

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. St. Burdach)

**Hochaufgereinigte CD19⁺CD10⁺ fetale B-Zellen aus
Nabelschnurblut als Vergleichszellen zur pädiatrischen
Akuten Lymphoblastischen Leukämie (cALL)
identifizieren eine neue Expressionssignatur des
malignen Phänotyps**

Beate Beinvogl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. St. Burdach
2. Priv.-Doz. Dr. M. H. M. Nathrath

Die Dissertation wurde am 13.08.2009 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.04.2010
angenommen.

Für meine Familie

Gedenken möchte ich Karen B., die sich am 15.5.1987, zwei einhalb Jahre nach Erstdiagnose einer ALL, von der Welt verabschiedete.

Gedenken möchte ich den betroffenen Kindern, die ich in der Kinderklinik München Schwabing mitbetreuen durfte, die mir so deutlich zeigten, wie viel Ausdauer und Kraft die Therapie dieser Erkrankung verlangt, dass aber ein so harter Schicksalsschlag bestritten werden kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Hämatopoese.....	1
1.1.1	Regulation	3
1.2	Leukozytopoese	3
1.3	Leukämie.....	7
1.3.1	Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL).....	7
1.3.2	Klassifikation	9
1.3.3	Klinische Symptomatik.....	12
1.3.4	Diagnostik	13
1.3.5	Risiko-Stratifikation und Prognose	14
1.3.6	Therapie und Verlaufskontrolle	15
1.4	Funktionelle Genomik.....	16
1.5	Aufgabenstellung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	19
2.2	Geräte.....	20
2.3	Untersuchungsmaterial	20
2.3.1	Die Kontrollproben	20
2.3.2	Probengewinnung	21
2.3.3	Aufbewahrung	21
2.3.4	Die Leukämieproben	22
2.4	Methode zur Anreicherung CD19⁺CD10⁺ B-Lymphoblasten.....	23
2.4.1	Zellseparation mittels Dichtezentrifugation	24
2.4.2	Bestimmung der Zellzahl.....	25
2.4.3	Block mit IgG.....	25
2.4.4	CD19 ⁺ Selektion.....	25
2.4.5	Entfernung der Dynabeads	27
2.4.6	CD10 ⁺ Selektion.....	28
2.4.7	Aufbewahrung	30
2.4.8	Durchflusszytometrische Kontrolle.....	31

2.5	Präparation der Nukleinsäuren für die Genchip Analyse mit cDNA Microarrays.....	33
2.5.1	Präparation der Gesamt-RNA aus den Zellen	33
2.5.2	cDNA-Synthese.....	35
2.5.3	in vitro-Transkription und Fragmentierung	36
2.6	GeneChip® System (Affymetrix).....	37
2.6.1	GeneChip® Arrays	37
2.6.2	Hybridisierung	41
2.6.3	Waschen, Färbung und Array Scan	42
2.7	Methoden zur Auswertung der Analysedaten.....	43
2.7.1	Normalisierung	43
2.7.2	Auswertungsprogramme	44
2.7.3	Clustering	45
2.7.4	Principal Component Analysis (PCA).....	46
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Bisherige Analysen	48
3.2	Aufreinigung CD19⁺CD10⁺ fetaler B-Lymphoblasten aus Nabelschnurblut.....	48
3.3	Die Genchipanalyse	53
3.3.1	Die ausgewählten Proben	53
3.3.2	Qualitätskontrolle	54
3.3.3	Unsupervised Cluster Analyse	54
3.3.4	Principal Component Analyse (PCA)	56
3.3.5	Significance Analysis of Microarrays (SAM)	57
3.3.6	Supervised Analysis.....	58
3.3.7	Prediction Analysis of Microarrays (PAM).....	60
4	Diskussion.....	66
4.1	Das Genexpressionsprofil Leukämischer Lymphoblasten (cALL) im Vergleich zu gesunden B-Lymphoblasten des gleichen Differenzierungsstadiums	66
4.1.1	Geeignete Kontrollproben	66
4.1.2	Quellen CD19 ⁺ CD10 ⁺ fetaler B-Zellen	68
4.1.3	Aufreinigungsmethoden im Vergleich	69
4.1.4	Die Expressionssignatur des malignen Phänotyps	71
4.1.5	cALL assoziierte Gene	72
4.1.6	Ergebnisse anderer vergleichenden Genexpressionsanalysen	83

4.2	Anwendungsmöglichkeiten in der Diagnostik.....	85
4.2.1	Das Rebound Phänomen.....	85
4.2.2	Die Erfassung von MRD (Mininal Residual Disease).....	85
5	Zusammenfassung	88
6	Literaturverzeichnis	90
7	Abbildungsverzeichnis.....	103
8	Tabellenverzeichnis	104
9	Anhang.....	105

Abkürzungen

A	absent (Gen ist nicht exprimiert)
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
ALL-BFM	ALL-Studie Berlin-Frankfurt-Münster
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
BCR	B-Cell Receptor (B-Zell Rezeptor)
BM	Bone marrow (Knochenmark)
Bp	Base pair (Basenpaare)
BSA	Bovines Serum Albumin
cALL	common Acute Lymphoblastic Leukemia
CB	Cord Blood (Nabelschnurblut)
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CFU	Colony Forming Units
CLL	Chronische Lymphoblastische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CR	Complete Remission (komplette Remission)
DC	Dendritic Cell (Dendritische Zelle)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGIL	European Group for the Immunological Classification of Leukemias
EST	Expressed Sequence Tags
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FC	Fold Change (Faktor des Expressionsunterschieds)
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FDR	False Discovery Rate (Prozentualer Anteil falsch weil zufällig als signifikant identifizierter Gene)
FEB	Fetale B-Zellen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gravitationsbeschleunigung [$g = 9,81 \text{ m/s}^2$]
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
h	Stunde
HLA	Human Leukocyte Antigen (Humanes Leukozyten Antigen)
HMGB2	High-mobility group box 2
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
IVT	In-vitro Transkription

KIR	Killer Cell Inhibitory Receptor
KM	Knochenmark
λ	Wellenlänge [m]
l	Liter
LIR	Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor
m	milli- [10^{-3}]
M	marginal (Gen ist geringfügig exprimiert)
M	Mol
MACS	Magnetic Activating Cell Sorting (magnetsich aktivierte Zellsortierung)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC I / II	Major Histocompatibility Class I / II (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I / II)
min	Minute
μ	mikro- [10^{-6}]
MM	mismatch
MRD	Minimal Residual Disease (Minimale Resterkrankung)
mRNA	messenger RNA
n	nano-, [10^{-9}]
n.a.	nicht analysiert
NK	Natürliche Killerzellen
NSB	Nabelschnurblut
OD	optische Dichte
P	present (Gen ist exprimiert)
PAM	Prediction Analysis of Microarrays
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PM	perfect match
PXDN	Peroxidasin homolog
RNA	Ribonucleid Acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Realtime-PCR
SAM	Significance Analysis of Microarrays
sec	Sekunde
SF	Skalierungsfaktor
SOX	SRY-related HMG-box
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
STK32B	Serin/Threonin Kinase 32B
TCR	T-Cell Receptor (T-Zell Rezeptor)
TdT	Terminale Deoxynukleotidyltransferase
U	Umdrehungen
U	Unit (Einheit)
ZNS	Zentrales Nerven System

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Als Hämatopoese wird die Bildung der Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen und deren Reifung bezeichnet (griech. *Haimatos* - Blut, *Poiesis* – Herstellung). Alle zellulären Bestandteile des Blutes entspringen derselben, im Knochenmark lokalisierten, hämatopoetischen Stammzelle, welche die Fähigkeit besitzt, sich fortwährend selbst zu erneuern. Sie wird als pluripotent bezeichnet, da sie sich unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in sämtliche unterschiedliche Zellen des Blutes und des Immunsystems differenzieren kann. Abbildung 1-1 zeigt eine schematische Übersicht der Hämatopoese.

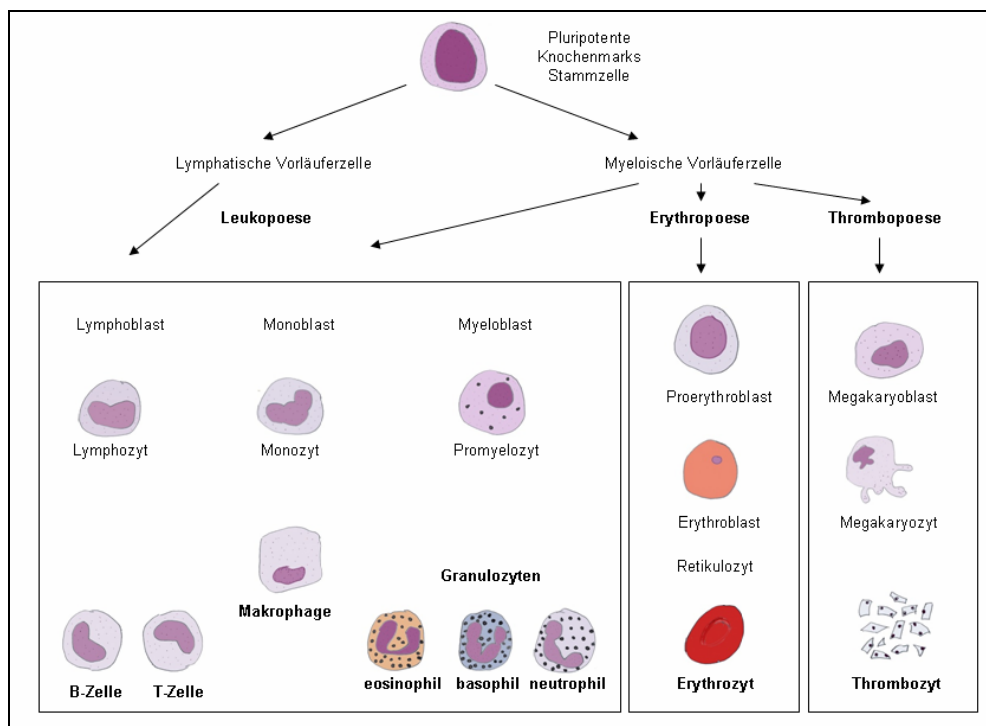


Abbildung 1-1 Übersicht der Hämatopoese

Pluripotente Stammzellen differenzieren sich unter dem Einfluss von Wachstumshormonen und Zytokinen in eine myeloische oder lymphatische Vorläuferzelle, um dann eine weitere Reifung in der Leukopoese, Erythropoese oder Thrombopoese zu durchlaufen. Nach (Produnis, 2005)

Aus der pluripotenten Stammzelle entstehen zunächst zwei verschiedene Vorläuferzellen, die myeloischen und lymphoiden Progenitorzellen. Diese können nur noch in bestimmte Zellreihen differenzieren. Aus den myeloischen Vorläuferzellen können sich sowohl Monozyten, Granulozyten und Makrophagen als auch Erythrozyten und Thrombozyten bilden, aus den lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich die verschiedenen Zellen des adaptiven Immunsystems, die B- und T-Lymphozyten. Nach der Art der gebildeten Blutzellen unterscheidet man die Leukopoese, die Bildung der weißen Blutkörperchen (Leukozyten), die Erythropoese, die Bildung der roten Blutkörperchen (Erythrozyten), und die Thrombopoese, die Bildung der Blutplättchen (Thrombozyten) mit jeweils unterschiedlicher Funktion.

Beim frühen Embryo findet die Hämatopoese im Mesenchym des Dottersacks statt. Mit dessen Rückbildung läuft die Blutbildung beim Fetus in der Leber, ab Mitte der Fetalperiode auch in der Milz ab. Nach der Geburt erfolgt die Hämatopoese im roten Knochenmark: Beim Erwachsenen in den platten Knochen Brustbein und Becken, bei Kindern zusätzlich in den langen Röhrenknochen der Arme und Beine.

Die Leukozyten verfügen je nach ihrer Art über unterschiedliche Gestalt und verschiedenen Aufbau. Die Größe der Leukozyten schwankt zwischen 7 μm bei Lymphozyten und 20 μm bei Monozyten. Leukozyten besitzen einen Zellkern mit der gesamten Erbinformation des Organismus. Die Lebensdauer der Zellen reicht von wenigen Tagen bis zu mehreren Monaten. Gedächtnis B- und T-Zellen können sogar ein Leben lang erhalten bleiben und bilden somit die Grundlage der erworbenen Immunität. Leukozyten sind amöboid beweglich und können aktiv aus dem Blut in die verschiedenen Zellgewebe einwandern.

Die funktionsfähigen, reifen Leukozyten haben eine essentielle Rolle in der Immunabwehr eines Organismus mit der Hauptfunktion, körperfremde und für den Organismus unverträgliche Stoffe bzw. Krankheitserreger unschädlich zu machen. Jede Leukozyten-Untergruppe hat dabei eine unterschiedliche Aufgabe, von der Antikörper-Produktion und Markierung von Antigenen, über die Bekämpfung von körperfremden und entarteten körpereigenen Zellen durch

Zytolyse und Phagozytose, bis hin zur Regulation der Immunreaktion durch die Produktion von Mediatoren (Zytokine und Leukotriene).

1.1.1 Regulation

Die physiologische Regulation der hämatopoetischen Zelldifferenzierung und Reifung erfolgt durch die Produktion von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Zytokine). In den letzten Jahren gelang die Identifizierung und molekulare Charakterisierung der Faktoren, die für die Proliferation und Differenzierung von bestimmten hämatopoetischen Zellen verantwortlich sind (Burdach, 1992; Burdach and Levitt, 1988; Burdach et al., 1988). Inwieweit sich hämatopoetische Zellen nach einem „intrinsischen“ genetischen Programm entwickeln bzw. „extrinsisch“ durch Zytokine in ihrer Differenzierung beeinflusst werden, ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Studien. Unter den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, eine Familie von Glykoproteinen, unterscheidet man zwischen koloniestimulierenden Faktoren (CSF), die das Wachstum anregen, und Interleukinen (IL), die Zell-Zell-Interaktionen vermitteln. Die Faktoren sind in sehr niedrigen Konzentrationen wirksam. Wachstumsfaktoren haben eine große therapeutische Bedeutung in der Hämatologie und Onkologie gewonnen. Beispiele solcher Wachstumsfaktoren sind GM-CSF, G-CSF, IL-1, IL-3, IL-6, Erythropoetin und Thrombopoetin (Burdach, 1991).

1.2 Leukopoese

Die Leukopoese bezeichnet den Reifungsprozess der Leukozyten ausgehend von Myelo-, Mono- oder Lymphoblasten, welche direkt aus der pluripotenten Stammzelle entstehen (vgl. Abbildung 1-1) bis hin zu den jeweilig entdifferenzierten Granulozyten (Eosinophile, Basophile und Neutrophile), Makrophagen und den einzigen adaptiven Zellen des Immunsystems, den B- und T-Lymphozyten. Bei der Entwicklung von der undifferenzierten Progenitorzelle zur reifen Zelle mit festgelegter Funktion durchlaufen die Zellen

verschiedene Reifungsstadien mit spezifischen morphologischen und funktionalen Charakteristika, die sich mit stadienspezifischen Expressionsmustern von Oberflächenantigenen (CD, *Cluster of Differentiation*) feststellen lassen. Im Folgenden soll nun genauer auf die Entwicklung der lymphozytären, insbesondere der B-Zellreihe eingegangen werden, da diese für die vorliegende Arbeit von unmittelbarer Relevanz ist (vgl. Abbildung 1-2).

Durch die Spezifität verschiedener CD-Moleküle einzelner Zellentwicklungsstufen können diese sowohl diagnostisch als auch therapeutisch genutzt werden. Sie dienen als Marker, die durch monoklonale Antikörper erkannt und auf diese Weise nachgewiesen oder als therapeutische Zielstrukturen genutzt werden können. Die Analyse des Expressionsmusters von CD-Molekülen auf Leukämiezellen, die sogenannte Immunphänotypisierung, spielt u.a. eine entscheidende Rolle bei der Diagnose und Klassifikation von Leukämien.

Knochenmark				Peripheres Blut			
Lymphatische Vorläuferzelle	Frühe pro-B-Zelle	Späte pro-B-Zelle	große/frühe prä-B-Zelle	kleine/späte prä-B-Zelle	Unreife B-Zelle	Reife, naive B-Zelle	
Diagnose einer cALL							
CD34	CD34	+/-					
CD45	CD45	CD45	+	CD45	CD45	CD45	CD45
	HLA-DR	HLA-DR	+	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR
	CD19	CD19	+	CD19	CD19	CD19	CD19
	CD79a	CD79a	+	CD79a	CD79a	CD79a	CD79a
	CD10	CD10	+	CD10			
		CD24	+/-	CD24	CD24	CD24	CD24
		CD22 _Z	+	CD22 _M	CD22 _M	CD22 _M	CD22 _M
		CD20	+/-	CD20	CD20	CD20	CD20
	TdT	TdT	+/-	(TdT)			
			+	(IgM _Z)	IgM _Z	IgM _M	IgM _M

Abbildung 1-2 Stadien der Reifung von B-Lymphozyten

Stadienspezifische Expression der Oberflächenantigene. Das Stadium der B-Zell-Reifung, in dem sich die proliferierenden Zellen bei der cALL (common Acute Lymphoblastic Leukemia) befinden, ist orange gekennzeichnet. Z = Zytoplasma, M = Zellmembran. Nach (Janeway, 2002)

Da die Lymphozyten die einzigen Immunzellen sind, die Antigene spezifisch erkennen und unterscheiden können, sind diese auch die einzigen Zellen, die die Kernfunktionen des adaptiven Immunsystems, die Spezifität und das Gedächtnis, ausführen können. Bei der B-Zellentwicklung (vgl. Abbildung 1-3) ist dafür die Bildung eines funktionellen B-Zell-Rezeptors, die membran-gebundene Form des Antikörpers, von entscheidender Bedeutung.








	Stammzelle	Frühe Pro-B-Zelle	Späte Pro-B-Zelle	Große Prä-B-Zelle	Kleine Prä-B-Zelle	Unreife B-Zelle	Reife B-Zelle
							
Gene der schweren Kette	Keimbahn	D-J-Umordnung	V-DJ-Umordnung	VDJ umgeordnet	VDJ umgeordnet	VDJ umgeordnet	VDJ umgeordnet
Gene der leichten Kette	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn	V-J-Umordnung	VJ umgeordnet	VJ umgeordnet
Oberflächen-Ig	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	μ -Kette vorübergehend auf der Oberfläche als Teil eines Prä-B-Zell-Rezeptors: hauptsächlich in der Zelle	Intrazelluläre μ -Kette	IgM auf der Zelloberfläche exprimiert	IgD und IgM aus alternativ gespleißten Transkripten für die schwere Kette

Abbildung 1-3 Die Entwicklung einer B-Zelle

Im Rahmen der B-Zellreifung durchläuft eine Zelle mehrere Stadien, charakterisiert durch die Umordnung und Expression verschiedener Immunglobulingene (Janeway, 2002).

Nur mit diesem Antigenrezeptor sind reife B-Zellen später in der Lage, fremde Antigene zu erkennen und durch die Sezernierung dieser Rezeptoren (Antikörper) feindliche Strukturen zu bekämpfen. Die Struktur eines typischen Antikörpermoleküls besteht aus zwei identischen schweren Proteinketten (H,

heavy), mit jeweils 4 bis 5 Domänen, die über Disulfidbrücken mit zwei identischen leichten (L, *light*) Proteinketten verknüpft sind. Jede Kette besitzt zwei Domänen: eine variable Domäne am N-Terminus, welche die Antigenbindungsstelle bildet, und die konstante Domäne am C-terminus (C, *constant*), welche die Antikörperfunktion (z.B. Rezeptorbindung) vermittelt. Die Antigenspezifität der variablen Domäne wird durch die Verknüpfung bestimmter Gensegmente festgelegt. Diese Segmente werden als V- (*variabel*), D- (*diversity*) und J- (*joining*) Segmente bezeichnet, weshalb der Prozess auch als V(D)J-Rekombination bezeichnet wird. Dabei werden diese Segmente, die den antigenbindenden Teil des B-Zell-Rezeptors bilden, durch Rekombination eines Genelements aus einer Genfamilie mit entsprechenden Genelementen aus anderen Genfamilien zu einem funktionellen Rezeptorgen fusioniert. Nur wenn die Gene dabei schrittweise erfolgreich rekombiniert werden, ein Prozess, der als produktive Genumlagerung bezeichnet wird, kann die Zelle in den jeweils nächsten Entwicklungsschritt ihres Reifungsprozesses übergehen.

Die Knochenmarkstammzelle hat mit der Umlagerung ihrer Immunglobulin(Ig)-Gensegmente noch nicht begonnen. Diese befinden sich noch in der Keimbahnkonfiguration etwa wie nicht-lymphatische Zellen. Das erste Stadium der B-Zellentwicklung, in welcher die Rekombination der schweren Kette erfolgt, stellen die Pro-B-Zellen dar, die sich direkt von pluripotenten Stammzellen ableiten. Durch die produktive Genumlagerung wird dabei eine sogenannte schwere VDJC μ -Kette gebildet, die dann zum Eintritt in das Stadium der Prä-B-Zelle führt. Im ersten Prä-B-Zell-Stadium, den so genannten großen Prä-B-Zellen, wird die schwere μ -Kette zusammen mit einem Ersatz für die leichte Kette in Form eines Prä-B-Zell-Rezeptors auf der Zelloberfläche exprimiert. Die großen Prä-B-Zellen teilen sich mehrmals und entwickeln sich schließlich zu den kleinen Prä-B-Zellen, die keinen Prä-B-Zell-Rezeptor mehr bilden und nur noch über intrazelluläre schwere VDJC μ -Ketten verfügen. In den kleinen Prä-B-Zellen wird mit der V-J-Umordnung der leichten Kette begonnen. Nachdem die Gene für die leichte Kette erfolgreich umgelagert wurden, geht die Zelle ins Stadium einer unreifen B-Zelle über. Dabei wird ein komplettes B-Zell-Rezeptormolekül IgM auf der Oberfläche exprimiert. Reife B-Zellen, die schließlich das Knochenmark verlassen und in das periphere Blut übertreten,

zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch alternatives Spleißen zusätzlich zur μ -Kette noch eine schwere δ -Kette produzieren. Man erkennt sie an der zusätzlichen Expression von IgD auf der Zelloberfläche (Janeway, 2002).

1.3 Leukämie

Alle hämatopoetischen Zellen können maligne entarten. Leukämien (griech. *Leukos* – weiß, *haima* – Blut) sind maligne Erkrankungen der weißen Zellreihe. Es findet eine systematisierte, diffuse, autonome Proliferation einer Leukozytenpopulation statt. Die Expansion eines malignen Zellklons führt zur generalisierten Ausbreitung desselben im blutbildenden Knochenmark, eventueller Infiltration extramedullärer Organe und Ausschwemmung dieser leukämischen Zellen ins Blut. Die Transformation oder Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle erfordert Veränderungen in ihrem Genom. Entsprechend dem Differenzierungsstadium der entarteten Zellpopulation werden die verschiedenen Leukämien bezeichnet. Je nach beteiligtem Zelltyp unterscheidet man zunächst myeloische von lymphatischen Leukämien. Die myeloischen Leukämien gehen von den Vorläuferzellen der Granulozyten und Monozyten, im weiteren Sinne auch der Erythrozyten und Thrombozyten aus. Anhand des klinischen Verlaufes wird weiter die Akute Myeloische Leukämie (AML) von der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) unterschieden. Die CML wird zu den chronischen myeloproliferativen Erkrankungen gezählt. Lymphatische Leukämien betreffen die Lymphozyten und ihre Vorläuferzellen. Sie werden ebenfalls in Akute- (ALL) oder Chronische Lymphatische Leukämien (CLL) unterteilt. Die CLL gehört zu den niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen.

1.3.1 Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL)

Laut dem Deutschen Kinderkrebsregister 2006/2007 sind Leukämien mit einem Anteil von 34,1% aller Krebserkrankungen im Kindesalter die häufigste maligne Erkrankung <15 Jahren: davon 79,1% ALL und 14% AML (Kaatsch, 2009) .

Die Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL) umfasst selbst nochmals eine heterogene Gruppe maligner Erkrankungen. In Abhängigkeit von der betroffenen Zellreihe kann sie weiter in B- oder T-Zell Leukämien unterteilt werden. In der pädiatrischen Onkologie gehen etwa 86,5% der ALL auf B-Lymphoblasten, 13,5% auf T-Lymphoblasten zurück. Untergruppen der B-Vorläuferzellen-ALL haben laut der deutschen Studie „ALL-BFM90“ eine Verteilung von 75% common ALL (cALL), 19% prä-B-ALL und 6% pro-B-ALL (Schrappé et al., 2000a).

Die ALL hat eine Prävalenz von 3,3 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner <15 Jahre. Die Inzidenz ist etwa 5-mal höher als bei der AML (0,7/100.000). Das Erkrankungsalter beträgt bei der ALL bis zum 18. Lebensjahr im Median 4,7 Jahre und zeigt einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr. Das Erkrankungsalter bei der AML liegt bei 7,9 Jahren. Das Geschlechterverhältnis von Jungen zu Mädchen beträgt 1,2 : 1, bei Säuglingen mit ALL (bis 12 Monate) ist das Geschlechtsverhältnis umgekehrt. Die Inzidenz in Deutschland, Costa Rica, Australien und unter kaukasischen Kindern in den USA liegt um das Doppelte höher als in Indien, Kuwait, Cuba und unter afroamerikanischen Kindern. Die Gründe hierfür sind noch nicht aufgeklärt (Bhatia et al., 2002).

Spontane somatische Mutationen oder präexistierende Keimbahnmutationen sind als wahrscheinlichste Ursache bei den meisten Patienten anzunehmen, denn Leukämien entstehen durch eine Fehlregulation der klonalen Expansion unreifer lymphoider (ALL) (vgl. Abbildung 1-2) oder myeloischer (AML) Progenitorzellen, die in einem bestimmten Stadium der Differenzierung arretiert sind, sich aber weiterhin teilen. Bestimmte konstitutionelle chromosomale Aberrationen und damit verbundene genetische Syndrome und / oder Immundefekte stellen Risikofaktoren für die ALL dar. Kinder mit Trisomie 21 haben beispielsweise ein ca. 20-fach erhöhtes Risiko, an einer akuten Leukämie zu erkranken. Auch genetische Syndrome wie die Fanconi-Anämie, Neurofibromatose Typ1, Ataxia teleangiectatica und das Bloom-Syndrom gehen ebenfalls mit einer deutlich erhöhten Inzidenz einher. Die genaue Ursache hierfür ist noch nicht bekannt (Buffler et al., 2005; Greaves, 2006). Ein erhöhtes

Geburtsgewicht stellt ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die ALL dar (Hjalgrim et al., 2004).

Auch einige exogene pathogenetische Faktoren pädiatrischer Leukämien wurden inzwischen durch Studien belegt, beispielsweise die mutagene Wirkung von Strahlung in der Schwangerschaft, Kindheit oder im Rahmen einer Therapie (Bhatia and Robison, 1999; Kaatsch et al., 2008; Loning et al., 2000; Neglia et al., 1991), Infektionen oder abnorme Immunreaktionen auf häufige Infektionen (Kroll et al., 2006; MacKenzie et al., 2006), Chemikalien / Medikamente (Alexander et al., 2001; Pui and Relling, 2000) und Ernährung. Es gibt zunehmende Hinweise, dass die sozioökonomischen Bedingungen einen Einfluss auf die Inzidenzraten haben können (Adelman et al., 2005; Hrusak et al., 2002; Ross and Milner, 2007; Swensen et al., 1997).

1.3.2 Klassifikation

Die Einteilung der ALL nach morphologischen Kriterien entsprechend der FAB-Klassifikation in die Subtypen L1, L2, L3 (Bennett et al., 1976) hat für die klinische Diagnostik an Bedeutung verloren und wurde von immunologischen, zyto- und molekulargenetischen Methoden abgelöst, da diese eine genauere Typisierung erlauben (Creutzig and Schrappe, 1996; Onciu and Pui, 1999). Die Myeloperoxidase-Reaktion (POX) ist für die Abgrenzung der ALL von der AML gut nutzbar (ALL: <3% POX-positiv) (Schrappe et al., 2005).

In der Immunophänotypisierung werden mit fluoreszenzmarkierten, monoklonalen Antikörpern ganz bestimmte CD Antigene auf der Zelloberfläche nachgewiesen (vgl. 1.2). Da aber nur sehr wenige dieser Antikörper hochspezifisch sind für einzelne Differenzierungsreihen, wird zur Klassifikation ein *Panel* von Antikörpern eingesetzt. Die meist verbreitete immunologische Klassifikation in Europa ist die EGIL (*European Group for the Immunological Classification of Leukemias*), dargestellt in Tabelle 1-1.

Durch die zunehmende Verbesserung zytogenetischer Methoden (Bandenfärbung) und der Einführung molekularer Techniken in die genetische Diagnostik der Leukämien wurden einige numerische und strukturelle

chromosomale Aberrationen beschrieben, von denen viele typisch sind für bestimmte Leukämieformen. Diese ermöglichen einerseits eine weitere Einteilung in genetische Subtypen der ALL, jeweils mit unterschiedlicher Prognose, und geben gleichzeitig einen Einblick in die Pathogenese der ALL. Abbildung 1-4 zeigt eine Übersicht der wichtigsten chromosomalen Aberrationen bei B- und T-ALL im Kindesalter mit entsprechendem molekulargenetischen Befund. Die wichtigsten chromosomalen Aberrationen bei der ALL sind die Translokationen t(1;19) (prä-B-ALL mit unklarer Prognose), t(4;11) (pro-B-ALL mit schlechter Prognose), t(8;14) (B-Zell-ALL/B-Zell-Lymphom mit guter Prognose), t(9;22) (c-ALL mit guter Prognose), t(11;14) (T-ALL) und t(12;21) (cALL mit guter Prognose) (Loh and Rubnitz, 2002; Schrappe et al., 2005).

Tabelle 1-1 Immunologische Klassifizierung der ALL entsprechend der EGIL-Kriterien (Bene et al., 1995)

ALL	Immunologische Kriterien
ALL der B-Zell-Linie	- CD19+ und/oder CD79a+ und/oder CD22+ - positiv mindestens 2 von 3 oben genannten Antigene - meist Tdt+ und HLA-DR+
Pro-B-ALL	keine Expression weiterer Differenzierungsantigene der B-Zell-Linie
common-ALL	CD10+
prä-B-ALL	zytoplasmatisches IgM+
B-ALL/B-NHL	Ig+ (membranständig oder zytoplasmatisch) Membranständige κ - oder λ -Ig-Leichtketten+
ALL der T-Zell-Reihe	- zytoplasmatisch (membranständig) CD3+ - meist Tdt+,HLA-DR- und CD34-
Pro-T-ALL	CD7+
Prä-T-ALL	CD2+ und/oder CD5+ und/oder CD8+
Intermediäre T-ALL	CD1a+
Reife-T-ALL	membranständig CD3+, CD1a-
α/β +T-ALL	Anti-TCR α/β +
δ/γ +T-ALL	Anti-TCR δ/γ +
ALL mit Koexpression von myeloischen Antigenen (My+ALL)	- CD13, CD33, CD65 auf >20% der Lymphoblasten einer immunphänotypischen ALL

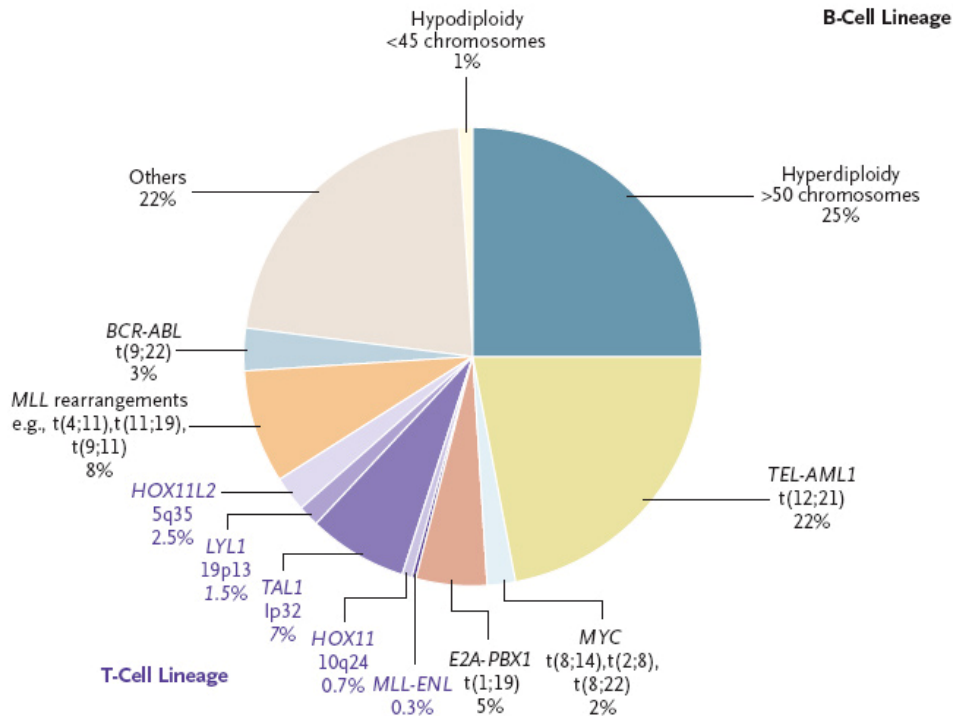


Abbildung 1-4 Häufigkeit der spezifischen chromosomalen Aberrationen der B- und T-ALL im Kindesalter (Pui et al., 2004a).

Obwohl die Häufigkeit bestimmter genetischer Subtypen im Kindesalter sehr unterschiedlich ist vom Erwachsenenalter, sind die allgemeinen Mechanismen, die eine Induktion der ALL bewirken, sehr ähnlich: hyperdiploide Chromosomensätze mit mehr als 50 Chromosomen, aberrierende Expression von Proto-Onkogenen und chromosomale Translokationen, die das Entstehen von Fusionsgenen als Folge haben, welche folglich aktive Kinasen und veränderte Transkriptionsfaktoren kodieren (Pui et al., 2004a). Es sind dabei nicht nur immer dieselben Chromosomen involviert, sondern auch immer wieder dieselben Gene. Die strukturellen Chromosomenanomalien beruhen auf Mutationen, meist balancierte Translokationen, in hämatopoetischen Stammzellen oder stammzellnahen Vorläuferzellen, welche die zelluläre Funktion verändern und somit eine leukämische Transformation bewirken. Dabei werden entscheidende Zellregulationsprozesse für die zelluläre Selbsterneuerung, Kontrolle der normalen Proliferation, Differenzierung und Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-Signalen verändert. Durch die Translokationen können neue Fusionsgene (Hybridgene) entstehen, deren

Bedeutung für die Leukämogenese in einigen Fällen nachgewiesen ist. Beispielsweise bewirkt die Translokation t(12;21) die Entstehung eines Fusionsgens welches den 5' Teil des Gens TEL und nahezu die ganze kodierende Region eines weiteren Gens, AML1 umfasst. TEL ist Mitglied einer Familie von Genen, die Transkriptionsfaktoren kodieren. AML1 kodiert für die alpha-Untereinheit eines *core binding factors*, dem Hauptregulator in der Entstehung vollentwickelter hematopoetischer Stammzellen (Speck and Gilliland, 2002). Normalerweise bindet AML1 an die als *core enhanced sequence* bezeichnete DNA-Region und rekrutiert andere Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren an diese Region (Hiebert et al., 1996). Der daraus entstehende Proteinkomplex reguliert dann die Transkription von Targetgenen, indem er über die enthaltenen Histon-Acetylasen eine Konformationsänderung im Chromatin bewirkt. Das fehlerhaft entstehende TEL-AML1 Fusionsprotein kann zwar wie AML1 an den *core enhanced sequence* binden, rekrutiert aber Histon-Deacetylasen, die das Schliessen der Chromatinstrukturen induzieren und damit die Transkription inhibieren (Pui et al., 2004a).

Es werden häufig numerische Anomalien im Zusammenhang mit der cALL identifiziert. Bei hyperdiploidem Chromosomensatz mit >50 Chromosomen liegt meistens eine Trisomie der Chromosomen X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20 und 21 vor (Heerema et al., 2000). Vier Kopien des Chromosom 21 können in manchen Fällen nachgewiesen werden. Die Trisomien haben je nach Therapieprotokoll eine etwas unterschiedliche Prognose (Pui et al., 1990). Allgemein gilt, dass Hyperdiploidien von 54-58 Chromosomen mit einer relativ guten Prognose verbunden sind, während extreme Hyperdiploidien von 59 – 84 Chromosomen oder Hypoploidien (weniger als 45 Chromosomen) eine schlechte Prognose ergeben (Harrison et al., 2004; Raimondi et al., 2003).

1.3.3 Klinische Symptomatik

Kinder mit ALL haben meist eine kurze Krankheitsanamnese von Tagen bis wenigen Wochen. Manchmal gibt es Hinweise auf eine mehrmonatige unspezifische Anamnese mit unklaren, wechselnden Schmerzen, langsam

zunehmender Schwäche und fieberigen Infekten. Es gibt keine Früherkennung für die ALL. Mögliche Frühsymptome sind schwer zu erkennen. Einzelsymptome reflektieren die hämatopoetische Situation durch die massive Knochenmarkinfiltration als Folge der schließlich zur Diagnose führenden leukämischen Proliferation: Eine Neutropenie kann hohes Fieber bedingen. Ein Mediastinaltumor kann eine Einflusstauung hervorrufen. Ein Pleura- oder Perikarderguss kann Ursache für Atemnot und Husten sein. Abgeschlagenheit und Blässe durch Anämie, Bauchschmerzen bei Ileus, Hepato- oder Splenomegalie, Kopfschmerzen und Hirnnervenausfall bei ZNS-Befall, indolente Hodenschwellung bei Hodenbefall, Blutungszeichen bei Thrombozytopenie, Knochen- und Gelenkschmerzen durch massiven Knochenmarkbefall, und Lymphknotenvergrößerung sind weitere mögliche Symptome. Seltener treten Niereninsuffizienz, Orbitatumor, Sehstörung, Gingivahyperplasie, Hautinfiltrate oder das Mikulicz-Syndrom auf. Durch die Kombination solcher unspezifischen Einzelsymptome ergibt sich häufig die Verdachtsdiagnose, die dann durch die wegweisende spezifische Diagnostik bestätigt werden kann.

1.3.4 Diagnostik

Die Diagnostik setzt sich aus der klinischen- und Leukämie-Diagnostik zusammen. Das Blutbild gibt initial in den meisten Fällen eindeutige Hinweise auf die leukämiebedingte hämatopoetische Insuffizienz. Selten ist das Blutbild normal. Die Leukämiediagnostik umfasst das Differentialblutbild, eine Knochenmarkspunktion (für Zyto- und Molekulargenetische Diagnostik, Immunphänotypisierung, DNA-Gewinnung) und eine Lumbalpunktion um einen Befall des ZNS auszuschliessen. Die klinische Diagnostik wird hinzugezogen, um die Ausbreitung und Organmanifestationen der Erkrankung zu ermitteln, und um die leukämiebedingten Vorschädigungen abschätzen zu können (Schrappe et al., 2005). Die erforderliche initiale Diagnostik ist detailliert in Studienprotokollen und Leitlinien festgelegt und muss bestimmten Mindestanforderungen genügen (Corrigan and Feig, 2004; Schrappe and

Creutzig, 2008). Die diagnostischen Prioritäten sind dabei an dem jeweils gültigen Behandlungsplan auszurichten.

Für die Diagnosefindung sind die erforderlichen Maßnahmen nicht besonders umfangreich. Lediglich die spezielle Leukämiediagnostik für die genaue biologische Charakterisierung (vgl. 1.3.5) bedeutet einen relativ großen Aufwand. Diese ist allerdings unabdingbar für eine eindeutige und differenzierte Diagnosestellung, sodass der / die Patient(in) die adäquate, risikoadaptierte Therapie erhalten kann.

1.3.5 Risiko-Stratifikation und Prognose

Die Überlebensraten für die ALL im Kindesalter haben sich seit den achtziger Jahren rasant verbessert. Mit erstmals eingesetzter zytostatischer Dauertherapie konnte die mittlere Überlebensrate zwischen 1963 und 1967 auf 17 Monate verlängert werden. Im Jahr 1972 wurde im St. Jude Children's Research Hospital Memphis erstmals eine rezidivfreie Überlebensrate von 30% erzielt (Creutzig and Klusmann, 2004). In den achtziger Jahren verbesserte sich die 8-Jahres-Überlebensrate von 65,8% (ALL-BFM81) auf 75,9% (ALL-BFM90) (Schrappe et al., 2000b). Fortlaufende Studien basierten auf zwei Therapieprinzipien: die prophylaktische Behandlung von Extrakompartimenten, insbesondere des ZNS, und einer Dauerbehandlung mit mehreren Zytostatika zur Vernichtung im Körper verbliebener Leukämiezellen. Seither ist das Behandlungsziel die Heilung und nicht mehr lediglich Lebenszeitverlängerung. Heute beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 78-85% (Creutzig and Klusmann, 2004; Gatta et al., 2005; Pui et al., 2004b). Diese Verbesserung ist auch darauf zurückzuführen, dass eine grosse Anzahl von Kindern nach standardisierten Therapie-Protokollen behandelt wird: Nach Angaben des Deutschen Kinderkrebsregisters werden 97,9% aller Kinder mit ALL im Rahmen von Therapieoptimierungsstudien behandelt (Kaatsch and Spix, 2005). Aktuelle Therapie-Protokolle der pädiatrischen ALL betonen die risikoadaptierte Therapie. So soll die Toxizität in niedrig-Risiko Patienten so gering wie möglich gehalten werden, und hoch-Risiko Patienten eine angemessene, aggressivere Therapie ermöglicht werden. Risikofaktoren, die das Rückfallrisiko und somit

die Intensität der Behandlung und die Prognose der Erkrankung beeinflussen, sind unter anderem die Unterform der ALL (unter Berücksichtigung zytologischer, immunologischer und genetischer Merkmale), das Alter und Geschlecht des Patienten, die Anzahl weißer Blutzellen (Leukozyten) zum Zeitpunkt der Diagnose (initiale Leukämiezellmasse) und das Ansprechen der Patienten auf die Therapie (Schrappe, 2003).

1.3.6 Therapie und Verlaufskontrolle

Die Therapie der ALL besteht aus einer Polychemotherapie mit den Phasen der Induktions-, Konsolidierungs-, Reinduktions- und Erhaltungstherapie, eine konsequente Mitbehandlung des ZNS, sowie einer Supportivtherapie zur Prävention therapiebezogener Komplikationen. Die meisten Therapieprotokolle erstrecken sich über 2-3 Jahre.

Das Ziel der risikoadaptierten Supportiv-Therapie ist die Prävention therapiebezogener Komplikationen, deren Auftreten von der Diagnose, der Therapiephase und der (genetischen) Konstitution der Patienten abhängt, bezieht sich aber ebenfalls auf das „Wohlbefinden“ des Patienten. Die Substitution von Blutbestandteilen ist der essenziellste Teil der Supportiv-Therapie. Infektionen durch Bakterien, Viren und Pilze sind die häufigste Todesursache während der Intensivtherapiephase und müssen konsequent mit entsprechenden Medikamenten behandelt werden (Rubnitz et al., 2004). Trotz der Verbesserung der Supportiv-Therapie bleiben Therapietoxizität bedingte Todesfälle und Langzeitkomplikationen (ZNS-Beeinträchtigung, Kardiotoxizität, Infertilität und eine erhöhte Inzidenz von Zweitmalignomen) ein großes Problem (Robison and Bhatia, 2003).

Ziel ist es, durch die ausgewählte Therapie der ALL eine komplette Remission (CR, *Complete Remission*) zu erreichen, d.h. die vollständige Erholung des Knochenmarks mit Wiederherstellung der normalen Blutbildung. Die Standarddefinition der CR ist ein Anteil von weniger als 5% Blasten an der Gesamtzahl aller nicht-erythrozytären Zellen im Knochenmark. Die Ansprechrate (der prozentuale Anteil der Lymphoblasten im Blut oder Knochenmark während oder am Ende der Induktionstherapie) hat sich als einer

der wichtigsten Prognosefaktoren erwiesen, da sich diese Zellen erneut vermehren und zu einem Wiederauftreten der Krankheit führen können (Hann et al., 2001). Diese residuellen Tumorzellen, die nach erfolgter Chemo- und Strahlentherapie verbleiben, werden als minimale Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) bezeichnet und lassen sich mit morphologischen Untersuchungsmethoden (Mikroskopie) nicht nachweisen. Hierfür sind lediglich hochempfindliche molekulargenetische Methoden wie die Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) geeignet, die bereits eine Leukämiezelle unter 100.000 bis 1 Million gesunden Zellen nachweisen kann .

Das so genannte MRD-Monitoring ermöglicht es, Patienten mit einem besonders hohen Rückfallrisiko früh zu identifizieren und rechtzeitig einer intensivierten Therapie zuzuführen. Ist die MRD-Messung hingegen negativ, sind also keine Leukämiezellen mit dieser Methode nachweisbar, ist dies ein Hinweis darauf, dass der Patient ein geringes Rückfallrisiko hat, eine Standardbehandlung also ausreicht. Das Ziel besteht in diesem Fall in einer Entschärfung der Therapie.

1.4 Funktionelle Genomik

Die Genomik ist die Erforschung des Genoms und die Wechselwirkung der darin enthaltenen Gene. Als funktionelle Genomik wird die Untersuchung aller zu einem Zeitpunkt in einer Zelle exprimierten Gene und die Veränderung dieses Expressionsmusters während Wachstum, Krankheit oder unter wechselnden Umweltbedingungen bezeichnet (Freeman et al., 2000). Anders ausgedrückt ist das Expressionsmuster einer Zelle die Summe der zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle transkribierten, also von der DNA in *messenger-RNA* (mRNA) umgeschriebenen Gene. Zur Analyse des Transkriptoms wird in aller Regel auf die *DNA-Microarray-Technologie* zurückgegriffen. Eine andere Methode, bei der auch die Aktivität unbekannter Gene beobachtet werden kann, ist die sogenannte Serielle Analyse der Genexpression (SAGE).

In dieser Arbeit wurde die *DNA-Microarray*-Technologie verwendet. Diese seit einigen Jahren bestehenden molekularbiologischen Untersuchungssysteme ermöglichen die parallele Analyse aller unterschiedlichen mRNA Moleküle einer Zelle in einer geringen Menge biologischen Probenmaterials.

Die ersten Arbeiten zu Genexpressionsprofilen der ALL befassten sich hauptsächlich mit der Differenzierung von AML und ALL (Golub et al., 1999). In den letzten Jahren sind multiple Arbeiten zu Genexpressionsanalysen der ALL, insbesondere der pädiatrischen ALL entstanden. Es wurden charakteristische Genexpressionsprofile beschrieben, die mit den Subtypen der ALL korrelieren, der Morphologie, dem Immunphänotyp und der Zytogenetik (Armstrong et al., 2002a; Armstrong et al., 2002b; Fine et al., 2004; Kohlmann et al., 2003; Ross et al., 2003; Yeoh et al., 2002).

Durch die sehr heterogenen Subtypen der ALL und die ebenfalls sehr unterschiedliche Prognose / Ansprechrate auf die zytostatische Therapie einzelner Patienten, sind nur zwei von vielen Hinweisen, dass die Therapieergebnisse (incl. Rezidive, Zweitmalignome und Komplikationen) durch die genetische Variation der Patientenpopulation determiniert werden. Auch dies konnte bereits in diversen Genexpressionsanalysen bestätigt werden (Evans and Relling, 1999; Lauten et al., 2002). So ergeben sich beispielsweise unterschiedliche Genexpressionsprofile bei Chemoresistenz, Erstdiagnose und im Falle eines Rezidivs (Staal et al., 2003).

Mit dem Ziel, krankheitsspezifische Eigenschaften auf molekularer Ebene aufzuklären, wurden an einer geringen Probenzahl oder limitierten Anzahl untersuchter Gene Pilotstudien durchgeführt, in denen das Genexpressionsprofil leukämischer (ALL) Lymphoblasten mit gesunden Zellen im gleichen Differenzierungsstadium aus Knochenmark verglichen wurde (Chen et al., 2001). Song et al. verglich sowohl das Genexpressionsprofil gesunder Knochenmarks-Lymphoblasten mit dem leukämischer Lymphoblasten als auch unterschiedlicher Leukämieformen untereinander (Song et al., 2006).

In einer weiteren Arbeit wurden erstmals semi-aufgereinigte CD19⁺CD10⁺ Zellen aus Nabelschnurblut gesunder Kinder herangezogen. Diese Analyse war

jedoch durch eine geringe Reinheit der Zielzellen bisher nur bedingt aussagekräftig (Hattenhorst, 2003).

1.5 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war, gesunde Kontrollzellen zu erhalten, die sich im gleichen Differenzierungsstadium wie die leukämischen Lymphoblasten der cALL befinden (vgl. 1.2). Dafür sollten ausreichende Mengen hoch-aufgereinigter, gesunder CD19⁺CD10⁺ fetaler B-Lymphoblasten aus Nabelschnurblut isoliert werden mit dem Endziel, in einer umfassenden Expressionsanalyse sowohl Unterscheidungsmerkmale als auch diagnostische Marker zu finden, die dazu verhelfen, gesunde von leukämischen Zellen zu unterscheiden und Einblicke in die Pathogenese der ALL zulassen.

Es stellt eine methodische Herausforderung dar, diese gesunden Lymphoblasten in ausreichender Menge und Reinheit aus Nabelschnurblut zu isolieren. In dieser Arbeit wird die erweiterte und modifizierte Methode beschrieben, die dies ermöglicht. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen werden dargestellt und die Bedeutung derselben in Bezug auf neue Möglichkeiten in der Diagnostik und dem pathogenetischen Verständnis der ALL diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

1 st -Strand-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
2 nd -Strand-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Antifoam	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
anti-human CD10-PE Antikörper	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
anti-human CD19-APC Antikörper	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
anti-human CD22-FITC Antikörper	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
anti-Mouse γ 1-APC Antikörper	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
anti-Mouse γ 1-FITC Antikörper	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
anti-Mouse γ 1-PE Antikörper	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
anti-PE-MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
autoMACS™-Rinsing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Biotin-anti-Streptavidin-AK	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Biotin-CTP	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Biotin-UTP	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
BSA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Carl Roth Chemie, Karlsruhe
Control Oligonucleotide B2	Affymetrix, Santa Clara, USA
DEPC-Wasser	Ambion, Austin, USA
DETAHaBEAD CD19	Dynal Biotech, Oslo, Norwegen
DNA Polymerase I (E.coli)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Ligase (E.coli)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNAse	Roche, Mannheim, Deutschland
dNTP-Mix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dynabeads CD19 (panB)	Dynal Biotech, Oslo, Norwegen
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Apotheke Klinikum rdl, München, Deutschland
Ethanol absolute	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim, Deutschland
Eucaryotic Hybridization Controls	Affymetrix, Santa Clara, USA
FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Schweden
Hering Sperm DNA	Promega, Mannheim, Deutschland
Humanes IgG (10mg/ml)	Apotheke Klinikum rdl, München, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Linear Acrylamid	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MEGAscript T7 Kit	Ambion, Austin, USA
MgCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaN ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim, Deutschland
Phycoerythrin Streptavidin	Molecular Probes, Leides, Niederlande

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SSPE (20x)	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Superscript Choice System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
T7-(dT)24-Primer	Affymetrix, Santa Clara, USA
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blue Stain 0.4%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Pierce Chemicals, Rockford, USA

2.2 Geräte

Dynal MPC Magnet	Dynal Biotech, Oslo, Norwegen
FACS Calibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
Fluidics Station	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip [®] HG-U133A	Affymetrix, Santa Clara, USA
MACS Mix Rotiergerät	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MiniMACS-Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MS-MACS-Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nabelschnurblut Entnahme System MSC 1	MacoPharma, Langen, Deutschland
Nabelschnurblut Kollektionsbeutel 1-BB-150-CPD-NP	Gerätezentrale für Bluttransfusion des Österreichischen Roten Kreuz, Eugendorf, Österreich
Phase Lock Gel Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
RNeasy Spin Column	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ultraschallbad Elmasonic S6OH	Elma, Singen, Deutschland

2.3 Untersuchungsmaterial

2.3.1 Die Kontrollproben

Das Untersuchungsmaterial umfasst 48 Kontrollproben, von denen 17 für die Genchip-Analyse eingesetzt wurden. Diese Kontrollproben sind hochaufgereinigte CD19⁺CD10⁺-Vorläufer-B-Zellen aus dem Nabelschnurblut gesunder Neugeborener.

Die Entnahme erfolgte auf Basis des *informed consent*, freiwillig und nur nach schriftlicher Einwilligung der Mutter. Die Probenentnahmen im Kreissaal der Gynäkologie des Klinikums München Schwabing und alle darauf folgenden Untersuchungen wurden durch die lokale Ethikkommission genehmigt. Die

Probenentnahmen im Kreissaal der Gynäkologie rechts der Isar wurden im Rahmen des STEMMAT-Projektes ebenfalls durch die lokale Ethikkommission der Technischen Universität München am 28.1.2003 genehmigt.

Die Nabelschnurblutproben CB 1-9 (CB, *cord blood*) stammen aus dem Kreissaal des Klinikums München Schwabing, in Zusammenarbeit mit Fr. Prof. Dr. med. Grischke. Die Proben CB 10-53 stammen aus dem Kreissaal der Gynäkologie des Klinikums rechts der Isar in freundlicher Zusammenarbeit mit PD Dr. med. V. Jacobs, Dr. med. Niemeyer, den Hebammen, PD Dr. Robert A.J. Oostendorp und seiner Arbeitsgruppe.

2.3.2 Probengewinnung

Es gibt verschiedene Methoden, das Nabelschnurblut zu entnehmen, in utero oder ex utero. In diesem Fall wurde das Blut überwiegend in utero entnommen. Nachdem das Kind geboren und die Nabelschnur durchtrennt war, die Plazenta aber noch in utero war, wurde die Umbilikalvene an einer gereinigten Stelle punktiert. Das Blut lief dann der Schwerkraft nach in einen mit 22 ml gerinnungshemmender Flüssigkeit gefüllten Beutel. Nach Sistieren des Blutflusses wurde der Schlauch des Entnahmebeutels zwischen der Nadel und dem Beutel abgeklemmt und die Nadel entfernt.

2.3.3 Aufbewahrung

Die Nabelschnurblutproben wurden bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Bis auf die Proben CB9 und CB 47-49 wurden alle Proben innerhalb von 24-36 Stunden nach Entnahme bearbeitet. CB9 enthält eine aufgetaute Nabelschnurblutkonserve, CB47-49 wurde erst 48 Stunden nach Entnahme verarbeitet. Es hat sich gezeigt, dass eine vernünftige Verarbeitung der Proben nur innerhalb von 24-36 Stunden möglich ist. Bei längerer Verzögerung wird die Aufreinigung von B-Lymphoblasten erheblich erschwert bis unmöglich. Die Aufreinigung aufgetauter Proben war nicht erfolgreich.

Es bestehen bereits viele Arbeiten zum Thema der optimalen Lagerung von Nabelschnurblut, da dies als Quelle für Stammzellen sehr begehrt ist. Es ist

belegt, dass sowohl CD34⁺ Stammzellen als auch CFU-GM (*colony forming units*) im Nabelschnurblut bei Lagerung in Raumtemperatur nach 48 Stunden höchste Zellzahlen aufweisen, mehr als nach 24 h Lagerung bei Raumtemperatur und dreimal soviel wie die gleiche Probe in 4° C nach 48 h. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass Lymphozytenzahlen nach 24 Stunden abnehmen (Moldenhauer et al., 2007). Eine weitere Arbeit belegte, dass B-Lymphozyten aus Nabelschnurblut Apoptose-anfälliger sind als B-Lymphozyten im Blut Erwachsener (Kessel et al., 2006).

2.3.4 Die Leukämieproben

Die 25 Leukämieproben bestehen aus Knochenmark (KM) pädiatrischer Patienten, die an einer Akuten Lymphoblastischen Leukämie (*common Acute Lymphoblastic Leukemia*, cALL) erkrankt waren (Blastenanteil >90%), mit einem Altersmedian von 6,1 Jahren (0,6-15,2). Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten war 0,93. Es wurden nur Proben verwendet, die zum Zeitpunkt der Erstmanifestation der cALL asserviert und kryokonserviert worden waren. Fünf der Patienten zeigten die TEL/AML1 (ETV6/CBFA2) Translokation t(12;21)(p13;q22). Nur ein Patient zeigte die Translokation auf, die das MLL Gen auf Chromosom 11q23 einschließt. Es wurden keine Proben nach Therapiebeginn oder einer Rezidivkrankung in die Untersuchung miteinbezogen. Für Details der für die Analyse verwendeten Leukämieproben siehe Dissertation von Dr. Uwe Hattenhorst (Hattenhorst, 2003). Sämtliche Leukämieproben stammen von Patienten der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche der Universität Leipzig (Prof. Dr. D. Körholz) oder von Patienten der Studiengruppe ALL-BFM der GPOH (Prof. Dr. M.Schrappe).

2.4 Methode zur Anreicherung CD19⁺CD10⁺ B-Lymphoblasten

Tabelle 2-1 Übersicht der Methode zur Anreicherung CD19⁺10⁺ Lymphoblasten

Nabelschnurblut

↓

Lymphozyten-Extraktion mittels Dichtezentrifugation (vgl. 2.4.1).

↓

CD19⁺-positiv-Selektion mit Dynabeads[®] in einem Magnetfeld und darauf folgende Entfernung der Beads mit DETACHaBEADS[®] (vgl. 2.4.4 und 2.4.5).

↓

CD10⁺-positiv-Selektion magnetisch markierter Zellen mit anti-PE und anti-CD10-PE Antikörpern in einer magnetischen Säule (*Magnetic Cell Sorting System*, MACS) (vgl. 2.4.6)

↓

RNA-Extraktion aus CD19⁺CD10⁺ Zellen mit TRIzol[®] (vgl. 2.5.1)

↓

cDNA (= Erst-Strang) Synthese (vgl. 2.5.2)

↓

Doppelstrang (=Zweitstrang)- Synthese

↓

cRNA- Synthese

↓

Hybridisierung der cRNA mit Sonden des Affymetrix-Genchips (vgl. 2.6.2)

↓

Fluoreszenzmarkierung der RNA (vgl. 2.6.3)

↓

Laseranregung des Arrays mit Scannen und Aufzeichnen des Emissionsspektrums

↓

Auswertung der Analysedaten (vgl. 2.7)

Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die folgende Methode bezieht sich ausschließlich auf die Aufreinigung der Kontrollproben.

2.4.1 Zellseparation mittels Dichtezentrifugation

Die Lymphozyten wurden aus dem Nabelschnurblut mittels Dichtezentrifugation isoliert. Hierzu wurde Ficoll-Paque benutzt. Das Nabelschnurblut wurde 1 : 2 mit PBS verdünnt. Das verdünnte Blut wurde vorsichtig im Verhältnis Blut-PBS : Ficoll = 4 (20 ml) : 3 (15 ml) aufgetragen: zuerst wurde die entsprechende Menge Ficoll-Paque in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und dann langsam und vorsichtig mit dem Blut-PBS-Gemisch überschichtet ohne die beiden Phasen zu vermischen. Die Proben wurden dann bei RT und 400 g für 30 min zentrifugiert. Wichtig ist, dass die Zentrifugenbremse ausgeschaltet ist, damit beim Auslaufen der Zentrifuge die Phasen nicht durch abruptes Stoppen vermischt werden.

In dem Zentrifugenröhrchen sind nach diesem Vorgang 4 Phasen abzugrenzen. Von oben nach unten: Plasma und Thrombozyten, Lymphozyten, Ficoll-Paque (Trennmedium), und ein Zellsediment aus Erythrozyten und Granulozyten. Die oberste Schicht (Plasma und Thrombozyten) wurde vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und verworfen, ohne dabei den Lymphozytenring aufzuwirbeln. Dann wurde der Lymphozytenring mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein weiteres Zentrifugenröhrchen gegeben, mit PBS aufgefüllt und erneut mit 1500 Umdrehungen (U) 10 min bei RT zentrifugiert. Wichtig ist die entnommenen Lymphozyten in diesem Waschvorgang mindestens im Verhältnis 1 : 2 mit PBS verdünnt sind, da die Lymphozyten bei höherer Konzentration nur unvollständig abzentrifugiert werden. Wenn nötig, d.h. bei sehr rot gefärbtem und instabilem Zellsediment, bedingt durch große Mengen an Erythrozyten, wurde nach diesem Schritt ein Erythrozyten-Lyse durchgeführt. Hierzu wurden 1 ml Ery-Lyse-Puffer / 10^8 Zellen auf das resuspendierte Zellsediment gegeben, und 2 min auf Eis gestellt. Danach wurde das Zentrifugenröhrchen mit PBS aufgefüllt und erneut bei 400 g für 10 min bei RT zentrifugiert.

Das Zellsediment wurde dann zweimal in PBS gewaschen. Der Waschvorgang beinhaltete das Abnehmen des Überstandes, Resuspendieren des

Zellsediments, Auffüllen des Zentrifugenröhrchens mit PBS und erneutes Zentrifugieren bei 400 g für 10 min bei RT.

2.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Nach dem zweiten Waschvorgang wurde das Zellsediment in 50 ml PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl dieser Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung 0,4% und 80 µl PBS gemischt und davon 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die lebenden Lymphozyten wurden unter dem Lichtmikroskop gezählt und die Gesamtzellzahl unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnung wie folgt errechnet: Gesamtzellzahl = Mittelwert der Zellen pro Eckquadrat der Zählkammer x Kammerfaktor (= 10^4) x Verdünnung x Gesamtvolumen der Zellsuspension (ml).

Für die Durchflusszytometrische Kontrolle 1 und 2 (vgl. Tabelle 2-2) wurden 4×10^5 Zellen entnommen und bis zur Analyse in einem separaten Röhrchen aufbewahrt. Die Zellsuspension wurde dann erneut bei 400 g für 10 min bei RT zentrifugiert.

2.4.3 Block mit IgG

Um unspezifische Bindungen der Färbeantikörper über ihren Fc-Teil an Fc-Rezeptoren der Zellen zu vermeiden, wurden die Lymphozyten mit 10 µl humanem IgG (10 mg / ml) pro 10^6 Zellen für 15 min auf Eis präinkubiert.

2.4.4 CD19⁺ Selektion

Als erster Selektionsschritt wurde die Positivselektion der CD19⁺ B-Lymphozyten durchgeführt. Die CD19 Dynabeads[®] (Pan B) bestehen aus CD19 spezifischen Antikörpern, an die superparamagnetische, gleichgroße, polymere Partikel (*Beads*) gebunden sind. Die *Beads* binden an die CD19⁺ Zellen und werden unter dem Einfluss eines starken Magnetfeldes an die Röhrchenwand gezogen. Es sind dann nur noch unmarkierte Zellen frei im Überstand. Für eine anschauliche Darstellung, siehe Abbildung 2-1.

Im Falle einer parallelen Verarbeitung verschiedener Proben, wurden sie in diesem Aufreinigungsschritt noch streng getrennt, da sonst die noch vorhandenen T-Lymphozyten das Fremdblut angegriffen, zu entsprechenden Zellverklumpungen geführt und somit die Weiterarbeit unmöglich gemacht hätten.

Für die Durchführung der Selektion wurden die Lymphozyten in die entsprechende Menge Selektionspuffer (PBS / 2% FCS / 2mM EDTA) aufgenommen, um eine Konzentration von $1,5 \times 10^7$ / ml zu erreichen. Es wurde angenommen, dass der Anteil der CD19⁺ B-Zellen an den Gesamtlmphozyten 15% ausmachen. Es wurden 6 *Beads* / CD19⁺ Zielzelle eingesetzt. Die entsprechende Menge CD19 Dynabeads[®] wurde vor Gebrauch zweimal gewaschen. Hierzu wurde die benötigte Menge Stocklösung (4×10^8 *Beads* / ml) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen zweimal in 2,5 ml Selektionspuffer suspendiert, in den Magneten gestellt, und nach 1 min der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellsuspension wurde dann zu den gewaschenen Dynabeads[®] gegeben und für 30 min bei 4 °C im Kühlraum rotierend inkubiert. Die Röhrchen wurden daraufhin erneut für 2 min in den Magneten gestellt, der Überstand mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die mit *Beads* markierten, nun an der Röhrchenwand haftenden CD19⁺ Zellen wurden abschließend zweimal gewaschen und die Zellzahl bestimmt (vgl. 2.4.2).

Die Inkubation der Lymphozyten mit den Dynabeads[®] sollte in 15 ml Zentrifugenröhrchen erfolgen, welche jeweils nicht mehr als 10 ml Volumen mit maximal $2,5 \times 10^6$ Zielzellen / ml enthalten sollte um eine ausreichende Bewegung und Austausch zu gewährleisten. Besonders gut geeignet ist hierfür ein Gerät, welches nicht nur um die vertikale Achse rotiert, sondern ebenfalls eine schräge Komponente hat.

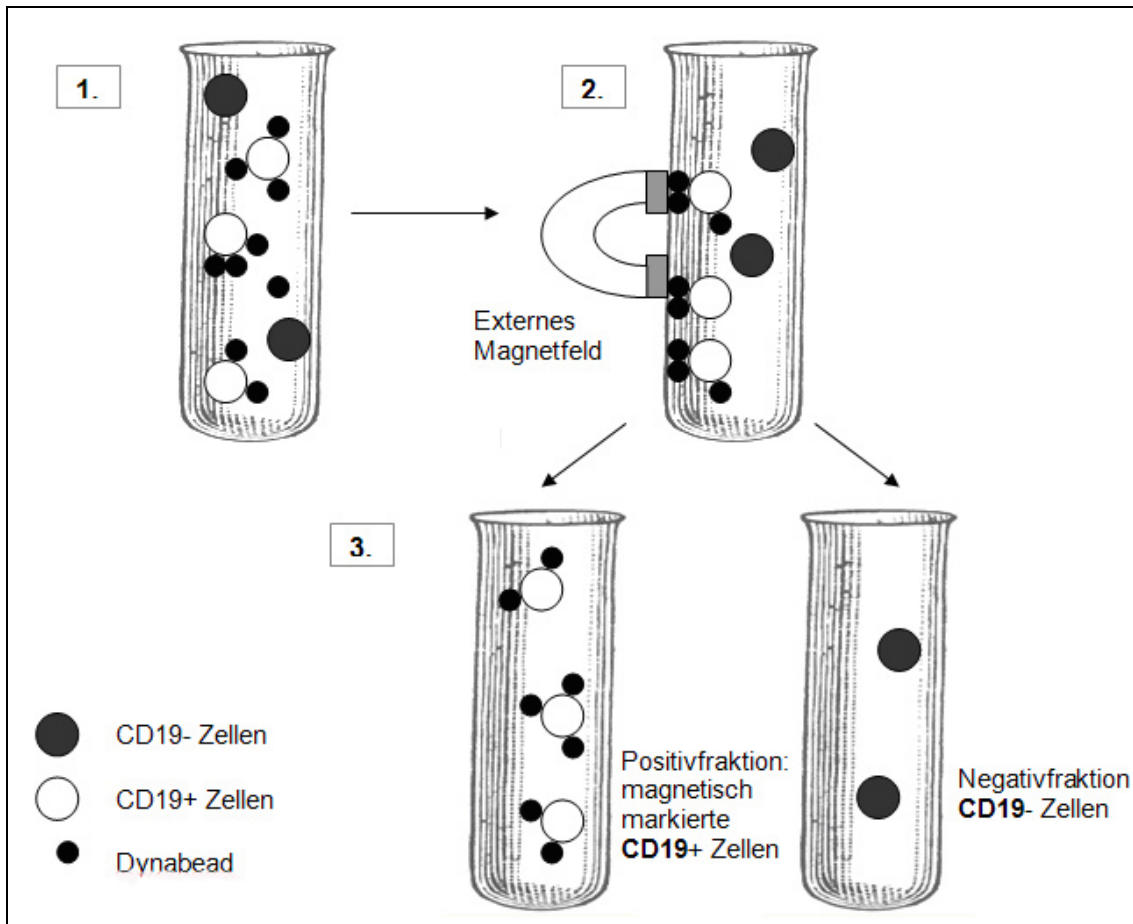


Abbildung 2-1 Übersicht der Positiv-Selektion der CD19⁺ Zellen

1. Magnetisch markierte Antikörper (Dynabeads[®]) werden zur Zellsuspension gegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Dynabeads binden an die CD19-Oberflächenantigene der Zielzellen. 2. Ein externes Magnetfeld wird angelegt. Die mit Dynabeads[®] markierten Zellen haften dadurch an der Röhrenwand und der Überstand kann abgenommen werden. 3. Nach Selektion: Erfolgte Separation der *Bead*-gebundenen CD19⁺ Fraktion von der unberührten CD19⁺ Fraktion. (Modifiziert nach www.dynalbiotech.com)

2.4.5 Entfernung der Dynabeads

Um mit der Probe weiterarbeiten zu können, müssen die Dynabeads[®] wieder entfernt werden. Hierzu wurden DETACHaBEADS[®] verwendet. DETACHaBEADS[®] sind poliklonale spezifische Fab Antikörper, die den Dynalbead-gekoppelten Primärantikörper von seiner Bindungsstelle verdrängen um *Bead*-freie, unstimulierte Zellen zu hinterlassen.

Dazu wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen / ml mit dem Selektionspuffer (PBS / 2% FCS / 2 mM EDTA) eingestellt und 200 μ l DETACHaBEADS / ml dazugegeben. Die Probe wurde dann 45 min bei RT

rotierend inkubiert. Darauf folgend wurde das Röhrchen wieder im Magneten platziert und der Überstand mit einer Pipette nach 2 min abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Dieser Überstand enthielt nun lediglich unmarkierte CD19⁺ Zellen. Da der Überstand nur noch B-Zellen enthielt, konnten die Überstände verschiedener, parallel verarbeiteter Proben zu diesem Zeitpunkt zusammen in einem Röhrchen gemischt werden und von diesem Zeitpunkt an problemlos als eine einzige, gemischte Probe weiter verarbeitet werden.

Die *Beads* wurden noch dreimal gewaschen und alle Überstände gesammelt. Das mehrfache Waschen ist sehr wichtig um die CD19⁺ Zellen von den Beads zu lösen. Der gesammelte Überstand wurde dann über eine MACS Säule gegeben um die Zellen, die trotz DETACHaBEADS noch mit Dynabeads[®] behaftet sind, abzufangen. Dieser zusätzliche Schritt gewährleistet eine höhere finale Reinheit an CD19⁺CD10⁺ Zellen, auch wenn er mit einem zusätzlichen, unvermeidbaren Zellverlust einhergeht. Die Zellen im Durchfluss wurden gezählt (vgl. 2.4.2) und 4×10^5 Zellen für die FACS-Analyse 3 und 4 entnommen (vgl. Tabelle 2-2).

2.4.6 CD10⁺ Selektion

Zur Positiv-Selektion der CD10⁺ Zellen wurde das *Magnetic Activating Cell Sorting* (MACS) Prinzip angewandt. Das Prinzip beruht auf der magnetischen Markierung der Zielzellen, sodass diese dann beim passieren durch eine Magnetsäule in der Säule hängen bleiben (Positivfraktion) bzw. nicht-magnetisch markierte Zielzellen die Magnetsäule ungehindert passieren können (Negativfraktion). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zielzellen zuerst mit anti-CD10-PE Antikörpern und in einem weiteren Schritt mit magnetischen Anti-PE *MicroBeads* markiert. Die Probe wurde dann über eine Säule gegeben, die sich im Magnetfeld eines MACS Separators befand. Die magnetisch-markierten CD10⁺ Zellen blieben in der Säule haften, die unmarkierten Zellen passierten die Säule. Nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld wurden die magnetisch-retinierten Zellen als die Positivfraktion eluiert (vgl. Abbildung 2-2).

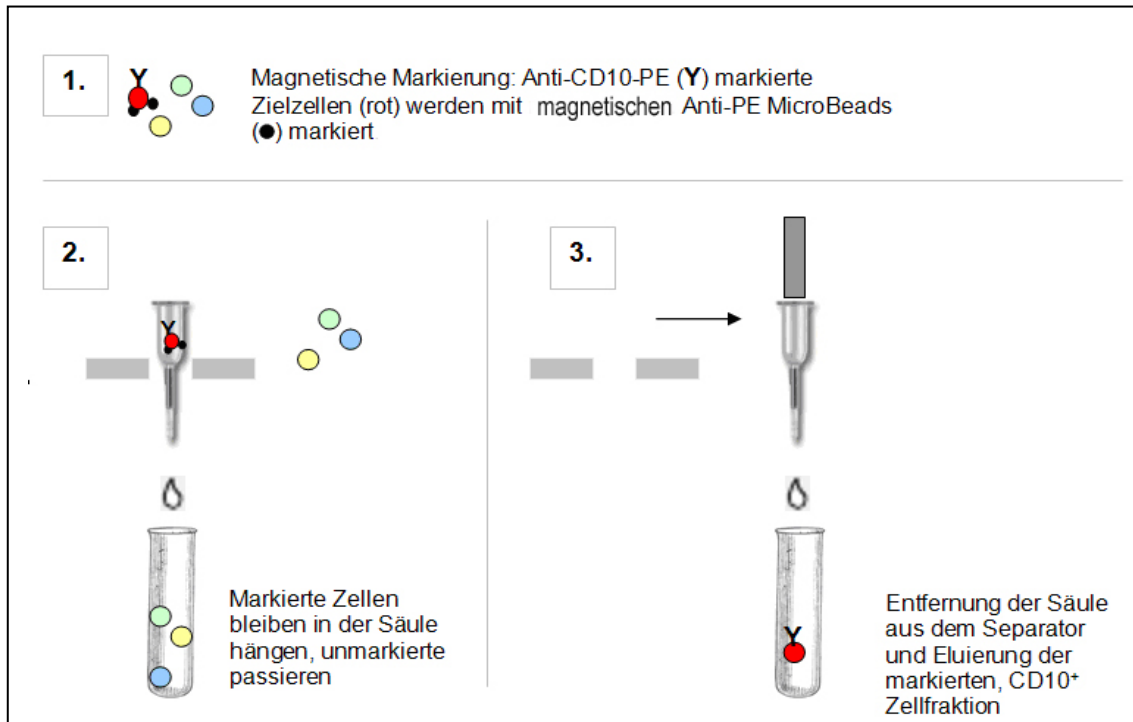


Abbildung 2-2 CD10⁺ Selektion, *Magnetic Activated Cell Sorting System (MACS)*

(Modifiziert nach www.miltenyibiotech.com)

In den folgenden Schritten wurde schnell gearbeitet, die Zellen immer kalt gehalten und ausschließlich vorgekühlte Lösungen verwendet. Der verwendete MACS-Puffer (PBS / 0.5% BSA / 2mM EDTA) wurde direkt vor Gebrauch in einem Ultraschallbad entlüftet um ein mögliches Verstopfen der MACS-Säule zu vermeiden.

Zuerst wurden die Zellen markiert. Hierzu wurden 10^7 Zellen in 100 μ l MACS-Puffer resuspendiert und 5 μ l anti-CD10-PE / 10^6 Zellen Antikörper dazugegeben. Die Probe wurde bei 4 °C im Dunkeln für 15 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen durch Zugabe von 1-2 ml MACS-Puffer / 10^7 Zellen und bei 300 g und 4-8 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das Zellsediment in 80 μ l MACS-Puffer / 10^7 (Gesamt)zellen resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 20 μ l anti-PE Microbeads / 10^7 Zellen. Diese wurden gut gemischt und 15 min bei 4 °C inkubiert, dann erneut gewaschen mit 1-2 ml MACS-Puffer / 10^7 Zellen und wieder bei 300 g und 4-8 °C für 10 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert (bis zu 10^8 Zellen / 500 μ l Puffer).

Obwohl laut Hersteller eine geringere Konzentration der Anti-PE Microbeads (10 μ l anti-PE Microbeads / 10^7 Gesamtzellen) ausreicht, ergab die doppelte Menge bessere Ergebnisse.

Entsprechend der Zahl markierter Zellen und Gesamtzellen wurde eine passende MACS-Säule und der dazu passende Separator ausgesucht (nach Angaben des mitgelieferten Protokolls). In dieser Arbeit wurden ausschließlich die MS-Säule und der MiniMACS Separator eingesetzt. Die MS Säule ist einzusetzen bei einer Zellzahl von maximal 10^7 markierte Zellen und maximal 2×10^8 Gesamtzellen. Die Säule wurde in den Separator eingesetzt und direkt vor der Zugabe der Probe kalibriert durch einmaliges Spülen mit 500 μ l gekühltem und entlüftetem (Ultraschallbad) MACS-Puffer. Die Zellsuspension wurde dann auf die Säule gegeben. Die unmarkierten Zellen, die durch die Säule liefen, wurden gesammelt und repräsentieren die $CD19^+10^-$ Fraktion, also die Negativ-Fraktion. Die Säule wurde dreimal gewaschen durch Zugabe von $3 \times 500 \mu$ l MACS-Puffer, jeweils wenn das Säulenreservoir leer war. Die Säule wurde dann aus dem Separator herausgenommen, auf ein passendes Röhrchen gesetzt, 1 ml MACS-Puffer in das Reservoir pipettiert und die magnetisch markierte $CD10^+$ Fraktion mit dem mitgelieferten, passenden Plastikkolben schnell aus der Säule gepresst. Die Zellzahl der $CD19^+CD10^+$ Fraktion wurde bestimmt (vgl. 2.4.2). Von der $CD19^+CD10^+$ und der $CD19^+CD10^-$ Fraktion wurden jeweils 2×10^5 Zellen für die FACS-Analyse 5 und 6 (vgl. Tabelle 2-2) entnommen.

2.4.7 Aufbewahrung

Bis zu 1×10^7 $CD19^+10^+$ Zellen / ml wurden in TRIzol[®], einem gebrauchsfertigen monophasischen Gemisch aus Phenol und Guanidine Isothiocyanat, homogenisiert. Dazu wurden die Zellen einige Male durch eine 19G Kanüle auf- und abgezogen. Durch diese Homogenisierung oder Lyse erhält das TRIzol[®]-Reagenz die Intaktheit der RNA bei gleichzeitigem Zellaufschluss, Auflösung der Zellkomponenten und Fragmentierung der chromosomalen DNA. Die so vorbereiteten Proben wurden bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Präparation aufbewahrt.

Analyse mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert, die gegen spezifische Oberflächenmerkmale gerichtet sind. Durch den Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden. Um den Anteil der CD19⁺ und CD19⁺CD10⁺ B-Lymphozyten zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit folgende Antikörper verwendet:

Isotyp-Färbung:	mouse γ 1-FITC Antikörper
	mouse γ 1-PE Antikörper
	mouse γ 1-APC Antikörper
Zielzellen-spezifische Färbung:	anti-human CD22-FITC Antikörper
	anti-human CD10-PE Antikörper
	anti-human CD19-APC Antikörper

Jeder Färbeansatz wurde mit 2×10^5 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit 100 μ l Färbepuffer (2% FCS / PBS 0.05% NaN₃) und 2 μ l (Isotyp) bzw. 5 μ l (Zielzellen-spezifische) Färbung des entsprechenden Antikörpers 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Ansätze 5 und 6 wurden an dieser Stelle lediglich mit anti-CD19-APC markiert, da sie bereits im Rahmen der Selektion mit anti-CD10-PE markiert wurden. Tabelle 2-2 zeigt die Übersicht der standardisierten Färbeansätze zur durchflusszytometrischen Kontrolle der Anteile an CD19⁺ und CD19⁺CD10⁺ Zellen nach den entsprechenden Aufreinigungsschritten.

Tabelle 2-2 Übersicht der durchflusszytometrischen Kontrolle

ID	Färbung	Arbeitsschritt
1	ISO-FITC / ISO-PE / ISO-APC	nach Lymphozyten-Isolation
2	CD22-FITC / CD10-PE / CD19-APC	
3	ISO-FITC / ISO-PE / ISO-APC	nach CD19 ⁺ Selektion
4	CD22-FITC / CD10-PE / CD19-APC	
5	CD22-FITC / (CD10-PE) / CD19-APC	CD19 ⁺ CD10 ⁺ Fraktion
6	CD22-FITC / (CD10-PE) / CD19-APC	CD19 ⁺ CD10 ⁻ Fraktion

() Markierung mit CD10-PE Antikörpern erfolgte bereits während Selektion

Die Proben wurden dann bei 1400 U für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit jeweils 200 µl Färbepuffer und Zentrifugieren bei 1400 U für 10 min und 4 °C, wurden die Zellsedimente in 300 µl PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen.

2.5 Präparation der Nukleinsäuren für die Genchip Analyse mit cDNA Microarrays

2.5.1 Präparation der Gesamt-RNA aus den Zellen

Jede eingefrorene RNA Probe wurde nach dem Auftauen für 2 min bei 65 °C erhitzt. Alle nachfolgenden Schritte wurden, sofern nicht anders vermerkt, auf Eis pipettiert. Die Proben wurden anschliessend bei 12000 g für 10 min bei 4 °C in 1,5 ml Gefäßen zentrifugiert. Ohne Mitschleppen von Zellklumpen wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt, 0,5 µl lineares Acrylamid zugeben und für 5 min bei RT inkubiert. Es wurden 0,2 ml Chloroform pro ml eingesetztem TRIzol[®] dazugegeben, 15 sec kräftig geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 g für 15 min bei 4 °C. Von der oberen, klaren, wässrigen Phase wurde soviel wie möglich in ein neues Röhrchen überführt, ohne dabei etwas von der Interphase mitzunehmen. Pro ml eingesetztem TRIzol[®] wurden dann 0,5 ml Isopropanol zur wässrigen Phase dazugegeben, kräftig gemischt (vortexen) und 10 min bei RT inkubiert, anschließend bei 12000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und aufgehoben. Es folgte die Zugabe von 1 ml kaltem 75-80% Ethanol pro ml eingesetztem TRIzol[®]. Die Röhrchen wurden invertiert, um das Zellsediment zu lösen und erneut bei 7500 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Sediment wurde unter dem Abzug 5 bis max. 10 min getrocknet, dann in 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

Zur Quantifizierung der RNA wurde diese für 10 min bei 65 °C erhitzt und sofort für 2 min auf Eis gestellt. Es wurde 1 µl der Probe mit 49 µl H₂O verdünnt. Die

Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren wurden mittels photometrischer Bestimmung der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Um die Konzentration der RNA zu berechnen (gemessen bei 260 nm, Schichtdicke 1 cm) gilt: 1 OD entspricht 40 µg / ml. Der OD Ratio (Absorption bei 260 nm : Absorption bei 280 nm) gibt Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäurepräparation. Für aufgereinigte RNA liegt der OD Ratio normalerweise bei 1,8 – 2,0. Für die Aufreinigung mit TRIzol® ist ein Wert zwischen 1,4 - 2 ebenfalls akzeptabel. Phenol absorbiert auch bei 260 nm, wodurch eine höhere RNA-Konzentration vorgetäuscht werden kann. Deshalb ist darauf zu achten, bei der Präparation kein TRIzol® mitzuschleppen.

Die weitere Aufreinigung der präparierten gesamt RNA erfolgt mittels RNeasy. Das Volumen der Probe wurde mit RNase-freiem Wasser auf 100 µl eingestellt, 350 µl Puffer RLT dazugegeben und kräftig geschüttelt. Es wurden 250 µl 100% Ethanol dazugegeben und das Lysat gründlich mit der Pipette gemischt. Die RNeasy Zentrifugationssäule (*Spin column*) wurde auf ein Sammelröhrchen (*Collection tube*) gesetzt, die Probe (700 µl) auf die *Spin column* gegeben und für 15 sec und RT bei 10000 g zentrifugiert. Die Zentrifugationssäule wurde dann auf ein neues Sammelröhrchen transferiert, 500 µl Puffer RPE dazugegeben und 15 sec bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Es wurden nochmals 500 µl RPE-Puffer auf die Zentrifugationssäule gegeben und für 2 min bei 12000 g zentrifugiert. Wichtig ist, dass die Membran der Zentrifugationssäule nach der Zentrifugation wirklich trocken ist. Danach wurden die Säulen auf ein frisches 1,5 ml Röhrchen gesetzt, 25 µl RNase-freies Wasser exakt auf die Membran der Zentrifugationssäule gegeben und bei RT für 5 min inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit. Dieser Elutionsschritt wurde einmal wiederholt. Das Endvolumen der aufgereinigten RNA in wässriger Lösung betrug somit 50 µl. Die Proben wurden erneut quantifiziert und einer Qualitätskontrolle unterzogen.

Für die folgende cDNA-Synthese wurden 10 µg RNA in maximal 10 µl H₂O verwendet. War die RNA-Konzentration zu gering, musste eine Ethanol-Präzipitation (EtOH-Präzipitation) durchgeführt werden und anschließend erneut die Konzentration bestimmt werden. Für die EtOH-Präzipitation wurde die RNA-Lösung mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 150 µl eingestellt und

die gleiche Menge 5M NH₄OAc hinzugegeben. Es wurden 2,5 Volumenteile Ethanol und 0,5 µl Glykogen hinzugegeben und gemischt. Nach Inkubation für 10 min bei -20 °C wurde die Probe für 30 min bei 12000 g und bei 16 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschliessend mit 500 µl kaltem 80% EtOH gewaschen und für 5 min bei 12000 g und 16 °C zentrifugiert. Nach Lufttrocknung des Zellsediments wurden die RNA in RNase-freiem Wasser resuspendiert und die Konzentration bestimmt.

2.5.2 cDNA-Synthese

Das Volumen der RNA wurde auf 10 µg / µl mit RNase-freiem Wasser eingestellt. Es wurden 1 µl T7-(dT)₂₄-Primer (1 µg / µl) dazugegeben und für 10 min bei 70 °C inkubiert, dann 5 sec zentrifugiert, damit sich entstandenes Kondenswasser sammelt. Danach wurde die Probe sofort für 2 min auf Eis gestellt.

In der Erst-Strang-Synthese wird an der vorhandenen RNA ein komplementärer cDNA-Strang synthetisiert. Hierzu wurde zuerst ein Master-Mix hergestellt. Für einen einfachen Ansatz (mit 7,0 µl Gesamtvolumen) galt: 4 µl 1st-Strand-Buffer (5x), 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP. Zu jedem RNA-Primer-Mix (11 µl) wurden 7,0 µl 1st-Strand Master-Mix hinzugegeben und für 2 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 2 µl Superscript RT II um ein Endvolumen von 20 µl zu erreichen. Die Proben wurden gemischt, zentrifugiert und für 60 min bei 37 °C inkubiert.

In der Zweit-Strang-Synthese wird aus dem cDNA-Strang ein DNA-Doppelstrang synthetisiert unter gleichzeitigem Abbau der ursprünglichen RNA. Ein weiterer Master-Mix wurde hierfür auf Eis hergestellt. Für den einfachen Ansatz (mit 130 µl Gesamtvolumen) galt: 91 µl H₂O, 30 µl 2nd-Strand-Buffer (5x), 3 µl dNTP (10 mM), 1 µl E. coli DNA Ligase (10 U / µl), 4 µl E. coli DNA Polymerase I (10 U / µl) und 1 µl RNase H (2 U / µl). Zu jeder Erst-Strang-Synthese Reaktion (20 µl) wurde 130 µl 2nd-Strand Master-Mix dazugegeben um ein Endvolumen 150 µl zu erreichen. Die Proben wurden dann für 2 h bei 16 °C inkubiert und zum beenden der Reaktion 10 µl 0,5 M EDTA auf Eis dazugegeben.

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient zur Aufreinigung der doppelsträngigen DNA aus dem Syntheseansatz. Zur Vorbereitung wurden *Phase Lock Gel (PLG) Tubes* für 1 min bei 12000 g zentrifugiert. *Phase Lock Gel* formt während der Zentrifugation eine Gelschicht an der Grenzfläche zwischen der organischen und wässrigen Phase und trennt somit die beiden Phasen voneinander. Der komplette cDNA-Synthese Ansatz (160 µl) wurde in diese *PLG Tubes* überführt. Es wurde 160 µl Phenol : Chloroform : Isoamyl Alkohol im Verhältnis 25 : 24 : 1 dazugegeben, kurz geschüttelt und für 2 min bei 12000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde dann in ein neues *Tube* mit 0,5 µl linear Acrylamid überführt und die gleiche Menge 5 M NH₄OAc und 2,5 Volumenteile kalten 100% EtOH dazugegeben, kurz geschüttelt und für 30 min bei 12000 g und 16 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment mit 500 µl kaltem (-20 °C) 80% EtOH gewaschen und nochmals für 5 min bei 12000 g und 16 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde unter dem Abzug getrocknet und in 3 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.5.3 in vitro-Transkription und Fragmentierung

In diesem Schritt der *in vitro*-Transkription (IVT) wird die doppelsträngige DNA wieder in RNA umgeschrieben. Bei den bisherigen Syntheseschritten wurden mRNA Moleküle im Verhältnis 1 : 1 umgeschrieben und durch Biotin gekoppelte Nukleotide markiert. Bei der *in vitro*-Transkription findet eine lineare Amplifikation statt. Diese Linearität ist Voraussetzung für die genaue Bestimmung der relativen Expressionslevel der betrachteten Transkripte. Für die *in vitro*-Transkription wurde das MEGAscript T7 Kit verwendet. Der einfache Ansatz des zur Transkription erforderlichen Master-Mixes (Gesamtvolumen 18,5 µl) setzte sich wie folgt zusammen: 2 µl ATP (75 mM), 2 µl GTP (75 mM), 1,5 µl CTP (75 mM), 1,5 µl UTP (75 mM), 3,75 µl Biotin-11-CTP (10 mM), 3,75 µl Biotin-16-UTP (10 mM), 2 µl Buffer Mix (10x) und 2 µl Enzyme Mix (10x). Der Master-Mix wurde auf die PCR-Strips aliquotiert und 1,5 µl der frisch hergestellten cDNA aus 2.5.2 dazugegeben, mit der Pipette gemischt und zentrifugiert. Dann folgte eine Inkubation über 6 h bei 37 °C.

Nach der *in vitro*-Transkription wurde die synthetisierte RNA mit dem RNAeasy Mini Kit gereinigt, quantifiziert und erneut einer Qualitätskontrolle unterzogen (vgl. 2.5.1). Um eine bessere Hybridisierung auf den Genchips zu ermöglichen, muss die RNA fragmentiert werden. Hierbei entstehen kleine RNA-Fragmente von 35-200 Basenpaaren. Diese kleinen Fragmente hybridisieren besser als die Großen. Für die Fragmentierung werden 16 µg cRNA in einem Volumen von maximal 16 µl benötigt. Die entsprechende Menge wurde in ein frisches Röhrchen übergeführt. Nach Zugabe von 4 µl 5x Fragmentierungspuffer (200 mM Tris-Acetat, pH 8,1, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc) wurden die Röhrchen für 35 min bei 95 °C inkubiert. Die Probe wurde 10 sec zentrifugiert und sofort auf Eis gegeben.

2.6 GeneChip® System (Affymetrix)

2.6.1 GeneChip® Arrays

Ein *Microarray*, auch als Genchip bezeichnet, ist ein modernes molekularbiologisches Untersuchungssystem, ein Trägermaterial, auf dem die parallele Analyse von mehreren tausend Genen auf engstem, fingernagelgroßem Raum durchgeführt werden kann. Abbildung 2-4 zeigt einen solchen GeneChip® von Affymetrix, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde.



Abbildung 2-4 GeneChip® Array von Affymetrix

Auf einer Fläche von 1,28 cm x 1,28 cm können mehrere tausend Gene parallel untersucht werden.

Auf einer festen Matrix werden genspezifische Sonden angebracht, die mit der markierten Proben-RNA hybridisieren können. Je stärker die Expression eines Gens ist, desto größer ist die Menge markierter RNA und folglich desto größer das zu detektierende Fluoreszenzsignal. Es werden hierbei nur relative Transkriptionsniveaus und keine absoluten Mengen bestimmt oder verglichen.

Voraussetzung für die Genexpressionsanalyse ist die Linearität aller experimentellen Schritte. Bei den Syntheseschritten zur Erst- und Zweit-Strang Synthese handelt es sich um 1 : 1 Umschreibungen. Die IVT ist eine lineare Amplifikation. Ebenso besteht zwischen der Menge an fluoreszenzmarkierter Probe und der detektierten Signalintensität ein linearer Zusammenhang (Freeman et al., 2000).

Die Arrays von Affymetrix werden mithilfe von Photolithographie und kombinatorischer Chemie angefertigt (Lipshutz et al., 1999). Die Sonden werden dabei *in situ* auf dem Chip synthetisiert. Eine Quarzscheibe wird mit einer lichtsensitiven chemischen Verbindung beschichtet, welche das Ankoppeln des ersten Nukleotids der zu synthetisierenden DNA Sonde verhindert. Lithographische Masken werden dann eingesetzt um an bestimmten Stellen auf der Scheibe entweder Licht zu blockieren oder durchzulassen. Die Oberfläche wird dann mit einer Lösung überschwemmt, die eines der vier Nukleotide Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin enthält. An den von Licht entschützten (*deprotected*) Stellen findet dann die Ankopplung des entsprechenden Nukleotids statt. Durch wiederholte Zyklen von Entschützung und Ankopplung können schrittweise ganz gezielt spezifische Oligonukleotide von bis zu 25 Basenpaaren (*basepairs*, bp) synthetisiert werden. Diese stellen dann die genspezifischen Sonden (*probes*) dar, an welche die komplementäre cDNA binden kann (vgl. 2.6.2). Die von der Affymetrix Homepage (www.affymetrix.com) entlehene Abbildung 2-5 stellt dieses Verfahren anschaulich dar.

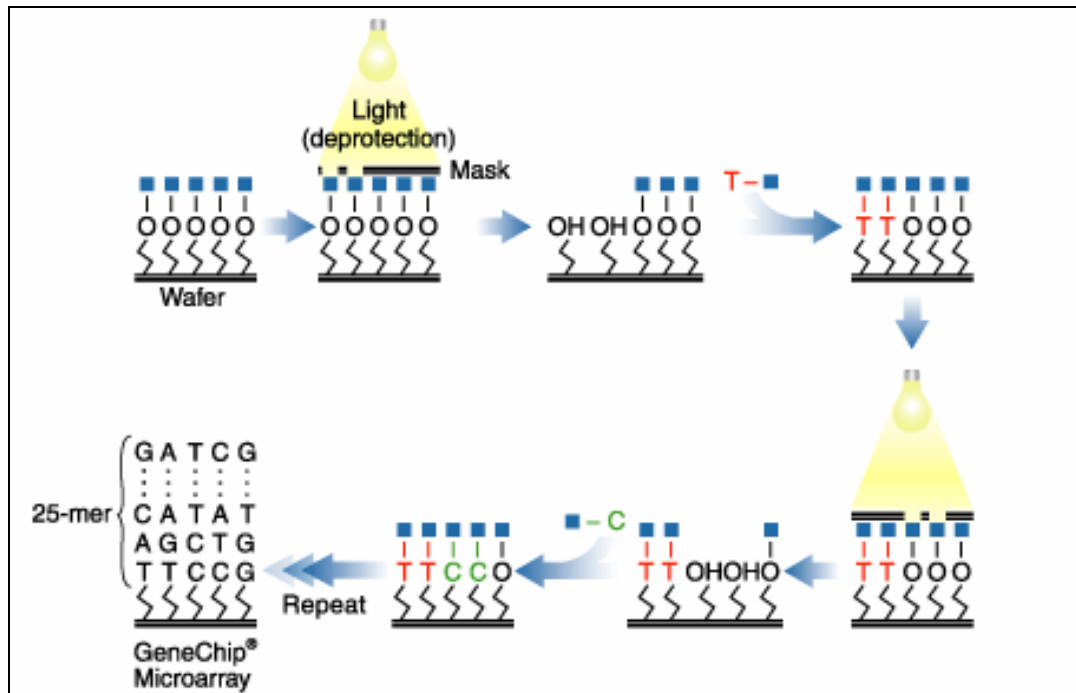


Abbildung 2-5 In situ Oligonucleotidsynthese auf GeneChip Arrays

Siehe Text für Details. (www.affymetrix.com)

Durch diese Technik ist es möglich, bis zu 300.000 unterschiedliche Sonden auf einer Fläche von nur 1,28 cm x 1,28 cm zu synthetisieren. Pro Sonde werden auf einer Fläche von 20 μm x 20 μm 1 x 10⁶ bis 1 x 10⁷ Kopien eines Oligonucleotids erzeugt (Schadt et al., 2000).

Die Sonden sind unter anderem so ausgewählt, dass sie sich, wenn möglich, nicht überlappen. Die Hälfte der Sonden stellen die genspezifischen Sonden (*perfect match probe*, PM) dar. Zu jeder genspezifischen Sonde gibt es genau eine Sonde, bei der an Position 13 des Oligonucleotids eine homomere Base ausgetauscht wurde (*mismatch probe*, MM). Die Idee der *mismatch*-Sonden ist, Hintergrundsignale oder unspezifische Interaktionen zu quantifizieren und mit dem PM-Signal zu verrechnen (Lockhart et al., 1996; Wodicka et al., 1997). Abbildung 2-6 zeigt exemplarisch die Darstellung korrespondierender Sondenpaare (PM und MM).

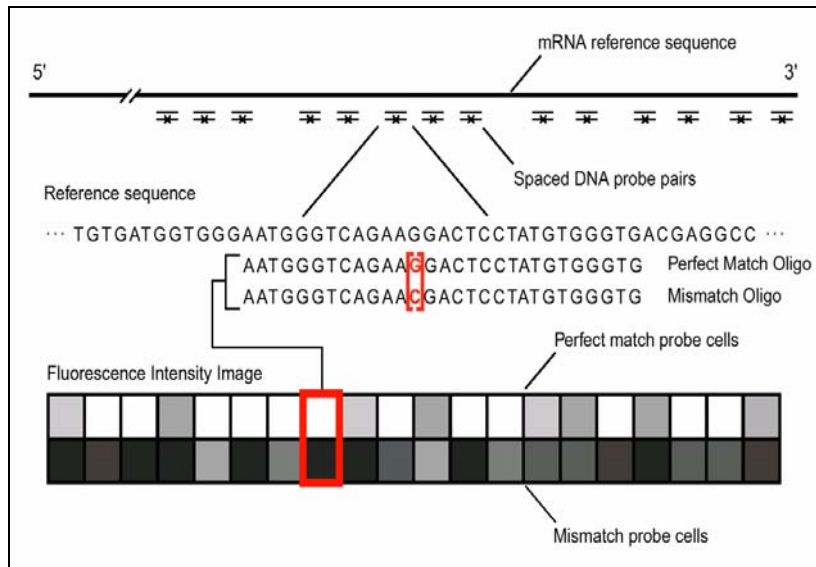


Abbildung 2-6 Schematische Darstellung eines gescannten Genechips

Jeder PM-Sonde wird die entsprechende MM-Sonde gegenübergestellt. Aus diesen Messwerten wird für jedes Gen ein Einzelwert berechnet, der die Expressionsstärke dieses Gens wiedergibt (www.affymetrix.com).

Ist das Signal bei den *perfect match* Sonden stärker als in den *mismatch* Sonden, bekommt es ein P (*present*) und umgekehrt A für (*absent*), bei Gleichheit ein M (*marginal*). Aus diesen Messwerten wird schließlich für jedes Gen ein Einzelwert (Algorithmus: $P=1$, $M=0,5$, $A=0$), das Signal, berechnet. Dieses Signal macht eine relative Angabe über die ursprüngliche Menge eines Transkripts und repräsentiert somit die Expressionsstärke eines Gens (Hattenhorst, 2003).

Auf dem verwendeten Affymetrix HG-U133A GeneChip[®] befinden sich 22.308 SONDENSÄTZE, welche 13.220 Gene und 5.413 EST (*expressed sequence tags*) detektieren können.

Das Affymetrix GeneChip[®] Instrument System besteht aus vier Gerätekomponenten: GeneChip Scanner 3000 7G, Fluidics Station 450, Hybridization Oven 640, und eine Computer-Workstation mit Microarray Suite 5.0 Auswertungssoftware. Von der zentralen Computerplattform aus werden die anderen Geräte gesteuert und auch die Analyse der erhobenen Messdaten ausgeführt.

2.6.2 Hybridisierung

Die aus den Kontrollzellen nach verschiedenen Schritten gewonnene cRNA (vgl. 2.5.3) wird dann mit den DNA-Microarrays hybridisiert. Hierbei binden markierte RNA-Fragmente (cRNA) an ihren komplementären Gegenpart (Sonde) auf dem *Array*.

Für diesen Vorgang der Hybridisierung wurde ein Hybridisierungscocktail-Master-Mix und ein Hybridisierungspuffer hergestellt und bei 4 °C gelagert. Der einfache Ansatz (280 µl) des Hybridisierungscocktails setzt sich zusammen aus 104 µl H₂O, 15 µl Eucaryotic Hybridization Controls (Spike Controls, Endkonzentration 100 pM), 5 µl Kontrolloligonucleotid B2 (3 nM, Endkonzentration 50 pM), 3 µl Hering Sperm DNA (3 nM, Endkonzentration 0,1 mg/ml), 3 µl acetyliertes BSA (50 mg/ml), 150 µl Hybridisierungspuffer. Es wurde ebenfalls ein 2x Hybridisierungspuffer hergestellt (200 mM MES, 2 M [Na⁺], 40 mM EDTA, 0,02% Tween20).

Die fragmentierte cRNA aus 2.5.3 (20 µl) wurde für 2 min bei 65 °C erhitzt, 280 µl Hybridisierungs-Master-Mix in jedes Röhrchen dazugegeben, gemischt, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Die *Arrays*, vor der Bearbeitung auf RT gebracht, wurden mit 200 µl Hybridisierungspuffer befüllt und die Öffnungen mit Klebestreifen abgedichtet und im Hybridisierungssofen für 10 min bei 45 °C rotierend inkubiert. Unterdessen wurde der die fragmentierte cDNA enthaltende Hybridisierungscocktail für 5 min bei 99 °C inkubiert, gefolgt von 5 min bei 45 °C. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 12000 g damit Schwebepartikel, die nicht mit auf die *Arrays* gebracht werden dürfen, sedimentieren.

Der Puffer wurde vorsichtig aus den *Arrays* entnommen und verworfen. Die *Arrays* wurden daraufhin mit 200 µl des entsprechenden Hybridisierungscocktails befüllt, die Öffnungen wieder abgedichtet und im Hybridisierungssofen für 16 h mit 20 rpm bei 45 °C inkubiert.

2.6.3 Waschen, Färbung und Array Scan

Nach Abwaschen der nicht gebundenen cRNA wird der Array mit SAPE (Streptavidin-PE) angefärbt, nochmals gewaschen und anschließend wird jedes einzelne Sondenfeld mit dem Licht des konfokalen Laserscanners angeregt. Durch die resultierende Photonenemission der fluoreszenzmarkierten und hybridisierten cRNA wird ein Bild generiert und dieses Lichtsignal in einen 16-Bit Intensitätswert übersetzt. Diese Bilder der gescannten Genechips stellen die Rohdaten eines jeden Experiments dar.

Dafür wurden die Hybridisierungscocktails aus den *Arrays* entnommen und für eventuell erneute Benutzung bei -20 °C eingefroren. Die *Arrays* wurden dann mit 200 µl Non-Stringent-Wash Buffer A (6x SSPE (20x SSPE Stock aus 3 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 0,02 M EDTA), 0,01% Tween20, in Wasser, sterilfiltriert, 0,005% Antifoam) befüllt. An dieser Stelle können die *Arrays* maximal 3 h bei 4 °C gelagert werden. Vor der Weiterverarbeitung müssen die *Arrays* allerdings wieder auf RT gebracht werden. Desweiteren wurde der Puffer Stringent-Wash B hergestellt (100 mM MES, 0,1 M [Na⁺], 0,01% Tween, sterilfiltriert). Für die Herstellung der SAPE-Lösung (Streptavidin-Phycoerythrin) wurde erst ein 2x Färbepuffer (200 mM MES, 2M [Na⁺], 0,1% Tween20, sterilfiltriert, 0,01% Antifoam) hergestellt. Zu 400 µl des 2x Färbepuffers wurden 360 µl H₂O, 32 µl acetyliertes BSA (50 mg / ml) und 8 µl SAPE (1 mg / ml) gegeben. Die SAPE-Lösung darf niemals eingefroren werden und muss immer frisch hergestellt und lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Die *Arrays* und die Röhrchen mit der SAPE-Lösung und den beiden Lösungen Stringent-Wash A und Stringent-Wash B wurden in den passenden Modulen der Fluidics Station plaziert und das für den Affymetrix GeneChip[®] spezifische Waschprogramm gestartet. Nach Beendigung des Waschprogramms wurden die *Arrays* dann bis zum Scan bei 4 °C im Dunkeln zwischengelagert.

Die Microarrays wurden bei einer Wellenlänge (λ) von 570 nm, mit einer Auflösung von 3 µm zweimal gescannt und das pro Pixel gemittelte Ergebnis gespeichert. Die *Arrays* können einem zweiten Färbeschritt unterzogen werden, bei dem es durch die Verwendung biotinylierter anti-Streptavidin-Antikörper und erneuter Färbung mit SAPE zu einer Verstärkung der Fluoreszenzsignale

kommt. Zur Herstellung der Antikörper-Lösung wurden zu 400 µl 2x Färbepuffer, 355,2 µl H₂O, 32 µl acetyliertes BSA (50 mg / ml), 8 µl IgG (10 mg / ml), 4,8 µl Anti-Streptavidin-Antikörper (0,5 mg / ml) gegeben. In der Fluidics-Station wurden die hybridisierten und bereits einmal gefärbten Arrays erneut mit der SAPE-Lösung 10 min bei 25 °C, dann mit der Antikörper-Lösung für 10 min bei 25 °C und wieder mit der SAPE-Lösung für 10 min bei 25 °C inkubiert und automatisch mit den beiden Lösungen Non-Stringent-Wash A und Stringent-Wash B gewaschen. Die fertigen *Arrays* wurden erneut bei 570 nm und einer Auflösung von 3 µm mit einer Wiederholung gescannt. Das aus den beiden Scans pro Pixel gemittelte Ergebnis wurde dann als endgültiges Bild im Programm Microarray Analysis Suite als so genannte *cell-file* gespeichert. Die Affymetrix Software erstellt somit für jedes Bild eine Liste aller auf dem Array vorhandenen SONDENSÄTZE und macht neben dem Signalwert eine Angabe darüber, ob das Gen exprimiert (P, *present call*) oder nicht exprimiert (A, *absent call*) ist.

2.7 Methoden zur Auswertung der Analysedaten

2.7.1 Normalisierung

Äußere, nicht-biologische Einflußfaktoren können zur Variabilität der Daten in biologischen Experimenten führen. Dies ist auch in der Untersuchung der differentiellen Genexpression, die eben gerade aus vielen einzelnen experimentellen Schritten besteht, nicht zu vernachlässigen. Bereits kleine Änderungen in Menge und Qualität der hybridisierten Proben oder Färbereagenzien können, trotz aller Standardisierungen der Methoden, die Hybridisierungsintensitäten beeinflussen. Um diese nicht-biologischen Einflüsse minimal zu halten, werden die Datensätze vor der Analyse normalisiert.

Die der Normalisierung zugrunde liegende Annahme ist, dass das gesamte Signal eines Genchips, über verschiedene Hybridisierungsexperimente betrachtet, vergleichbar ist, d.h. ungefähr gleich ist. Diese Annahme ist

vertretbar, da mit jeder Hybridisierungslösung dieselbe RNA-Menge auf einen Genchip gebracht wird. Es wird desweiteren vorausgesetzt, dass die betrachteten Variablen, also die Fluoreszenzintensitäten aller SONDENSÄTZE auf einem Chip, regelmäßig verteilt sind.

Die Skalierung ist eine mathematische Methode um Unterschiede zu minimieren, die während der Bearbeitung und Analyse der Proben auftreten können. Hierfür werden alle vorhandenen SONDENSÄTZE berücksichtigt. Alle Einzelsignale eines Arrays werden zu einem bereinigten Mittelwert, dem so genannten *Trimmed Mean Signal*, zusammengefasst. Um diesen bereinigten Mittelwert zu ermitteln, werden zuerst alle extremen Minima und Maxima entfernt. Der bereinigte Mittelwert wird dann auf eine vom Anwender zu definierende Gesamtintensität (*Target Signal*) korrigiert. Der hierfür erforderliche Skalierungsfaktor (*Scale Factor*, SF) ermittelt sich demnach aus: $Target\ Signal = Scale\ Factor \times Trimmed\ Mean\ Signal$. Die Idee für diese Art der Skalierung ist die Annahme, alle Genchips hätten in etwa die gleiche Gesamthelligkeit bzw. eine gleiche mittlere Helligkeit. Die *Microarrays* in diesem Experiment wurden auf denselben mittleren Targetintensitätswert von 500 (Empfehlung von Affymetrix) normalisiert. Die Skalierungsfaktoren von Arrays, die direkt miteinander verglichen werden sollen, sollten nicht mehr als ein Wert 5 voneinander abweichen. Bei zu großen Skalierungsfaktoren besteht die Gefahr, dass der lineare Zusammenhang zwischen auf dem Array hybridisierter RNA und dem gemessenen Fluoreszenzsignal verloren geht (Hattenhorst, 2003).

2.7.2 Auswertungsprogramme

Die Ergebnisse der mit dem Affymetrix HG-U133A Genchip erhobenen Daten wurden mit den Programmen *Microarray Analysis Suite 5.0* (Affymetrix, Santa Clara, USA) normalisiert und Excel-Datensätze der relativen Expression für die weitere Auswertung erstellt. Für die unüberwachten *Cluster* Analysen und die *Principal Component Analyse* wurde das Softwarepaket *Genesis* (Sturn et al., 2002) verwendet. Für die Identifikation differentiell exprimierter Gene wurde die *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) (Tusher et al., 2001) angewandt.

Um Gene zu identifizieren, die möglicherweise für die Klassifikation von Proben als Maligne oder Gesund herangezogen werden könnten, wurde die *Prediction Analysis of Microarrays* (PAM) eingesetzt.

2.7.3 Clustering

Bei jedem der *Microarray Scans* entstehen extrem große Mengen an komplexen Daten, die entsprechend analysiert werden müssen. Die Visualisierung ist dabei eine effektive Analysetechnik, die sich die Fähigkeit des menschlichen Gehirns zunutze macht, große Datenmengen visuell verarbeiten zu können (Gilbert et al., 2000). Die traditionellen Visualisierungsmethoden basieren auf dem so genannten *Clustering*. Unter Clusteranalyse versteht man ein strukturentdeckendes, multivariantes Analyseverfahren zur Ermittlung von Gruppen von Objekten anhand bestimmter Ähnlichkeiten oder Unterschiedlichkeiten, den so genannten *Clustern*. Somit können Objekte / Proben anhand bestimmter, festgelegter Merkmale automatisch klassifiziert werden. Historisch gesehen stammt das Verfahren aus der Taxonomie in der Biologie, wo über ein *Clustering* von verwandten Arten eine Ordnung der Lebewesen ermittelt wird.

Clustering Algorithmen können hierarchisch oder partitionierend sein, wobei man die hierarchischen Clustering Algorithmen noch in agglomerierende (agglomerative) und unterteilende (divisive) Algorithmen unterteilt. Bei den am häufigsten angewandten agglomerierenden Algorithmen werden schrittweise einzelne Objekte zu *Clustern* und diese zu größeren Gruppen zusammengefasst, während bei den teilenden Verfahren größere Gruppen schrittweise immer weiter unterteilt werden. In dem auch hier verwendeten agglomerierenden Algorithmus wird beim Anhäufen der *Cluster* zunächst jedes Objekt als ein eigener *Cluster* betrachtet. Es werden dann in jedem Schritt die jeweils einander nächsten *Cluster* zu einem einzelnen *Cluster* zusammengefasst. Dies geschieht so lange, bis alle zu einem einzigen *Cluster* zusammengefügt sind. Zu Beginn, wenn jedes Objekt ein eigenes *Cluster* repräsentiert, werden die Abstände zwischen diesen Objekten von dem gewählten Distanzmaß bestimmt. Sobald aber mehrere Objekte

zusammengefügt wurden, wird es notwendig Verknüpfungsregeln (*linkage* oder *amalgamation rules*) zu bestimmen, um festzulegen, ob zwei *Cluster* ähnlich genug sind, um verbunden zu werden. Als Abstandsfunktion wurde in der vorliegenden Arbeit die euklidische Distanz verwendet. Durch das hierarchische Clustering wird dann die errechnete Distanzmatrix in eine Hierarchie von verschachtelten Unterteilungen transformiert. Die hierbei entstehende Baumstruktur, die also die errechneten Verhältnisse der Gene graphisch aufzeigt, wird dann anschaulich in Form eines Dendrogramms dargestellt. Die Primärdaten werden dabei in einer Tabelle farblich dargestellt, in der jede Spalte eine Probe und jede Zeile ein Gen repräsentiert. Diese Darstellungsweise wird auch als heat-map bezeichnet. Die Zellen geben somit quantitativ und qualitativ die ermittelten Fluoreszenz-Verhältnisse (*Ratios*), also die Genexpressionsstärke, wieder. Jedem Punkt wird entsprechend des gemessene Fluoreszenzverhältnisses eine Farbe zugeordnet: Grün repräsentiert negative Log Ratios, Rot positive Log Ratios. Schwarz ergibt sich aus einem Log Ratio von 0.

Weiterhin unterscheidet man zwischen überwachten (*supervised*) und nicht-überwachten (*unsupervised*) Analysen. Ziel einer überwachten Clusteranalyse ist es, Klassifikationsregeln zu finden, um bekannte Objekte so genau wie möglich zu unterscheiden. Sie wird beispielsweise angewandt, um Genexpressionssignaturen zu identifizieren, die eine bestimmte Gruppe von Proben charakterisieren, z.B. gesunde vs. maligne Zellen. In der nicht-überwachten Clusteranalyse hingegen sind beliebig viele Objekte gegeben und Ziel ist es, ähnliche Objekte zu gruppieren. Diese wird beispielsweise eingesetzt um vorher unbekannte Subtypen einer Erkrankung aufzudecken. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl überwachte als auch nicht-überwachte Analysen durchgeführt.

2.7.4 *Principal Component Analysis (PCA)*

Eine weitere angewandte Analysemethode ist die sogenannte Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA). Die PCA dient dazu, umfangreiche, multidimensionale Datensätze zu strukturieren, zu

vereinfachen und zu veranschaulichen, indem eine Mehrzahl statistischer Variablen durch eine geringere Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen, die sogenannten Hauptkomponenten (*Principal Components*), genähert wird. Die vielen Dimensionen bei den durchgeführten Genexpressionsanalysen entstehen durch die große Anzahl an Beobachtungen und der großen Anzahl untersuchter Gene.

Mathematisch werden dabei aus hochdimensionalen Datenvektoren drei Hauptkomponenten ermittelt, die einen möglichst großen Anteil der Varianz der ursprünglichen Vektoren enthalten. Kleinere Unterschiede in den Daten werden dabei weniger bewertet. Die Hauptkomponenten werden in einem dreidimensionalen Koordinatensystem dargestellt. Punkte, die in einem solchen Koordinatensystem nah beieinander liegen, haben ähnliche Eigenschaften, beruhen daher auf ähnlichen Expressionsmustern und umgekehrt unterscheiden sich Punkte, die weiter voneinander entfernt sind, mehr in ihren Expressionsmustern.

3 Ergebnisse

3.1 Bisherige Analysen

Zu Beginn dieser Arbeit lag lediglich eine einzige Aufzeichnung vor, in der in einer umfassenden Analyse die Genexpression von Leukämieproben mit CD19⁺CD10⁺ Kontrollproben verglichen wurden. Die Kontrollproben waren aber nur partiell aufgereinigt (siehe Dissertation von Dr. U. Hattenhorst (Hattenhorst, 2003)). 25 Leukämieproben aus der genannten Dissertation, die auf den *Arrays* vergleichbare Skalierungsfaktoren hatten, gingen auch in die Analyse der vorliegenden Arbeit ein.

Mit der bisherigen Methode in der oben genannten Arbeit wurden die Zielzellen durch eine Negativselektion mittels B-Cell-Isolationkit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) angereichert. Hiermit wurde eine Anreicherung der CD19⁺ B-Lymphozyten von $10,8 \pm 5,7\%$ auf $79,3 \pm 10,1\%$ erreicht, die Anreicherung der CD19⁺CD10⁺ B-Vorläuferzellen lediglich von $4,0 \pm 2,2\%$ auf $25,2 \pm 6,8\%$ (Hattenhorst, 2003).

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine erweiterte Methode zur Anreicherung hoch aufgereinigter CD19⁺CD10⁺ B-Lymphoblasten höherer Reinheit (vgl. 2.4). Diese hoch-reinen CD19⁺CD10⁺ B-Lymphoblasten ermöglichen erstmals einen Vergleich der Genexpressionsprofile pädiatrischer cALL mit gesunden Zellen des gleichen Differenzierungsstadiums aus Nabelschnurblut.

3.2 Aufreinigung CD19⁺CD10⁺ fetaler B-Lymphoblasten aus Nabelschnurblut

Als Kontrollproben wurden Nabelschnurblutproben gesunder, reifgeborener Kinder herangezogen. Das Blut wurde nach Durchtrennung der Nabelschnur aus dem mütterlichen Teil der Nabelschnur in utero entnommen (vgl. 2.3.2). Das Nabelschnurblut sollte bis zur Verarbeitung bei RT gelagert werden, damit die Lebensfähigkeit der Zellen gewährleistet ist. Es hat sich gezeigt, dass eine

vernünftige Verarbeitung der Proben nur innerhalb von 24-36 Stunden möglich ist. Bei längerer Verzögerung wird die Aufreinigung von B-Lymphoblasten erheblich erschwert bis unmöglich. Die Aufreinigung aufgetauter Proben war nicht erfolgreich.

Die Kontrolle der Aufreinigung der Nabelschnurblutproben (*Cord Blood*, CB) erfolgte durch durchflusszytometrische Analysen (vgl. 2.4.8) und Bestimmung der Zellzahl nach jedem erfolgten Aufreinigungsschritt. Die Ergebnisse der einzelnen Proben nach jedem Schritt sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Es konnten Volumina von 10 bis 102 ml Blut aus den Nabelschnurvenen entnommen werden. Die Aufreinigung erfolgte in drei Schritten. Zuerst wurden die Lymphozyten mittels Ficoll-Gradient aus dem Nabelschnurblut isoliert (vgl. 2.4.1). Dabei wurden bereits die meisten Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten aus den Proben entfernt. Der Anteil an lebenden Zellen in den Proben betrug im Durchschnitt $> 80\%$. Der Anteil an $CD19^+$ Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl machte im Mittel $5,6\%$ (mit Ausreißern von $0,2\%$ bis $10,5\%$) aus, der Anteil an $CD19^+CD10^+$ Lymphoblasten machte im Mittel $2,6\%$ aus (mit Ausreißern von $0,01\%$ bis $6,5\%$ (vgl. Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2a).

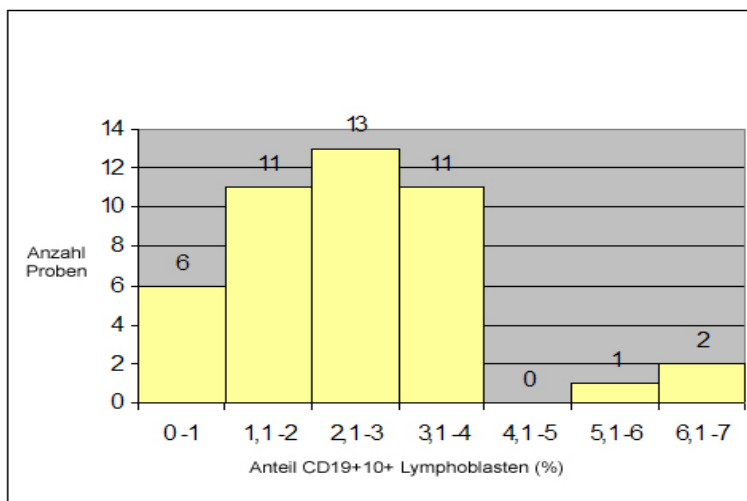


Abbildung 3-1 Prozentualer Anteil der $CD19^+CD10^+$ Lymphoblasten

Anteil der $CD19^+CD10^+$ Lymphoblasten an der Gesamtlymphozytenzahl der einzelnen NSB-Proben vor der Aufreinigung. Es ist eine symmetrische Verteilung zwischen 1% und 4% erkennbar, mit einigen Ausreißern bis zu $6,5\%$.

Im zweiten Schritt der Zellseparation der CD19⁺ B-Lymphozyten (vgl. 2.4.4), wurde deren Anteil von den anfangs im Mittel 5,6% auf im Mittel 90,1% (mit einer Schwankungsbreite von 39,9% bis 99,3%) angereichert (vgl. Abbildung 3-2b). Dabei wurden die CD19⁺CD10⁺ B-Lymphoblasten von durchschnittlich 2,6% auf durchschnittlich 55,1% (Schwankungsbreite von 21,6% - 79,0%) angereichert. Dieser Selektionschritt beinhaltet die Markierung der Zellen mit Dynabeads[®] zur Positiv-Selektion der erwünschten Zellen und der darauf folgenden Entfernung der Dynabeads[®] (vgl. 2.4.5). Zwischen diesen beiden Schritten fand zugunsten der Reinheit ein unvermeidbarer Zellverlust von durchschnittlich ca. 24% statt.

Im dritten Schritt der Positivselektion der CD10⁺ B-Lymphoblasten mit magnetisch markierten Anti-PE Antikörpern (vgl. 2.4.6) wurde eine weitere Steigerung der Reinheit auf durchschnittlich 79,8% erreicht, mit Maximalwerten bis zu 94,3% (vgl. Abbildung 3-2c).

Insgesamt war die Ausbeute, also die Anzahl tatsächlich isolierter CD19⁺CD10⁺-Zellen im Vergleich zu der Menge CD19⁺CD10⁺ Zellen, die laut durchflusszytometrischer Analyse in den jeweiligen Proben ursprünglich enthalten waren, mit nur durchschnittlich 10,2% sehr gering. Beispielsweise hätten in der Probe CB6 laut FACS Analyse mit 3,8% CD19⁺CD10⁺ Zellen und der Gesamtlymphozytenzahl von $2,76 \times 10^8$ insgesamt etwa $1,35 \times 10^7$ CD19⁺CD10⁺ Zellen enthalten sein müssen. Nach erfolgter Aufreinigung wurden aber lediglich $1,10 \times 10^6$ CD19⁺CD10⁺ Zellen gezählt. Dies ergibt eine Ausbeute von 8,1%. Mit einem gewissen Verlust ist offensichtlich zu rechnen, da diese neue Methode viele aufeinander folgende Schritte beinhaltet. Die Reinheit ging auf Kosten der Ausbeute. Dennoch verblieben ausreichende Zellzahlen, die genug RNA für eine Expressionsanalyse lieferten.

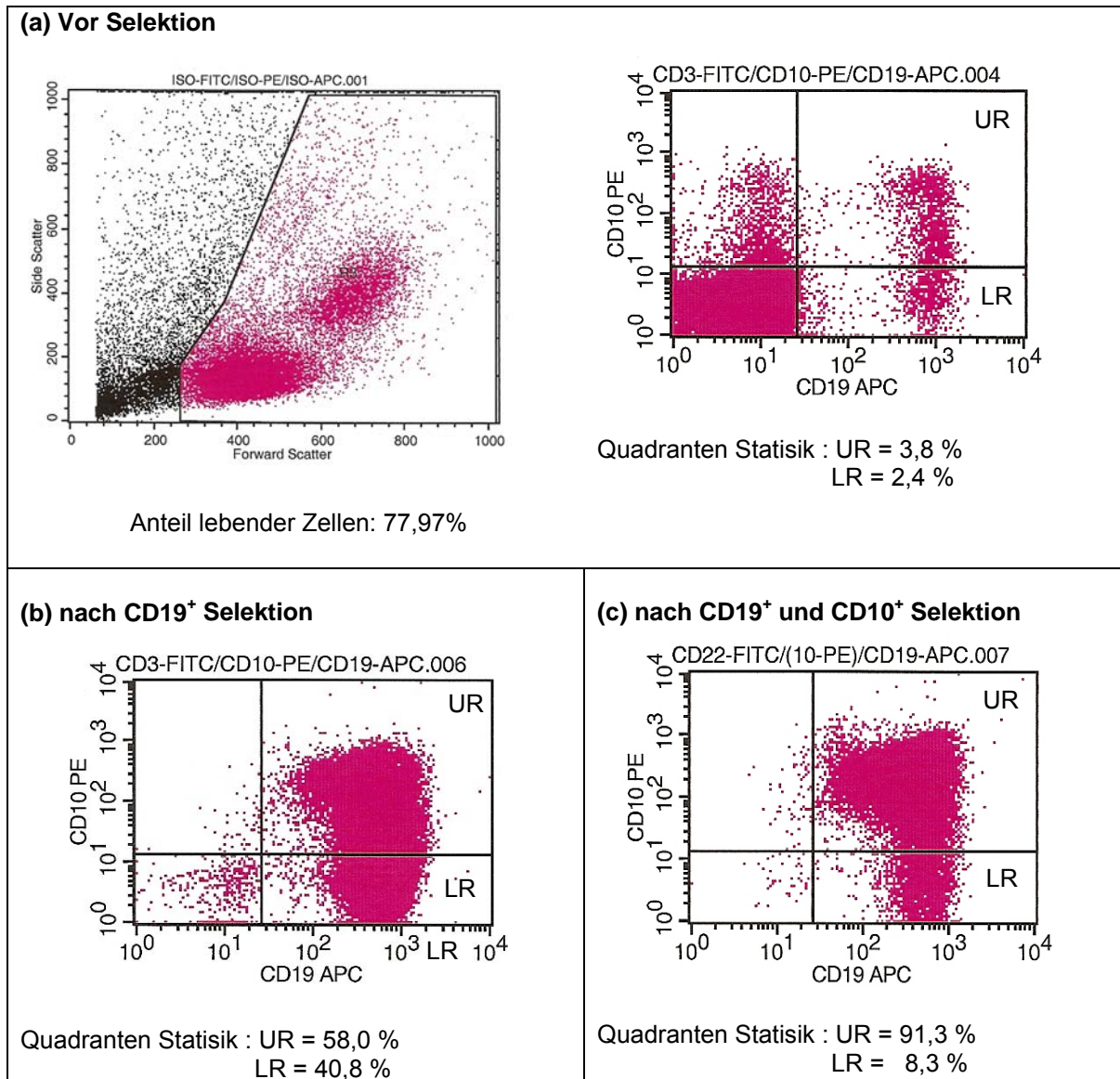


Abbildung 3-2 Durchflusszytometrische Kontrolle der Zellseparation

Durchflusszytometrische Kontrolle der Zellseparation und Anreicherung am Beispiel der Probe CB6. Alle Angaben sind im *gate* der lebenden Zellen (rosa). **a) vor Selektion:** Der Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl beträgt 77,97%, davon 6,25% CD19⁺ Zellen, 3,8% CD19⁺CD10⁺ Zellen. **b) nach CD19⁺ Selektion** mit CD19-Dynabeads: Anreicherung des Anteils an CD19⁺ an der Gesamtlymphozytenzahl auf 98,8%, des Anteils an CD19⁺CD10⁺ Zellen auf 58,0% **c) nach CD10⁺ Selektion** mit magnetisch markierten Anti-CD10-PE Antikörpern: Anreicherung der CD19⁺CD10⁺ Fraktion auf 91,3%. (UR= upper right quadrant (oberer rechter Quadrant), LR = lower right quadrant (unterer rechter Quadrant)).

Tabelle 3-1 Übersicht der Ergebnisse einzelner Aufreinigungsschritte

ID	Vor Selektion				nach CD19 ⁺ Selektion				nach CD10 ⁺ Selektion	
	Vol (ml)	Anteil lebender Zellen (%)	Anteil CD19 ⁺ (%)	Anteil CD19 ⁺ 10 ⁺ (%)	CD19 ⁺ Zellzahl +Dynabeads	CD19 ⁺ Zellzahl nach Detach	Anteil CD19 ⁺ (%)	Anteil CD19 ⁺ 10 ⁺ (%)	CD19 ⁺ 10 ⁺ Zellzahl	Anteil CD19 ⁺ 10 ⁺ (%)
CB1	98	84,72	n.a.	n.a.	2,15E+07	1,03E+07	84,00	55,34	3,85E+05	76,91
CB2	57	87,35	5,12	3,52	n.a.	2,77E+07	81,14	50,46	6,80E+05	73,35
CB3	65	84,93	5,06	3,09	1,89E+07	8,20E+06	97,92	55,48	2,55E+05	74,57
CB4	63	83,38	6,51	3,64	1,30E+07	1,04E+07	99,06	68,46	1,12E+06	93,32
CB6	67	77,97	6,29	3,84	1,58E+07	1,26E+07	98,81	58,05	1,10E+06	91,32
CB7	48	61,00	n.a.	n.a.	6,15E+06	8,20E+06	97,86	31,27	6,60E+05	45,77
CB8	65	84,82	3,74	2,20	5,00E+06	3,00E+06	98,12	75,67	7,20E+05	94,31
CB5	55	n.a.	n.a.	n.a.	4,00E+06	4,60E+06	93,56	48,89	4,40E+05	56,46
CB9	35	87,86	n.a.	n.a.	5,00E+06					
CB10	34	96,22	1,17	0,98	4,75E+06	5,40E+06	98,04	79,35	6,50E+05	88,03
CB11	33	64,60	2,93	1,19	3,64E+06	1,96E+06	97,16	55,41	6,00E+05	80,71
CB12	38	83,32	4,46	2,51	1,13E+07	1,42E+07				
CB13	35	83,45	7,21	3,63	2,30E+07	7,95E+07	86,40	53,42	4,84E+06	75,23
CB14	98	83,53	4,95	3,12	4,90E+07					
CB15	78	82,05	10,09	6,51	3,50E+07					
CB16	37	53,77	2,75	1,87	n.a.	1,34E+07	79,53	59,83	1,07E+06	67,78
CB18	18	83,97	4,10	2,82	4,30E+06	2,10E+07	88,21	76,39	1,58E+06	94,39
CB19	38	90,84	3,42	2,11	2,19E+07					
CB20A*	13	80,34	4,50	2,87	1,15E+07	1,09E+07	99,16	71,31	7,77E+05	90,54
CB20B*									5,65E+05	89,57
CB22	58	86,96	0,93	0,48	1,95E+07	6,88E+07	89,10	60,95	4,00E+06	93,69
CB23	58	82,08	5,26	3,56	9,18E+07					
CB24	45	85,85	4,17	2,47	3,33E+07					
CB25*	13	74,47	1,88	1,11	1,01E+07	1,00E+08	84,75	46,53	1,10E+07	86,22
CB26*	32	73,87	3,10	2,04	2,83E+07					
CB27*	38	81,85	0,81	0,54	1,50E+07					
CB28*	65	85,58	4,38	2,45	7,11E+07					
CB29*	43	71,56	3,88	2,46	2,31E+07					
CB30*	56	87,68	6,36	3,68	2,10E+07					
CB31*	48	84,87	4,96	3,22	3,99E+07	3,17E+07	99,36	69,64	2,34E+06	90,79
CB32*	10	40,82	5,21	2,32	2,63E+05	1,32E+08	39,94	21,64	1,15E+07	83,97
CB33*	92	85,79	4,70	2,89	8,34E+07					
CB34*	48	80,71	4,13	2,67	1,50E+07					
CB35*	33	85,78	0,16	0,01	3,12E+07					
CB36*	23	87,66	0,76	0,32	3,50E+07					
CB37*	40	80,50	2,17	1,21	2,89E+07					
CB38*	78	79,96	10,50	6,01	3,60E+07					
CB39*	68	76,55	8,91	6,19	2,48E+07	3,83E+07	98,35	56,44	4,16E+06	90,63
CB40*	43	89,68	5,15	2,05	5,20E+07					
CB41	90	68,46	6,11	3,14	7,00E+07	4,05E+07	94,69	46,33	2,20E+06	77,96
CB42	65	80,80	3,50	1,91	1,72E+07					
CB43	21	76,57	2,35	1,27	3,52E+06					

ID	Vor Selektion				nach CD19 ⁺ Selektion				nach CD10 ⁺ Selektion	
	Vol (ml)	Anteil lebender Zellen (%)	Anteil CD19 ⁺ (%)	Anteil CD19 ⁺ 10 ⁺ (%)	CD19 ⁺ Zellzahl +Dynabeads	CD19 ⁺ Zellzahl nach Detach	Anteil CD19 ⁺ (%)	Anteil CD19 ⁺ 10 ⁺ (%)	CD19 ⁺ 10 ⁺ Zellzahl	Anteil CD19 ⁺ 10 ⁺ (%)
CB47	13	64,30	1,08	0,19	1,78E+07	4,33E+07	78,71	20,82	1,68E+06	42,16
CB48	63	74,73	9,02	3,70	2,46E+07					
CB49	45	90,39	7,31	2,09	3,49E+07					
CB50	25	80,75	3,63	1,68	9,00E+06	7,40E+07	97,35	51,71	1,35E+06	77,16
CB51	102	82,54	3,31	1,31	2,40E+07					
CB52	48	86,51	3,52	1,63	1,98E+07					
CB53	35	88,84	2,96	1,59	1,90E+07					

Grau = Zellzahlen, Weiss = prozentualer Anteil, gemessen in der Durchflusszytometrie. Angaben beziehen sich auf die lebenden Zellen. n.a. = nicht analysiert. * Proben wurden für die Microarray Analyse verwendet.

3.3 Die Genchipanalyse

3.3.1 Die ausgewählten Proben

Für die Genchipanalyse wurden ausschließlich Proben mit einer finalen Reinheit von über > 79,3% herangezogen. Dieses Kriterium wurde von 56,5% der Proben erfüllt. Da in früheren Experimenten pro Genchip standardmäßig ca. 15 µg RNA eingesetzt wurden und die einzelnen Proben dieser Arbeit dafür nicht ausreichten, wurden einige Proben gepoolt. Die Zusammensetzung der verwendeten Proben für die durchgeführten Analysen mit 3 Affymetrix HG-U133A Genchips ist in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Tabelle 3-2 Übersicht der zur Microarray Analyse eingesetzten Proben

Chip ID	CB ID	Reinheit CD19 ⁺ CD10 ⁺	Gesamtzahl CD19 ⁺ CD10 ⁺ Zellen/ Genchip	µg RNA
FEB 25-29	25 – 29	86,22 %	1,1 x10 ⁷	9,90
FEB 30-37	20A+B	90,10 %	1,52 x10 ⁷	9,07
	30+31	90,79 %		
	32-37	83,97 %		
FEB 38-40	38-40	90,63 %	4,16 x10 ⁶	23,0

3.3.2 Qualitätskontrolle

Die zur *Microarray* Analyse herangezogenen Proben (17 Proben, vgl. Tabelle 3-1) wurden einer Qualitätskontrolle unterzogen (vgl. Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3 Qualitätskontrolle der drei zur Microarrayanalyse herangezogenen Proben

Chip ID	FEB 25-29	FEB 30-37	FEB 38-40
Sample Type:	cRNA	cRNA	cRNA
Reagents:	15ug	15ug	15ug
TGT**	500	500	500
SF*	7,52584	5,543655	7,347106
SFGene	All	All	All

*SF=*scaling factor*, **TGT=*Mittlere Targetintensität*

3.3.3 Unsupervised Cluster Analyse

Die hierarchische Cluster Analyse wurde herangezogen, um die Leukämie- und Kontrollproben nach der Ähnlichkeit ihres Genexpressionsmusters zu gruppieren und somit ihre Verwandtschaft darzustellen (vgl. 2.7.3). Ziel der unüberwachten Cluster Analyse ist es, Proben mit ähnlichen Eigenschaften zusammen zu gruppieren. Hierarchisches Clustern hat den großen Vorteil, dass nur das Distanzmaß und die Verbindungsregeln (*linkage rules*) spezifiziert werden müssen. Das Resultat ist ein neu geordnetes Set von Proben oder Genen, in dem ähnliche *Cluster* in der Baumstruktur nah zusammen liegen. Einbezogen in die Analyse wurden 25 ALL-Proben, 6 semi-aufgereinigte CD19⁺CD10⁺ Kontrollproben (FEBxNP Proben) und 3 hoch-aufgereinigte CD19⁺CD10⁺ Kontrollproben (FEBx Proben) (FEB, Fetale B-Zellen) (vgl. 3.3.1). In der nicht-überwachten Clusteranalyse wurden insgesamt 10729 Gene mit einer Standardabweichung von $\geq 1,1$, also Gene mit größter Expressionsvarianz zwischen den Proben, herausgefiltert und analysiert. Das resultierende Dendrogramm ist in Abbildung 3-3 dargestellt.

Die Clusteranalyse zeigt, dass die hoch-aufgereinigten Proben (FEBx), wie erwartet, eine eigene Gruppe bilden und die größte Verwandtschaft zu den semi-aufgereinigten Kontrollen (FEBxNP) zeigen. Sie haben aber eine größere

Verwandtschaft zu den Leukämien als die Leukämien untereinander. Die hochgereinigten stellen damit geeignete Kontrollen dar.

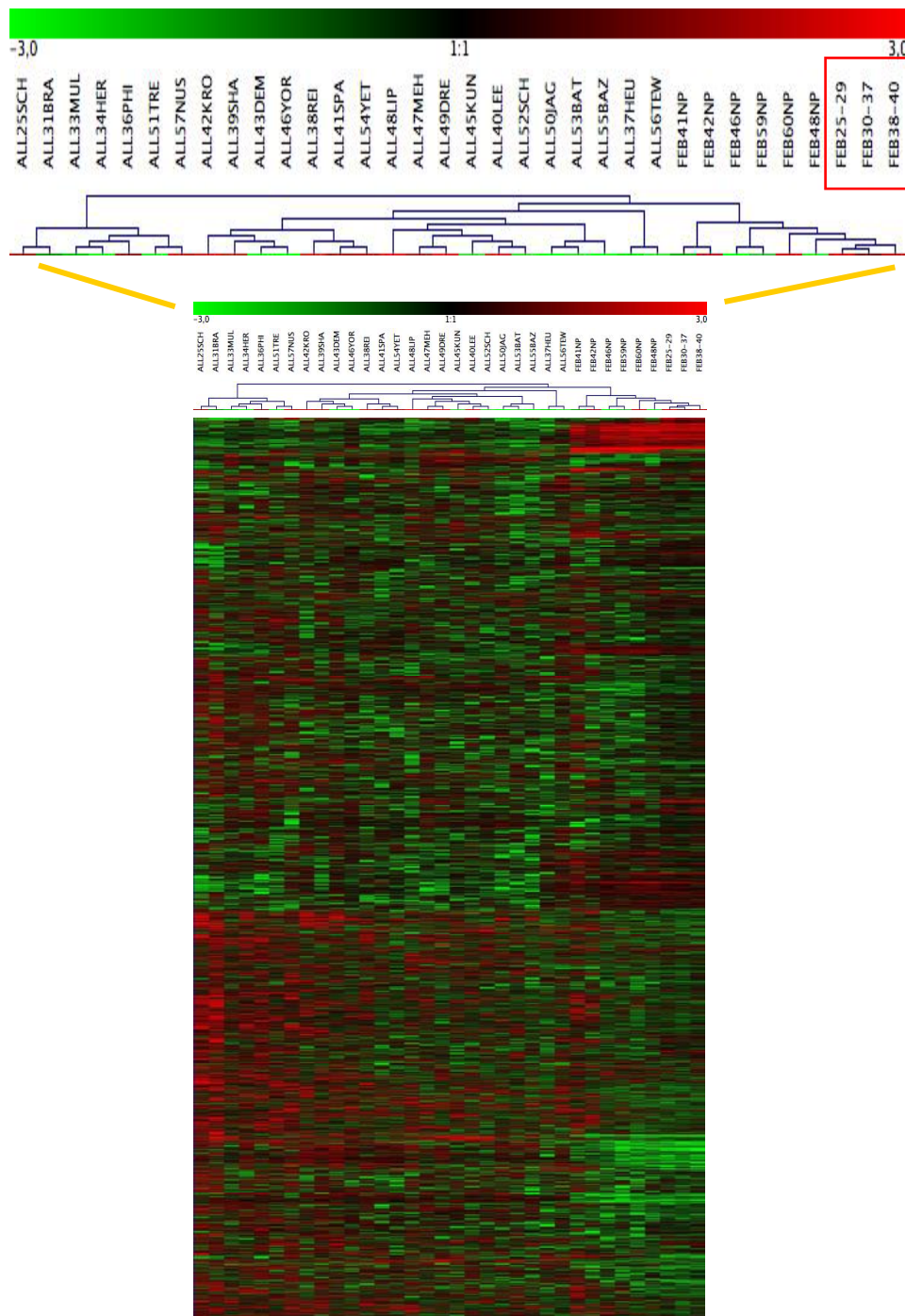


Abbildung 3-3 Unsupervised Cluster Analyse

Jede Spalte repräsentiert eine Probe (siehe Text), jede Zeile ein Gen (Gesamtanzahl 10729, gefiltert für eine Standardabweichung $\geq 1,1$). Die Farben der einzelnen Zellen geben quantitativ und qualitativ das Fluoreszenzverhältnis der entsprechenden Spots auf dem Microarray wieder. Zunehmend positive log ratios sind mit zunehmender Intensität von Rot dargestellt, zunehmend negative log ratios mit zunehmender Intensität von Grün. Log ratios von 0 sind Schwarz dargestellt.

3.3.4 Principal Component Analyse (PCA)

In Abbildung 3-4 ist die nicht-überwachte Principal Component Analyse (PCA, vgl. 2.7.4) derselben 34 Genexpressionsdatensätze wie in 3.3.3 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass sich die Kontrollproben beträchtlich von den Leukämien unterscheiden. Die hoch-aufgereinigten Proben bilden eine kleine zusammenhängende Untergruppe unter den Kontrollproben (roter Kasten in Abbildung 3-4).

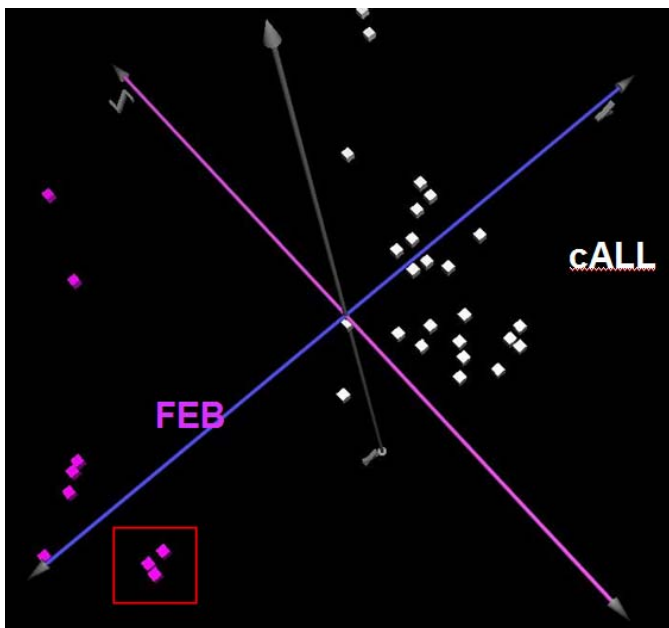


Abbildung 3-4 Unsupervised Principal Component Analysis (PCA)

PCA anhand Genexpressionsdaten von 34 *Microarray* Experimenten: 25 cALL Proben (weiss) und 9 Nabelschnurblut Kontrollproben (rosa). Jeder Punkt entspricht einem *Microarray* Experiment. Es ist ersichtlich, dass sich die Leukämieproben deutlich von den Kontrollproben unterscheiden.

Die Clusteranalyse zeigte eine zu erwartende Ähnlichkeit bzw. Verwandtschaft der Kontroll- und Leukämieproben. Die PCA zeigt nun im Gegensatz dazu, dass sich die Leukämien von den Kontrollen dennoch deutlich unterscheiden. Da die PCA die Proben anhand von wenigen Charakteristika ordnet, gibt das vorliegende Ergebnis einen Hinweis darauf, dass es eine Reihe von Charakteristika bzw. Gene gibt, die beide Gruppen deutlich voneinander unterscheiden.

3.3.5 Significance Analysis of Microarrays (SAM)

Eine Methode zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene ist die *Significance Analysis of Microarrays* (SAM). Diese Analyse soll hier kurz beschrieben werden. Für den genauen mathematischen Hintergrund und Ausführung der SAM sei auf die Publikation von Tusher et. al verwiesen (Tusher et al., 2001).

Durch die Assimilierung eines Sets von genspezifischen t-tests werden statistisch signifikante Veränderungen der Genexpression identifiziert. Basierend auf der Veränderung in Genexpression relativ zur Standardabweichung wiederholter Messungen desselben Gens wird jedem Gen ein Wert zugewiesen ($d(i)$, *observed relative difference*). Gene mit Werten, die größer sind als ein vorgegebener, variierbarer Grenzwert, werden als potentiell signifikant gewertet. Der Grenzwert kann variiert werden, um kleinere oder größere Sets von Genen zu identifizieren, und für jedes Set wird eine entsprechende *false discovery rate* (FDR) berechnet. Die FDR ist der prozentuale Anteil der zufällig identifizierten Gene. Zur genauen Berechnung der FDR werden *Nonsens*-Gene durch berechnete Permutationen wiederholter Messungen erfasst.

Die SAM wurde eingesetzt, um die differentielle Genexpression von cALL Proben im Vergleich zu hoch-aufgereinigten Kontrollproben (FEBx) zu untersuchen. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3-5 dargestellt. Aufgetragen ist der beobachtete Wert (*observed relative difference*, $d(i)$) gegen den erwarteten Wert (*expected relative difference*, $d_E(i)$). Der *expected score* ist dabei der Mittelwert des *observed relative difference* über 36 balancierte Permutationen. Für die meisten Gene gilt $d(i) = d_E(i)$. Gene, die von dieser Geraden abweichen, gelten als signifikant, also differentiell exprimiert. Als *Fold Change* (FC) wird das Verhältnis der Genexpression in Bezug auf das Grundniveau bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fold Change von $FC \geq 2$ festgelegt um ein Gen als differentiell exprimiert zu identifizieren. Die mediane *false discovery rate* (FDR), also der Prozentsatz der falsch weil zufällig als signifikant identifizierten Gene wurde mit $\leq 10,22\%$ zugelassen. Mit diesen Vorgaben wurden 1593 Gene als signifikant identifiziert.

In P/A (*present/absent*) calls (P entspricht 1, M entspricht 0,5, A entspricht 0) wurden mit einer Anforderung $FC \geq 8,5$ für in Leukämien überexprimierte Gene (unter Berücksichtigung der Heterogenität der Leukämien) und $FC \geq 2,5$ für in den Kontrollen überexprimierte Gene, 487 hoch-regulierte und 572 herunterregulierte Gene identifiziert. Mit der weiteren Einschränkung eines $FC \geq 3$ wurden immer noch 367 Gene als signifikant hoch-reguliert und 338 als signifikant runterreguliert erfasst.

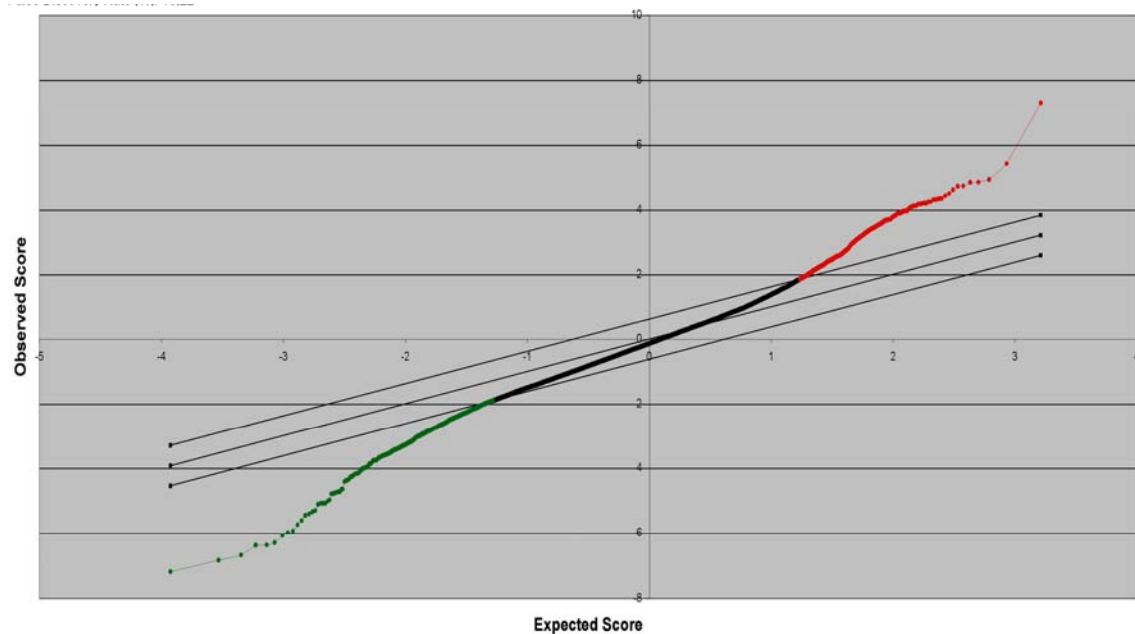


Abbildung 3-5 Significance Analysis of Microarrays (SAM)

SAM mit 25 cALL Proben und 3 hoch-aufgereinigten Kontrollproben. Mit einem $FC \geq 2$ und einer $FDR \leq 10,22\%$ wurden 1593 Gene als signifikant identifiziert. Grün: herunter-regulierte Gene, Rot: hoch-regulierte Gene

3.3.6 Supervised Analysis

In der SAM Analyse wurden 1593 differentiell exprimierte Gene identifiziert, also die Gene, deren Expression sich in den leukämischen Zellen deutlich von gesunden FEB Zellen unterscheidet. Anhand dieser Gene wurde folglich eine überwachte Cluster und PCA Analyse durchgeführt, dargestellt in Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7. Es ist eine klare Trennung der cALL-Proben von den fetalen Kontrollproben sowohl in der überwachten Cluster Analyse als auch in der

überwachten PCA erkennbar. Die PCA zeigt dies besonders deutlich: die ALL-Proben (weiss) gruppieren eng zusammen und sind klar von den gesunden Kontrollproben abgrenzbar. Die Kontrollproben (rosa) bestehen aus semi- und hoch-aufgereinigten Proben, die sich untereinander klar unterscheiden. Insgesamt lassen sich aber die Kontrollproben, sowohl hoch- als auch semi-aufgereinigt, eindeutig von den leukämischen Blasten trennen.

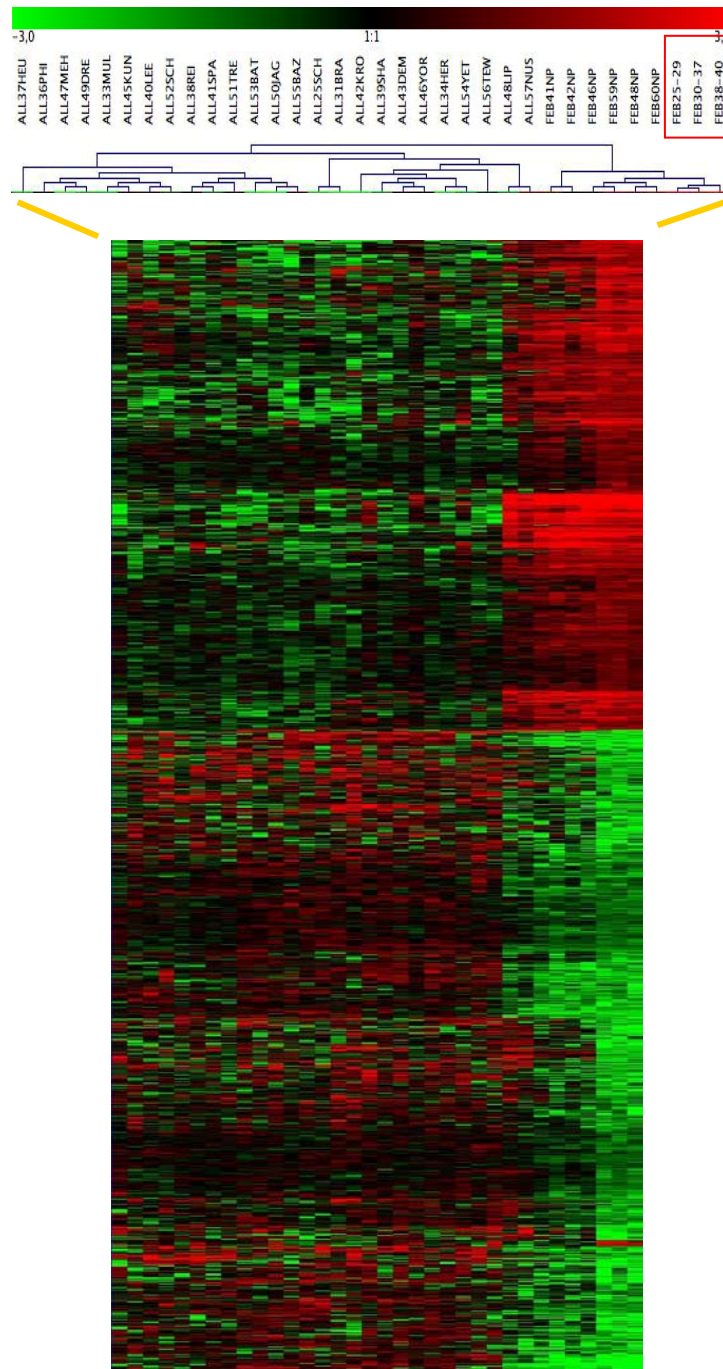


Abbildung 3-6 Supervised Cluster Analyse

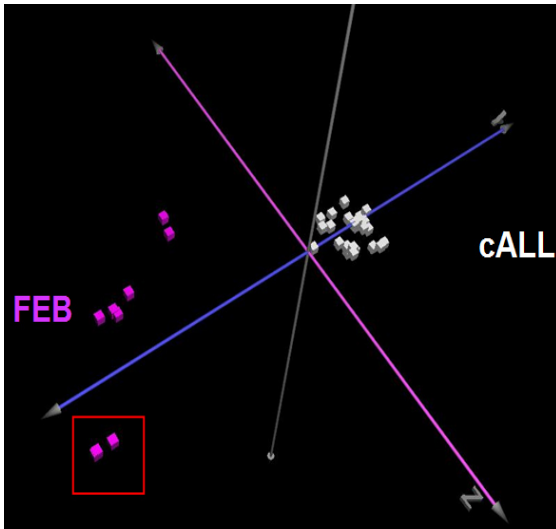


Abbildung 3-7 Supervised PCA

Die PCA erlaubt eine klare Unterscheidung zwischen leukämischen und gesunden Proben. Weiss = cALL, rosa = fetale B-Lymphblasten (Kontrollproben), roter Kasten = hochaufgereinigte Kontrollproben.

3.3.7 Prediction Analysis of Microarrays (PAM)

Weiterhin wurde die Möglichkeit untersucht, eine Probe anhand ihres Genexpressionsmusters einer bestimmten Klasse oder diagnostischer Kategorie, gesund oder maligne, zuzuordnen oder diese vorherzusagen. Die Herausforderung in der Klassifizierung ist zum einen die große Anzahl an *Inputs* (Gene) aus denen Klassen potentiell vorausgesagt werden können bei einer relativ kleinen Anzahl an Proben. Desweiteren ist es entscheidend herauszufinden, welche Gene am meisten zur Klassifikation beitragen sollen. Für diesen Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode des *nearest shrunken centroids* von Tibshirani et al (Tibshirani et al., 2002) eingesetzt, auch *Prediction Analysis of Microarrays* (PAM) genannt.

Hierbei werden minimalste Untermengen (Prototypen) von der Gesamtmenge an Genen identifiziert, die eine Klasse am besten charakterisieren. Die Prototypen werden dann in einem mathematischen Prozess auf einen Zentroid „geschrumpft“, um somit einen sehr genauen Klassifikator zu erhalten. Zunächst werden Zentroide als Prototypen für jede Klasse berechnet. Die Standardabweichung eines jeden Gens innerhalb einer Klasse wird

standardisiert mit dem Effekt, dass diejenigen Gene mehr gewichtet werden, deren Expression innerhalb der Proben derselben Klasse stabil ist. Die Klassenzentroide werden dann in Richtung des allgemeinen Zentroids unter Einführung eines Schrumpfparameters (*shrinkage parameter*) geschrumpft. Diese Methode hat die erwünschwerte Eigenschaft, dass durch die Erhöhung des Schrumpfparameters viele der Komponenten (Gene) von der *class prediction* eliminiert werden. Durch eine Vergleichsprüfung (*cross-validation*) wird ermittelt, um wieviel geschrumpft werden darf ohne signifikante Erhöhung der Fehlklassifizierungsrate (*misclassification error*). Diese Vergleichsprüfung ist in Abbildung 3-8 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass ab einem Schwellenwert (*Threshold*) von etwa 5 die Fehlklassifikationsrate für die gesunden Kontrollproben (FEB) rapide ansteigt.

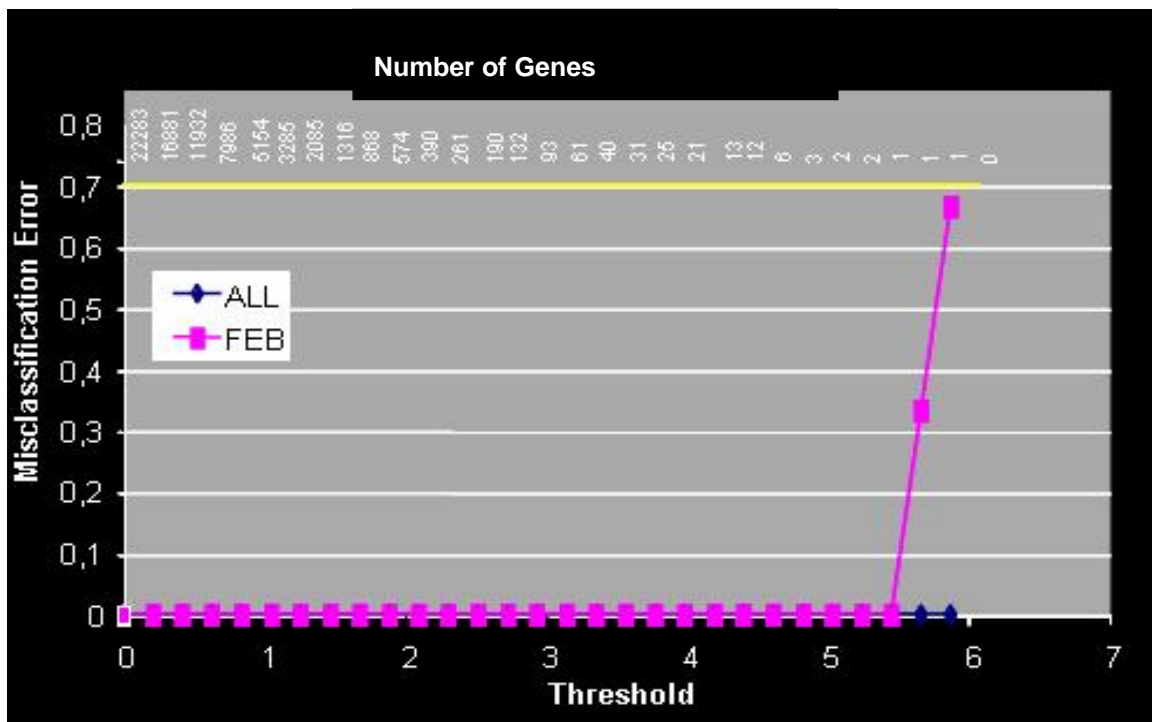


Abbildung 3-8 Cross-validation

Mit zunehmenden Werten des Schrumpfparameters (*Threshold*, x-Achse unten), und entsprechend kleinerer Untermenge an Genen (x-Achse oben), die zur Klassifizierung herangezogen werden, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Fehlklassifizierung. Ab einem Schrumpfparameter-Wert von 5 steigt die Fehlklassifizierungswahrscheinlichkeit für die hier untersuchten Proben erheblich.

Als Trainingsset für die PAM Analyse wurden 15 cALL-Proben und 3 hochaufgereinigte Kontrollproben (FEB) eingesetzt. Bei einem festgelegten *Threshold* von 3,3 erfolgte die Klassifikation bekannter Proben.

Abbildung 3-9 zeigt die genaue Auswahl an Proben und die Wahrscheinlichkeit (*Cross-validated (CV) Probability*), mit der die jeweilige Probe als „gesund“ (FEB= rosa) oder „maligne“ (cALL = blau) klassifiziert wird. Die Probe ALL31BRA wird beispielsweise mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 als maligne und mit einer Wahrscheinlichkeit von 0 als gesund klassifiziert. Die Trainingsproben wurden fehlerfrei zugeordnet.

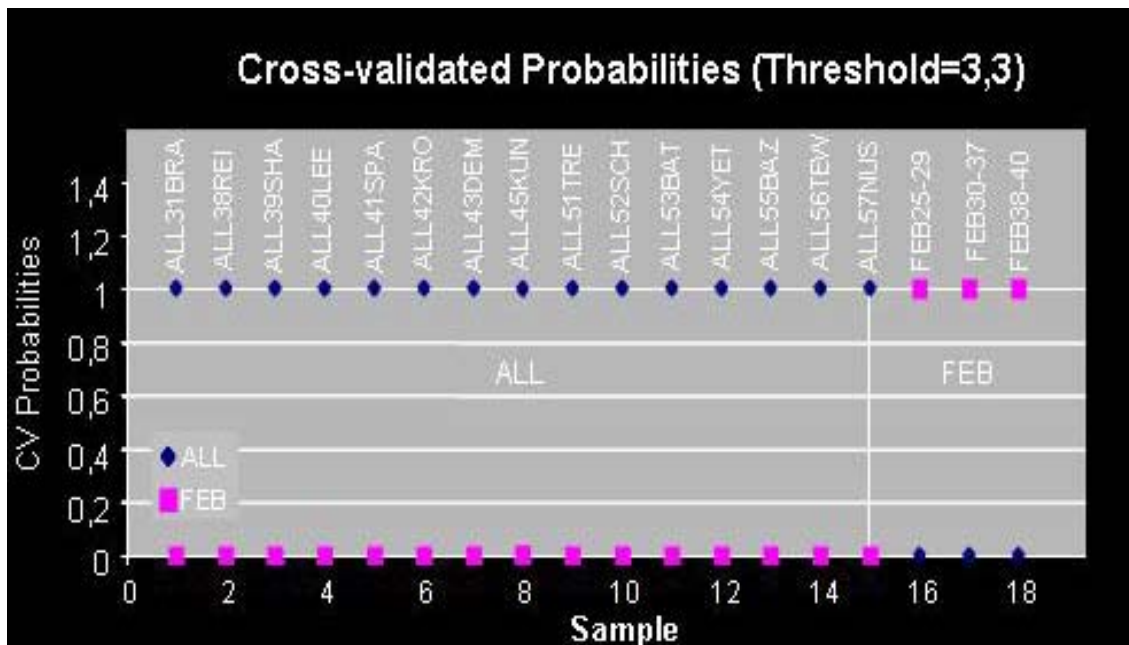


Abbildung 3-9 Klassifikation der 18 Trainingsproben

Mit einem Threshold-Wert von 3,3 wurden die Proben fehlerfrei klassifiziert.

In Abbildung 3-10 sind diejenigen Gene dargestellt, die als Klassenzentroide berechnet wurden. Mathematisch ausgedrückt sind das diejenigen Gene, für die bei zunehmendem Schrumpfparameter eine Differenz verbleibt, d.h. das sich die Zentroide der Proben nicht vollkommen an den allgemeinen Klassenzentroid annähern lassen, also Klassen-spezifisch sind. Es ist sehr deutlich, dass sich die beiden Klassen signifikant voneinander unterscheiden.

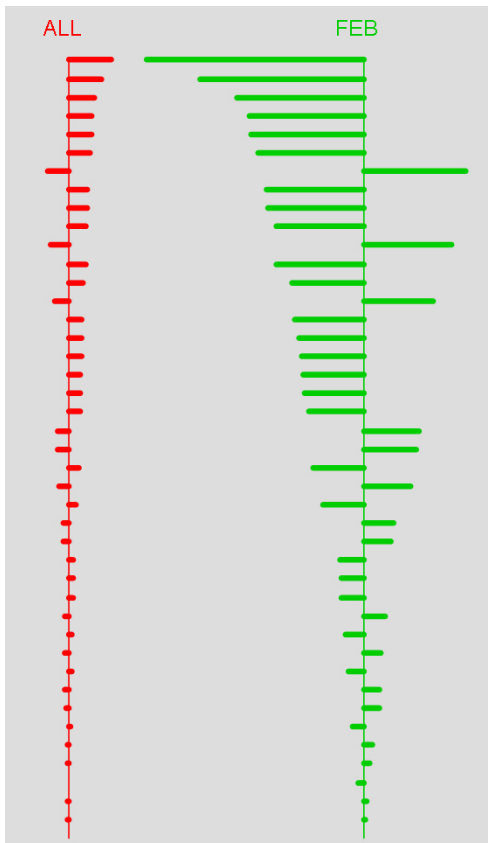


Abbildung 3-10 Darstellung des Klassifikators

Darstellung des Klassifikators: 43 Gene, welche die Klassen ALL und FEB (gesunde Kontrollproben) charakterisieren. Die horizontalen Balken repräsentieren die *shrunk differences* der 43 Gene, die sich bei einem *Threshold* von 3,3 nicht an den allgemeinen Zentroiden angleichen lassen und somit spezifisch für die jeweilige Klasse sind.

Nach der *Cross-Validation* und der Klassifizierung der Trainingsproben wurde der identifizierte Klassifikator angewandt, um weitere 20 Testproben zu klassifizieren. Diese setzten sich zusammen aus 11 cALL Proben, 6 semi-aufgereinigte Kontrollproben, einer Non-Hodgkin-Lymphom Probe, und 3 cALL Zelllinien (NALM6, cALL2 und 697). Mathematisch wird dabei der Abstand im Quadrat von den beiden Klassenzentroiden für das Genexpressionsprofil jeder Testprobe berechnet. Die prognostizierte Klasse ist diejenige, deren Zentroid am nächsten an dem Expressionsprofil der Testprobe liegt.

Die 20 Testproben wurden jeweils mit Threshold-Werten von 3,3 (entspricht 43 Genen), 4,4 (entspricht 12 Genen) und 5 (entspricht 2 Genen) klassifiziert (siehe Abbildung 3-11, a-c).

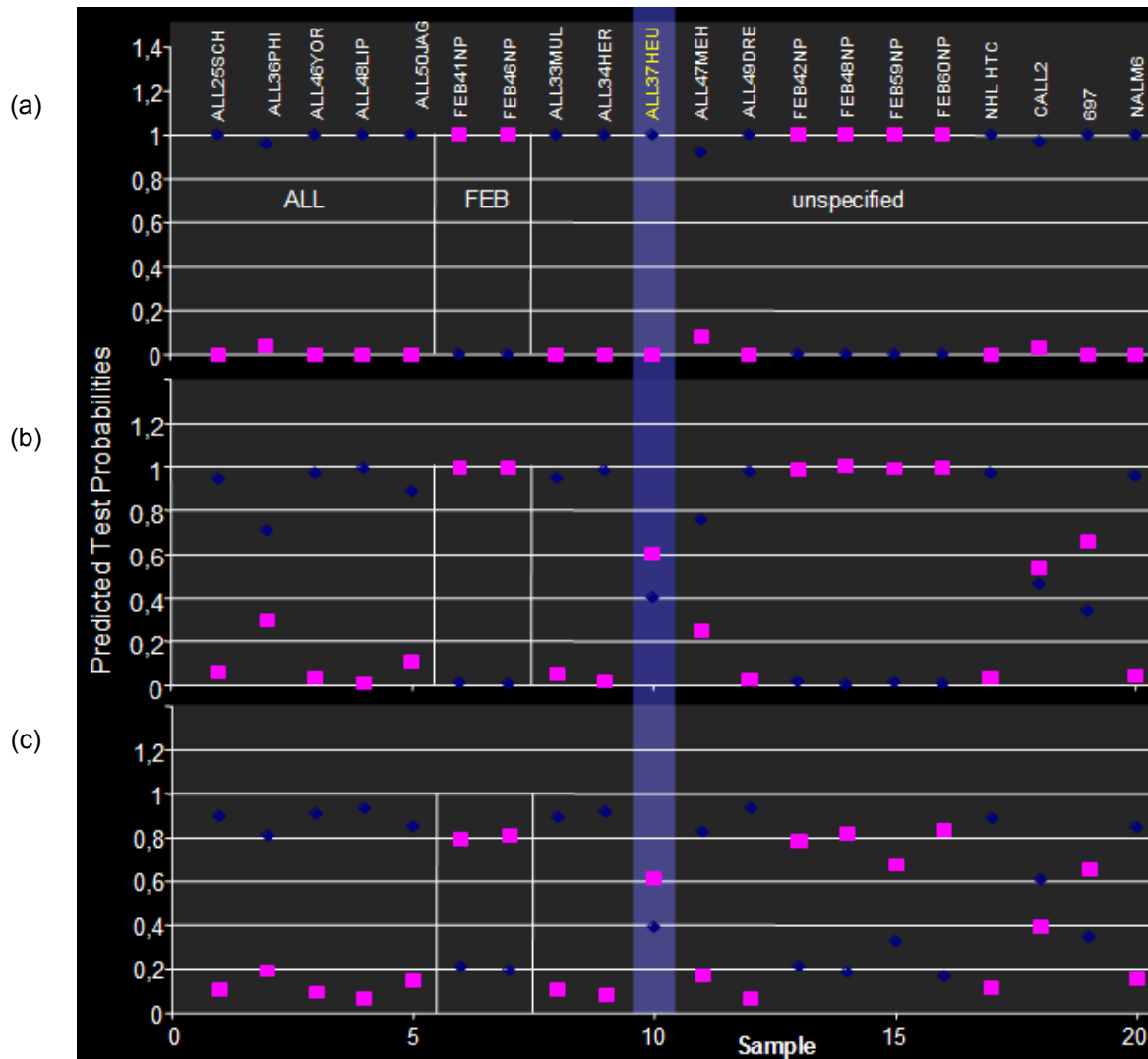


Abbildung 3-11 Prediction Analysis of Microarrays (PAM)

Klassifizierung der 20 Testproben mit unterschiedlichen *Threshold* (T) Werten. **(a)** mit $T=3,3$ (43 Gene) werden die Testproben mit einer Genauigkeit von $\geq 92\%$ richtig klassifiziert. **(b)** mit $T=4,4$ (12 Gene) und **(c)** $T=5$ (2 Gene), werden einige Proben falsch identifiziert. (Bsp. ALL37HEU) blau= ALL, rosa = FEB

Bei einem Threshold von 3,3, oder anhand von 43 Genen, wurden die Proben mit einer sehr hohen Genauigkeit von $\geq 92\%$ klassifiziert (vgl. Abbildung 3-11a). Bei höheren Threshold-Werten werden zu wenige Gene zur Klassifikation herangezogen und sie wird fehlerhaft (vgl. Abbildung 3-11b und c). Für Details der identifizierten Gene, die zur Klassifikation herangezogen werden können, siehe Tabelle 9-3 im Anhang.

Diese PAM-Analyse zeigt, dass ein Klassifikator von 43 Genen zu einer akkuraten Klassifikation führt, während 12 Gene nicht ausreichen um korrekt zu

klassifizieren. Es sind also eine ganze Reihe von Genen notwendig um die Leukämie korrekt einzustufen bzw. von gesunden Kontrollproben (FEB) zu unterscheiden.

4 Diskussion

4.1 Das Genexpressionsprofil Leukämischer Lymphoblasten (cALL) im Vergleich zu gesunden B-Lymphoblasten des gleichen Differenzierungsstadiums

4.1.1 Geeignete Kontrollproben

Ziel der Arbeit war es, gesunde Kontrollzellen zu erhalten, die sich im gleichen Differenzierungsstadium wie die leukämischen Lymphoblasten der cALL befinden. Der Differenzierungsgrad der Leukämien wurde am Antigenexpressionsmuster der Lymphoblasten festgelegt. Dabei erfolgte die Orientierung an den Differenzierungsstufen der normalen Hämatopoese, obwohl asynchrone Expressionsmuster oder linienaberrante Antigene vorkommen können (Greaves et al., 1986). Es sei an dieser Stelle nochmals auf Abbildung 2-1 verwiesen, in der die einzelnen Reifungsphasen der B-Lymphozyten und die entsprechenden stadienspezifischen Oberflächenantigene dargestellt sind. CD19 ist ein B-Zell-spezifisches Oberflächenantigen, welches von allen Entwicklungsstadien der frühen pro-B-Zelle bis hin zur reifen, naiven B-Zelle exprimiert wird (Rickert et al., 1995; Tedder et al., 1994). In der Entwicklung der B-Zellen ist CD10 nicht ganz spezifisch für ein einziges Reifungsstadium, da CD10 auf der frühen pro-B-Zelle, der späten pro-B-Zelle und auf der großen, bzw. frühen prä-B-Zelle exprimiert ist. Die Koexpression von CD19 und CD10 grenzt dennoch die erwünschten Zielzellen best möglichst ein. Da leukämische Lymphoblasten keine spezifischen morphologischen oder zytochemischen Eigenschaften besitzen, ist die Diagnose stark von der Immunphänotypisierung abhängig. Durch die Bestimmung des Expressionsmusters differenzierungsrelevanter Antigene können leukämische Zellen entsprechend der normalen Reifungsreihe der Lymphozyten klassifiziert werden (Pui and Evans, 1998). Die immunphänotypische Diagnose einer cALL wird derzeit anhand des Nachweises von CD19⁺CD10⁺ Zellen gesichert (Bene et al., 1995; Gudowius et

al., 2006). Die Möglichkeit, B-Vorläuferzellen immunphänotypisch genauer einzugrenzen, wird weiterhin erforscht (Vaskova et al., 2008).

Eine unterschiedlich hohe Expression des Oberflächenantigens CD10 auf gesunden und leukämischen Zellen ist eine bekannte Gegebenheit. So wurde gezeigt, dass sich auf der Oberfläche leukämischer Blasten mehr CD10 Moleküle befinden als auf der Oberfläche gesunder Zellen (Rego et al., 2001). Auf B-Zell Leukämien konnten bis zu $1,8 \times 10^5$ CD10 Moleküle / Zelle nachgewiesen werden. In gesunden lymphatischen Vorläuferzellen des fetalen Knochenmarks lediglich bis zu 5×10^4 CD10 Moleküle / Zelle (Lavabre-Bertrand et al., 1994).

Die Zugehörigkeit der untersuchten Proben zu bestimmten Zellreihen des hämatopoetischen Systems kann nicht nur durch die Durchflusszytometrie gezeigt werden, wie es bei der Diagnose der leukämischen Zellen routinemäßig geschieht und wie es auch in dieser Arbeit zur Selektion und Kontrolle der B-Lymphoblasten eingesetzt wurde. Auch auf mRNA-Ebene lässt sich dieser Nachweis führen, indem die entsprechenden Transkripte mit Hilfe der Genchips detektiert werden. Auch in der vorliegenden Expressionsanalyse lässt sich bestätigen, dass CD10 eines der exprimierten Gene mit hoher Signifikanz ist und auch CD19 in allen Proben exprimiert ist.

Zu der Frage, ob die verschiedenen Subtypen der ALL direkt aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle hervorgehen, oder aus einer bereits (teil-) differenzierten B-Zelle, bestehen bereits einige Arbeiten. Beispielsweise wurde belegt, dass Leukämien der kurzlebigen myeloischen Zellreihen (CML und MDS) aus einer multipotenten (lympho-myeloiden) hämatopoetische Stammzelle hervorgehen (Bonnet and Dick, 1997; Nilsson et al., 2000). Die lymphozytären Zellen sind dagegen langlebiger (Tough and Sprent, 1995), und es ist somit plausibel, dass Akute Lymphatische Leukämien möglicherweise sowohl aus differenzierten Progenitorzellen als auch hämatopoetischen Stammzellen entstehen können. Es wurde die Entstehung einer ALL aus multipotenten Stammzellen belegt (Cox et al., 2004; Kong et al., 2008). Castor et al. zeigten zusätzlich, dass klinisch und genetisch unterschiedliche Subtypen der ALL aus ganz bestimmten Stufen der B-Zellreifung hervorgehen bzw. eine maligne Transformation durchlaufen (Castor

et al., 2005). Gene, bzw. die veränderte Expression bestimmter Gene, die für diese maligne Transformation verantwortlich sind, sind sehr wahrscheinlich eine Auswahl der in dieser Arbeit als differentiell exprimiert identifizierten Gene in gesunden vs. malignen Lymphoblasten. Die gezielte Erforschung dieser Gene verspricht weitere Einsichten in die Pathogenese der ALL.

Die Tatsache, dass die gesunden und leukämischen Lymphoblasten einen vergleichbaren Phänotyp haben, also beide dieselben Oberflächenantigene CD19 und CD10 exprimieren, lässt vermuten, dass diese Zellen auch ontogenetisch denselben Ursprung haben. Die unüberwachte Cluster Analyse (vgl. 3.3.3) bestätigt dies. Sie zeigt, dass die gesunden CD19⁺CD10⁺ Lymphoblasten eine große Ähnlichkeit bzw. Verwandtschaft mit den leukämischen Blasten haben, sogar eine größere Verwandtschaft zu einzelnen Leukämien als die Leukämieproben untereinander. Der ähnlichen Immunphänotypisierungscharakter und die durchgeführten Clusteranalyse bestätigen also, dass sie aus Nabelschnurblut isolierten CD19⁺CD10⁺ FEB tatsächlich geeignete Kontrollzellen sind. Zugleich zeigt aber die *Principal Component Analyse* (vgl. 3.3.4), welche die Proben anhand weniger Hauptkomponenten einteilt, dass sich die gesunden von den malignen Lymphoblasten eindeutig unterscheiden lassen. Um genau diejenigen Gene zu identifizieren, die sich signifikant zwischen den gesunden und leukämischen Lymphoblasten unterscheiden, also differenziell exprimiert sind, wurde eine SAM Analyse (vgl. 3.3.5) durchgeführt. Mit entsprechenden Vorgaben eines angemessenen FDR und FC wurden dabei 367 Gene als hoch signifikant hoch-reguliert und 338 als signifikant herunterreguliert erfasst.

4.1.2 Quellen CD19⁺CD10⁺ fetaler B-Zellen

Nabelschnurblut hat sich als eine geeignete Quelle erwiesen, da es mehr unreife B-Zellen enthält als peripheres Blut von Kindern oder Erwachsenen (D'Arena et al., 1996; Hoffkes et al., 1996), von einer sehr homogenen Altersgruppe stammt und bei leichter Verfügbarkeit die meisten unreifen B-Zellen enthält (Rubinstein et al., 1995; Wu et al., 1999). Der absolute und prozentuale Anteil unreifer Zellen, der im Nabelschnurblut eines Neugeborenen

vorhanden sind, sinkt mit zunehmendem Alter des Kindes: Bei der Geburt und im Säuglingsalter zirkulieren phänotypisch unreife Zellen in geringen Mengen im peripheren Blut. Mit etwa 2 bis 4 Jahren erreichen die Werte dann die (sehr niedrigen) Werte von Jugendlichen (Calado et al., 1999). Im peripheren Blut gesunder Erwachsener sind die Anteile an Lymphoblasten vernachlässigbar gering mit durchschnittlich 0,54%. CD19⁺CD10⁺ B-Lymphoblasten sind ausserdem in hoher Konzentration im Knochenmark enthalten (Rego et al., 1999). Knochenmark gesunder Kinder stand nicht zur Verfügung.

Die Angaben in der Literatur über die genaue Zusammensetzung von Nabelschnurblut sind sehr unterschiedlich und schwer vergleichbar. Der Anteil der CD19⁺ Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl im Nabelschnurblut wird zwischen 12% und 14% angegeben, der Anteil der CD19⁺CD10⁺ Zellen zwischen 0,5 und 1,5% (Comans-Bitter et al., 1997; O'Gorman et al., 1998; Theilgaard-Monch et al., 2001). In dieser Arbeit wurden in 53 Nabelschnurblutproben Anteile CD19-exprimierender Lymphozyten von durchschnittlich 5,62% gemessen, Anteile CD10⁺CD19⁺ doppelt positiver Zellen von durchschnittlich 2,62%.

4.1.3 Aufreinigungsmethoden im Vergleich

Die vorliegende Arbeit stellt eine Erweiterung der Methode zur Aufreinigung CD19⁺CD10⁺ Zellen aus Nabelschnurblut dar. Die Aufreinigungsmethode, die zuvor zur Anreicherung der CD19⁺CD10⁺ Lymphoblasten für Genexpressionsanalysen angewandt wurde, lieferte unbefriedigende Reinheiten (Hattenhorst, 2003). Weder die durchflusszytometrische Sortierung der mit CD19 und CD10 fluoreszenzmarkierten Antikörpern markierten Zielzellen, noch die Isolierung durch zwei aufeinanderfolgende Schritte mit paramagnetisch markierten Antikörpern gegen CD19 und CD10 waren erfolgreich. In jener Arbeit wurde letztendlich zur Kontrollprobengewinnung das B-Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) eingesetzt. Es enthält magnetisch markierte Antikörper gegen sämtliche Oberflächenantigene nicht-CD19-exprimierender Blutzellen: Antigene gegen CD2 und CD4 (T-Lymphozyten und NK-Zellen), CD11b (Granulozyten und

Monozyten), CD16 und CD36 (Monozyten und Thrombozyten) und IgE-Antikörper (Mastzellen und Basophile Granulozyten). Diese markierten nicht-B-Zellen werden bei der Passage durch eine magnetische Säule zurückgehalten und nur die unmarkierten, CD19⁺ Zellen, können passieren. Unter Verwendung des B-Cell Isolation Kit konnte eine Anreicherung CD19 exprimierender B-Lymphozyten von $10,8 \pm 5,7\%$ auf $79,3 \pm 10,1\%$ erreicht werden, die Anreicherung an CD19⁺CD10⁺ B-Lymphoblasten von $4,0 \pm 2,2\%$ auf $25,2 \pm 6,8\%$ war aber unbefriedigend. Es zeigte sich eine erhebliche Kontamination mit CD19⁻CD10⁺ Zellen. Nabelschnurblut enthält, anders als peripheres Blut Erwachsener, myeloische Vorläuferzellen (Promyelozyten und Myelozyten). Diese machen in Nabelschnurblut einen größeren Anteil aus als in vergleichbaren Quellen wie beispielsweise peripheres Blut, fetales oder adultes Knochenmark (Wu et al., 1999) und exprimieren ebenfalls das Oberflächenantigen CD10 (Elghetany et al., 2004; Wang et al., 2001). Das B-Cell Isolation Kit ist aber auf die Selektion von B-Zellen aus peripherem Blut Erwachsener ausgerichtet, welches eben keine CD10⁺ Zellen der myeloischen Zellreihe enthält und somit auch keinen Antikörper enthält, der CD19⁻CD10⁺ Zellen magnetisch markiert und damit depletiert. Dementsprechend war die bisherige Genexpressionsanalyse nur bedingt aussagekräftig, denn es wurden durch die Kontamination mit CD19⁻CD10⁺ Zellen auch Gene in die Expressionsanalyse miteinbezogen, die Granulozyten-spezifisch sind.

Die entscheidende Erweiterung der Methode in der vorliegenden Arbeit waren die zwei aufeinander folgenden Selektionen, erst der CD19⁺ Lymphozyten und darauf folgend die Selektion der CD19⁺CD10⁺ Zellen. Es wurden also zuerst alle B-Zellen selektiert und aus dieser Auswahl in einem weiteren Schritt die Vorläuferzellen, welche durch die Oberflächenantigene CD19 und CD10 charakterisiert sind und dadurch „identifiziert“ werden können. Obwohl diese Methode ermöglicht, hoch-aufgereinigte CD19⁺CD10⁺ Kontrollproben von bis zu 94,39% zu erhalten, ist die Ausbeute von durchschnittlich 10% unveränderbar gering. Um diesem Problem der geringen Ausbeute entgegenzukommen, bei gleichzeitiger Erhaltung der hohen Reinheit, wurden parallel bearbeitete Proben gepoolt. Solange sich noch T-Lymphozyten in den Proben befanden, mussten die Proben parallel verarbeitet werden. Die T-Lymphozyten erkennen „fremde“

Zellen und greifen sich gegenseitig an. Dies würde durch die resultierende Zellverklumpung die Aufreinigung erheblich erschweren bis unmöglich machen. Nach Entfernung der Dynabeads® konnten die Proben gemischt werden, da ab diesem Arbeitsschritt nur noch CD19⁺ Zellen vorhanden waren. Sämtliche T-Zellen waren ab diesem Zeitpunkt eliminiert.

Ein Nachteil der angewandten Methode ist, dass die Zielzellen direkt mit Antikörpern markiert wurden und nicht genau absehbar war, inwiefern die Antikörperbindung das Genexpressionsprofil verändert. Es bestehen derzeit keine Publikationen speziell zu diesem Thema. Moir et al. zeigte allerdings, dass sich die Leukapharese auf das Genexpressionsprofil von Lymphozyten auswirkt (Moir et al., 2003). Allgemein wird davon ausgegangen, dass jegliche Art von Manipulation der Zellen das Genexpressionsmuster derselben, wenn auch nur gering, beeinflusst. Allerdings konnte in der vorliegenden Genexpressionsanalyse kein Hinweis auf eine Aktivierung der Zellen oder einzelner Gene durch die positiv-Selektion beobachtet werden.

4.1.4 Die Expressionssignatur des malignen Phänotyps

Mittels der SAM Analyse (vgl. 3.3.5) wurden mit einem q-Wert cut-off von < 0,87 in der vorliegenden Vergleichsanalyse von gesunden B-Lymphoblasten mit leukämischen Lymphoblasten 465 neue Gene identifiziert, die bisher noch nicht mit der cALL assoziiert waren. Insgesamt wurde ein spezifisches Expressionsmuster ermittelt, das die pädiatrische cALL repräsentiert. Diese Gene ermöglichen eine Zuordnung von Proben zur malignen oder gesunden Gruppe und können somit als Markergene betrachtet werden. Teilt man die neu identifizierten anhand funktioneller und regulatorischer Gruppen ein, sind davon 14 Gene im Vorgang der Apoptose involviert, 21 in Entzündungs- und Immunreaktion, 46 in der Proliferation und Zellzyklus-Regulation, 40 im Stoffwechsel, 137 in der Signalisierung, 68 in der Transkription, 50 in Transportprozessen und 89 weitere mit unbekannter Funktion. Es sind Gene mit potentieller „*master switch*“ Funktion involviert, d.h. mit zentraler, signifikanter Bedeutung für das pathogenetisch veränderte Expressionsmusters dieser Leukämien im Vergleich zu normalen Zellen des gleichen

Differenzierungsstadiums. Diese Analyse legt somit die Grundlage für die Untersuchung der malignen Entartung leukämischer Blasten der cALL. Die signifikantesten 100 Gene sind im Anhang in Tabelle 9-1 (hoch-reguliert) und Tabelle 9-2 (herunter-reguliert) zusammengefasst.

Wenn es nun eine gewisse, begrenzte Anzahl von Genen gibt, deren Expression sich in gesunden von malignen Zellen unterscheiden, eine Tatsache, die sich aus der SAM Analyse ergab (vgl. 3.3.5) und in der überwachten Clusteranalyse und PCA (vgl. 3.3.6) bestätigt werden konnte, ergibt sich die Frage, ob es möglich ist, anhand jener Gene auch den richtigen Phänotyp unbekannter Proben zu identifizieren. Hierzu wurde die oben beschriebene PAM (vgl. 3.3.7) eingesetzt. Systematisch wurde eine verschieden grosse Anzahl von Genen zur Klassifizierung unbekannter Proben herangezogen. Ein Klassifikator von 43 Genen erwies sich als passend, um die Proben mit einer Sicherheit von > 92% korrekt zuzuordnen. Dadurch ergibt sich eine neue Perspektive der Zuordnung unbekannter Proben, die in speziellen klinischen Fällen genutzt werden könnte.

4.1.5 cALL assoziierte Gene

Der besondere Wert der hier dargestellten Analyse soll anhand einer Auswahl von Genen demonstriert werden. Die Gene wurden mit Expressionsdaten aus Normalgewebe verglichen ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gds;GSE1133, GSE2361](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gds;GSE1133,GSE2361)), die auf der gleichen Arrayplattform erhoben und auf eine mittlere Targentintensität von 500 normalisiert wurden. Als Normalgewebe wird hier eine Auswahl von gesundem Gewebe bezeichnet und beinhaltet niedrig- und hoch-aufgereinigten fetale CD19⁺CD10⁺ Kontrollproben (FEB), B-Zelllinien, Knochenmark (BM) und Gewebe verschiedener Organe. Im Falle des Knochenmarks wurden verschiedene Zellpopulationen einzeln zum Vergleich herangezogen: CD34⁺ Stammzellen, CD19⁺ B-Zellen, und CD33⁺ myeloische Zellen (vgl. Abbildung 4-1 - Abbildung 4-5). Die in der Mikroarrayanalyse beobachtete differentielle Expression der als signifikant dargestellten Gene wurde mit quantitativen RT-PCR Methoden an unabhängigen Proben (Richter et al., unveröffentlicht) verifiziert, ist aber nicht mehr Teil dieser Doktorarbeit.

Eine Auswahl von fünf differentiell exprimierten Genen, die im möglichen Zusammenhang mit der Pathogenese der cALL stehen, sollen kurz diskutiert werden: STK32B, SOX4, HMGB2, LILRA2 und PXDN. Diese Gene sind allesamt in cALL Proben hoch-reguliert im Vergleich zu gesunden Lymphoblasten. Die genannten Gene sind aber nicht zwangsläufig auch relevante Gene in der Differenzierung gesunder von leukämischen Lymphoblasten. Ein *Classifier*, wie er in der PAM Analyse eingesetzt wird kann, muss aber nicht zwingend, dieselben Gene wie die SAM enthalten. Nicht nur die Auswahl sondern auch das *Ranking* der Gene kann in beiden Analysen unterschiedlich sein. Nur drei dieser fünf Gene, namentlich STK32B, HMGB2 und PXDN sind zusätzlich Teil des Sets von 43 Genen, welches als Klassifikator in der PAM Analyse eingesetzt werden kann. Es konnte allerdings noch nicht verifiziert werden, ob es sich bei der differentiellen Expression eines Gens um ein ursächlich pathogenes Phänomen oder um ein konsequentes Ereignis der cALL handelt.

4.1.5.1 STK32B

Das Gen STK32B ist auf Chromosom 4p16.2 lokalisiert und kodiert für das Protein Serin/Threonin Kinase 32B. Eukaryotische Protein Kinasen formen eine der größten Proteinfamilien des menschlichen Genoms (Kostich et al., 2002). Mit ihrer Funktion der Proteinphosphorylierung als wichtiger post-translationaler Kontrollmechanismus in der Signaltransduktion einer Zelle sind sie wichtige Vermittler in sämtlichen zellulären Signalwegen sowohl in der normalen Zellentwicklung als auch in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Die Serin/Threonin Kinasen bilden eine Untergruppe der Proteinkinasen, die speziell Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin und Threonin phosphorylieren. Die Phosphorylierung kann durch Ladungs- oder Konformationsänderungen das Zielprotein aktivieren, inhibieren oder seine subzelluläre Lokalisierung bestimmen. Durch diese Fähigkeit, grundlegend in die Synthese und Aktivierung von Proteinen einzugreifen, kann eine veränderte Genexpression des kodierenden Gens weitreichende Folgen haben.

Weder eine potentiell aktivierende Mutation noch der genaue Mechanismus der veränderten Regulation des STK32B Gens im Hinblick auf die Pathogenese der cALL ist bekannt. Dysfunktion von Proteinkinasen ist aber eine bekannte Ursache zahlreicher anderer, insbesondere onkologischer Erkrankungen. Blume-Jensen et. al. beschrieb, dass onkogene Veränderungen von Proteinkinasen (z.B. durch Mutationen) eine Störung der normalen autoinhibitorischen Funktion der Kinaseaktivität bewirken und die resultierende Dysregulation eine fehlerhafte Kinaseaktivität und maligne Transformation bewirkt (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Kang et. al. beschrieb eine Korrelation von drei bestimmten Mutationen mit einer erhöhten katalytischen Aktivität in in-vitro Kinase Assays. Transformierte Zellen zeigten eine konstitutive Phosphorylierung der Kinasen Akt, p70S6 Kinase und 4E-*binding protein* 1, die durch Rapamycin (TOR) Kinase reguliert wird und die Rate der Proteinsynthese bestimmt (Kang et al., 2005). Diese pathogenetischen Mechanismen könnten gleichermassen in Lymphoblasten eine maligne Transformation bewirken.

Die relative Genexpression von STK32B in leukämischen Blasten im Vergleich zu Normalgewebe ist in Abbildung 4-1 dargestellt und zeigt eine deutliche relative Überexpression in leukämischen Blasten bei sehr geringer bis fehlender Expression in Normalgewebe.

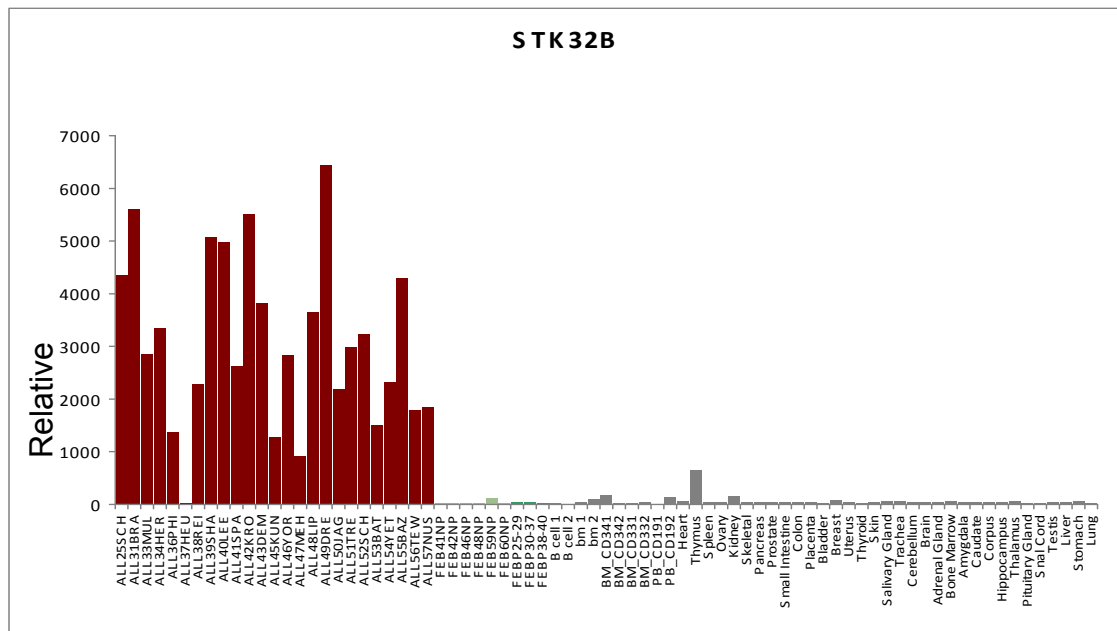


Abbildung 4-1 Relative Expression von STK32B

cALL Proben (rot), FEB Kontrollproben (grün), gesundes Gewebe (grau). Siehe Text für Detail.

4.1.5.2 SOX4

Das Gen SOX4 (*SRY (sex determining region Y) - box4*) auf Lokus 6p22.3 kodiert für ein Mitglied der SOX (*SRY-related HMG-box*) Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine Untergruppe der *HMG-box superfamily bilden*. Sie sind an der Regulation embryologischer Entwicklung und an der Bestimmung des Zellschicksals beteiligt. SOX Proteine üben ihre Funktion in einem vom Zelltyp abhängigen, komplexen Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren aus. Sie zeigen eine bemerkenswerte Interaktion und funktionelle Redundanz untereinander. Das SOX4 Gen besteht aus einem einzigen Exon und war der erstbeschriebene Transkriptionsfaktor unter der SOX Genfamilie mit DNA-Bindungs- und Transaktivierungsdomänen (Schilham et al., 1993). Es kann als Transkriptionsregulator agieren indem es einen Proteinkomplex mit anderen Proteinen eingeht. Das Protein kann ebenfalls über die Induktion von Apoptose zum Zelltod führen (Aaboe et al., 2006; Hur et al., 2004).

In gesundem Gewebe wurde SOX4 in embryonalem Herzgewebe, ZNS, Lunge, Zahnknospen, Mesonephros, Gonaden und Thymus nachgewiesen (Wegner, 1999). Desweiteren wurde SOX4 als wichtiger Transkriptionsfaktor in Lymphozyten der B- und T-Zellreihe beschrieben (Busslinger, 2004; van de Wetering et al., 1993). Die vermehrte Expression von SOX4 wurde bereits in Zusammenhang mit der Pathogenese einiger Tumoren gebracht: Medulloblastom (Lee et al., 2002), Zystisches Adenom (Pramoonyago et al., 2006), Blasenkarzinom (Aaboe et al., 2006), Hepatozelluläres Karzinom (Ahn et al., 2002) und Prostatakarzinom (Liu et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass SOX4 vor allem in leukämischen Lymphoblasten hoch exprimiert ist. Im Vergleich dazu ist SOX4 in gesunden fetalen B-Zellen weniger hoch exprimiert. In anderen Geweben wie Thymus, Uterus und Knochenmark zeigte sich ebenfalls eine geringe relative Expression von SOX4 (vgl. Abbildung 4-2).

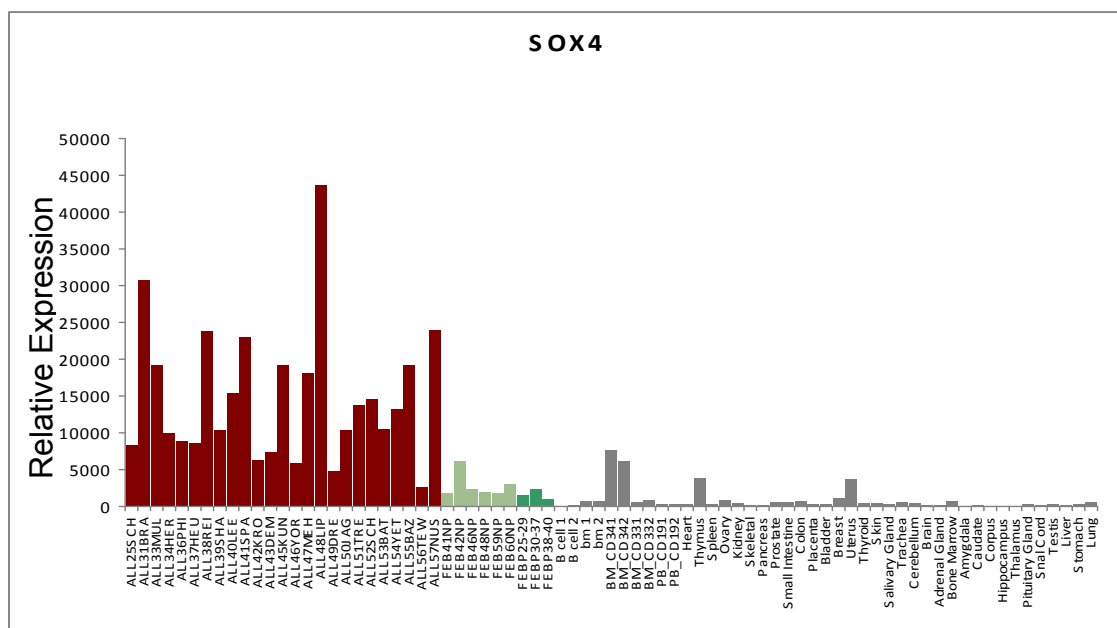


Abbildung 4-2 Relative Expression von SOX4

cALL Proben (rot), FEB Kontrollproben (grün), gesundes Gewebe (grau). Siehe Text für Detail.

Von besonderem Interesse ist hier der Zusammenhang der Expression von SOX4 und der Zellentwicklung, insbesondere der B-Zellreifung. Die Tatsache, dass SOX4 in der Zellreifung eine wichtige Rolle spielt wurde mehrfach belegt.

Hoser et al. zeigten beispielsweise, dass die Expression von SOX4 der Differenzierung von Gliazellen der Rinde transgener Mäuse entgegenwirkt und dass dasselbe Gen herunterreguliert sein muss bevor die volle Reifung erfolgen kann (Hoser et al., 2007). Im Zusammenhang mit myeloischen Leukämien konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Expression von SOX4 die Zytokin induzierte granulozytäre Zellreifung und -differenzierung blockiert und im Zusammenspiel mit anderen Genen, u.a. Evi1 einen myeloproliferativen Effekt hat (Boyd et al., 2006). Es wurde desweiteren mittels SOX4-defizienter Mäuse nachgewiesen, dass im Falle des Fehlens von SOX4 einerseits ein spezifischer, aber nicht absoluter Block der B-Zellentwicklung auf Ebene der pro-B-Zelle stattfindet. Pro-B Zellen in Sox4^{-/-} Mäusen waren in ihrer Anzahl leicht erniedrigt, aber stark eingeschränkt in ihrer Fähigkeit zu proliferieren als Antwort auf IL-7 (Schilham et al., 1996). Andererseits wurde eine stimulierende Wirkung von IL-5 auf das Transaktivierungspotential von SOX4 beschrieben. Dabei rekrutiert das Adaptorprotein Syntenin das Sox4 Protein direkt an die α -Kette des IL-5 Rezeptors (Geijsen et al., 2001). Das genaue Signalsystem verantwortlich für die Syntenin-vermittelte Aktivierung von SOX4 ist bisher noch nicht geklärt.

Es gibt also mehrfach Hinweise, dass SOX4 sowohl eine proliferative als auch eine differenzierungsarretierende Wirkung auf Zellen, insbesondere auch auf Leukozyten hat, zwei entscheidende Komponenten in der Pathogenese der Leukämie.

4.1.5.3 HMBG2

Das Gen HMGB2 (HMG2, *high-mobility group box 2*), lokalisiert auf Locus 4q31, kodiert ein Chromatin-assoziiertes Protein. Es ist Mitglied der Familie von „*high mobility group proteins*“, die ebenfalls zu einem gewissen Masse ubiquitär im Nukleus höherer eukaryotischen Zellen zu finden sind. Paull et al. zeigten, dass HMG2 (und HMG1) DNA sehr effizient biegen kann um kleinste DNA-Kreise zu formen (bis zu 59 bp bei hohen HMG Konzentrationen). Durch diese Fähigkeit, DNA in eine hoch-kompakte Formen zu wickeln, haben HMG1 und 2 einen übergreifenden Einfluss auf die Chromatinstruktur (Paull et al., 1993). In

der vorliegenden Analyse zeigt sich eine signifikante Hochregulation des kodierenden Gens HMGB2 in cALL Proben im Vergleich zu gesundem Gewebe und Kontroll Lymphoblasten (vgl. Abbildung 4-3). Es ist ersichtlich, dass HMGB2 in allen aufgeführten Gewebearten in unterschiedlicher Stärke exprimiert ist. Die Leukämiezellen zeigen jedoch eine durchschnittlich höhere Expressionsstärke im Vergleich zu gesunden Zellen.

Das Protein HMGB2 spielt eine ausschlaggebende Rolle in der V(D)J Rekombination und im letzten Bindungsschritt der DNA, indem es die Enden nach reparaturbedingten Doppelstrangbrüchen wieder verbindet (Fan et al., 2002; Nagaki et al., 1998). Shykind et al. wiesen darauf hin, dass HMG2 essentiell ist zur Aktivierung des TFIID-TFIIA Komplexes, sodass diesem Protein auch eine transkriptionsaktivierende Eigenschaft zugeschrieben wird (Shykind et al., 1995). In Hinblick auf eine onkogene Wirkung zeigten Stros et al., dass HMGB1 und 2 Zell- und Promotor spezifisch die Transkriptionsaktivität einzelner Mitglieder der p53 Familie steigernd oder hemmend beeinflussen können (Stros et al., 2002). Das Gen p53 ist ein kritisches Tumor Suppressor Gen, welches die maligne Transformation von Zellen verhindert indem es den Zellzyklus arretiert und Apoptose induziert.

Es bleibt Gegenstand weiterer Forschung, inwiefern diese veränderte Expression im Detail die Chromatinstruktur beeinflusst. Es ist aber erdenkbar, dass jede Veränderung der HMG2 Konzentration, Struktur oder Funktion – durch den übergreifenden Einfluss auf die Chromatinstruktur – die Expression einer ganzen Anzahl von Genen gleichzeitig beeinflussen kann.

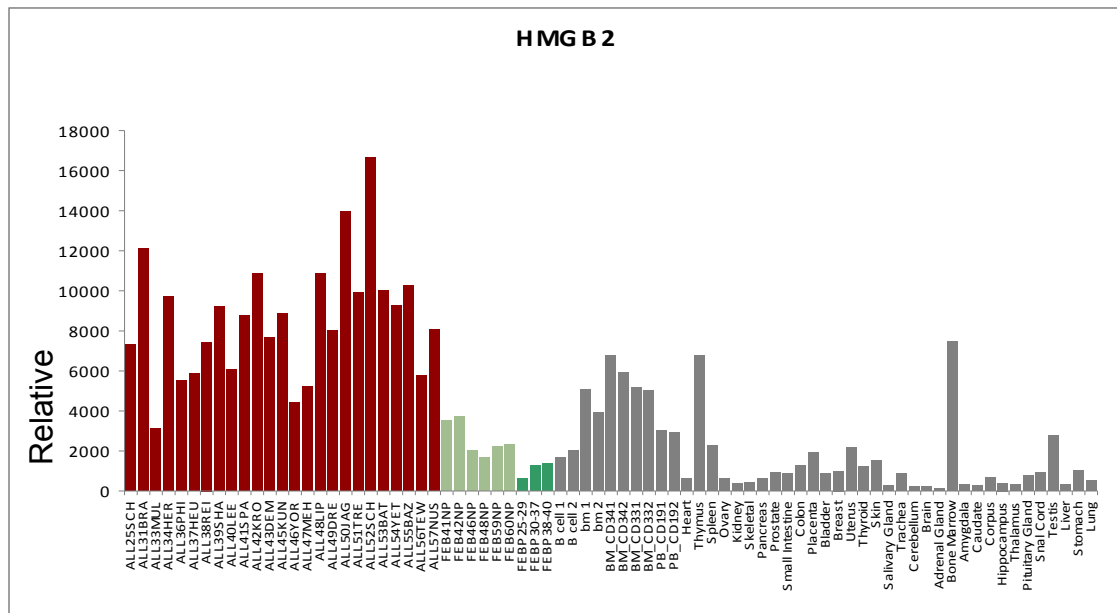


Abbildung 4-3 Relative Expression von HMGB2

cALL Proben (rot), FEB Kontrollproben (grün), gesundes Gewebe (grau). Siehe Text für Detail.

4.1.5.4 LILRA2

Das Gen LILRA2 (ILT1, LIR7, CD85H) kodiert für einen leukozytären Immunoglobulin-ähnlichen Rezeptor (LIR, *Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor*). Der für LILRA2 kodierende, ca. 1-Mb Leukozyten Rezeptor Komplex auf Locus 19q13.4 ist eine polymorphe Region für Gene mit Schlüsselfunktion, die alle natürlichen Killer-Rezeptor (KIR, *Killer cell Inhibitory Receptors*) und verwandten LIR Gene enthält (Wilson et al., 2000). LIRs sind eine Familie von Immunorezeptoren, die weiter klassifiziert werden in die Unterfamilien A (aktivierende) oder B (inhibitorische). Sie werden hauptsächlich von Monozyten, Granulozyten, in geringeren Mengen auch von Dendritischen- und Natürlichen Killerzellen (NK) exprimiert. LILRA2 ist in entzündlichem Gewebe stark exprimiert und ist in der Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen involviert (Samaridis and Colonna, 1997). In Abbildung 4-4 bestätigen sich hohe Expressionswerte von LILRA2 in hämatopoetischem und lymphatischem Gewebe.

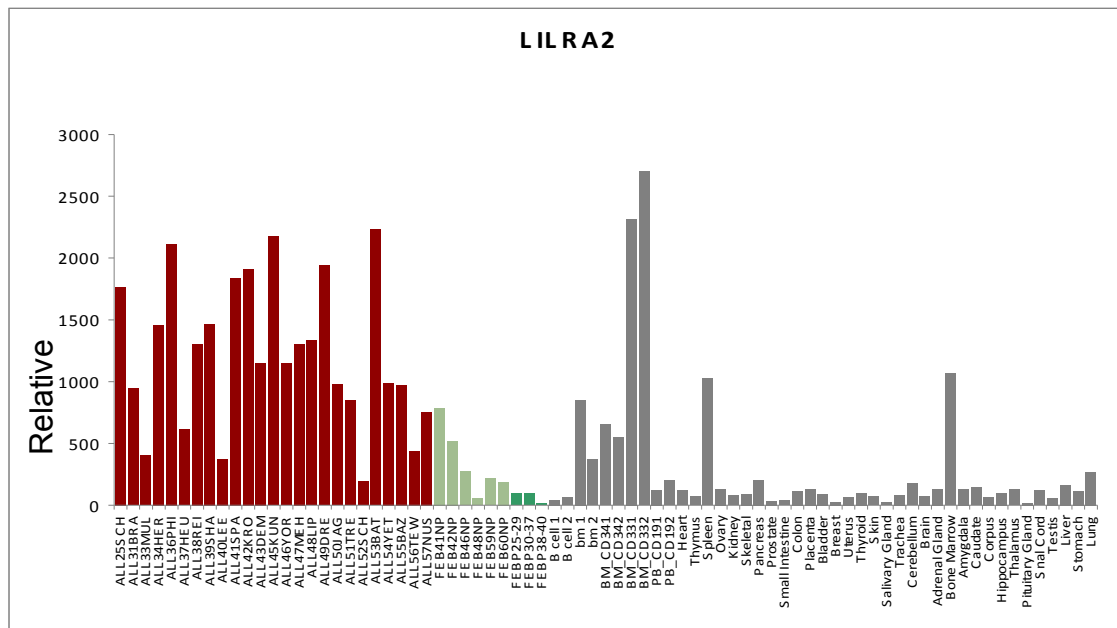


Abbildung 4-4 Relative Expression von LILRA2

cALL Proben (rot), FEB Kontrollproben (grün), gesundes Gewebe (grau). Siehe Text für Detail.

Stimulierende LIRS, zu denen auch LILRA2 gehört, haben eine sehr kurze zytoplasmatische Domäne ohne ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*), und müssen deshalb mit anderen Zelloberflächenproteinen assoziieren um einen Rezeptorkomplex zu bilden, der fähig ist, Signalmoleküle innerhalb der Zelle zu rekrutieren. Nakajima et al. zeigte, dass LILRA2 mit einer FcR γ Kette assoziieren muss, um auf der Zelloberfläche tranfizierter Zellen exprimiert zu werden (Nakajima et al., 1999). Im Zusammenhang mit B-Zellen wurde bisher ausschliesslich die Expression inhibitorischer LIRs beschrieben. Die in KIRs der NK-Zellen enthaltenen ITIMs gleichen den IgG Rezeptoren Fc γ RIIb in B-Zellen. Interaktionen zwischen dem B-Zell Antigen Rezeptor und inhibitorischen Rezeptor Fc γ RIIb inhibieren beispielsweise die B-Zell Blastogenese und Proliferation und induzieren Zelltod durch Apoptose (Cambier et al., 1999; Malbec et al., 1999).

LIRs regulieren nachgewiesenerweise sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort. Mittels der Erforschung von Lepra in Menschen ergaben sich zahlreiche Einsichten in die immunoregulatorische Rolle der LILR-Genfamilie. Es wurde beobachtet, dass eine charakteristische Genexpression jeweils genau mit der klinischen Form der Erkrankung korreliert. Gene, bzw.

mRNA, die zur LIR-Familie gehören, waren signifikant hoch-reguliert in Läsionen von Lepra Patienten, die an der disseminierten Form der Infektion erkrankt waren im Vergleich zur selbst-limitierenden, tuberkuloiden Form (Bleharski et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von LILRA2 die Differenzierung unreifer Dendritischer Zellen behindert und damit auch die Antigenpräsentation an CD1- und MHC Klasse II-assoziierte T-Zellen. Indem die LILRA2-Aktivierung eine verminderte Differenzierung und Funktion Dendritischer Zellen bewirkt, kann es die adaptive T-Zell Antwort des angeborenen Immunsystems kontrollieren. So ist die vermehrte Expression von LILRA2 in Makrophagen in Hautläsionen der progressiven Form von Lepra Ursache der ineffektiven T-Zell-Antwort auf das pathogene Mykobakterium *leprae* (Lee et al., 2007). Desweiteren wurde die Fähigkeit von LILRA2 beschrieben, alternative Differenzierungswege der Dendritischen Zellen zu stimulieren. So kann es beispielsweise die intrazelluläre Kommunikation via Aktivierungssignalen overändern. Dies wiederum kann die myeloische Differenzierung und Funktion beeinflussen, mit dem Resultat eines alternativen Makrophagen-Phänotyps mit geringerer Antigen-präsentierender Kapazität (Bakker et al., 1999; Bakker et al., 2000; Hamerman et al., 2006).

Es gibt bisher keine Veröffentlichungen, die LILRA2 im Zusammenhang mit cALL oder anderen Leukämien beschreiben. Allerdings lässt die Überexpression von LILRA2 in der pädiatrischen cALL einen immunsuppressiven Mechanismus, bzw. eine Fehlleitung potentieller Immunantworten wie bei Lepraerkrankungen vermuten.

4.1.5.5 PXDN

Das Gen PXDN (*peroxidasin homolog*, auch PRG2, MG50 genannt) ist ein Homolog des Drosophila Peroxidasin Gens. Letzteres ist eine mit extrazellulärer Matrix assoziierte Peroxidase, die nur in Hämocyten (Phagozyten wirbelloser Tiere) des Kopf-Mesoderms in einer sehr frühen Differenzierungsphase der Entwicklung exprimiert ist. Peroxidasin katalysiert Wasserstoffperoxidase vermittelte Radioiodinationen, Oxidationen, und die in vitro Formation von Dityrosin. Dem Drosophila Peridoxin wurde ebenfalls eine Funktion in der

Konsolidierung der extrazellulären Matrix, in der Phagozytose und in der Immunabwehr zugeschrieben (Nelson et al., 1994).

PRG2 (*p53-responsive gene 2*) teilt 38% (entspricht über 1,412 Aminosäuren) seiner Aminosäuresequenz mit dem Drosophila Peroxin. Horikoshi et al. folgerten, dass PRG2 das humane Homolog des Drosophila Peroxidasin sei (Horikoshi et al., 1999). *Northern-Blot* Analysen menschlichen Gewebes zeigten ein 7.5-kb PRG2 Transkript in allen gesunden menschlichen Geweben ausser im Gehirn und in Leukozyten. Ein 4.5-kb Transkript konnte in Hoden- und p53-induzierten Koloncarcinom Zelllinien nachgewiesen werden (Nagase et al., 1996).

Weiler et al. ermittelten, dass PRG2, welches sie *melanoma-associated gene 50* benannten, in einem begrenzten Muster in malignen Zellen exprimiert wird. So zeigte sich eine Expression des 8.5-kb mRNA in Melanom-, Glioblastom-, Fibroblasten-, Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien, nicht aber in Kolonkarzinomzellen, im Burkitt Lymphom, lymphozytären oder myeloischen Tumorzelllinien (Mitchell et al., 2000; Weiler et al., 1994). Desmond et al. beschrieben eine verminderte Expression von PXDN in allen untersuchten Karyotypen der AML im Vergleich zu gesunden CD34⁺ Stammzellen (Desmond et al., 2007).

Abbildung 4-5 zeigt die Expression von PXDN in Normalgewebe und ALL Proben der vorliegenden Arbeit. Es zeigt sich eine geringe relative Expression in gesundem Gewebe bei deutlicher Überexpression in leukämischen Lymphoblasten. Aus dem Vergleich unterschiedlicher Analysen geht hervor, dass die Expression von PXDN keinem klaren Muster folgt, teilweise scheinbar widersprüchliche Aussagen vorliegen, die weitere Abklärung erfordern.

Bezüglich der Funktion von PRG2 wurde gezeigt, dass dieses Gen bzw. dessen Transkript im Vorgang der Apoptose involviert ist, hinweisend dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der fehlerhaften p53-abhängigen Apoptose und der Produktion reaktiver Sauerstoffprodukte besteht (Horikoshi et al., 1999).

wurden, zu untersuchen. Aus jener Arbeit geht allerdings nicht hervor, wie hoch die für die Analyse hinzugezogenen CD19⁺CD10⁺ Kontrollproben angereichert wurden. Überexpression wurde definiert als eine > 1.5-fache Erhöhung in Expression in leukämischen Zellen bei paarweisem Vergleich mit der Expression in gesunden Zellen. Von den 4132 untersuchten Genen waren in den leukämischen Proben 334 Gene überexprimiert. Nur ein einziges Gen war mit > 1.5-fach Erhöhung in Expression unterexprimiert im Vergleich zu gesunden Zellen. Als mögliche Marker für MRD wurden Gene identifiziert, die sich durch ein starkes Hybridisierungssignal im Vergleich zur Kontrollprobe unterschieden. Die entsprechend kodierten Proteine bzw. Oberflächenantigene wurden mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Dabei wurden neun potentielle Transkripte (Proteine) identifiziert, die sich als Marker für MRD eignen sollten. Eine Anzahl von 7 Proteinen, namentlich CD58, CKB, Ninjurin1, Ref1, Calpastatin, HDJ-2 und Annexin VI. Der mögliche Einsatz von CD58 als Marker der MRD wurde weiter untersucht und zeigte eine Sensitivität vergleichbar mit der PCR (Chen et al., 2001). Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Chen et al. sind schwer zu vergleichen mit der vorliegenden Analyse, da ein sehr unterschiedliches Verfahren eingesetzt wurde, um Gene als differentiell exprimiert zu identifizieren. Es konnte bestätigt werden, dass CD58 in leukämischen Blasten im Vergleich zu gesunden überexprimiert ist, allerdings ist es nicht eines der Gene/Proteine, die laut PAM zur präzisen Klassifikation von Proben als gesund oder maligne herangezogen werden könnten (vgl. Tabelle 9-1 und Tabelle 9-3).

Song et al. verglich neben den Expressionsprofilen verschiedener Leukämieformen untereinander auch das Expressionsprofil gesunder Knochenmark-Lymphoblasten mit dem Expressionsprofil leukämischer Blasten. Hierfür wurden Knochenmark Proben von 65 an ALL erkrankten Erwachsenen mit gesundem Knochenmark von Knochenmarktransplantations-Spendern unbekanntem Alters verglichen. Eingesetzt wurde in jener Analyse der *Platinum Biochip™ Human 8.3K Microarray* (GenoCheck, Ansan, Korea), für die Analyse wurde das Programm GeneSpring 6.1 (Silicon Genetics, CA) verwendet. Mittels SAM, mit einem festgelegten FC von 1,3. und einer FDR von 2,36%, wurden die 50 am signifikantesten differentiell exprimierten Gene zwischen Kontroll-

und Leukämieproben identifiziert. Diese enthielten u.a. PIK3CA (p110 α *catalytic subunit of phosphoinositide 3-kinase*), CD69 (p60, *early T-cell activation antigen*), SNCA (synuclein α) und OAT (ornithine aminotransferase). Ziel war hierbei ebenfalls unter anderem Marker zur Klassifikation oder mögliche therapeutische Zielstrukturen aufzudecken. Es ging in jener Arbeit um die ALL im Erwachsenenalter. Unklar ist auch, welches Differenzierungsstadium der Lymphozyten als Kontrolle eingesetzt wurde (Song et al., 2006).

4.2 Anwendungsmöglichkeiten in der Diagnostik

4.2.1 Das Rebound Phänomen

Ein erneutes Auftreten von erhöhten Lymphblastenzahlen im Knochenmark nach erfolgter Chemotherapie ist nicht immer ein Zeichen eines Rezidivs. Eine „Überproduktion“ normaler, nicht-maligner Blasten kann auch Ausdruck eines sich erholenden Knochenmarks sein. Dieses Phänomen wird auch als *Rebound* bezeichnet. Problematisch ist, dass sich diese *Rebound*-Zellen immunologisch meist nicht von malignen Zellen unterscheiden lassen. Hier könnte die Differenzierung zwischen gesunden und malignen Lymphblasten mittels Genexpressionsanalyse eine Lösung darstellen. Die PAM Analyse zeigt, dass unbekannte Proben anhand von 43 Genen mit einer Sicherheit von > 92% dem richtigen Phänotyp zugeordnet werden können (vgl. 3.3.7). Diese Notwendigkeit, leukämische Rezidivblasten von gesunden Lymphblasten eindeutig unterscheiden zu können, ist essentiell um den betroffenen Patienten im Falle eines *Rebouds* möglicherweise eine weitere nebenwirkungsreiche Therapie zu ersparen.

4.2.2 Die Erfassung von MRD (*Mininal Residual Disease*)

Zahlreiche Studien belegen, dass die Überlebensrate der Patienten mit dem Level an Minimaler Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) während der klinischen Remission korreliert (Brisco et al., 1994; Cave et al., 1998;

Coustan-Smith et al., 2002; Goulden et al., 2003; Nyvold et al., 2002; van Dongen et al., 1998). Therapieresistenz, mit entsprechend hoher MRD, wird bereits in Zusammenhang mit charakteristischen Genexpressionsprofilen gebracht und verspricht zukünftig eine Möglichkeit der genaueren Risikostratifikation (Cario et al., 2005).

Rezidive gehen allgemein von verbleibenden leukämischen Blasten aus. Eine Studie zeigte, dass eine geringe Anzahl von 15 Blasten / 100000 Zellen bereits ein Rezidivrisiko darstellt (Cave et al., 1998), eine so geringe Anzahl, die mit den meisten konventionellen Detektionsverfahren kaum bis gar nicht nachgewiesen werden können. Lediglich die PCR und die Immunphänotypisierung weisen eine ausreichende Sensitivität (die Fähigkeit, zwischen malignen und normalen Zellen zu unterscheiden) auf. Mittels PCR kann beispielsweise eine einzige maligne Zellen unter bis zu 1 Million Zellen detektiert werden. Die PCR kann aber nicht in allen Patienten erfolgreich eingesetzt werden, da ihre Spezifität auf die individuell-bestimmten Verbindungssequenzen der IgG und TCR Gene oder typische Fusionsgene leukämischer Zellen angewiesen ist (van Dongen et al., 1999). Es kommen neben einer häufigen Oligoklonalität dieser Sequenzen auch primäre und sekundäre Umlagerungen im Verlaufe der Erkrankung vor (Ford et al., 2001; Steenbergen et al., 1997) . Wenn der Klon-spezifische Marker für die MRD Detektion verändert ist, oder oligoklonale Populationen vorliegen, können leukämische Zellen undetektiert bleiben (Campana and Coustan-Smith, 1999). Diese Unsicherheit kann auch mit zwei oder mehr unabhängigen PCR-Zielsequenzen nur bedingt kompensiert werden.

Desweiteren können normale hämatopoetische Progenitorzellen das gleiche zytoplasmatische oder Oberflächenantigen Profil exprimieren und somit die Unterscheidung zwischen maligner und normaler Zelle unmöglich machen. Es besteht auch die Gefahr, dass sich die immunophänotypische Expression der leukämischen Zellen im Verlauf der Erkrankung verändert und somit ein falsch negatives Ergebnis ergibt.

Ziel ist es letztendlich, neue Marker leukämischer Zellen zu identifizieren mit dem Ziel, ein universelles Markerprofil zusammenzustellen, welches verbleibende Tumorzellen erfassen kann, den Therapieresponse vorhersagen

kann und dies mit einer Wahrscheinlichkeit und Genauigkeit, die derzeitige Methoden deutlich übertrifft.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der PAM Analyse Markergene identifiziert, die die Unterscheidung von gesund und maligne ermöglichen. Die Reproduzierbarkeit dieser Differenzierung wurde bereits erfolgreich bei Analysen von Reboundzellen demonstriert (Richter et al., unveröffentlicht). Ziel ist dabei, Leukämie-spezifische Marker zu finden, im Gegensatz zu den bisherigen Verfahren, leukämische Zellen anhand physiologischer Oberflächenantigenen immunphänotypisch zu charakterisieren und zu identifizieren. Gene sowohl der SAM als auch der PAM Analyse (vgl. 3.3.5 und 3.3.7) könnten für eine verbesserte MRD-Diagnostik geeignet sein und sind damit Gegenstand weiterer Erforschung.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Methode, CD19⁺CD10⁺ Lymphoblasten aus Nabelschnurblut bis zu einer Reinheit von 94,39% anzureichern mit dem Ziel, eine geeignete Kontrollprobe für die vergleichende Genexpressionsanalyse leukämischer mit gesunden B-Lymphoblasten des gleichen Differenzierungsstadiums zu erhalten.

Die unüberwachte Clusteranalyse zeigt eine hohe Verwandtschaft leukämischer- und hier untersuchter gesunder B-Lymphoblasten. Dennoch zeigen sich fundamental unterschiedliche Genexpressionsmuster der untersuchten Proben, sodass trotz Ähnlichkeit eine eindeutige Differenzierung der zwei Gruppen möglich ist.

Mittels der SAM Analyse wurden mit einem q-Wert cut-off von $< 0,87465$ neue Gene identifiziert, die bisher noch nicht mit der cALL assoziiert wurden. Sie bilden mit anderen Genen das spezifische Expressionsmuster der cALL, die Grundlage der Erforschung der malignen Entartung. Mit einem FC > 3 und einer FDR $\leq 10,22\%$ wurden 367 Gene als signifikant hochreguliert und 338 als signifikant herunterreguliert erfasst. Anhand einiger in leukämischen Blasten hoch-regulierten Genen, namentlich STK32B, SOX4, HMBG2, LILRA2 und PXDN, wurde diskutiert, dass es sich bei diesen differentiell exprimierten Genen um Gene handelt, die potentiell einen entscheidenden Einfluss auf die Reifung, Signaltransduktion und Transkription einer Zelle haben.

Der diagnostische Wert der Analyse zeigt sich in der Möglichkeit, anhand von 43 Genen gesunde von leukämischen Proben mit $> 90\%$ Sicherheit zu unterscheiden (PAM). Dies eröffnet langfristig die vielversprechende Möglichkeit, durch Genexpressionsanalysen selbst oder durch das Definieren eines universellen Markerprofils anhand differentiell exprimierter Gene, mit höherer Sensitivität und Spezifität als derzeitige Methoden gesunde von leukämischen Zellen zu unterscheiden. Beispielsweise wäre hiermit die Möglichkeit gegeben, gesunde Rebound- von malignen Rezidivzellen zu

unterscheiden, Zelltypen die sich immunphänotypisch nicht unterscheiden lassen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzen existierende Studien, welche bereits charakteristische Genexpressionsprofile verschiedener ALL-Subtypen, Translokationen, Pharmaka-Resistenzen und möglichem Therapieversagen beschreiben. Weitere Untersuchungen, basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, werden möglicherweise zu weiteren Einsichten in die Pathogenese der malignen Entartung der cALL verhelfen. Neue Forschungsmöglichkeiten bestehen darin, die erfassten Gene bzw. ihre Transkripte als mögliche hoch-sensitive und -spezifische diagnostische Marker oder therapeutische Zielstrukturen im Rahmen der Behandlungsmöglichkeiten der pädiatrischen cALL genauer zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

Aaboe, M., Birkenkamp-Demtroder, K., Wiuf, C., Sorensen, F. B., Thykjaer, T., Sauter, G., Jensen, K. M., Dyrskjot, L., and Orntoft, T. (2006). SOX4 expression in bladder carcinoma: clinical aspects and in vitro functional characterization. *Cancer research* 66, 3434-3442.

Adelman, A. S., McLaughlin, C. C., Wu, X. C., Chen, V. W., and Groves, F. D. (2005). Urbanisation and incidence of acute lymphocytic leukaemia among United States children aged 0-4. *British journal of cancer* 92, 2084-2088.

Ahn, S. G., Kim, H. S., Jeong, S. W., Kim, B. E., Rhim, H., Shim, J. Y., Kim, J. W., Lee, J. H., and Kim, I. K. (2002). Sox-4 is a positive regulator of Hep3B and HepG2 cells' apoptosis induced by prostaglandin (PG)A(2) and delta(12)-PGJ(2). *Experimental & molecular medicine* 34, 243-249.

Alexander, F. E., Patheal, S. L., Biondi, A., Brandalise, S., Cabrera, M. E., Chan, L. C., Chen, Z., Cimino, G., Cordoba, J. C., Gu, L. J., *et al.* (2001). Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer research* 61, 2542-2546.

Armstrong, S. A., Hsieh, J. J., and Korsmeyer, S. J. (2002a). Genomic approaches to the pathogenesis and treatment of acute lymphoblastic leukemias. *Current opinion in hematology* 9, 339-344.

Armstrong, S. A., Staunton, J. E., Silverman, L. B., Pieters, R., den Boer, M. L., Minden, M. D., Sallan, S. E., Lander, E. S., Golub, T. R., and Korsmeyer, S. J. (2002b). MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature genetics* 30, 41-47.

Bakker, A. B., Baker, E., Sutherland, G. R., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (1999). Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9792-9796.

Bakker, A. B., Hoek, R. M., Cerwenka, A., Blom, B., Lucian, L., McNeil, T., Murray, R., Phillips, L. H., Sedgwick, J. D., and Lanier, L. L. (2000). DAP12-deficient mice fail to develop autoimmunity due to impaired antigen priming. *Immunity* 13, 345-353.

Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., and van't Veer, M. B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9, 1783-1786.

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute

leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology* 33, 451-458.

Bhatia, S., and Robison, L. L. (1999). Epidemiology of leukemia and lymphoma. *Current opinion in hematology* 6, 201-204.

Bhatia, S., Sather, H. N., Heerema, N. A., Trigg, M. E., Gaynon, P. S., and Robison, L. L. (2002). Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100, 1957-1964.

Bleharski, J. R., Li, H., Meinken, C., Graeber, T. G., Ochoa, M. T., Yamamura, M., Burdick, A., Sarno, E. N., Wagner, M., Rollinghoff, M., *et al.* (2003). Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science* (New York, NY 301, 1527-1530.

Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365.

Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3, 730-737.

Boyd, K. E., Xiao, Y. Y., Fan, K., Poholek, A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Perkins, A. S. (2006). Sox4 cooperates with Evi1 in AKXD-23 myeloid tumors via transactivation of proviral LTR. *Blood* 107, 733-741.

Brisco, M. J., Condon, J., Hughes, E., Neoh, S. H., Sykes, P. J., Seshadri, R., Toogood, I., Waters, K., Tauro, G., Ekert, H., and *et al.* (1994). Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* 343, 196-200.

Buffler, P. A., Kwan, M. L., Reynolds, P., and Urayama, K. Y. (2005). Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer investigation* 23, 60-75.

Burdach, S. (1991). The granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF): basic science and clinical application. *Klinische Padiatrie* 203, 302-310.

Burdach, S. (1992). Molecular regulation of hematopoietic cytokines: implications and indications for clinical use in pediatric oncology. *Medical and pediatric oncology* 2, 10-17.

Burdach, S., and Levitt, L. (1988). T cell regulated hematopoiesis--molecular interactions in hematopoietic control by CD2 and interleukin 2. *Behring Institute Mitteilungen*, 56-67.

Burdach, S., Zessack, N., and Levitt, L. (1988). [Molecular mechanisms of cellular interaction in immune regulation of hematopoiesis]. *Klinische Padiatrie* 200, 165-170.

Busslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annual review of immunology* 22, 55-79.

Calado, R. T., Garcia, A. B., and Falcao, R. P. (1999). Age-related changes of immunophenotypically immature lymphocytes in normal human peripheral blood. *Cytometry* 38, 133-137.

Cambier, J. C., Fong, D., and Tamir, I. (1999). The unexpected complexity of Fc gamma RIIB signal transduction. *Current topics in microbiology and immunology* 244, 43-55.

Campana, D., and Coustan-Smith, E. (1999). Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 38, 139-152.

Cario, G., Stanulla, M., Fine, B. M., Teuffel, O., Neuhoff, N. V., Schrauder, A., Flohr, T., Schafer, B. W., Bartram, C. R., Welte, K., *et al.* (2005). Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 105, 821-826.

Castor, A., Nilsson, L., Astrand-Grundstrom, I., Buitenhuis, M., Ramirez, C., Anderson, K., Strombeck, B., Garwicz, S., Bekassy, A. N., Schmiegelow, K., *et al.* (2005). Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nature medicine* 11, 630-637.

Cave, H., van der Werff ten Bosch, J., Suci, S., Guidal, C., Waterkeyn, C., Otten, J., Bakkus, M., Thielemans, K., Grandchamp, B., and Vilmer, E. (1998). Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *The New England journal of medicine* 339, 591-598.

Chen, J. S., Coustan-Smith, E., Suzuki, T., Neale, G. A., Mihara, K., Pui, C. H., and Campana, D. (2001). Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 97, 2115-2120.

Comans-Bitter, W. M., de Groot, R., van den Beemd, R., Neijens, H. J., Hop, W. C., Groeneveld, K., Hooijkaas, H., and van Dongen, J. J. (1997). Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *The Journal of pediatrics* 130, 388-393.

Corrigan, J. J., and Feig, S. A. (2004). Guidelines for pediatric cancer centers. *Pediatrics* 113:1833.

Coustan-Smith, E., Sancho, J., Behm, F. G., Hancock, M. L., Razzouk, B. I., Ribeiro, R. C., Rivera, G. K., Rubnitz, J. E., Sandlund, J. T., Pui, C. H., and Campana, D. (2002). Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100, 52-58.

Cox, C. V., Evely, R. S., Oakhill, A., Pamphilon, D. H., Goulden, N. J., and Blair, A. (2004). Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* 104, 2919-2925.

Creutzig, U., and Klusmann, J.-H. (2004). Die Chronik der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). In, (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie), p. 63.

Creutzig, U., and Schrappe, M. (1996). Acute leukemia in childhood. Classification--diagnosis--therapy--prognosis. *Der Internist* 37, 982-993.

D'Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N., Di Giorgio, G., Zendoli, F., and Carotenuto, M. (1996). Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 81, 404-409.

Desmond, J. C., Raynaud, S., Tung, E., Hofmann, W. K., Haferlach, T., and Koeffler, H. P. (2007). Discovery of epigenetically silenced genes in acute myeloid leukemias. *Leukemia* 21, 1026-1034.

Elghetany, M. T., Ge, Y., Patel, J., Martinez, J., and Uhrova, H. (2004). Flow cytometric study of neutrophilic granulopoiesis in normal bone marrow using an expanded panel of antibodies: correlation with morphologic assessments. *Journal of clinical laboratory analysis* 18, 36-41.

Evans, W. E., and Relling, M. V. (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science (New York, NY)* 286, 487-491.

Fan, Z., Beresford, P. J., Zhang, D., and Lieberman, J. (2002). HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Mol Cell Biol* 22, 2810-2820.

Fine, B. M., Stanulla, M., Schrappe, M., Ho, M., Viehmann, S., Harbott, J., and Boxer, L. M. (2004). Gene expression patterns associated with recurrent chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103, 1043-1049.

Ford, A. M., Fasching, K., Panzer-Grumayer, E. R., Koenig, M., Haas, O. A., and Greaves, M. F. (2001). Origins of "late" relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes. *Blood* 98, 558-564.

Freeman, W. M., Robertson, D. J., and Vrana, K. E. (2000). Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *BioTechniques* 29, 1042-1046, 1048-1055.

Gatta, G., Capocaccia, R., Stiller, C., Kaatsch, P., Berrino, F., and Terenziani, M. (2005). Childhood cancer survival trends in Europe: a EURO CARE Working Group study. *J Clin Oncol* 23, 3742-3751.

Geijsen, N., Uings, I. J., Pals, C., Armstrong, J., McKinnon, M., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L., and Coffey, P. J. (2001). Cytokine-specific transcriptional regulation through an IL-5 alpha interacting protein. *Science (New York, NY)* 293, 1136-1138.

Gilbert, D. R., Schroeder, M., and van Helden, J. (2000). Interactive visualization and exploration of relationships between biological objects. *Trends in biotechnology* 18, 487-494.

Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., *et al.* (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science (New York, NY)* 286, 531-537.

Goulden, N., Bader, P., Van Der Velden, V., Moppett, J., Schilham, M., Masden, H. O., Krejci, O., Kreyenberg, H., Lankester, A., Revesz, T., *et al.* (2003). Minimal residual disease prior to stem cell transplant for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* 122, 24-29.

Greaves, M. (2006). Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature reviews* 6, 193-203.

Greaves, M. F., Chan, L. C., Furley, A. J., Watt, S. M., and Molgaard, H. V. (1986). Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 67, 1-11.

Gudowius, S., Recker, K., Laws, H. J., Dirksen, U., Troger, A., Wieczorek, U., Furlan, S., Gobel, U., and Hanenberg, H. (2006). Identification of candidate target antigens for antibody-based immunotherapy in childhood B-cell precursor ALL. *Klinische Padiatrie* 218, 327-333.

Hamerman, J. A., Jarjoura, J. R., Humphrey, M. B., Nakamura, M. C., Seaman, W. E., and Lanier, L. L. (2006). Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. *J Immunol* 177, 2051-2055.

Hann, I., Vora, A., Harrison, G., Harrison, C., Eden, O., Hill, F., Gibson, B., and Richards, S. (2001). Determinants of outcome after intensified therapy of childhood lymphoblastic leukaemia: results from Medical Research Council United Kingdom acute lymphoblastic leukaemia XI protocol. *British journal of haematology* 113, 103-114.

Harrison, C. J., Moorman, A. V., Broadfield, Z. J., Cheung, K. L., Harris, R. L., Reza Jalali, G., Robinson, H. M., Barber, K. E., Richards, S. M., Mitchell, C. D., *et al.* (2004). Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* 125, 552-559.

Hattenhorst, U. (2003) Untersuchung der differentiellen Genexpression mit DNA-Microarrays bei Akuter Lymphoblastischer Leukämie im Vergleich mit normalen B-Lymphozyten, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle-Wittenberg.

Heerema, N. A., Sather, H. N., Sensel, M. G., Zhang, T., Hutchinson, R. J., Nachman, J. B., Lange, B. J., Steinherz, P. G., Bostrom, B. C., Reaman, G. H., *et al.* (2000). Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol* 18, 1876-1887.

Hiebert, S. W., Sun, W., Davis, J. N., Golub, T., Shurtleff, S., Buijs, A., Downing, J. R., Grosveld, G., Roussell, M. F., Gilliland, D. G., *et al.* (1996). The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol* 16, 1349-1355.

Hjalgrim, L. L., Rostgaard, K., Hjalgrim, H., Westergaard, T., Thomassen, H., Forestier, E., Gustafsson, G., Kristinsson, J., Melbye, M., and Schmiegelow, K. (2004). Birth weight and risk for childhood leukemia in Denmark, Sweden, Norway, and Iceland. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 1549-1556.

Hoffkes, H. G., Schmidtke, G., Uppenkamp, M., and Schmucker, U. (1996). Multiparametric immunophenotyping of B cells in peripheral blood of healthy adults by flow cytometry. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 3, 30-36.

Horikoshi, N., Cong, J., Kley, N., and Shenk, T. (1999). Isolation of differentially expressed cDNAs from p53-dependent apoptotic cells: activation of the human homologue of the *Drosophila* peroxidase gene. *Biochemical and biophysical research communications* 261, 864-869.

Hoser, M., Baader, S. L., Bosl, M. R., Ihmer, A., Wegner, M., and Sock, E. (2007). Prolonged glial expression of Sox4 in the CNS leads to architectural cerebellar defects and ataxia. *J Neurosci* 27, 5495-5505.

Hrusak, O., Trka, J., Zuna, J., Polouckova, A., Kalina, T., and Stary, J. (2002). Acute lymphoblastic leukemia incidence during socioeconomic transition: selective increase in children from 1 to 4 years. *Leukemia* 16, 720-725.

Hur, E. H., Hur, W., Choi, J. Y., Kim, I. K., Kim, H. Y., Yoon, S. K., and Rhim, H. (2004). Functional identification of the pro-apoptotic effector domain in human Sox4. *Biochemical and biophysical research communications* 325, 59-67.

Janeway, C. A. J. (2002). Entwicklung und Überleben von Lymphozyten. In *Immunologie*, C.A.J. Janeway, P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik, eds. (Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH), pp. 241-311.

Kaatsch, P. (2009). Deutsches Kinderkrebsregister. In.

Kaatsch, P., and Spix, C. (2005). Jahresbericht 2004 des Deutschen Kinderkrebsregisters In.

Kaatsch, P., Spix, C., Schulze-Rath, R., Schmiedel, S., and Blettner, M. (2008). Leukaemia in young children living in the vicinity of German nuclear power plants. *Int J Cancer* 122, 721-726.

Kang, S., Bader, A. G., and Vogt, P. K. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 802-807.

Kessel, A., Yehudai, D., Peri, R., Pavlotzky, E., Bamberger, E., Tov, N., and Toubi, E. (2006). Increased susceptibility of cord blood B lymphocytes to undergo spontaneous apoptosis. *Clinical and experimental immunology* 145, 563-570.

Kohlmann, A., Schoch, C., Schnittger, S., Dugas, M., Hiddemann, W., Kern, W., and Haferlach, T. (2003). Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology. *Genes, chromosomes & cancer* 37, 396-405.

Kong, Y., Yoshida, S., Saito, Y., Doi, T., Nagatoshi, Y., Fukata, M., Saito, N., Yang, S. M., Iwamoto, C., Okamura, J., *et al.* (2008). CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia* 22, 1207-1213.

Kostich, M., English, J., Madison, V., Gheyas, F., Wang, L., Qiu, P., Greene, J., and Laz, T. M. (2002). Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome biology* 3, RESEARCH0043.

Kroll, M. E., Draper, G. J., Stiller, C. A., and Murphy, M. F. (2006). Childhood leukemia incidence in Britain, 1974-2000: time trends and possible relation to influenza epidemics. *Journal of the National Cancer Institute* 98, 417-420.

Lauten, M., Matthias, T., Stanulla, M., Beger, C., Welte, K., and Schrappe, M. (2002). Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia* 16, 1437-1442.

Lavabre-Bertrand, T., Janossy, G., Ivory, K., Peters, R., Secker-Walker, L., and Porwit-MacDonald, A. (1994). Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry: I. CD10 expression. *Cytometry* 18, 209-217.

Lee, C. J., Appleby, V. J., Orme, A. T., Chan, W. I., and Scotting, P. J. (2002). Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. *Journal of neuro-oncology* 57, 201-214.

Lee, D. J., Sieling, P. A., Ochoa, M. T., Krutzik, S. R., Guo, B., Hernandez, M., Rea, T. H., Cheng, G., Colonna, M., and Modlin, R. L. (2007). LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. *J Immunol* 179, 8128-8136.

Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R., and Lockhart, D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature genetics* 21, 20-24.

Liu, P., Ramachandran, S., Ali Seyed, M., Scharer, C. D., Laycock, N., Dalton, W. B., Williams, H., Karanam, S., Datta, M. W., Jaye, D. L., and Moreno, C. S. (2006). Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer research* 66, 4011-4019.

Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., and Brown, E. L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature biotechnology* 14, 1675-1680.

Loh, M. L., and Rubnitz, J. E. (2002). TEL/AML1-positive pediatric leukemia: prognostic significance and therapeutic approaches. *Current opinion in hematology* 9, 345-352.

Loning, L., Zimmermann, M., Reiter, A., Kaatsch, P., Henze, G., Riehm, H., and Schrappe, M. (2000). Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy. *Blood* 95, 2770-2775.

MacKenzie, J., Greaves, M. F., Eden, T. O., Clayton, R. A., Perry, J., Wilson, K. S., and Jarrett, R. F. (2006). The putative role of transforming viruses in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 91, 240-243.

Malbec, O., Fridman, W. H., and Daron, M. (1999). Negative regulation of hematopoietic cell activation and proliferation by Fc gamma RIIB. *Current topics in microbiology and immunology* 244, 13-27.

Mitchell, M. S., Kan-Mitchell, J., Minev, B., Edman, C., and Deans, R. J. (2000). A novel melanoma gene (MG50) encoding the interleukin 1 receptor antagonist and six epitopes recognized by human cytolytic T lymphocytes. *Cancer research* 60, 6448-6456.

Moir, S., Donoghue, E. T., Pickeral, O. K., Malaspina, A., Planta, M. A., Chun, T. W., Krishnan, S. R., Kottlil, S., Birse, C. E., Leitman, S. F., and Fauci, A. S. (2003). Continuous flow leukapheresis induces expression of stress genes in lymphocytes: impact on microarray analyses. *Blood* 102, 3852-3853.

Moldenhauer, A., Wolf, J., Habermann, G., Genter, G., Kiesewetter, H., and Salama, A. (2007). Optimum storage conditions for cord blood-derived hematopoietic progenitor cells prior to isolation. *Bone marrow transplantation* 40, 837-842.

Nagaki, S., Yamamoto, M., Yumoto, Y., Shirakawa, H., Yoshida, M., and Teraoka, H. (1998). Non-histone chromosomal proteins HMG1 and 2 enhance ligation reaction of DNA double-strand breaks. *Biochemical and biophysical research communications* 246, 137-141.

Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Ohira, M., Kawarabayasi, Y., Ohara, O., Tanaka, A., Kotani, H., Miyajima, N., and Nomura, N. (1996). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. *DNA Res* 3, 321-329, 341-354.

Nakajima, H., Samaridis, J., Angman, L., and Colonna, M. (1999). Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol* 162, 5-8.

Neglia, J. P., Meadows, A. T., Robison, L. L., Kim, T. H., Newton, W. A., Ruyman, F. B., Sather, H. N., and Hammond, G. D. (1991). Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *The New England journal of medicine* 325, 1330-1336.

Nelson, R. E., Fessler, L. I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., Parker, C. G., and Fessler, J. H. (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *The EMBO journal* 13, 3438-3447.

Nilsson, L., Astrand-Grundstrom, I., Arvidsson, I., Jacobsson, B., Hellstrom-Lindberg, E., Hast, R., and Jacobsen, S. E. (2000). Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *Blood* 96, 2012-2021.

Nyvold, C., Madsen, H. O., Ryder, L. P., Seyfarth, J., Svejgaard, A., Clausen, N., Wesenberg, F., Jonsson, O. G., Forestier, E., and Schmiegelow, K. (2002). Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood* 99, 1253-1258.

O'Gorman, M. R., Millard, D. D., Lowder, J. N., and Yogeve, R. (1998). Lymphocyte subpopulations in healthy 1-3-day-old infants. *Cytometry* 34, 235-241.

Onciu, M., and Pui, C. H. (1999). Diagnosis and classification. In *Childhood Leukemias*, C.H. Pui, ed. (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 19-37.

Paull, T. T., Haykinson, M. J., and Johnson, R. C. (1993). The nonspecific DNA-binding and -bending proteins HMG1 and HMG2 promote the assembly of complex nucleoprotein structures. *Genes Dev* 7, 1521-1534.

Pramoonjago, P., Baras, A. S., and Moskaluk, C. A. (2006). Knockdown of Sox4 expression by RNAi induces apoptosis in ACC3 cells. *Oncogene* 25, 5626-5639.

Produnis (2005). Hämatopoese. In.

Pui, C. H., Crist, W. M., and Look, A. T. (1990). Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 76, 1449-1463.

Pui, C. H., and Evans, W. E. (1998). Acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine* 339, 605-615.

Pui, C. H., and Relling, M. V. (2000). Topoisomerase II inhibitor-related acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 109, 13-23.

Pui, C. H., Relling, M. V., and Downing, J. R. (2004a). Acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine* 350, 1535-1548.

Pui, C. H., Sandlund, J. T., Pei, D., Campana, D., Rivera, G. K., Ribeiro, R. C., Rubnitz, J. E., Razzouk, B. I., Howard, S. C., Hudson, M. M., *et al.* (2004b). Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 104, 2690-2696.

Raimondi, S. C., Zhou, Y., Mathew, S., Shurtleff, S. A., Sandlund, J. T., Rivera, G. K., Behm, F. G., and Pui, C. H. (2003). Reassessment of the prognostic significance of hypodiploidy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 98, 2715-2722.

Rego, E. M., Garcia, A. B., Carneiro, J. J., and Falcao, R. P. (2001). Immunophenotype of normal and leukemic bone marrow B-precursors in a Brazilian population. A comparative analysis by quantitative fluorescence cytometry. *Braz J Med Biol Res* 34, 183-194.

Rego, E. M., Tone, L. G., Garcia, A. B., and Falcao, R. P. (1999). CD10 and CD19 fluorescence intensity of B-cell precursors in normal and leukemic bone marrow. Clinical characterization of CD10(+strong) and CD10(+weak) common acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research* 23, 441-450.

Rickert, R. C., Rajewsky, K., and Roes, J. (1995). Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* 376, 352-355.

Robison, L. L., and Bhatia, S. (2003). Late-effects among survivors of leukaemia and lymphoma during childhood and adolescence. *British journal of haematology* 122, 345-359.

Ross, M. E., Zhou, X., Song, G., Shurtleff, S. A., Girtman, K., Williams, W. K., Liu, H. C., Mahfouz, R., Raimondi, S. C., Lenny, N., *et al.* (2003). Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 102, 2951-2959.

Ross, S. A., and Milner, J. A. (2007). Epigenetic modulation and cancer: effect of metabolic syndrome? *The American journal of clinical nutrition* 86, s872-877.

Rubinstein, P., Dobrila, L., Rosenfield, R. E., Adamson, J. W., Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Taylor, P. E., and Stevens, C. E. (1995). Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10119-10122.

Rubnitz, J. E., Lensing, S., Zhou, Y., Sandlund, J. T., Razzouk, B. I., Ribeiro, R. C., and Pui, C. H. (2004). Death during induction therapy and first remission of acute leukemia in childhood: the St. Jude experience. *Cancer* 101, 1677-1684.

Samaridis, J., and Colonna, M. (1997). Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *European journal of immunology* 27, 660-665.

- Schadt, E. E., Li, C., Su, C., and Wong, W. H. (2000). Analyzing high-density oligonucleotide gene expression array data. *Journal of cellular biochemistry* 80, 192-202.
- Schilham, M. W., Oosterwegel, M. A., Moerer, P., Ya, J., de Boer, P. A., van de Wetering, M., Verbeek, S., Lamers, W. H., Kruisbeek, A. M., Cumano, A., and Clevers, H. (1996). Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 380, 711-714.
- Schilham, M. W., van Eijk, M., van de Wetering, M., and Clevers, H. C. (1993). The murine Sox-4 protein is encoded on a single exon. *Nucleic acids research* 21, 2009.
- Schrapppe, M. (2003). Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Indian journal of pediatrics* 70, 817-824.
- Schrapppe, M., and Creutzig, U. (2008). Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie In *Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2008: Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen*, D. Krebsgesellschaft, ed. (München: Zuckerschwerdt), pp. 263-275.
- Schrapppe, M., Harbott, J., and Riehm, H. (2005). Akute lymphoblastische Leukämien. In *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, H. Gadner, G. Gaedicke, and C. Niemeyer, eds. (Berlin: Springer), pp. 656-679.
- Schrapppe, M., Reiter, A., Ludwig, W. D., Harbott, J., Zimmermann, M., Hiddemann, W., Niemeyer, C., Henze, G., Feldges, A., Zintl, F., *et al.* (2000a). Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 95, 3310-3322.
- Schrapppe, M., Reiter, A., Zimmermann, M., Harbott, J., Ludwig, W. D., Henze, G., Gadner, H., Odenwald, E., and Riehm, H. (2000b). Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia* 14, 2205-2222.
- Shykind, B. M., Kim, J., and Sharp, P. A. (1995). Activation of the TFIID-TFIIA complex with HMG-2. *Genes Dev* 9, 1354-1365.
- Song, J. H., Kim, H. J., Lee, C. H., Kim, S. J., Hwang, S. Y., and Kim, T. S. (2006). Identification of gene expression signatures for molecular classification in human leukemia cells. *International journal of oncology* 29, 57-64.
- Speck, N. A., and Gilliland, D. G. (2002). Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nature reviews* 2, 502-513.
- Staal, F. J., van der Burg, M., Wessels, L. F., Barendregt, B. H., Baert, M. R., van den Burg, C. M., van Huffel, C., Langerak, A. W., van der Velden, V. H., Reinders, M. J., and van Dongen, J. J. (2003). DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute

lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. *Leukemia* 17, 1324-1332.

Steenbergen, E. J., Verhagen, O. J., van den Berg, H., van Leeuwen, E. F., Behrendt, H., Slater, R. R., von dem Borne, A. E., and van der Schoot, C. E. (1997). Rearrangement status of the malignant cell determines type of secondary IgH rearrangement (V-replacement or V to DJ joining) in childhood B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 11, 1258-1265.

Stros, M., Ozaki, T., Bacikova, A., Kageyama, H., and Nakagawara, A. (2002). HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. *The Journal of biological chemistry* 277, 7157-7164.

Sturn, A., Quackenbush, J., and Trajanoski, Z. (2002). Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 18, 207-208.

Swensen, A. R., Ross, J. A., Severson, R. K., Pollock, B. H., and Robison, L. L. (1997). The age peak in childhood acute lymphoblastic leukemia: exploring the potential relationship with socioeconomic status. *Cancer* 79, 2045-2051.

Tedder, T. F., Zhou, L. J., and Engel, P. (1994). The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today* 15, 437-442.

Theilgaard-Monch, K., Raaschou-Jensen, K., Palm, H., Schjodt, K., Heilmann, C., Vindelov, L., Jacobsen, N., and Dickmeiss, E. (2001). Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets, lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts. *Bone marrow transplantation* 28, 1073-1082.

Tibshirani, R., Hastie, T., Narasimhan, B., and Chu, G. (2002). Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6567-6572.

Tough, D. F., and Sprent, J. (1995). Lifespan of lymphocytes. *Immunol Res* 14, 1-12.

Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5116-5121.

van de Wetering, M., Oosterwegel, M., van Norren, K., and Clevers, H. (1993). Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *The EMBO journal* 12, 3847-3854.

van Dongen, J. J., Macintyre, E. A., Gabert, J. A., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., *et al.* (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report

of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13, 1901-1928.

van Dongen, J. J., Seriu, T., Panzer-Grumayer, E. R., Biondi, A., Pongers-Willemse, M. J., Corral, L., Stolz, F., Schrappe, M., Masera, G., Kamps, W. A., *et al.* (1998). Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 352, 1731-1738.

Vaskova, M., Fronkova, E., Starkova, J., Kalina, T., Mejstrikova, E., and Hrusak, O. (2008). CD44 and CD27 delineate B-precursor stages with different recombination status and with an uneven distribution in nonmalignant and malignant hematopoiesis. *Tissue antigens* 71, 57-66.

Wang, S. Y., Hsu, M. L., Huang, M. Z., Hsu, H. C., Tzeng, C. H., Hung, J. H., and Ho, C. K. (2001). The activity in ex vivo expansion of cord blood myeloid progenitor cells before and after cryopreservation. *Acta Haematol* 105, 38-44.

Wegner, M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic acids research* 27, 1409-1420.

Weiler, S. R., Taylor, S. M., Deans, R. J., Kan-Mitchell, J., Mitchell, M. S., and Trent, J. M. (1994). Assignment of a human melanoma associated gene MG50 (D2S448) to chromosome 2p25.3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 22, 243-244.

Wilson, M. J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S., and Trowsdale, J. (2000). Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4778-4783.

Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M. H., and Lockhart, D. J. (1997). Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature biotechnology* 15, 1359-1367.

Wu, A. G., Michejda, M., Mazumder, A., Meehan, K. R., Menendez, F. A., Tchabo, J. G., Slack, R., Johnson, M. P., and Bellanti, J. A. (1999). Analysis and characterization of hematopoietic progenitor cells from fetal bone marrow, adult bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Pediatric research* 46, 163-169.

Yeoh, E. J., Ross, M. E., Shurtleff, S. A., Williams, W. K., Patel, D., Mahfouz, R., Behm, F. G., Raimondi, S. C., Relling, M. V., Patel, A., *et al.* (2002). Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer cell* 1, 133-143.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Übersicht der Hämatopoese.....	1
Abbildung 1-2	Stadien der Reifung von B-Lymphozyten.....	4
Abbildung 1-3	Die Entwicklung einer B-Zelle.....	5
Abbildung 1-4	Häufigkeit der spezifischen chromosomalen Aberrationen der B- und T-ALL im Kindesalter (Pui et al., 2004a).	11
Abbildung 2-1	Übersicht der Positiv-Selektion der CD19 ⁺ Zellen.....	27
Abbildung 2-2	CD10 ⁺ Selektion, <i>Magnetic Activated Cell Sorting System</i> (MACS).....	29
Abbildung 2-3	Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie.....	31
Abbildung 2-4	GeneChip [®] Array von Affymetrix.....	37
Abbildung 2-5	In situ Oligonukleotidsynthese auf GeneChip Arrays.....	39
Abbildung 2-6	Schematische Darstellung eines gescannten Genechips.....	40
Abbildung 3-1	Prozentualer Anteil der CD19 ⁺ CD10 ⁺ Lymphoblasten.....	49
Abbildung 3-2	Durchflusszytometrische Kontrolle der Zellseparation.....	51
Abbildung 3-3	Unsupervised Cluster Analyse.....	55
Abbildung 3-4	Unsupervised Principal Component Analysis (PCA).....	56
Abbildung 3-5	Significance Analysis of Microarrays (SAM).....	58
Abbildung 3-6	Supervised Cluster Analyse.....	59
Abbildung 3-7	Supervised PCA.....	60
Abbildung 3-8	Cross-validation.....	61
Abbildung 3-9	Klassifikation der 18 Trainingsproben.....	62
Abbildung 3-10	Darstellung des Klassifikators.....	63
Abbildung 3-11	<i>Prediction Analysis of Microarrays</i> (PAM).....	64
Abbildung 4-1	Relative Expression von STK32B.....	75
Abbildung 4-2	Relative Expression von SOX4.....	76
Abbildung 4-3	Relative Expression von HMGB2.....	79
Abbildung 4-4	Relative Expression von LILRA2.....	80
Abbildung 4-5	Relative Expression von PXDN.....	83

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1	Immunologische Klassifizierung der ALL entsprechend der EGIL-Kriterien (Bene et al., 1995)	10
Tabelle 2-1	Übersicht der Methode zur Anreicherung CD19+10+ Lymphoblasten	23
Tabelle 2-2	Übersicht der durchflusszytometrischen Kontrolle.....	32
Tabelle 3-1	Übersicht der Ergebnisse einzelner Aufreinigungsschritte	52
Tabelle 3-2	Übersicht der zur Microarray Analyse eingesetzten Proben....	53
Tabelle 3-3	Qualitätskontrolle der drei zur Microarrayanalyse herangezogenen Proben	54
Tabelle 9-1	Signifikant hochregulierte Gene in cALL Proben im Vergleich zu gesunden CD19 ⁺ CD10 ⁺ Kontrollproben (SAM, cut-off q < 0,875)	105
Tabelle 9-2	Signifikant herunterregulierte Gene in cALL Proben im Vergleich zu gesunden CD19 ⁺ CD10 ⁺ Kontrollproben (SAM, cut-off q < 0,875)	108
Tabelle 9-3	Klassifikator (43 Gene) der <i>Prediction Analysis of Microarrays</i> (PAM)	111

9 Anhang

Tabelle 9-1 Signifikant hochregulierte Gene in cALL Proben im Vergleich zu gesunden CD19⁺CD10⁺ Kontrollproben (SAM, cut-off q < 0,875)

Gen Symbol	Gen Titel	Score (d)	Fold Change	q-value (%)
TPM2	tropomyosin 2 (beta)	-7,200	0,0116	0,0000
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	-6,389	0,0279	0,0000
SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	-6,086	0,0309	0,0000
SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	-5,343	0,0336	0,0000
ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	-4,642	0,0507	0,0000
TYMS	thymidylate synthetase	-4,258	0,1205	0,0000
HMGB2	high-mobility group box 2	-4,973	0,1274	0,0000
ZMIZ1	zinc finger, MIZ-type containing 1	-4,759	0,1328	0,0000
KIAA0101	KIAA0101	-4,107	0,1671	0,0000
STK32B	serine/threonine kinase 32B	-5,454	0,0113	0,0000
PXDN	peroxidasin homolog (Drosophila)	-4,651	0,0532	0,0000
RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	-5,080	0,0681	0,0000
SHCBP1	SHC SH2-domain binding protein 1	-4,015	0,0976	0,0000
PRKCH	protein kinase C, eta	-4,012	0,0845	0,0000
DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	-4,196	0,1793	0,0000
HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	-4,725	0,0422	0,0000
LILRA2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain)	-5,078	0,0560	0,0000
SLC12A4	Solute carrier family 12 (K/Cl transporters), member 4	-4,741	0,1605	0,0000
HSPB1 / MEIS3	heat shock 27kDa protein 1;Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 3 (mouse)	-4,033	0,0352	0,0000
RCBTB2	regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 2	-4,082	0,1324	0,0000
DNTT	deoxynucleotidyltransferase, terminal	-5,406	0,0169	0,0000
ZNF423	zinc finger protein 423	-4,353	0,0781	0,0000
HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	-6,384	0,0148	0,0000
TOX	thymus high mobility group box protein TOX	-4,376	0,1343	0,0000
CSRP2	cysteine and glycine-rich protein 2	-4,170	0,0427	0,0000
HLX1	H2.0-like homeobox 1 (Drosophila)	-4,297	0,0978	0,0000
NKG7	natural killer cell group 7 sequence	-5,983	0,0081	0,0000
RAB13	RAB13, member RAS oncogene family	-5,022	0,0464	0,0000
FLJ23556	hypothetical protein FLJ23556	-4,002	0,0684	0,0000
SPRY2	sprouty homolog 2 (Drosophila)	-4,151	0,0363	0,0000
GPR56	G protein-coupled receptor 56	-5,739	0,0104	0,0000
LILRB2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains)	-5,306	0,0801	0,0000
CFDP1	craniofacial development protein 1	-5,108	0,0944	0,0000
PLXNB2	plexin B2	-4,723	0,0236	0,0000
ADA	adenosine deaminase	-6,688	0,0323	0,0000
LILRB2 / LILRA6 / LOC652626	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2	-4,153	0,0740	0,0000

Gen Symbol	Gen Titel	Score (d)	Fold Change	q-value (%)
AIF1	allograft inflammatory factor 1	-3,986	0,0273	0,0000
PTPLA	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member A	-4,415	0,0753	0,0000
TBCD	tubulin folding cofactor D; tubulin folding cofactor D	-5,078	0,0236	0,0000
NT5DC2	5'-nucleotidase domain containing 2	-5,931	0,0264	0,0000
KIAA1794	KIAA1794	-6,844	0,0292	0,0000
HELLS	helicase, lymphoid-specific	-6,306	0,0297	0,0000
BLMH	bleomycin hydrolase	-4,170	0,1423	0,0000
PBX2	pre-B-cell leukemia transcription factor 2	-4,777	0,0681	0,0000
TCF7L2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	-4,232	0,0483	0,0000
P2RY5	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5	-3,658	0,0726	0,5744
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	-3,767	0,1008	0,5744
SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	-3,708	0,1098	0,5744
C21orf96	chromosome 21 open reading frame 96	-3,938	0,1108	0,5744
GNA15	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class)	-3,858	0,1134	0,5744
ELK3	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	-3,761	0,0804	0,5744
CACNB3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	-3,960	0,1694	0,5744
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	-3,753	0,1329	0,5744
SYNGR1	synaptogyrin 1	-3,834	0,1085	0,5744
PLXND1	plexin D1	-3,760	0,1555	0,5744
CDT1	chromatin licensing and DNA replication factor 1	-3,868	0,1613	0,5744
DHRS3	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	-3,655	0,1112	0,5744
RAB15	RAB15, member RAS oncogene family	-3,685	0,2159	0,5744
AIF1	allograft inflammatory factor 1	-3,799	0,0313	0,5744
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	-3,668	0,0245	0,5744
TCF7L2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	-3,762	0,1146	0,5744
WDFY3	WD repeat and FYVE domain containing 3	-3,913	0,0298	0,5744
NET1	neuroepithelial cell transforming gene 1	-3,637	0,0686	0,7215
PXDN	peroxidasin homolog (Drosophila)	-3,616	0,1282	0,7215
TIAF1 / MYO18A	TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1 ; myosin XVIII A	-3,566	0,1415	0,7215
SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	-3,545	0,1760	0,7215
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	-3,607	0,2281	0,7215
FRMD4B	FERM domain containing 4B	-3,552	0,1166	0,7215
TCF7L2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	-3,456	0,1515	0,7215
ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	-3,511	0,0707	0,7215
ARMCX1	armadillo repeat containing, X-linked 1	-3,479	0,0980	0,7215
ITGA6	integrin, alpha 6	-3,609	0,0131	0,7215
CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	-3,528	0,0980	0,7215
SNX26	sorting nexin 26	-3,584	0,1813	0,7215
MME	membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase)	-3,479	0,0258	0,7215
GNAI1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	-3,461	0,1536	0,7215

Gen Symbol	Gen Titel	Score (d)	Fold Change	q-value (%)
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	-3,572	0,0348	0,7215
LILRA2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 2	-3,465	0,1281	0,7215
PRKCI	protein kinase C, iota	-3,477	0,1573	0,7215
TIMM44	translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog (yeast)	-3,598	0,0894	0,7215
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	-3,577	0,0651	0,7215
SCARF1	scavenger receptor class F, member 1	-3,511	0,0982	0,7215
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	-3,432	0,0714	0,8751
ZAP70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa	-3,373	0,1962	0,8751
SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	-3,399	0,1491	0,8751
SAP30	Sin3A-associated protein, 30kDa	-3,426	0,1048	0,8751
ID2 / ID2B	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein ; inhibitor of DNA binding 2B, dominant negative helix-loop-helix protein	-3,350	0,1022	0,8751
SMAD7	SMAD family member 7	-3,382	0,0997	0,8751
CD58	CD58 molecule	-3,410	0,0947	0,8751
CTGF	connective tissue growth factor	-3,428	0,0095	0,8751
MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase	-3,429	0,1681	0,8751
TCF7L2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	-3,352	0,1881	0,8751
FUT4	fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)	-3,422	0,1452	0,8751
PISD	phosphatidylserine decarboxylase	-3,380	0,2437	0,8751
PTK7	PTK7 protein tyrosine kinase 7	-3,418	0,1698	0,8751
AIF1	allograft inflammatory factor 1	-3,334	0,0432	0,8751
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G	-3,435	0,2524	0,8751

Tabelle 9-2 Signifikant herunterregulierte Gene in cALL Proben im Vergleich zu gesunden CD19⁺CD10⁺ Kontrollproben (SAM, cut-off q < 0,875)

Gen Symbol	Gen Titel	Score (d)	Fold Change	q-value(%)
FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)	7,296	27,9882	0,0000
ADARB1	adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat)	5,425	27,6037	0,0000
IGHD	immunoglobulin heavy constant delta	3,706	24,5881	0,0000
IGHM	immunoglobulin heavy constant mu	3,674	23,2515	0,0000
BLR1	Burkitt lymphoma receptor 1, GTP binding protein (chemokine (C-X-C motif) receptor 5)	4,502	21,7009	0,0000
IGL@	Immunoglobulin lambda locus	4,723	20,5827	0,0000
LOC652128	Similar to Ig heavy chain V-II region ARH-77 precursor ; Similar to Ig heavy chain V-II region ARH-77 precursor	3,910	20,0185	0,0000
MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	4,732	20,0164	0,0000
MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	4,846	19,3702	0,0000
IL8	Interleukin 8	4,079	19,0904	0,0000
FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)	4,199	16,7408	0,0000
IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	3,967	16,0626	0,0000
IGKC / NTN2L / GJB6	immunoglobulin kappa constant; / netrin 2-like (chicken); netrin 2-like (chicken)/gap junction protein, beta 6 (connexin 30)	4,206	15,6475	0,0000
IGLV2-14	immunoglobulin lambda variable 2-14	4,612	15,5988	0,0000
ADAM28	ADAM metallopeptidase domain 28	3,822	15,4426	0,0000
E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding	4,116	15,4396	0,0000
IGHD	immunoglobulin heavy constant delta	3,888	15,3800	0,0000
FCRL2	Fc receptor-like 2 / Fc receptor-like 2	3,951	15,3277	0,0000
OSBPL10	oxysterol binding protein-like 10	4,341	15,2159	0,0000
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	4,311	13,4500	0,0000
CR2	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2	4,244	13,3632	0,0000
IVD	Isovaleryl Coenzyme A dehydrogenase	3,782	13,3448	0,0000
P2RX5	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	3,767	12,7871	0,0000
MARCH1	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1	3,817	11,8461	0,0000
LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog;	4,856	11,6147	0,0000
HLA-C	Major histocompatibility complex, class I, C	4,324	11,4615	0,0000
IL8	Interleukin 8	3,313	11,1926	0,0000
PNOC	prepronociceptin	3,860	11,0302	0,0000
KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	3,451	10,9707	0,0000
BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	4,054	10,9410	0,0000
---	Immunoglobulin light chain variable region complementarity determining region (CDR3) mRNA	3,509	10,8182	0,0000
ARL4A	ADP-ribosylation factor-like 4A	3,489	10,5691	0,0000
IGLJ3	immunoglobulin lambda joining 3	3,785	10,4807	0,0000
SNX10	sorting nexin 10	3,627	10,4567	0,0000
C12orf32	Chromosome 12 open reading frame 32	3,434	10,2967	0,0000
LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog; v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	3,871	10,0836	0,0000

Gen Symbol	Gen Titel	Score (d)	Fold Change	q-value(%)
NTN2L	Netrin 2-like (chicken)	4,162	10,0011	0,0000
ABCB1 / ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member	3,013	9,7031	0,0000
LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	4,207	9,2514	0,0000
HBG1 / HBG2	hemoglobin, gamma A; hemoglobin, gamma G	3,076	9,0733	0,0000
---	Immunoglobulin kappa light chain (IGKV) mRNA variable region, joining region, and constant region	3,967	8,6854	0,0000
CD37	CD37 molecule	4,022	8,4658	0,0000
IGHM	immunoglobulin heavy constant mu;	3,434	8,2619	0,0000
RNGTT	RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase	3,139	8,2348	0,0000
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	3,155	8,1665	0,0000
HBG1 / HBG2	hemoglobin, gamma A; hemoglobin, gamma G;	2,711	8,1318	0,0000
CD48	CD48 molecule	4,935	7,9058	0,0000
---	Immunoglobulin kappa light chain (IGKV gene), cell line JVM-2, clone 1	3,165	7,8385	0,0000
AFF3	AF4/FMR2 family, member 3	3,917	7,7882	0,0000
NCOA3	nuclear receptor coactivator 3	3,163	7,7171	0,0000
HBG1 / HBG2	hemoglobin, gamma A; hemoglobin, gamma G	2,274	7,7155	0,4267
RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	3,198	7,4402	0,4267
IFI6 / IGHA1 / IGHD / IGHG1 / IGHM / IL8 / EXOC7 / IGHV4-31 / ZCWPW2	interferon, alpha-inducible protein 6; immunoglobulin heavy constant alpha 1; immunoglobulin heavy constant delta; immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker); immunoglobulin heavy constant mu; interleukin 8; exocyst complex component 7; immunoglobulin heavy variable 4-31; zinc finger, CW type with PWWP domain 2	2,728	7,4005	0,4267
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)	4,431	7,3165	0,4267
IGL@ / IGLV4-3 / IGLV3-25 / IGLV2-14	immunoglobulin lambda locus; immunoglobulin lambda variable 4-3; immunoglobulin lambda variable 3-25; immunoglobulin lambda variable 2-14	3,671	7,2666	0,4267
HLA-C	Major histocompatibility complex, class I, C	3,218	7,2506	0,4267
HLA-DOB	major histocompatibility complex, class II, DO beta	2,795	7,2267	0,4267
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)	3,657	6,9297	0,4267
PIP5K1B	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	2,705	6,9201	0,4267
TANK	TRAF family member-assoc NFKB activator	2,643	6,8971	0,4267
HLA-C	Major histocompatibility complex, class I, C	3,289	6,8523	0,4267
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)	3,679	6,8359	0,4267
IL8	Interleukin 8	3,337	6,6819	0,4267
MTSS1	metastasis suppressor 1	2,981	6,6305	0,4267
P2RY10	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 10	3,087	6,5255	0,4267
TRAK1	trafficking protein, kinesin binding 1	3,545	6,5080	0,6579
IGL@	Immunoglobulin lambda locus	3,603	6,5052	0,6579
ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	2,593	6,4845	0,6579

Gen Symbol	Gen Titel	Score (d)	Fold Change	q-value(%)
TRIB2	tribbles homolog 2 (Drosophila)	2,553	6,4666	0,6579
CTSZ	cathepsin Z	2,729	6,4224	0,6579
KIAA0746	KIAA0746 protein	3,700	6,4202	0,6579
SPIB	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related);	3,225	6,3849	0,6579
NCF1 / NCF1B / NCF1C	neutrophil cytosolic factor 1, (chronic granulomatous disease, autosomal 1); neutrophil cytosolic factor 1B pseudogene;neutrophil cytosolic factor 1C pseudogene	2,728	6,3681	0,6579
IGHM	immunoglobulin heavy constant mu	2,747	6,2965	0,6579
IGLJ3	immunoglobulin lambda joining 3	4,247	6,2646	0,8751
MTSS1	metastasis suppressor 1	3,377	6,1574	0,8751

Tabelle 9-3 Klassifikator (43 Gene) der *Prediction Analysis of Microarrays (PAM)*

Probe Set ID*	Gene Symbol	Gene Title	ALL score	FEB score
219686_at	STK32B	serine/threonine kinase 32B	0,2934	-1,4668
210487_at	DNTT	deoxynucleotidyltransferase, terminal	0,2223	-1,1117
216705_s_at	ADA	adenosine deaminase	0,1728	-0,8641
211052_s_at	TBCD	tubulin folding cofactor D; tubulin folding cofactor D	0,1548	-0,7738
203373_at	SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	0,1529	-0,7643
204083_s_at	TPM2	tropomyosin 2 (beta)	0,1427	-0,7134
214192_at	NUP88	Nucleoporin 88kDa	-0,1382	0,691
213008_at	KIAA1794	KIAA1794	0,1316	-0,6579
204798_at	MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	0,1295	-0,6474
202252_at	RAB13	RAB13, member RAS oncogene family	0,119	-0,595
206760_s_at	FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)	-0,1189	0,5944
203821_at	HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	0,1187	-0,5935
212070_at	GPR56	G protein-coupled receptor 56	0,0978	-0,4889
203865_s_at	ADARB1	adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat)	-0,0943	0,4717
218051_s_at	NT5DC2	5'-nucleotidase domain containing 2	0,0936	-0,4681
220085_at	HELLS	helicase, lymphoid-specific	0,0881	-0,4406
207030_s_at	CSRP2	cysteine and glycine-rich protein 2	0,0847	-0,4235
221349_at	VPREB1	pre-B lymphocyte gene 1	0,0816	-0,4081
213915_at	NKG7	natural killer cell group 7 sequence	0,0802	-0,4011
222303_at	---	---	0,0749	-0,3747
206126_at	BLR1	Burkitt lymphoma receptor 1, GTP binding protein (chemokine (C-X-C motif) receptor 5)	-0,0737	0,3685
210356_x_at	MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	-0,0708	0,3539
203372_s_at	SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	0,0686	-0,3428
217418_x_at	MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	-0,0625	0,3125
208893_s_at	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	0,0546	-0,2732
211644_x_at	IGKC / NTN2L / GJB6	immunoglobulin kappa constant; immunoglobulin kappa constant; netrin 2-like (chicken); gap junction protein, beta 6 (connexin 30)	-0,0399	0,1994
216984_x_at	IGL@	Immunoglobulin lambda locus	-0,0366	0,1831
220570_at	RETN	resistin	0,0315	-0,1576
201890_at	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	0,0313	-0,1567
219271_at	GALNT14	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine	0,0308	-0,1539
204118_at	CD48	CD48 molecule	-0,0289	0,1444
212606_at	WDFY3	WD repeat + FYVE domain containing 3	0,0257	-0,1285
210448_s_at	P2RX5	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	-0,023	0,1151
208808_s_at	HMGB2	high-mobility group box 2	0,0218	-0,1088
202625_at	LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	-0,0213	0,1067
219452_at	DPEP2	dipeptidase 2	-0,0208	0,104
202870_s_at	CDC20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	0,015	-0,0748
208536_s_at	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	-0,0107	0,0537
212577_at	SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	-0,0079	0,0393
213095_x_at	AIF1	allograft inflammatory factor 1	0,0073	-0,0365

Probe Set ID*	Gene Symbol	Gene Title	ALL score	FEB score
217875_s_at	TMEPAI	transmembrane, prostate androgen induced RNA	-0,0037	0,0187
211010_s_at	NCR3	natural cytotoxicity triggering receptor 3	-0,0029	0,0143
212013_at	PXDN	peroxidasin homolog (Drosophila)	0,0007	-0,0035

* Affymetrix HG-U133A GeneChip®

Danksagung

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. med. S. Burdach und Dr. rer. nat. G. Richter für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe zur Durchführung meiner Doktorarbeit. Bei Dr. Richter möchte ich mich besonders für die Anregungen, Diskussionen und Unterstützung bedanken, besonders auch für die Erklärungen im Bereich der Bioinformatik und der Analysetechniken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an PD Dr. med. V. Jacobs und Dr. med. M. Niemeyer der Gynäkologie des Klinikum rechts der Isar, München und PD Dr. Robert A.J. Oostendorp und seiner Arbeitsgruppe aussprechen, für die äußerst freundliche und angenehme Zusammenarbeit. Danke an das Hebammen-Team, für das Engagement und die vielen Nabelschnurblutentnahmen, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können!

Mein Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe im Forschungslabor der Kinderklinik Schwabing. An Collette Zobywalski, die mich gutmütig in die experimentelle Arbeit einwies, mir die grundlegenden Fertigkeiten beibrachte und immer sehr hilfsbereit war. An Andreas Mollweide und Stefan Pirson, die mir mit viel Geduld und Ausdauer stets für Fragen am Computer und der Durchflusszytometrie zur Verfügung standen. An Daniela Schenk für die angenehme Zusammenarbeit. An Sabine Heim für die Ermutigung in zahlreichen Nachtschichten, die wir gemeinsam im Labor bestritten.

Ich möchte mich bedanken beim Team der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Hilfe.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie für all die Unterstützung, besonders an meinen Vater, für all die Diskussionen, Ratschläge und die Motivation.

Danke an Hayley für die Unterstützung und Ermutigung. Danke Jöran für die Hilfe beim Formatieren.

Curriculum Vitae

Beate Cornelia Beinvogl, geb. am 22.10.1982 in München

Schulbildung

- 1988 – 1992 **Rudolf-Steiner Schule Gröbenzell**
1992 – 1993 **Cammerloher Grundschule, München**
1993 – 1994 **Maria-Ward-Gymnasium, München**
1994 – 1997 **Millbrook Highschool, New York, USA**
1997 – 2001 **Europäische Schule München, Englischer Zweig (Abitur)**

Studium/Weiterbildung

- 10/2001 – 03/2002 **Studium der Physik**
Ludwig-Maximilians-Universität München
- 04/2002 – 03/2004 **Studium der Humanmedizin**
Ludwig-Maximilians-Universität München
- 03/2004 **Ärztliche Vorprüfung**
- 05/2004 – 08/2007 **Studium der Humanmedizin**
Technische Universität München
- Famulaturen und Klinische Praktika**
Projekt 'Salud y Paz', Xela, Guatemala
Hospital No. 6, Peking, China
Fachklinik für Innere Medizin Neuwittelsbach, München
Praxis für Radiologie Dr. med. Scheid, München
Internistische Gemeinschaftspraxis Dr. med. H. Tittus, München
Krankenhaus Barmherzige Brüder, München
St. Lukes Medical Center, Milwaukee, WI, USA
- 02/2008 – 02/2009 **Praktisches Jahr mit Wahlfach Pädiatrie**
Kantonspital Frauenfeld, Frauenfeld, Schweiz
Kinderspital der Universität Zürich, Zürich, Schweiz
Kinderklinik München Schwabing der TU München
New York University Medical School, New York, USA
- 05/2009 **Staatsexamen Humanmedizin**
- 08/2009 – aktuell **Assistenzärztin Kinderklinik Starnberg**

Förderung

- 2001 – 2004 Bayerische Begabtenförderung
2004 – 2009 Max-Weber-Stipendium der Deutschen Studienstiftung

München, den 05. Juni 2010