichkeiten getestet. Die gewonnenen Ergebnisse verdeutlichen Unterschiede in den angewandten Methoden. Zu favorisieren ist die Nutzung des RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die durch die Fixierung und Lagerung eingebrachten Veränderungen der Struktur und Qualität der RNA nicht vollständig reversibel sind.

Somit muss die Fixierung und Lagerung als ursächlich für die registrierten Messausfälle bezeichnet werden.

4.2.2 Konzentration der extrahierbaren RNA

Die Konzentration der extrahierbaren RNA hängt unmittelbar von der Größe der Probe und deren Zusammensetzung ab. Für die RNA Extraktion wurde eine konstante Anzahl an Schnitten verwendet. Das Volumen der Proben war

unterschiedlich. Bekannt war lediglich, dass der Tumorzellgehalt bei über 70% anzusiedeln ist. Die Extraktion gelang in allen Fällen.

Da der Zustand der RNA vor der Fixierung (eventuell transportbedingte prolongierte Ischämiezeiten) nicht bekannt ist, kann somit auch keine Aussage zur Ausgangsquantität und -qualität getroffen werden.

4.2.3 Fragmentierungszustand der RNA

Wie anhand der Bioanalyzer-Profile zweier Proben exemplarisch gezeigt wurde (vgl. Diagramm 1 und Diagramm 2), ist RNA, die von FFPE-Material extrahiert wurde, stark fragmentiert. Die mittlere Fragmentlänge von RNA, die aus FFPE-Material extrahiert werden kann, liegt bei 100 bis 250 bp [55]. Auch diese Angaben wurden in der Arbeit bestätigt.

Ein Messwert für die Fragmentierung ist die RIN. Je geringer dieser Wert ist, umso fragmentierter ist der Zustand der RNA und umso höher sind auch die zu erwartenden Ct-Werte aus dem qPCR Experiment [47].

Da auch das Amplikon fragmentiert vorliegen kann, sind Messausfälle zu erwarten.

4.2.4 cDNA Synthese

Die Generierung von cDNA mittels reverser Transkription ist der nächste kritische Schritt nach der RNA Extraktion. Hierfür gibt es verschiedene Priming-Methoden. So kann mit sequenzspezifischen Primern, mit Poly-A-Primern oder mit Random Hexamer Primern gearbeitet werden.

Bei der Arbeit mit FFPE-Material wird in der Literatur empfohlen, Random Hexamer Primer zu verwenden. Ursächlich dafür ist, dass bei der RNA-Extraktion Monomethylgruppen nicht vollständig entfernt werden. Diese binden Adenine und verhindern damit die Bindung von Poly-A-Primern. Zusätzlich dazu kann in einem mRNA-Molekül der Poly-A-Schwanz fehlen, weil er bei der Fixierung oder Einbettung verloren ging [56].

Es wurde mit Random Hexamer Primern gearbeitet. Es kann nicht garantiert werden, dass alle vorliegenden Fragmente der RNA amplifiziert werden. Dies ist ein weiterer Faktor, der das Fehlen einiger Messwerte erklärt.

Zusätzlich dazu können residuelle Vernetzungen von RNA mit Proteinen eine weniger effektive cDNA-Synthese bedingen [55].

4.2.5 Primer

Die besonderen Bedingungen des Ausgangsmaterials erfordern eine Anpassung der Primer. Die Länge des Amplikons sollte 130bp nicht übersteigen [56]. Damit wird dem Fragmentierungszustand der RNA Rechnung getragen. Kürzere Amplikons limitieren allerdings auch die Auswahl der Primer, die benutzt werden können. Dies führt dazu, dass es in einigen Fällen auch nicht möglich sein kann, ein Design durchzuführen. Somit ist hier die Auswahl der zu untersuchenden Gene limitiert.

Ein Bruchpunkt im Bereich des zu untersuchenden Amplikons kann hiermit nicht umgangen werden.

4.3 Einflussgröße Probenalter am Beispiel des Referenzgens

Als Referenzgen für die vorliegenden Untersuchungen wurde B2M genutzt. Grund für diese Wahl ist, dass dieses Gen anhand der vorliegenden Genchip-Daten stabil und gleichmäßig am hier vorliegenden Kollektiv exprimiert wird.

Weitere Gene mit geringer Varianz in der Genexpression (CAMK2B, ZNF335 und NCAPH2) wurden als Referenzgene getestet. Diese wurden vom hier vorliegenden Kollektiv gering exprimiert.

Am Beispiel des Referenzgens B2M kann an den hier vorliegenden Proben der Einfluss des Probenalters in einem Box Plot dargestellt werden (Diagramm 6). Die x-Achse stellt das Probenalter in Jahren dar, die y-Achse gibt den Ct-Wert für B2M an (effizienzkorrigiert).

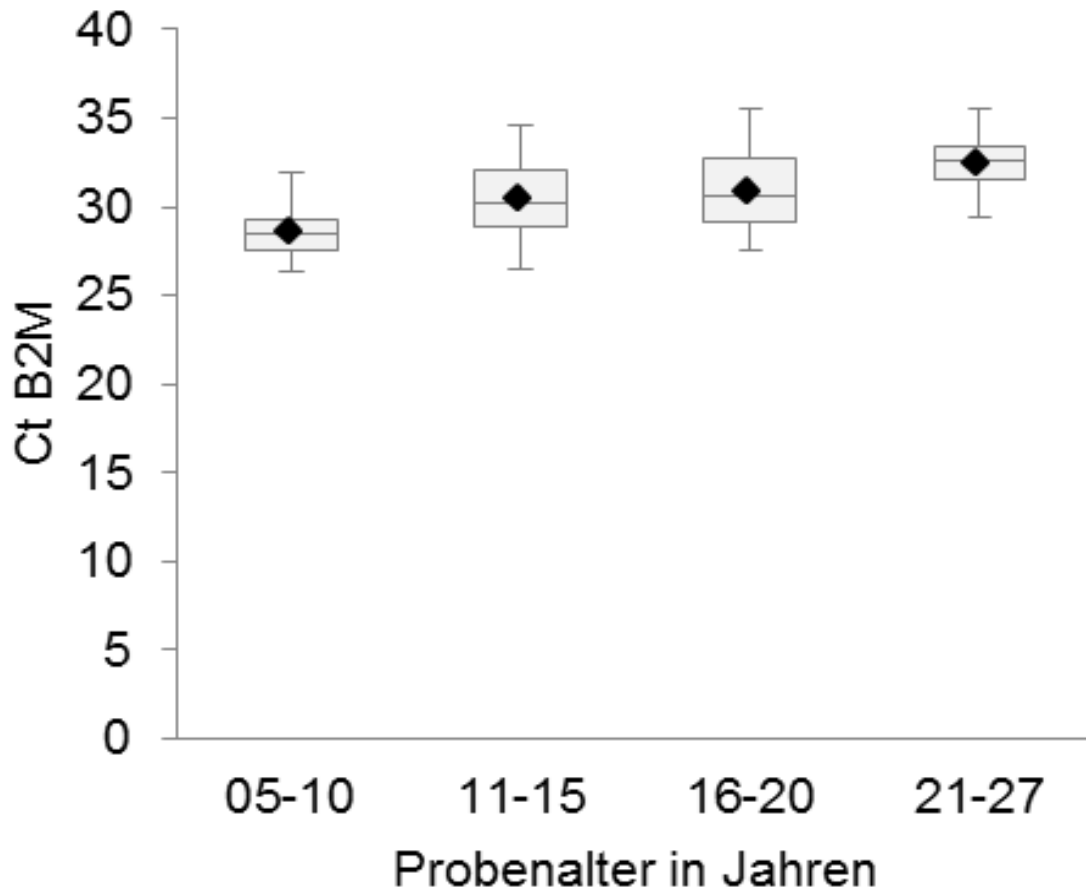


Diagramm 6: Probenalter in Jahren in Bezug zum Ct-Wert des Referenzgens

Man erkennt einen statistisch signifikanten Unterschied der Ct-Werte mit steigendem Probenalter ($p=1,17717E-26$).

Trotz steigender Messwerte mit höherem Probenalter kann mit den hier vorliegenden Messwerten nicht generell konstatiert werden, dass besonders alte Proben nicht retrospektiv untersucht werden können.

4.4 Intermediäre Fälle

Fälle, die mit dem Genchip-basierten Klassifikator nicht einer Gruppe (mBL oder non-mBL) zugeordnet werden können, werden mit geringer Sensitivität von dem vorliegenden qPCR-Klassifikator erkannt. Diese Fälle bleiben, wie auch bei der Einteilung nach dem Genchip-Klassifikator, eine diagnostische Herausforderung. Hier sind weitere Untersuchungen erforderlich.

4.5 Einordnung im Vergleich zu anderen Klassifikatoren

Techniken, mit denen man viele Daten in kurzer Zeit generieren kann - wie die Genchip-Technik - wurden bei der Untersuchung vieler Tumoren eingesetzt. Häufig wurden hiermit Gensets ermittelt, die nachfolgend mit der qPCR-Methode validiert wurden. Nachfolgend werden drei Beispiele solider Tumoren sowie ein Beispiel für ein Lymphom aufgeführt.

Bei der Untersuchung von Gliomen wurde ein Klassifikator, basierend auf 58 Genen als Prognoseprediktor mittels Adapter-markierter konkurrierender PCR (ATAC-PCR) Methode entwickelt und nachfolgend auf die qPCR übertragen [57]. Genutzt wurde hierfür kryo-Material. Die Korrelation zwischen beiden Klassifikatoren beträgt 0,94. Hier wird allerdings betont, dass diese Technik nicht auf die Messung einzelner Genproben übertragbar ist.

Auf dem Gebiet der Brustkrebsforschung wurden in den letzten Jahren mehrere, teils prognostische, teils prädiktive Genexpressionsstudien durchgeführt. Die zu untersuchenden Gensets überschneiden sich minimal [58]. Auch hier wurden bereits Untersuchungen zur Übertragung der an kryo-konserviertem Gewebe gewonnenen Daten auf FFPE-Gewebe-Daten durchgeführt [59]. Die Autoren der vorliegenden Veröffentlichung untersuchten die Expression von 384 der Literatur entnommenen Genen mit qPCR. Zusätzlich untersuchten sie 21 Gene, die mit einem auf dem Markt verfügbaren Kit, Oncotype DX, bestimmbar sind. Es wurden hierfür bis zu vier Jahre alte FFPE-Blöcke benutzt. Messausfälle wurden nicht beschrieben. Die Expression der Gene konnte mit der Klinik der Patienten verglichen werden. Es handelt sich auch hier somit um einen prädiktiven Test. Die Ergebnisse finden Einzug in den klinischen Alltag.

Es konnte mit der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass auch ältere Proben mit dieser Herangehensweise zu anwendbaren Ergebnissen führt.

Ein weiteres Beispiel für die Validierung von Genchipdaten mit qPCR wird in [60] vorgestellt. Es handelt sich um eine Veröffentlichung zur Unterscheidung zirrhotischer Leberproben mit und ohne hepatozellulärem Karzinom. Genchipdaten wurden durch Berechnungen reduziert auf ein Set von wenigen Genen, die mit qPCR validiert wurden. Es wird nicht explizit erwähnt, ob es sich bei den

Validierungsproben um kryo oder FFPE-Material handelt. In diesem Fall wurden also Genexpressionsanalysen zur Früherkennung und –diagnose genutzt.

In der Lymphom-Forschung wurde ein prädiktiver Klassifikator von Mantelzell-Lymphomen, bestehend aus fünf Genen ermittelt, der sowohl an kryo-konservierten als auch an FFPE-Gewebe funktioniert [61]. Hierfür wurden lediglich bis 15 Jahre alte Paraffinblöcke genutzt. In nur 72% der in dieser Veröffentlichung eingeschlossenen Proben konnten Daten zu diesen Fällen gemessen werden. Es handelt sich auch hier um einen prädiktiven Test.

Die vorliegende Arbeit reiht sich somit in diese Untersuchungen ein. Mit einem reduzierten Set an Genen konnte die mittels Genchipdaten ermittelte Einteilung bestätigt und die Basis für umfangreiche Analysen von FFPE-Material gelegt werden. Es wurde der qPCR-Klassifikator erarbeitet. Hierbei handelt es sich um einen diagnostischen Klassifikator, der an FFPE-Material validiert ist. Das benutzte Material war bis zu 27 Jahre gelagert.

4.6 Schlussfolgerungen

1. Die entwickelte Methode ist sehr gut geeignet, um RNA von FFPE-Blöcken für Genexpressionsanalysen mit qPCR nutzbar zu machen.
2. Die entwickelten Primer sind geeignet für Untersuchungen an bis zu 27 Jahre alten FFPE-Proben.
3. Die Übertragbarkeit von Genexpressionsdaten von kryo-Material auf FFPE-Material ist mathematisch nachgewiesen.
4. Die Konkordanz zwischen dem Genchip-Klassifikator und dem qPCR-basierten Klassifikator beträgt 89%.
5. Der erarbeitete Klassifikator, basierend auf qPCR-Untersuchungen an hochmalignen B-Zell Lymphomen gestattet mit hoher Sensitivität und Spezifität die Differenzierung von mBL- und non-mBL Fällen.

6. Retrospektive Untersuchungen, z. B. im Rahmen von Studien, sind auf der Basis der erarbeiteten Untersuchungsmethode somit auch an langzeitarchiviertem Material möglich.

7. Der qPCR Klassifikator kann zusätzlich zur Morphologie und Immunhistochemie als unterstützendes diagnostisches Werkzeug für morphologisch herausfordernde Fälle dienen.

5 Zusammenfassung

Hintergrund:

Das Burkitt Lymphom und das Diffus großzellige B-Zell Lymphom können überlappende morphologische und immunhistochemische Eigenschaften aufweisen. Eine Differenzierung beider Entitäten ist klinisch relevant. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen an kryo-konservierten Proben hochmaligner B-Zell Lymphome, bestehend aus Burkitt Lymphomen und Diffus großzelligem B-Zell Lymphomen, gelang 2006 die molekulare Definition des Burkitt Lymphoms (mBL) mit einer burkittspezifischen Gensignatur (Genchip-Klassifikator). Demgegenüber wurden Proben, die nicht diese Signatur aufwiesen als non-mBL bezeichnet. Proben, die weder mBL noch non-mBL klassifiziert wurden, wurden als intermediär eingestuft.

Ziel:

Entwicklung einer Methode zur Unterscheidung von mBL und non-mBL mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qPCR) durch die Etablierung eines Assays-Sets einer kleinen Anzahl von Genen der mBL-Signatur an formalinfixiertem, in paraffineingebettetem (FFPE) Gewebe.

Methoden:

An 116 Proben, bestehend aus mBL, non-mBL und intermediären Fällen (entsprechend der Genchip-Klassifikation) wurden qPCR Messungen für sechs Gene und ein Referenzgen durchgeführt. Die Expressionsmessungen wurden auf den vorhandenen Genchip-Klassifikator projiziert.

Ergebnisse:

90 von 116 Proben konnten mit dem qPCR-Klassifikator klassifiziert werden. Bei 22 Proben kam es zu Messausfällen. 4 Fälle wurden bioinformatisch ausgesondert. 13 von 14 mBL, 59 von 61 non-mBL und 8 von 15 intermediären Fällen wurden identisch zu dem Genchip-Klassifikator bewertet.

Diskussion:

Der entwickelte qPCR-Klassifikator ist eine objektive, schnelle und kosteneffiziente diagnostische Herangehensweise zur Bestimmung des mBL. Nicht alle FFPE-Proben

waren mit dem qPCR Klassifikator eindeutig auswertbar und für eine Klassifikation zu nutzen. Eine Einflussgröße hierbei stellt das Alter der Proben dar. Mit Hilfe dieser Untersuchung können retrospektive Analysen durchgeführt werden. Der Klassifikator kann zusätzlich zur Morphologie und Immunhistochemie mit eindeutiger Klassifikation von 93% (mBL) und 97% (non-mBL) angewendet werden.

6 Summary

Background:

Burkitt lymphoma and Diffuse large B-cell lymphoma can exhibit overlapping morphological and immunohistochemical characteristics. Differentiating these entities is of clinical relevance. Applying gene expression analyses on snap-frozen samples of highly malignant B-cell lymphomas, consisting of Burkitt lymphomas and Diffuse large B-cell lymphomas, in 2006 a molecular definition of Burkitt lymphoma (mBL) with a Burkitt specific gene signature (Genchip-classifier) was gained. In contrast, samples not exhibiting this signature classified as non-mBL. Probes that are classified neither mBL nor non-mBL are called intermediate.

Goal:

The purpose of this study is to establish a method applying a quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qPCR) assay-panel consisting of a limited number of genes selected from the mBL-signature distinguishing mBL from non-mBL on formalin fixed, paraffin embedded (FFPE) material.

Methods:

qPCR measurements of six genes and one reference gene were performed on a set of 116 cases consisting of mBL, non-mBL and intermediate cases (according to the Genchip-classifier). Expression data was projected on the preexisting Genchip-classifier.

Results:

90 of 116 cases were classified via qPCR. In 22 cases measurement failures were observed. 4 cases were excluded bioinformatically. 13 of 14 mBL, 59 of 61 non-mBL and 8 of 15 intermediates were classified identically to the Genchip-classifier.

Discussion:

The developed qPCR classifier is an objective, fast and cost efficient diagnostic approach for mBL. Not all FFPE samples were definitively evaluable and useful for classification. An influencing parameter is the age of the sample. With the help of this investigation retrospective investigations can be conducted. The classifier can be

applied in addition to morphology and immunohistochemistry with 93% (mBL) and 97% (non-mBL) of definite classifications.

Literaturverzeichnis

1. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 2002, Berlin: de Gruyter.
2. *Pathologie*, ed. W. Böcker, H. Denk, and P.U. Heitz. 2004, München: München ; Jena : Elsevier, Urban und Fischer
3. *Indikatorenkatalog zum Hessischen Gesundheitsbericht 2001*. Forschungs- und Entwicklungsgesellschaft Hessen; Hessisches Sozialministerium: Wiesbaden.
4. *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes.*, ed. R. Koch-Institut. 2010, RKI, Berlin.
5. Lenz, G. and L.M. Staudt, *Aggressive Lymphomas*, in *N Engl J Med*. 2010. p. 1417-29.
6. Lennert, K., Feller A. , *Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome*. 1981, Berlin: Springer.
7. Harris, N.L., et al., *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group*. *Blood*, 1994. **84**(5): p. 1361-92.
8. Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Vardiman, J. W., ed. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2001, IARC Press: Lyon.
9. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W, ed. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2008, IARC: Lyon.
10. Coakley, D., *Denis Burkitt and his contribution to haematology/oncology*, in *Br J Haematol*. 2006. p. 17-25.
11. Kuppers, R., *Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(4): p. 251-62.
12. Yustein, J.T. and C.V. Dang, *Biology and treatment of Burkitt's lymphoma*, in *Curr Opin Hematol*. 2007. p. 375-381.
13. Tedder, T.F., et al., *The gene that encodes the human CD20 (B1) differentiation antigen is located on chromosome 11 near the t(11;14)(q13;q32) translocation site*. *The Journal of Immunology*, 1989. **142**(7): p. 2555-9.
14. Barker, P.E., et al., *The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27)*. *The Journal of Immunology*, 1989. **142**(1): p. 283-7.
15. Gerdes, J., et al., *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. *Int J Cancer*, 1983. **31**(1): p. 13-20.
16. Hockenbery, D., et al., *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death*. *Nature*, 1990. **348**(6299): p. 334-6.
17. Kuppers, R. and R. Dalla-Favera, *Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas*. *Oncogene*, 2001. **20**(40): p. 5580-94.
18. Hummel, M., et al., *A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(23): p. 2419-30.

19. Campo, E., et al., *The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications*. Blood. **117**(19): p. 5019-32.
20. Rosenwald, A., et al., *The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma*. N Engl J Med, 2002. **346**(25): p. 1937-47.
21. Hartmann, S. and M.L. Hansmann, *Grauzonenlymphome Relevanz für die Klinik?*, in *Der Pathologe*. 2009.
22. Dave, S.S., et al., *Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma*. N Engl J Med, 2006. **354**(23): p. 2431-42.
23. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y), 1992. **10**(4): p. 413-7.
24. Murphy, J. and S.A. Bustin, *Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: gold standard or substandard?* Expert Rev Mol Diagn, 2009. **9**(2): p. 187-97.
25. Gilbert, M.T., et al., *The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when?* PLoS One, 2007. **2**(6): p. e537.
26. Moller, K., et al., *The use of formaldehyde in RNA-protein cross-linking studies with ribosomal subunits from Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1977. **76**(1): p. 175-87.
27. Masuda, N., et al., *Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(22): p. 4436-43.
28. Frank, M., et al., *Global gene expression profiling of formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples: a comparison to snap-frozen material using oligonucleotide microarrays*. Virchows Arch, 2007. **450**(6): p. 699-711.
29. van der Velden, V.H., et al., *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects*. Leukemia, 2003. **17**(6): p. 1013-34.
30. Pardo, M.
31. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. e36.
32. Rozen, S. and H.J. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*, in *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, S. Krawetz and S. Misener, Editors. 2000: Totowa, NJ. p. 365-386.
33. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
34. Klapper, W., et al., *Molecular profiling of pediatric mature B-cell lymphoma treated in population-based prospective clinical trials*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1374-81.
35. Salaverria, I. and R. Siebert, *The gray zone between Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma from a genetics perspective*. J Clin Oncol. **29**(14): p. 1835-43.
36. Hummel, M., et al., *A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling*, in *N Engl J Med*. 2006. p. 2419-30.
37. Katho, M. and M. Katho, *Identification and characterization of ARHGAP24 and ARHGAP25 genes in silico*, in *Int. J. Molec. Med*. 2004. p. 333-338.

38. Aruffo, A., et al., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate*, in *Cell*. 1990. p. 1303-1313.
39. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*, in *Journal of Leukocyte Biology*. 2000.
40. Shu, H.-B., D.R. Halpin, and D.V. Goeddel, *Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis*, in *Immunity*. 1997. p. 751-763.
41. Park, J.-I., et al., *Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin*, in *Nature*. 2009. p. 66-72.
42. Castro, P., et al., *A novel, evolutionarily conserved gene family with putative sequence-specific single-stranded DNA-binding activity*, in *Genomics*. 2002. p. 78-85.
43. Gussow, D., et al., *The human beta-2-microglobulin gene: primary structure and definition of the transcriptional unit*, in *J. Immun.* 1987. p. 3132-3138.
44. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
45. *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual*. 2008, Thermo Fisher Scientific Inc Wilmington, U.S.A.
46. Mueller, O., et al., *A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(1): p. 128-34.
47. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. *BMC Mol Biol*, 2006. **7**: p. 3.
48. Pfaffl, M.W., *Relative quantification*, International University Line. p. 63-82.
49. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
50. Pfaffl, M.W., H.W. Graham, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*, in *Nucleic Acids Research*. 2002.
51. Spang, A. 2010: Regensburg.
52. Cronin, M., et al., *Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(1): p. 35-42.
53. Kluin, P.M., et al., *B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma*, in *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, S.H. Swerdlow, et al., Editors. 2008, International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon. p. 265-266.
54. Mizuno, T., et al., *RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies*. *Diagn Mol Pathol*, 1998. **7**(4): p. 202-8.
55. Koch, I., et al., *Real-time Quantitative RT-PCR Shows Variable, Assay dependent Sensitivity to Formalin Fixation: Implications for Direct Comparison of Transcript Levels in Paraffin-embedded Tissues*, in *Diagn Mol Pathol*. 2006. p. 149-156.
56. Farragher, S.M., et al., *RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **130**(3): p. 435-45.
57. Kawarazaki, S., et al., *Conversion of a molecular classifier obtained by gene expression profiling into a classifier based on real-time PCR: a prognosis predictor for gliomas*. *BMC Med Genomics*. **3**: p. 52.
58. Fan, C., et al., *Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(6): p. 560-9.

59. Gianni, L., et al., *Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer.* J Clin Oncol, 2005. **23**(29): p. 7265-77.
60. Archer, K.J., et al., *Identifying genes for establishing a multigenic test for hepatocellular carcinoma surveillance in hepatitis C virus-positive cirrhotic patients.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(11): p. 2929-32.
61. Hartmann, E., et al., *Five-gene model to predict survival in mantle-cell lymphoma using frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.* J Clin Oncol, 2008. **26**(30): p. 4966-72.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Bestimmung des molekularen Burkitt Lymphoms auf der Basis von Paraffinblockmaterial

in dem Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie

unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. M.-L. Hansmann mit Unterstützung durch Herrn Dr. M. Frank ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht*. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

1. Vortrag im Rahmen des 15. Treffens der European Association for Haematopathology, Uppsala, Schweden, 2010:

Thema: "Burkitt lymphoma can be distinguished from Diffuse large B-cell lymphoma by qRT-PCR"

2. Poster im Rahmen der 3rd Mildred Scheel Cancer Conference, Bonn 2008:

Thema: "Establishing a set of qRT-PCR assays to distinguish Burkitt's lymphoma from Diffuse large B-cell lymphoma on a molecular level (first data)"

Frankfurt am Main, 03.04.2013