

Untersuchung primärer Neuroblastome auf Deletion des *LSAMP*-Gens

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Lucas Möhle

aus Memmingen

Gießen 2019

Aus dem Institut für Humangenetik,
unter der Leitung von Prof. Dr. Dagmar Nolte
(kommissarische Leitung Forschung und Lehre) und
PD Dr. Axel Weber (kommissarische ärztliche Leitung),
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Axel Weber

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Bräuninger

Tag der Disputation: 02.07.2020

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1. Neuroblastom..... | 1 |
| 1.1.1 Definition und Allgemeines..... | 1 |
| 1.1.2 Epidemiologie..... | 1 |
| 1.1.3 Histologie..... | 2 |
| 1.1.4 Klinik..... | 3 |
| 1.1.5 Diagnose..... | 4 |
| 1.1.6 Stadieneinteilung nach INSS (International-Neuroblastoma-Staging-System)..... | 6 |
| 1.1.7 Therapie..... | 7 |
| 1.1.8 Prognose..... | 8 |
| 1.1.9 Tumorgenetik..... | 10 |
| 1.1.9.1 DNA-Gehalt der Tumor-Zellen..... | 11 |
| 1.2 LIMBIC SYSTEM-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN, LSAMP..... | 13 |
| 1.2.1 Genbeschreibung und Funktion..... | 13 |
| 1.2.2 Varianten und Tumorgenese..... | 15 |
| 1.3 Aufgabenstellung..... | 17 |
| 2. Materialien..... | 18 |
| 2.1. Chemikalien..... | 18 |
| 2.2. Computerprogramme..... | 18 |
| 2.3. Enzyme und Nukleotide..... | 18 |
| 2.4. Geräte..... | 18 |
| 2.5. Kits..... | 19 |
| 2.6. Lösungen und Puffer..... | 20 |
| 2.7 Verbrauchsmaterialien..... | 20 |
| 2.8 Tumormaterial..... | 21 |
| 2.9 DNA aus Zellkulturen..... | 24 |
| 3. Methoden..... | 25 |
| 3.1 DNA-Extraktion..... | 25 |
| 3.2 DNA-Quantifizierung..... | 25 |
| 3.3 PCR..... | 26 |
| 3.3.1 Grundlagen der PCR..... | 26 |
| 3.3.1.1 Grundlagen der Real-Time-PCR..... | 27 |
| 3.3.2 Durchführung der PCR..... | 28 |
| 3.3.2.1 Durchführung der <i>LSAMP</i> -CNV-Real-Time-PCR (<i>LSAMP</i> -CNV-qPCR)..... | 28 |
| 3.3.2.2 Effizienzbestimmung der <i>LSAMP</i> -CNV-qPCR..... | 29 |
| 3.3.2.3 Auswertung der <i>LSAMP</i> -CNV-qPCR..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 3.4 Primerdesign | 32 |
| 3.5 Microarray..... | 33 |
| 3.5.1 Auswertung von Microarray-Neuroblastom-Daten | 33 |
| 3.6 Auswertung von Neuroblastom Expressions-Daten der „R2: Neuroblastoma Genomics Analysis and Visualization Platform“ | 35 |
| 4. Ergebnisse | 38 |
| 4.1 Etablierung und Validierung der <i>LSAMP</i> -CNV-qPCR | 38 |
| 4.2 Untersuchung primärer Neuroblastome auf genomische Veränderungen im <i>LSAMP</i> - Gen | 39 |
| 4.2.1 Neuroblastome mit Verdacht auf Veränderungen im <i>LSAMP</i> -Gen im Rahmen einer NGS-Studie..... | 39 |
| 4.2.2 Neuroblastome mit Verdacht auf Veränderungen im <i>LSAMP</i> -Gen innerhalb veröffentlichter Microarraydatensätze (GEO2R Daten)..... | 41 |
| 4.2.3 Untersuchung primärer Neuroblastome ohne Information zum <i>LSAMP</i> -Gen | 43 |
| 4.3 Untersuchung verschiedener Zelllinien | 45 |
| 4.3.1 Ergebnisse der Neuroblastom-Zelllinien..... | 45 |
| 4.3.2 Ergebnisse der Zelllinien verschiedener Ursprungsgewebe..... | 48 |
| 4.4 Ergebnisse der Neuroblastom-Expressions-Datensätze | 51 |
| 4.4.1 Gesamtüberleben der Patienten mit Neuroblastom Stadium 1-4 nach INSS | 51 |
| 4.4.2 Gesamtüberleben der Patienten mit Neuroblastom Stadium 1-3 nach INSS | 52 |
| 4.4.3 Gesamtüberleben der Patienten mit Neuroblastom Stadium 4 nach INSS | 53 |
| 4.4.4 Gesamtüberleben von Patienten ohne <i>MYCN</i> -Amplifikation..... | 54 |
| 4.4.5 Gesamtüberleben von Patienten mit <i>MYCN</i> -Amplifikation | 55 |
| 4.4.6 Gesamtüberleben von Patienten >/<18 Monaten bei Erstdiagnose | 55 |
| 5. Diskussion..... | 57 |
| 5.1 Genomische Veränderungen von <i>LSAMP</i> in primären Tumoren..... | 57 |
| 5.2 Genomische Veränderungen von <i>LSAMP</i> in Zelllinien | 63 |
| 5.3 <i>LSAMP</i> -Expression..... | 65 |
| 6. Zusammenfassung | 70 |
| 7. Summary | 71 |
| 8. Abkürzungsverzeichnis..... | 72 |
| 9. Abbildungsverzeichnis | 74 |
| 10. Tabellenverzeichnis | 75 |
| 11. Literaturverzeichnis | 76 |
| 12. Anhang..... | 84 |
| 12.1 Votum der Ethikkommission Köln zur Neuroblastomstudie 2004 | 84 |
| 12.2 Einwilligung zur Studienteilnahme | 85 |
| 12.3 Lizenz für Abbildungen aus der "R2: genome analysis and visualization platform"..... | 90 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 13. Erklärung zur Dissertation | 91 |
| 14. Danksagung..... | 92 |

1. Einleitung

1.1. Neuroblastom

1.1.1 Definition und Allgemeines

Das Neuroblastom ist ein bösartiger Tumor, der von Zellen des sympathischen Nervensystems ausgeht. Es wird den embryonalen Tumoren zugeordnet, für die ein Auftreten im frühen Kindesalter charakteristisch ist. Die Zellmorphologie ähnelt embryonalen Vorläuferzellen, den Neuroblasten. Primäre Neuroblastome sind in Geweben des sympathischen Nervensystems lokalisiert. Sie können vom Nebennierenmark, zervikalem-, thorakalem- und abdominalem Grenzstrang sowie den sympathischen Paraganglien ausgehen. In etwa jedem zweiten Fall liegen bereits bei der Erstdiagnose Metastasen vor. Häufig sind dabei Knochenmark, Knochen, Lymphknoten und die Leber betroffen. Seltener sind Metastasen im Gehirn oder in der Haut lokalisiert. Die initiale Symptomatik ist maßgeblich von der Lokalisation des Neuroblastoms abhängig. Neben der Ausbreitung und Metastasierung des Tumors, sowie dem Patientenalter, spielen molekulargenetische Marker eine wesentliche Rolle in der Prognose des Neuroblastoms.

1.1.2 Epidemiologie

Das Neuroblastom ist das häufigste solide, extrakraniell auftretende Malignom im Kindesalter. 7,2 % der bösartigen Erkrankungen bis zur Vollendung des 15. Lebensjahres sind dieser Erkrankung zuzuordnen (Olshan, 2005). Die Inzidenz in der europäischen Gesamtbevölkerung beträgt 1,78/100.000. Betrachtet man nur die unter 15-Jährigen, so liegt die Inzidenz bei 8,82/100.000. Die Prävalenz wird europaweit mit 15,1/Million Menschen angegeben (Gatta et al., 2012). In Deutschland erkrankten zwischen 2005 und 2015 im Durchschnitt 120-130 Kinder jährlich. Jungen erkranken etwa 1,3-mal so häufig wie Mädchen. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei etwa 15 Monaten (Deutsches Kinderkrebsregister, 2016). 90 % der Erkrankungen werden vor dem 5. Lebensjahr diagnostiziert (Berthold, 2002). Unter dem von 1993-2000 v.a. in Japan durchgeführten Neuroblastom-Screening-Programm wurden mehr Neuroblastome diagnostiziert. Hierbei wurden vermehrt niedrigere Krankheitsstadien detektiert. Der erhoffte Effekt, als Vorsorgemaßnahme für fortgeschrittene Stadien mit schlechter Prognose, blieb jedoch aus. Der Grund hierfür ist wohl, dass Neuroblastome einerseits eine sehr hohe Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen, andererseits ein nicht geringer

Teil in Spontanregression geht. Aufgrund der potentiellen Überdiagnosen und der damit einhergehenden unnötigen Behandlungen, wurde das Neuroblastom-Screening in Deutschland nicht eingeführt. 2015 wurden in Deutschland über 99 % der Patienten in die NB2004-Studie eingeschlossen, um die Therapie und die Prognose des Neuroblastoms zu verbessern (Schilling et al., 2003).

1.1.3 Histologie

Periphere neuroblastische Tumore werden morphologisch in vier Gruppen eingeteilt (Shimada et al., 1999): Das Neuroblastom wird histologisch vom Ganglioneuroblastom-intermixed, nodulären Ganglioneuroblastom und vom Ganglioneurom unterschieden.

Neuroblastome bestehen aus neuroblastischen Zellen variabler Morphologie und dünnen Schwann-Zell-Septen. Die Schwann-Zellen besitzen ein typisches Oberflächenprotein, S-100 genannt. Das Neuroblastom wird nach der INPC-Klassifikation (International Neuroblastoma Pathology Committee) unterteilt in einen undifferenzierten, einen gering differenzierten und einen differenzierten Subtyp.

Der seltene *undifferenzierte Subtyp* kann, aufgrund fehlender eindeutiger Morphologie, nur mittels zusätzlicher Untersuchungen, wie der Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie oder molekulargenetischen Untersuchungen diagnostiziert werden.

Beim *gering differenzierten Subtyp* sind weniger als 5 % der Tumorzellen differenziert. Die Diagnose lässt sich aufgrund des Neuropils und der typischen Homer-Wright-Rosetten histologisch stellen. Der Anschnitt erscheint makroskopisch, ebenso wie beim undifferenzierten Subtyp, hämorrhagisch.

Im *differenzierten Subtyp* liegen über 5 % differenzierte Tumorzellen vor, eingebettet in reichlich Neuropil. Die Zellen besitzen exzentrisch gelegene, große Kerne mit Kernkörperchen, umgeben von eosinophilem oder amphophilem Zytoplasma. Das Präparat erscheint im Anschnitt makroskopisch dunkelgelb.

Zusätzlich zur Untergliederung in die o.g. Subtypen, kann jedem Neuroblastom histologisch ein Mitose-Karyorrhexis-Index (MKI) zugeordnet werden, welcher die Anzahl an mitotischen und sich im Zerfall befindlicher Zellen pro 5000 Tumorzellen angibt.

Das **Ganglioneuroblastom-intermixed** besteht aus über 50 % Schwann-Zellen. Es sind nur noch kleine Herde mit neuroblastischen Zellen und reifenden Ganglionzellen im Neuropil nachweisbar.

In **nodulären Ganglioneuroblastomen** liegen neuroblastische Knoten neben Schwann-Zell-haltigen Arealen, ähnlich dem Gewebe im Ganglioneuroblastom-intermixed oder Ganglioneuromen.

Das **Ganglioneurom** wird in einen reifen und einen reifenden Subtyp untergliedert. Beide bestehen hauptsächlich aus Schwann-Zell-Gewebe mit unterschiedlich reifen Ganglienzellen. Im reifen Subtyp liegen ausgereifte Schwann-Zellen, sowie reife Ganglienzellen, umgeben von Satellitenzellen vor. Die Schwann-Zellen werden durch Perineuralzellen in Faszikel unterteilt. Im reifenden Subtyp erscheinen diese Zellen noch nicht so differenziert. Makroskopisch stellen sich die Anschnitte von Ganglioneuromen dunkelgelb dar (Shimada und Ambros, 2005).

1.1.4 Klinik

Die Symptome des Neuroblastoms sind häufig unspezifisch. Bei einem großen Teil der Patienten handelt es sich um Säuglinge oder Kleinkinder. Dies erschwert die Beurteilung der Symptomatik v.a. in frühen Krankheitsstadien. Über 30 % der Diagnosen werden in Deutschland im Rahmen von Routineuntersuchungen gestellt (Powell et al., 1998). Die Symptome unterscheiden sich abhängig von der Lokalisation des Primärtumors und dem Stadium der Erkrankung, vor allem durch eine möglicherweise bereits erfolgte Metastasierung bedingt, erheblich.

Abdominale Schmerzen oder Schmerzen durch Knochenmetastasen treten in etwa 30 % der Erkrankungsfälle auf und sind damit die am häufigsten beobachteten Symptome. Eine fehlende Gewichtszunahme oder Gewichtsverlust wird bei 11 % der erkrankten Kinder beobachtet. Durch eine Vergrößerung des Lebervolumens kann es zu einer Einschränkung der Atemmechanik bis hin zur Dyspnoe kommen. Weiter kann ein Harnstau oder ein Ileus Folge eines Neuroblastoms sein. Subkutan liegende, palpable Knoten, teilweise als „Blueberry-Sign“ sichtbar, sprechen für eine Metastasierung in die Haut. Ein spezifischeres Symptom ist ein beidseitig auftretendes Brillenhämatom, verursacht durch eine tumorbedingte, intraorbitale Raumforderung. Seltener (5,4 % der NB90/97 Studie) wächst ein Neuroblastom durch ein Neuroforamen in den Spinalkanal ein. Dadurch kann es zu einer Querschnittssymptomatik kommen, die durch motorische

Ausfälle, radikuläre Schmerzen, Sphinkterfunktionsstörungen und sensorische Ausfälle ein spezifisches Symptom darstellt. Therapieresistente Durchfälle können durch eine Überproduktion an Vasoaktivem Intestinalem Peptid (VIP) der Neuroblasten verursacht werden. Bei 4 % der Patienten wurde eine Diarrhoe, mit daraus folgender Hypokaliämie und Dehydratation beobachtet. Das Horner-Syndrom (Horner'sche Trias) ist sehr spezifisch für ein zervikal lokalisiertes Neuroblastom. Zusätzlich zu der in 2,4 % der Fälle beobachteten Trias aus Ptosis, Miosis und Enophthalmos kann eine Heterochromie der beiden Regenbogenhäute auftreten, deren Ursache ebenfalls in einer Beeinträchtigung der zervikalen, sympathischen Ganglien liegt. Die Pathogenese des in 1,3 % der Fälle aufgetretenen Opsomyoklonus-Ataxie-Syndroms hingegen ist bislang noch unklar. Der Nachweis von Autoantikörpern legt eine autoimmune, paraneoplastische Genese nahe. Die Patienten zeigen schnelle, unregelmäßige Augenbewegungen, sowie Ataxie und Myoklonus der Extremitäten, des Körperstamms und der Augenlider. Auch kognitive- und Verhaltensstörungen können auftreten. Etwa gleich häufig wie das Opsomyoklonus-Ataxie-Syndrom tritt ein Hypertonus auf. Dieser kann sowohl durch eine direkte Kompression der Arteria renalis durch den Tumor und dadurch verursachter Aktivierung des RAAS-Systems, als auch durch eine Sekretion von vasoaktiven Substanzen entstehen. In diesem, etwas seltenerem zweiten Fall, werden von den Neuroblasten vor allem Katecholamin-Metabolite wie Dopamin, Epinephrin und Norepinephrin ausgeschüttet (Berthold und Simon, 2005).

1.1.5 Diagnose

Bei Verdacht auf ein Neuroblastom, sollte stets die Entnahme von mindestens zwei Gewebeprobe(n) angestrebt werden. Die Diagnose eines Neuroblastoms kann dann in den meisten Fällen bereits vom Pathologen gestellt werden, sofern ein lichtmikroskopisch eindeutiger Befund des Tumorgewebes vorliegt. In diesem Fall werden keine Immunhistologie, Elektronenmikroskopie oder erhöhte Katecholamin-Metabolite zur Diagnosestellung benötigt. Werden eindeutige Tumorzellen in einer Knochenmarkbiopsie festgestellt, muss jedoch zusätzlich ein erhöhter Spiegel an Katecholaminen im Blut oder im Urin zur Diagnosestellung vorliegen. Wird radiologisch der Verdacht auf ein Neuroblastom geäußert, lässt sich dieser durch im Blut oder Urin erhöhte Katecholamin-Metabolite oder durch eine Metaiodbenzylguanidin-Szintigraphie (MIBG-Scan) erhärten.

Der Ausschluss von differentialdiagnostisch in Frage kommenden Tumoren, wie einem Phäochromozytom oder einem reifen Ganglioneurom, kann jedoch nur durch eine Gewebeuntersuchung erfolgen.

Nach Diagnosestellung ist ein komplettes Staging durchzuführen. Dieses umfasst die Bestimmung der Katecholaminmetabolite in Serum und Urin und der neuronenspezifischen Enolase. Zusätzlich hat eine MR- und sonographische-Bildgebung, eine MIBG-Scan und Knochenmarkdiagnostik zu erfolgen. Vor Therapieeinleitung sind ggf. weitere Untersuchungen bei Einsatz von kardio-, oto- und nephrotoxischen Zytostatika durchzuführen.

Genetisch untersuchtes Tumormaterial kann diagnostisch wegweisende und prognostisch relevante Informationen liefern. Neben der Diagnosestellung, können beim Neuroblastom Tumormarker auch zur Verlaufskontrolle und Prognoseabschätzung eingesetzt werden. Die oben genannten Katecholamin-Metabolite haben hierbei die größte Aussagekraft. Die Vanillinmandelsäure und die Homovanillinsäure werden vorrangig im Urin bestimmt. Die Bestimmung im Serum und die Mitbestimmung von Dopamin können in manchen Fällen ergänzend erfolgen. Falsch positive Ergebnisse werden nach dem Konsum von großen Mengen Apfelsaft und bei Kindern mit Neurodermitis beobachtet. Wie in anderen neuroektodermalen Tumoren, ist bei Neuroblastompatienten ebenfalls die Neuronenspezifische Enolase erhöht. Der Vorteil dieses im Vergleich zu den Katecholamin-Metaboliten unspezifischeren Tumormarkers, liegt in der Möglichkeit der Verlaufskontrolle und der prognostischen Aussagekraft. Ebenfalls zu prognostischen Zwecken sinnvoll, ist die Bestimmung des Ferritins bei Diagnosestellung. Erhöhte Ferritinspiegel sind zwar nicht spezifisch für das Neuroblastom, jedoch lässt sich von Neuroblasten produziertes Ferritin biochemisch differenzieren (Hann et al., 1985).

Die Höhe des Chromogranin A Spiegels korreliert in höheren Stadien mit der Prognose. Wie das Chromogranin A, ist auch das Neuropeptid Y mit der Katecholaminausschüttung vergesellschaftet. Dessen Spiegel stehen in Zusammenhang mit dem Stadium und der Differenzierung des Neuroblastoms. Die Laktatdehydrogenase hilft als allgemeiner Zellumsatzmarker zwar nicht bei der Differentialdiagnose weiter, kann jedoch helfen, die Aktivität der Erkrankung einzuschätzen (Berthold und Simon, 2005).

1.1.6 Stadieneinteilung nach INSS (International-Neuroblastoma-Staging-System)

Das Neuroblastom wird nach dem International-Neuroblastoma-Staging-System in fünf Gruppen gegliedert (Stadium 1-4 und 4S, siehe Tabelle 1). Dabei werden sowohl die Lage des Primärtumors, als auch ein Lymphknotenbefall in der Klassifikation berücksichtigt. In Ergänzung zur INSS-Klassifikation, welche erst postoperativ erstellt werden kann, existiert noch eine präoperative Einteilung, das International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS). Diese Einteilung basiert auf in der Bildgebung gewonnenen Informationen. Abhängig von der Anzahl der so ermittelten Risikofaktoren (IDRFs = image defined risk factors), erfolgt die Einteilung in die Stadien L1, L2, M und MS. Die Stadien L1 und L2 beschreiben lokalisierte Krankheitsstadien. Im Stadium M liegt nach bildgebenden Kriterien eine Metastasierung vor. Das Stadium MS beschreibt ein ähnliches Patientenkollektiv wie das Stadium 4S nach INSS, allerdings liegt die Altersgrenze höher, bei 18 Monaten. Die INRGSS-Klassifikation schätzt das operative Komplikationsrisiko anhand der IDRFs ab (National Cancer Institute, 2002; La Quagila und Michael, 2005).

| Internationale Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INSS | |
|---|---|
| Stadium 1 | Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter Entfernung (mit oder ohne mikroskopischem Resttumor); repräsentative ipsi- und kontralaterale Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall. Lediglich unmittelbar am Tumor adhärenente, chirurgisch entfernte Lymphknoten dürfen positiv sein. Auch bilaterale Tumoren, die makroskopisch komplett exstirpiert werden können und keinen regionalen Lymphknotenbefall aufweisen, gehören zum Stadium 1. |
| Stadium 2a | Unilateraler Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung; repräsentative ipsi- oder kontralaterale Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall. |
| Stadium 2b | Unilateraler Tumor; regionale, ipsilaterale, nichtadhärenente Lymphknoten zeigen Tumorbefall, kontralaterale Lymphknoten sind histologisch negativ. |
| Stadium 3 | Nichtresektabler unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie mit oder ohne Lymphknotenbefall oder unilateraler lokalisierter Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall oder nichtresektabler Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration oder durch Lymphknotenbefall (bis zur oder über die gegenseitige Wirbelkante hinaus). |
| Stadium 4 | Disseminierung des Tumors ins Knochenmark, in Knochen, zu entfernten Lymphknoten, Leber, Haut und/oder anderen Organen. |

| | |
|-------------------|--|
| Stadium 4S | Lokalisierter Primärtumor wie beim Stadium 1, 2a oder 2b und Disseminierung nur in Leber, Haut und/oder Knochenmark. Nur Säuglinge im 1. Lebensjahr. Die Knochenmarkinfiltration ist gering (weniger als 10 % Tumorzellen im Ausstrich, mIBG für Knochenmark negativ). Übergang in das Stadium 4 möglich. |
|-------------------|--|

Tabelle 1: INSS Klassifikation aus der Neuroblastomstudie NB 97

1.1.7 Therapie

Zur Behandlung werden Neuroblastom-Patienten in drei Risikogruppen unterteilt. Es wird eine Beobachtungsgruppe (Low-Risk), von einer Standard/Mittleres-Risiko-Gruppe (Intermediate Risk) und einer Hoch-Risiko-Gruppe (High Risk) unterschieden. Die Gemeinsamkeit in allen Risikogruppen ist, dass wenn möglich primär eine komplette Tumorentfernung angestrebt werden soll. Die Entscheidung, ob der Patient operabel ist, sollte immer multidisziplinär im Rahmen eines Tumor-Boards getroffen werden. Maßgebend ist das Risiko für den Patienten, wie es beispielsweise durch die IDRFs der INRGSS-Klassifikation abgeschätzt wird. Bevor ein Patient in eine der Studiengruppen aufgenommen wird, muss die Diagnose histologisch gesichert sein. Zusätzlich muss der *MYCN*-Amplifikations- und 1p-Aberrations-Status im Rahmen eines initialen Stagings geklärt sein. Selbstverständlich muss auch das Einverständnis der Eltern und sofern einwilligungsfähig, auch des Patienten vorliegen. Bei weiblichen Patienten im gebärfähigen Alter ist eine sichere Kontrazeption zu gewährleisten.

In die Beobachtungsgruppe werden Patienten abhängig von ihrem Alter (< 2 Jahre), ohne *MYCN*-Amplifikation oder 1p-Aberration der INSS-Stadien 1-3 und 4S eingeschlossen. Sie erhalten nach der primären Operation aufgrund ihrer günstigen Prognose, mit über 90 % Gesamtüberleben, nur bei Symptompersistenz eine Chemotherapie. Alle Patienten werden in festgeschriebenen Abständen kontrolliert (Simon et al., 2017).

Zur Standard-Risiko-Gruppe zählen im Vergleich zur Beobachtungsgruppe ältere Kinder, Patienten mit 1p-Aberration, oder solche im INSS Stadium 4 ohne *MYCN*-Amplifikation. Sie erhalten nach der Operation 6 Blöcke intensive Chemotherapie, gefolgt von 4 oralen Chemotherapieblöcken. Abhängig vom dann noch vorhandenen Befund, schließt sich eine Bestrahlung des Resttumors oder eine erneute Operation an.

Patienten, die älter als 6 Monate sind und zu den INSS-Stadien 1, 2, 3 und 4S gehören, beziehungsweise älter als 12 Monate im INSS-Stadium 4 und eine *MYCN*-

Amplifikation aufweisen, werden der Hochrisiko-Gruppe zugeordnet. Die Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) empfiehlt nach der Operation sechs Zyklen Chemotherapie, bei Ansprechen eine ¹³¹I-mIBG-Therapie, gefolgt von einer myeloablativen Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation. Sofern notwendig können anschließend noch eine Bestrahlung und eine Immuntherapie folgen (La Quagila und Michael, 2005; NB2004, 2016; Simon et al., 2017).

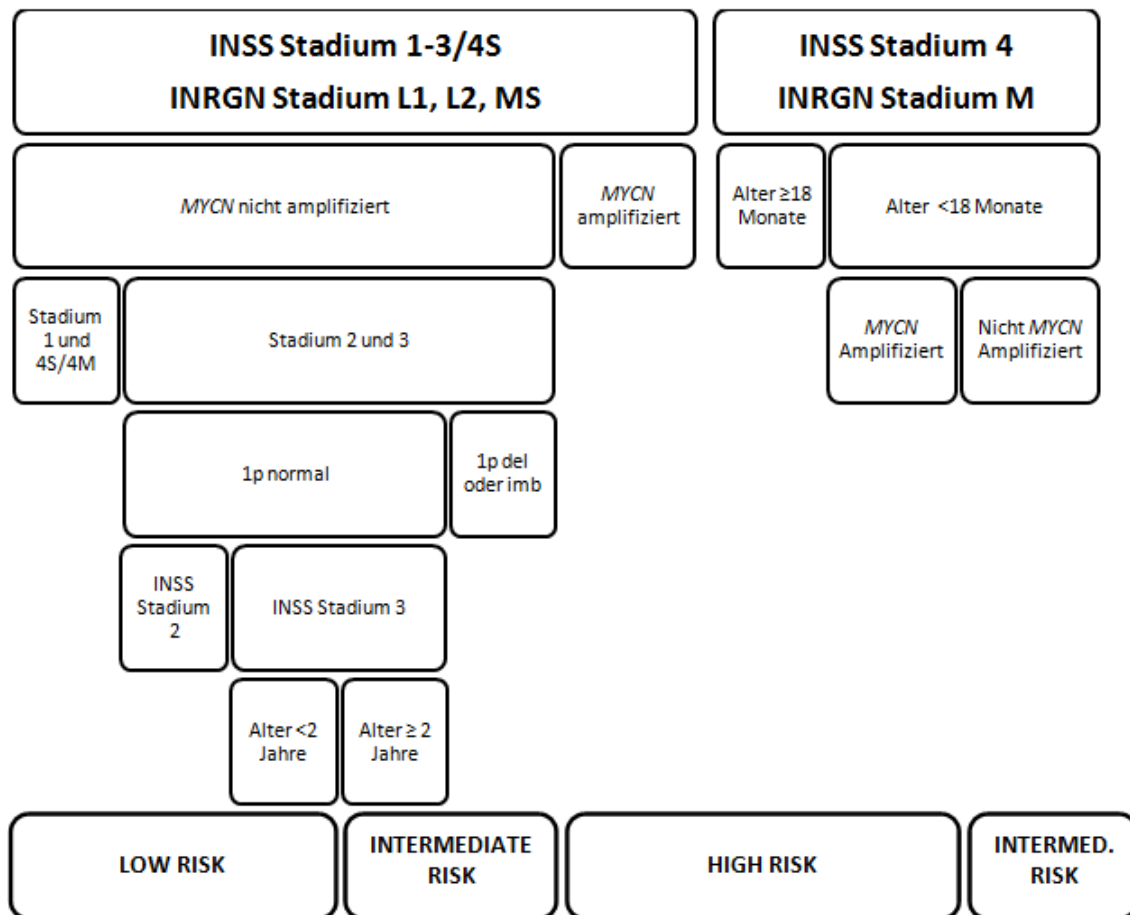


Abbildung 1: Einteilung in Behandlungsgruppen nach Simon et al., 2017

1.1.8 Prognose

Zwischen August 1989 und Dezember 2008 wurden unter verschiedenen Studienprotokollen (NB90, NB95, NB97 und NB04) insgesamt 2603 Patienten in die deutsche Neuroblastom-Studie eingeschlossen. Sie hatten unabhängig von Stadium, Alter und anderen prognostischen Faktoren im Schnitt ein 5-Jahres-ereignisfreies Überleben von 62,3 %, sowie ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 73,3 % (Simon et al., 2012). Die stadienabhängige Analyse nach INSS der Daten von 836 Patienten aus der NB90 Studie ergibt für das Stadium 1 ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 99 %. Im

Stadium 2 sinkt dieses auf 93 %, im Stadium 3 auf 80 %. 77 % der Patienten mit einem Stadium 4S Neuroblastom überlebten trotz großem Primärbefund und initialer Metastasierung 5 Jahre. Deutlich geringer ist das 5-Jahres-Gesamtüberleben für Patienten im Stadium 4, mit nur 31 %.

Zusätzlich zur Stadieneinteilung bei Diagnosestellung, hat auch das Alter einen Einfluss auf die Prognose. Die 615 ausgewerteten Fälle unter einem Jahr, hatten dabei mit 85 % ein mehr als doppelt so hohes 5-Jahres-Überleben wie die 1028 Kinder über einem Jahr, mit nur 42 %. Die altersbezogene Stadieneinteilung bestätigt diesen Trend für alle Stadien. Das 5-Jahres-Überleben, für die Stadien 1-3 zusammengefasst, sinkt auf 76 % bei über Einjährigen gegenüber 95 % bei jüngeren Kindern. Im Stadium 4 ist dies mit 53 % zu 20 % ebenso der Fall. Das Stadium 4S, zu welchem definitionsgemäß nur Kinder unter einem Jahr zählen, wies ein 5-Jahres Überleben von 79 % auf (Berthold, 2002). Es stellt sich eine günstige Prognose-Gruppe mit den Stadien 1-3 und 4S gegenüber Stadium 4 heraus.

Ein zusätzlicher prognostischer Faktor ist der *MYCN*-Status des Patienten. Bei etwa 25 % aller Patienten liegt das auf Chromosom 2p liegende Gen amplifiziert vor (Huang und Weiss, 2013). Dies geht mit einem verkürzten ereignisfreien Überleben und verkürzter Gesamtüberlebenszeit einher. Die *MYCN*-Amplifikation gewinnt als negativer prognostischer Faktor vor allem bei Patienten mit sonst günstigen Eigenschaften, wie geringem Alter bei Diagnosestellung und niedrigem Stadium nach INSS, an Bedeutung (Tonini et al., 1997; Bordow et al., 1998).

Eine Prognoseeinschätzung des Neuroblastoms ist auch anhand histologischer Kriterien und dem Alter der Patienten bei Diagnosestellung möglich. So werden nach der International Neuroblastoma Pathology Classification nach Shimada günstige und ungünstige Prognosen unterschieden. Die in ihr enthaltenen Parameter erlauben im Vergleich zur früher verwendeten Einteilung nach Joshi eine signifikantere Unterscheidung in zwei prognostische Gruppen. Für Patienten mit günstiger Prognose kann nach der retrospektiven Arbeit von Shimada et al. 1999 ein ereignisfreies Dreijahresüberleben von 85 % angenommen werden. Wird hiernach eine ungünstige Prognose gestellt, ermittelte die Studie für den gleichen Zeitraum ein ereignisfreies Überleben von nur 41 % (Shimada et al., 1999; Shimada und Ambros, 2005).

| Prognostisch günstig | Prognostisch ungünstig |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Neuroblastome mit niedrigem und mittlerem MKI, bei Diagnosestellung jünger als 18 Monate - Differenzierte Neuroblastome mit niedrigem MKI im Alter von 1,5-5 Jahren - Ganglioneuroblastome intermixed, jeden Alters | <ul style="list-style-type: none"> - Neuroblastome jeden Alters, mit hohem MKI - Im Alter von 1,5-5 Jahren diagnostizierte undifferenziert und schlecht differenzierte Neuroblastome - Im Alter von 1,5-5 Jahren diagnostizierte Neuroblastome mit mittlerem MKI - Nach dem 5. Lebensjahr diagnostizierte Neuroblastome - Noduläre Ganglioneuroblastome jeden Alters |
| <p>Der MKI beschreibt die Anzahl an mitotischen und sich im Zerfall befindlichen Zellen: niedriger MKI: <100 /5000; mittlerer MKI: 100-200/5000; hoher MKI: >200/5000</p> | |

Tabelle 2: Prognoseeinschätzung von Neuroblastom-Patienten nach der International Neuroblastoma Pathology Classification (Shimada-System).

1.1.9 Tumorgenetik

Für Neuroblastome wird eine Vielzahl genetischer Veränderungen beschrieben, die in der Regel somatisch, d.h. nur in den Tumorzellen vorliegen. Bei einigen wenigen Familien sind Keimbahnmutationen beschrieben. Diese hereditären Neuroblastome sind sehr selten, zumal viele Patienten das Reproduktionsalter nicht erreichen. Die Stammbaumanalyse von Familien mit hereditären Neuroblastomen deutet auf einen autosomal dominanten Erbgang mit inkompletter Penetranz hin. Die Erkrankung übersprang teilweise eine Generation und trat innerhalb der Familien bezüglich des Alters bei der Diagnosestellung, den biologischen Eigenschaften, sowie Stadium und Überleben, sehr variabel auf. Die Erkrankung präsentierte sich, insbesondere auch in ihrer Penetranz, sehr unterschiedlich zwischen den einzelnen Familien (Marris und Brodeur, 2005). Bekannte Risikogenene hereditärer Neuroblastome sind beispielsweise *ALK* und *PHOX2B* (Tolbert et. al., 2017).

Für die sehr viel häufigeren, spontan entstandenen Neuroblastome, existieren einige typische zytogenetische Veränderungen. Der wohl prognostisch wichtigste genomische Faktor in humanen Neuroblastomen ist die Amplifikation des *MYCN*-Protoonkogens auf dem kurzen Arm des Chromosom 2 (Huang und Weiss, 2013).

Als morphologisches Korrelat können in den Tumorzellen häufig sogenannte dmns (double-minute-bodies) oder HSRs (homogeneously staining chromosomal regions)

nachgewiesen werden. Während HSRs als homolog anfärbare Regionen der Chromosomen imponieren, stellen dmns kleine, neben den Chromosomen liegende DNA-Abschnitte dar. Der genomische Inhalt der dmns und HSRs in Zellen des gleichen Tumors stimmt dabei überein. Dies legte die Annahme nahe, dass in Tumorzellen freie dmns in Chromosomen eingebaut werden können und dann den HSRs entsprechen (Storlazzi et al., 2010). Für dmns wird in primären Neuroblastomen eine Häufigkeit von 45 %, für HSRs eine Häufigkeit von 3 % angegeben (Brodeur und Fong, 1989).

Der Verlust eines elterlichen Allels auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (LOH, loss of heterozygosity 1p36) konnte in 23 % der untersuchten Neuroblastome festgestellt werden (Attiyeh et al., 2005). In dieser Region wird mindestens ein für die Entstehung des Neuroblastoms mit verantwortlichem Tumorsuppressorgen vermutet. Eine Deletion auf Chromosom 1p korreliert mit einer *MYCN*-Amplifikation. Bei der Analyse der SRO (smallest region of overlapping deletions) konnten interessanterweise unterschiedliche Regionen für *MYCN* amplifizierte und nicht amplifizierte Neuroblastome eingegrenzt werden (Schwab, 2005).

Ein LOH 11q23 konnte in 34 % der untersuchten Neuroblastome nachgewiesen werden, in 17 % lag eine Deletion dieses Abschnitts zugrunde (Attiyeh et al., 2005). 17 % der 915 untersuchten Neuroblastome wiesen einen Verlust der Heterozygotie (LOH) von Chromosom 11q auf. Diese ist bei nicht *MYCN* amplifizierten Patienten mit einer verkürzten ereignisfreien- und verkürzten Gesamtüberlebenszeit assoziiert. Weitere Deletionen sind für die Chromosomen 3p21-pter, 4p16, 9p21-24, 11q14-23, 14q32, 16p12-13, 18q21 und 19q13 beschrieben (Marris und Brodeur, 2005). Ein Zugewinn von DNA am langen Arm von Chromosom 17 geht ebenfalls mit einer schlechteren Langzeitprognose einher (Lastowska et al., 1997; Bown et al., 1999).

1.1.9.1 DNA-Gehalt der Tumor-Zellen

Genetische Instabilität ist ein typisches Zeichen von entarteten Zellen, ausgehend von Störungen der natürlichen DNA Replikations- und Reparatursmechanismen. Neuroblastome lassen sich diesbezüglich in zwei Gruppen einteilen. Ein Teil der Tumore besitzt einen diploiden Chromosomensatz, einem DNA-Index (DI) von eins entsprechend. Diese Patienten weisen eine schlechtere Therapieansprechrate im Vergleich zu Patienten mit hyperdiploidem-DNA-Gehalt ($DI > 1$) auf. Folglich konnte

bei Patienten mit hyperdiploidem-DNA-Gehalt auch in über 90 % der untersuchten Fälle ein Langzeitergebnisfreies-Überleben beobachtet werden. Weiter wurden unter den diploiden Neuroblastomen mehr *MYCN*-Amplifikationen entdeckt, als unter den Hyperdiploiden. Somit stellt die Diploidie einen ergänzenden negativen prognostischen Marker zu *MYCN* dar. Diese Beobachtungen treffen bis zu einem Alter bei Diagnosestellung von 24 Monaten zu. Es konnte kein Zusammenhang zwischen DNA-Gehalt der Tumorzellen und Erfolg der Behandlung bei älteren Kindern festgestellt werden (Look et al., 1984; Look et al., 1991).

Die Entstehungsmechanismen der hyperdiploiden Tumorzellen sind bislang nicht abschließend geklärt. Wahrscheinlich geht die Entwicklung von tetraploiden Zellen aus (Lundberg et al., 2013). Einer gesamten Verdopplung des Genoms, durch beispielsweise Fehler in der Mitose, folgt demnach ein kontinuierlicher Verlust von Chromosomen hin zu hyperdiploiden Zellen. Zusätzlich besteht ein Selektionsvorteil gegenüber Zellen mit Monosomien. Diese Theorie erklärt auch die hohe intratumorale Variation der Chromosomenanzahl. Die Masse der Tumorzellen eines Neuroblastoms besitzt einen peritriploiden Chromosomensatz. Vorausgesetzt, dass ein fortschreitender Chromosomenverlust irgendwann zum Absterben der Zellen führt, könnte theoretisch über diesen Mechanismus die spontane Regression von Stadium 1 und Stadium 4S Neuroblastomen erklärt werden. Warum andere Tumorstadien, insbesondere solche mit einer *MYCN*-Amplifikation, nicht diesen günstigen Verlauf nehmen, kann anhand dieser Theorie nicht erklärt werden. Möglicherweise läuft in diesen Tumoren der gesamte Chromosomenverlust langsamer ab (Lundberg et al., 2013).

1.2 LIMBIC SYSTEM-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN, LSAMP

1.2.1 Genbeschreibung und Funktion

LSAMP (OMIM*603241; alternative Gensymbole: LAMP oder IGLON3), ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Zusammen mit dem Opioid-binding cell adhesion molecule (OBCAM), Neuronal growth regulator 1 (NEGR1) und Neurotrimin bildet es die IgLON (LAMP, OBCAM und Neurotrimin) Unterfamilie. IgLONs bilden durch Homo- oder Heterodimerisierung funktionelle Einheiten, sogenannte Diglons (Pimenta et al., 1996; Reed et al., 2007).

Das *LSAMP*-Gen umfasst 644 kb, verteilt auf 7 Exons (e!Ensembl). In der Promotorregion des Gens befindet sich eine CpG Insel (Kresse et al., 2009). Das Gen wurde auf Chromsom 3q13.2-q21 lokalisiert (Pimenta et al., 1998).

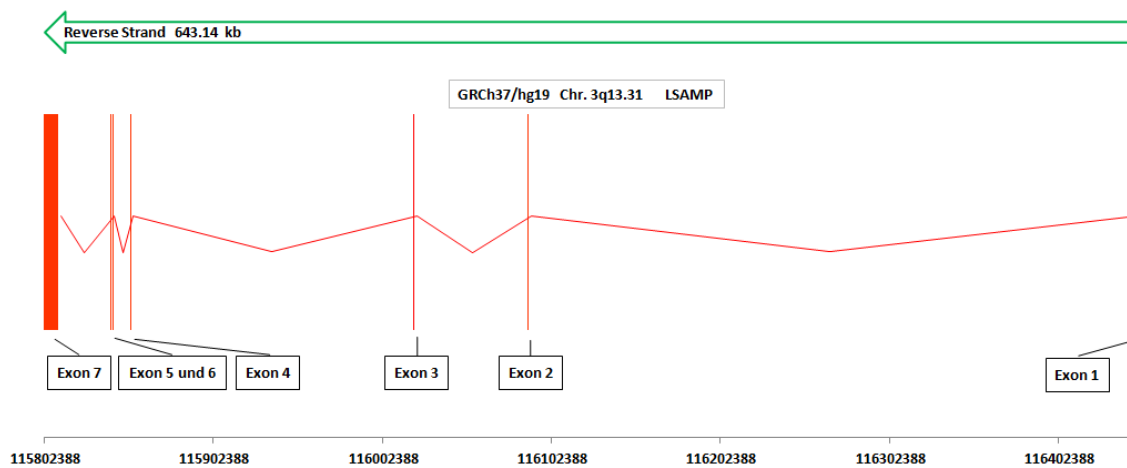


Abbildung 2: Darstellung des *LSAMP*-Gens von Exon 1-7 (e!Ensembl).

Pimenta und Kollegen klonierten erstmals das humane *LSAMP*-Gen, ausgehend von vom Ratten-Genom bekannten cDNA-Sequenzen. Dabei stellten sie eine hohe Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen von 94 % zwischen Ratten- und menschlichem Genom fest. Das 338 Aminosäuren lange Protein weist, da der genetische Code degeneriert ist, sogar eine Übereinstimmung von 99 % zwischen den genannten Spezies auf (Pimenta et al., 1996).

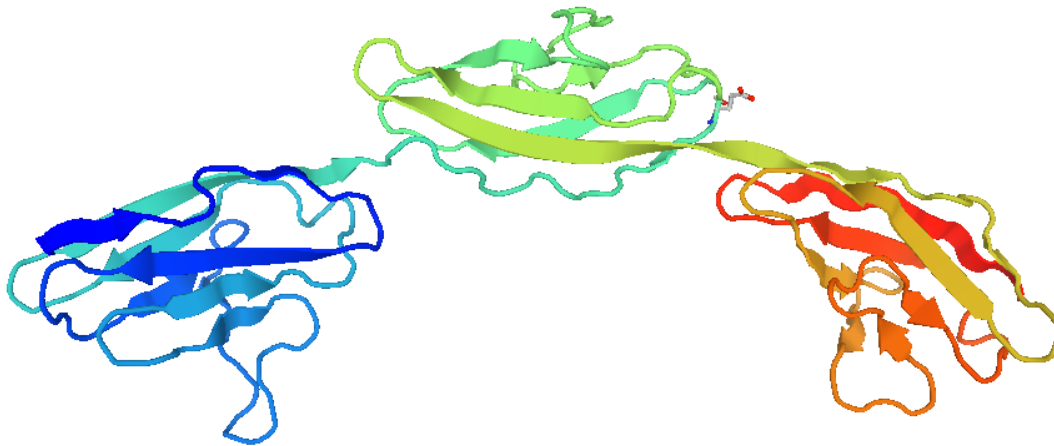


Abbildung 3: Tertiärstruktur des LSAMP-Proteins (Q13449) (Bienert et al., 2017). Aus SWISS MODEL Repository, Lizenz gemäß <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Das Protein besitzt am N-Terminus eine Signalsequenz, welche dem Protein-Targeting in das Endoplasmatische Retikulum dient. C-Terminus befindet sich eine hydrophobe Aminosäuresequenz. Diese ist typisch für Membranproteine mit einem Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker. In dem Protein befinden sich acht mutmaßliche Stellen für N-Glykosylierungen. Zusätzlich sind drei Immunoglobulin Domänen, gekennzeichnet durch Cystein-Paare, vorhanden. Diese Domänen finden sich bei anderen Proteinen der Immunoglobulin-Superfamilie wieder, welche an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind (Pimenta et al., 1996; Pimenta et al., 1998).

Das LSAMP Protein konnte in kortikalen und subkortikalen Regionen des limbischen Systems nachgewiesen werden (Levitt, 1984). In einer Immunfluoreszenzfärbung färbten sich in adultem Hirngewebe der präfrontale und perirhinale Cortex, das ventrale Pallidum, anteriore, mediodorsale und periventriculäre Thalamuskern, große Teile des Hypothalamus, der Amygdala, der Formatio Reticularis und autonome Hirnstammkerne an. In Untersuchungen an Ratten-Föten konnte ein komplexes zeitliches Auftreten des LSAMP Proteins nachgewiesen werden. Im Unterschied zu adulten, färbten sich in fetalen Hirnschnitten zusätzlich zum Zytoplasma und den Dendriten auch die Axone der limbischen Neurone an. Eine Blockade von LSAMP durch monoklonale Anti-LSAMP Antikörper bewirkte keine direkte Wachstumshemmung der Neurone, jedoch verhinderte es die Innervation von Strukturen des limbischen Systems. LSAMP scheint angesichts dieser Ergebnisse eine wichtige Rolle bei der Verbindung funktioneller Systeme während der Entwicklung des Gehirns/ZNS zu haben (Horton und Levitt, 1988; Keller et al., 1989).

1.2.2 Varianten und Tumorgenese

Im Zusammenhang mit der Untersuchung von Translokations-Bruchstellen beim klarzelligen Nierenzellkarzinom wurde erstmals die Rolle von *LSAMP* im Rahmen der Tumorentstehung diskutiert (Chen et al., 2003). Die detektierte Translokations-Bruchstelle auf Chromosom 3 befindet sich in Intron 2 des *LSAMP*-Gens. Für das zweite, nicht an der Translokation beteiligte Allel konnte eine Promotor-Methylierung und ein damit herunter regulierter *LSAMP*-Promotor nachgewiesen werden. Die Herunterregulierung bestätigte sich in einer verminderten Expression von *LSAMP*. Möglicherweise ist das *LSAMP*-Gen Teil eines mehrstufigen Prozesses der Tumorentstehung. Die Inaktivierung beider *LSAMP*-Allele in einem Tumor lässt auf ihre Funktion als mögliche Tumorsuppressorgene schließen. In der Zellkultur bewirkte eine Einschleusung von *LSAMP* mittels Plasmid eine Wachstumshemmung von Nierenzellkarzinom-Zellen (Kanayama et al., 2001; Chen et al., 2003).

Ntougkos und Kollegen beschreiben eine größtenteils verminderte Expression von *LSAMP* in Epithelialen Ovarialkarzinomen (seröser, klarzelliger, muzinöser und endometroider Tumor), im Vergleich zu normalem Ovarialgewebe. Hohe *LSAMP*-Expressionslevel korrelieren dabei mit einer stärkeren Differenzierung der Zellen (Ntougkos et al., 2005).

Eine häufige genomische Deletion des Abschnitts auf Chromosom 3q13.31, in der unter anderem das *LSAMP*-Gen enthalten ist, ist für Osteosarkome beschrieben (56 % der untersuchten Tumore) (Kresse et al., 2009). Die Bestimmung der Expression von *LSAMP* ergab teils erniedrigte Werte sowohl für Tumore mit als auch ohne Deletion im *LSAMP*-Gen, verglichen mit normalem Knochengewebe. Zusätzlich konnte in einigen Fällen eine Methylierung der *LSAMP*-Promotorregion mit einer verminderten Expression in Zusammenhang gebracht werden. Die Betrachtung der Prognose der Patienten mit erniedrigter *LSAMP*-Expression ergab einen signifikanten Zusammenhang mit kürzerem Überleben.

Ein häufiges Auftreten von mono- und biallelischen Deletionen auf Chromosom 3q13.31 in Osteosarkomen konnte von Pasic und Kollegen bestätigt werden. Vergleichende Untersuchungen der Tumorproben mit Blutproben der jeweiligen Patienten zeigten, dass die detektierten Veränderungen in allen Fällen auf somatische Ereignisse in den Tumorzellen zurückzuführen sind. Keimbahnmutationen konnten

nicht nachgewiesen werden. Punktmutationen in den kodierenden Bereichen des *LSAMP*-Gens konnten in Osteosarkomen und Nierenzellkarzinomen nicht nachgewiesen werden (Chen et al., 2003; Pasic et al., 2010). Lediglich ein stiller Polymorphismus in Exon 4 einiger Osteosarkome wurde von Pasic und Kollegen beschrieben. Eine weitere Arbeitsgruppe identifizierte *LSAMP* innerhalb der Deletion 3q13.31 im Osteosarkom (Barøy et al., 2014). Untersuchungen der Expression zeigten jedoch, dass diese nicht allein von der Anzahl der Gen-Kopien abhängt. Des Weiteren konnte kein klarer Zusammenhang zwischen der Höhe der mRNA- und der Protein-Expression hergestellt werden.

Eine Einschleusung des *LSAMP*-Gens in Zellen mit homozygoter *LSAMP*-Deletion (IOR/OS14-Zelllinie) zeigte sowohl in vitro als auch in vivo eine signifikante Verlangsamung des Wachstums und der Tumorbildung im Vergleich zu den unbehandelten Tumorzellen (Barøy et al., 2014). Zusätzlich beeinflusste die Reexpression von *LSAMP* die Expression von drei weiteren Genen. Die Gene *HES1* (hairy and enhancer of split 1), *CTAG2* (cancer/testis antigen 2) und *KLF10* (kruppel-like factor 10) wiesen eine Überexpression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf. Der Einfluss von *LSAMP* auf die Expression von in der Tumorbildung bekannten Genen stellt einen ersten Erklärungsansatz der Funktion von *LSAMP* in der Tumorgenese dar.

1.2.3 *LSAMP*-Expression in Neuroblastomen

Uns sind keine Veröffentlichungen zur *LSAMP*-Expression in Neuroblastomen, sowie Auswirkungen der Expression auf das Überleben der Patienten bekannt. In der Internetdatenbank „R2: Genomics Analysis and Visualization Platform“ ist für sieben Expressionsdatensätze von Neuroblastomen eine Auswertung bezüglich des Gesamtüberlebens nach Kaplan-Meier möglich. In den Datensätzen sind neben dem Gesamtüberleben auch der *MYCN*-Status, das Stadium nach INSS, sowie teilweise eine Einordnung in die Altersgruppen \geq / $<$ 18 Monate hinterlegt.

1.3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist eine Beschreibung der Rolle genomischer Kopienzahlveränderungen des *LSAMP*-Gens in der Entstehung humaner Neuroblastome.

Dazu wurde eine quantitative Real-Time-PCR für das *LSAMP*-Gen etabliert. Mittels dieser Untersuchung wollen wir die Häufigkeit von Deletionen für jedes Exon des Gens beschreiben. Die Validierung der Methode erfolgte an zuvor mittels Micro-Array untersuchten Zelllinien, in denen eine Deletion verschieden großer Abschnitte des *LSAMP*-Gens nachgewiesen werden konnte. Diese dienten als Positivkontrolle für die quantitative Real-Time-PCR.

Um einen Eindruck über die Häufigkeit einer *LSAMP*-Deletion in primären Neuroblastomen zu gewinnen, haben wir genomische DNA aus primären Neuroblastomen verschiedener Gewebekbanken untersucht.

Zunächst konnten wir Neuroblastom-Proben aus der Tumorbank in Köln untersuchen, welche im Rahmen einer Next-Generation-Sequencing-Untersuchung Auffälligkeiten im Bereich des *LSAMP*-Gens gezeigt haben. Weitere Tumorproben (ebenfalls aus der Tumorbank in Köln) mit einer potentiellen *LSAMP*-Deletion konnten wir über eine Analyse, der in einer öffentlichen Datenbank (Gene Expression Omnibus; GEO2R) verfügbaren Neuroblastom-Micro-Array-Daten auswählen.

Im Anschluss wurde eine Gruppe von n=37 Neuroblastomen ohne eine Vorabinformation über eine Deletion des Chromosomenabschnitt 3q13 auf Deletionen innerhalb des *LSAMP*-Gens untersucht.

Neben der Untersuchung weiterer Neuroblastom-Zelllinien, wurden auch Zelllinien anderer Ursprungsgewebe auf Deletionen im *LSAMP*-Gen untersucht, um festzustellen, ob Veränderungen dieses Genabschnitts neuroblastomspezifisch sind. Für einige Tumorarten sind Deletionen im *LSAMP*-Gen bereits vorbeschrieben.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Höhe der *LSAMP* Expression und dem klinischen Verlauf von Neuroblastompatienten beschreiben zu können, wurden in einem weiteren Schritt Expressionsdaten von Neuroblastomen unterschiedlicher Datensätze einer öffentlichen Datenbank bezüglich deren Gesamtüberleben ausgewertet.

2. Materialien

2.1. Chemikalien

| | |
|-----------------|----------------------|
| Betain | Sigma, Steinheim |
| Ethanol (96%) | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Merck, Darmstadt |
| Genagarose L.E. | Inno-Train, Kronberg |

2.2. Computerprogramme

| | |
|-------------------|---|
| Real-Time-PCR: | Bio-Rad CFX Manager 3.1 |
| Primerdesign: | Oligo 6.71 (www.oligo.net) |
| Expressionsdaten: | R2: Kaplan Meier Scanner (Pro) http://r2.amc.nl |

2.3. Enzyme und Nukleotide

| | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| iTaq Universal SYBR Green Supermix | Bio Rad, Kalifornien, USA |
| Hot Start Mix S | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Primer: Biolegio | Nijmegen, Niederlande |

2.4. Geräte

| | |
|-----------------------|---|
| Analysenwaagen: | |
| PM400 | Mettler Toledo, Gießen |
| LabStyle 5001 | Mettler Toledo, Gießen |
| Eiszubereiter: | |
| AF 80 | Scotsman/Frimont, Pogliano Milanese, Italien |
| Elektrophorese-Kämme: | |
| 14, 20 Taschen | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen |

2. Materialien

| | |
|---------------------------------------|--|
| Gelschlitten (100ml und 150 ml) | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Horizontale Gelelektrophorese-Kammern | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Thermomixer Compact | Eppendorf, Hamburg |
| Mikrowelle KOR-6305 | DAEWOO, Seoul, Südkorea |
| NanoDrop 2000 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

Pipetten:

| | |
|---------|------------------------|
| 2 µl | Gilson, Middleton, USA |
| 10µl | Gilson, Middleton, USA |
| 20 µl | Gilson, Middleton, USA |
| 100 µl | Gilson, Middleton, USA |
| 200 µl | Gilson, Middleton, USA |
| 1000 µl | Gilson, Middleton, USA |

Spannungsquelle:

| | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Biometra | Biometra, Göttingen |
| Sofortbildkamera Bio-Print | Kaiser |
| Thermocycler, MJ Mini | Bio Rad, Kalifornien, USA |
| CFX384 Real-Time System | Bio Rad, Kalifornien, USA |
| Tischzentrifuge, Fresco 21 | Heraeus, Hanau |
| UV-Illuminator Macro Vue UV 25 | Hoefler, San Francisco, USA |
| Gel-Imager | Intas, Göttingen |
| Vortex RS1 | IDL, Nidderau |

2.5. Kits

| | |
|----------------------------|----------------|
| DNeasy Blood & Tissue Kit. | Qiagen, Hilden |
|----------------------------|----------------|

2.6. Lösungen und Puffer

| | |
|--------------------------|---|
| Laufpuffer/Ladepuffer | 40% Sucrose (w/v) 1x TBE 0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25 % Xylen-Zyanol (w/v) |
| 100 bp DNA Ladder | Invitrogen, Kalifornien, USA |
| 1x TBE | 200ml 5x TBE ad 800ml H ₂ O dd |
| 5x TBE (Tris-Borat-EDTA) | 53.91 g/l (0.445 M) Tris-Base 27.52 g/l (0.445 M) Borsäure 3.72 g/l (0.01 M) EDTA pH 8,1-8,5 ad 5000 ml H ₂ O dd |

2.7 Verbrauchsmaterialien

| | |
|-------------------------------------|---|
| Eppendorf Gefäße (0,5, 1,5, 2 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| Falcon Tube (15 ml) | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| 0,2 ml Streifen/Hütchen, | Sarstedt, Nümbrecht |
| Multiply- μ Strip Pro 8er Kette | |
| Hard-Shell PCR plates 384-well | Bio Rad, Kalifornien, USA |
| Microseal ‚B‘ seal Seals | Bio Rad, Kalifornien, USA |

2.8 Tumormaterial

In der Arbeit verwendete DNA stammt aus der Tumorbank der Universitätsklinik Köln, sowie aus dem NBL Labor des Universitäts-Kinderklinikums Leipzig. Bei den Proben aus der Tumorbank in Köln handelt es sich um genomische DNA von Neuroblastomen verschiedener Stadien, die im Rahmen einer Studie mittels Next Generation Sequencing (NGS) auf genomische Veränderungen hin untersucht wurden. Dabei wurden bei n=13 von 201 Auffälligkeiten im Bereich des *LSAMP* Gens nachgewiesen, die auf eine Kopienzahlveränderung hindeuten können. Eine genaue Aussage zum *LSAMP*-Gen kann aus der genannten Untersuchung nicht gewonnen werden, da die Genkopienzahl in diesem Bereich über relativ große Abschnitte gemittelt wurde (persönliche Kommunikation mit Frau Dr. Ackermann, Universitätskinderklinik Köln, Abteilung Kinderonkologie und –hämatologie, Experimentelle Kinderonkologie). Die DNA dieser Tumore wurde uns freundlicherweise zur Untersuchung zur Verfügung gestellt (siehe Tabelle 3).

| Tumor ID | Stadium nach INSS | Alter bei Erst-diagnose in Tagen | NMYC-Amplifikation | Status (08/16) | Überleben in Tagen ab Diagnosestellung | Zeit von Diagnose bis Ereignis/letzte Info in Tagen | Histologie und Prognose nach INPC |
|----------|-------------------|----------------------------------|--------------------|----------------|--|---|--|
| 2972094 | 4s | 84 | 1 | lebt | 1919 | 1919 | NB, gering differenziert, stromaarm, günstig |
| 2972102 | 4s | 3 | 1 | Rezidiv | 3867 | 164 | NB, gering differenziert, stromaarm, günstig |
| 2972110 | 3 | 227 | 1,5 | Rezidiv | 1775 | 112 | NB, gering differenziert, stromaarm, ungünstig |
| 2972140 | 3 | 860 | 1 | lebt | 3009 | 3009 | NB, gering differenziert, stromaarm, ungünstig |
| 2972149 | 4 | 150 | 1 | lebt | 1470 | 1470 | NB, gering differenziert, stromaarm, günstig |

2. Materialien

| | | | | | | | |
|---------|----|------|-----|--------------|------|------|--|
| 2972242 | 4s | 193 | 1 | lebt | 4774 | 4774 | NB, gering differenziert, stromaarm, günstig |
| 2972361 | 4 | 1325 | 1,5 | Rezidiv | 2590 | 833 | NB, gering differenziert, stromaarm, ungünstig |
| 2972370 | 3 | 279 | 1 | Rezidiv | 3136 | 738 | NB, gering differenziert, stromaarm, ungünstig |
| 2972380 | 1 | 98 | 1 | lebt | 776 | 776 | NB, gering differenziert, stromaarm, günstig |
| 2972398 | 4 | 3749 | 16 | lebt | 3287 | 3287 | NB, undifferenziert, stromaarm, ungünstig |
| 2972536 | 3 | 49 | 1 | Rezidiv | 3230 | 59 | NB, gering differenziert, stromaarm, günstig |
| 2974350 | 4 | 1644 | 1 | lebt | 3861 | 3861 | NB, gering differenziert, stromaarm, ungünstig |
| 2974378 | 4 | 536 | 15 | Verstorbenen | 220 | 212 | NB, undifferenziert, stromaarm, ungünstig |

Tabelle 3: Beschreibung der Tumorproben aus dem NGS, Universitätskinderklinik Köln, Abteilung Kinderonkologie und –hämatologie, Experimentelle Kinderonkologie (08/2016).

Bei den Proben aus dem NBL-Labor in Leipzig handelt es sich um DNA von n= 37 Tumoren, von denen keine genetischen Informationen des *LSAMP* Bereiches vorlagen. Für 7 Tumore lag uns zusätzlich DNA aus Rezidivtumoren vor (siehe Tabelle 4). Des Weiteren wurden uns, ebenfalls aus Köln, zusätzlich n=4 Tumor-DNAs zur Verfügung gestellt, bei denen aus Datenbankinformationen (GEO2R) der Verdacht auf eine Kopienzahlveränderung im *LSAMP* Gen abgeleitet werden konnte (siehe 3.5 Microarray, Tabelle 5).

2. Materialien

| Patientennummer | Rezidiv (Monate nach ED) | Alter bei Diagnose in Monaten | Status (05/2013) | Überleben in Monaten | Stadium nach INSS | MYCN-Status | LSAMP-Status |
|-----------------|--------------------------|-------------------------------|------------------|----------------------|-------------------|--------------|-------------------|
| 871581 | | 10,67 | verstorben | 13,167 | 4 | amplifiziert | Del. Ex. 2+3 |
| 908142 | | 2,67 | verstorben | 7,425 | 4 | amplifiziert | 0 |
| 908743 | | 52,03 | verstorben | 18,348 | 3 | amplifiziert | 0 |
| 918483 | | 42,63 | verstorben | 5,973 | 4 | amplifiziert | 0 |
| 928223 | | 57,60 | verstorben | 12,573 | 4 | amplifiziert | 0 |
| 928861 | | 11,97 | verstorben | 4,686 | 4 | amplifiziert | Dupl. Ex. 1+3-6 |
| 930751 | | 48,30 | verstorben | 15,18 | 4 | amplifiziert | Del. Ex. 3 |
| 931263 | | 44,47 | verstorben | 19,536 | 4 | amplifiziert | 0 |
| 940482 | | 65,04 | verstorben | 31,713 | 4 | single copy | 0 |
| 940731 | | 32,73 | lebt | 65,373 | 3 | amplifiziert | 0 |
| 941541 | | 36,43 | verstorben | 11,484 | 3 | amplifiziert | 0 |
| 950941 | | 26,60 | lebt | 94,182 | 1 | single copy | 0 |
| 951054 | | 12,37 | lebt | 68,277 | 3 | amplifiziert | 0 |
| 951332 | | 35,47 | verstorben | 2,145 | 3 | amplifiziert | 0 |
| 951852 | | 25,77 | lebt | 70,323 | 4 | amplifiziert | 0 |
| 960091 | | 16,20 | verstorben | 2,31 | 4 | amplifiziert | 0 |
| 960122 | | 18,97 | verstorben | 18,414 | 4 | amplifiziert | Del. Ex. 2+3 |
| 960221 | | 22,40 | verstorben | 20,592 | 4 | amplifiziert | 0 |
| 961141 | | 4,53 | verstorben | 3,036 | 4 | amplifiziert | 0 |
| 961355 | | 22,30 | verstorben | 10,23 | 2 | single copy | 0 |
| 961531 | | 62,20 | verstorben | 7,128 | 4 | amplifiziert | 0 |
| 961881 | | 15,17 | verstorben | 7,722 | 3 | amplifiziert | Dupl. Ex. 3+4+6 |
| 962401 | | 37,90 | lebt | 56,364 | 3 | amplifiziert | Del. Ex. 3 |
| 970702 | | 9,80 | lebt | 42,174 | 3 | amplifiziert | 0 |
| 971721 | | 0,03 | lebt | 44,385 | 5 | amplifiziert | Dupl. Ex. 1+3+5-7 |
| 981021 | | 12,50 | lebt | 30,756 | 4 | amplifiziert | Dup. Ex. 1-7 |
| 981043 | | 53,50 | lebt | 80,784 | 4 | single copy | Dupl. Ex. 6 |
| 981954 | | 30,59 | verstorben | 21,087 | 4 | single copy | Del. Ex. 3 |
| 990841 | | 15,03 | lebt | 27,522 | 1 | amplifiziert | 0 |
| 992002 | | 8,00 | verstorben | 11,682 | 4 | amplifiziert | 0 |
| 908662 | Ja | 66,10 | verstorben | 92,697 | 3 | single copy | 0 |
| 908669 | 43 | | | | | single copy | Dupl. Ex. 1+3+5+6 |
| 930173 | Ja | 3,70 | verstorben | 66,165 | 5 | amplifiziert | 0 |
| 930174 | 16 | | | | | amplifiziert | 0 |
| 931332 | Ja | 86,89 | verstorben | 69,3 | 3 | single copy | 0 |
| 931335 | 32 | | | | | single copy | Del. Ex. 3+5 |
| 940871 | Ja | 55,30 | lebt | 81,015 | 2 | single copy | 0 |
| 940874 | 26 | | | | | single copy | 0 |
| 951432 | Ja | 73,56 | lebt | 94,611 | 4 | single copy | 0 |
| 951435 | 18 | | | | | single copy | 0 |
| 970922 | Ja | 33,60 | lebt | 102,96 | 2 | single copy | 0 |
| 970928 | 30 | | | | | single copy | 0 |
| 972251 | Ja | 77,45 | verstorben | 37,29 | 3 | single copy | Dupl. Ex. 3 |
| 972254 | 14 | | | | | single copy | 0 |

Tabelle 4: Patientendaten der Tumorproben aus dem NBL-Labor Universitätskinderklinik Leipzig. In der Spalte „LSAMP-Status“ sind die in der Real-Time-PCR detektierten Veränderungen des LSAMP-Gens aufgeführt. Auswertung nach der +/-2SA-Methode.

| Tumor ID | Lokalisation auffälliger Microarraysonden | Geschlecht | Stadium | Alter |
|------------------|---|------------|---------|-------------|
| GSM1105180 NB22 | Zwei Mal Intron 1, Exon 1, 3 und 4 | ♀ | 4 | >18 Monaten |
| GSM1105187 NB29 | Exon 3 und 4 | ♀ | 2a | >18 Monaten |
| GSM1105313 NB147 | Intron 1 und 2 | ♂ | 3 | <18 Monaten |
| GSM1105349 NB183 | Exon 4 und 6 | ♂ | 4 | <18 Monaten |

Tabelle 5: Beschreibung der Neuroblastome mit auffälligem *LSAMP*-Gen-Lokus aus der GEO2R Datenbank.

Alle Patienten wurden im Rahmen der zu dem entsprechenden Zeitpunkt gültigen Neuroblastom-Studienprotokolle behandelt. Der Einschluss in das Behandlungsprotokoll beinhaltet ein Einverständnis zur Verwendung von Tumorgewebe und anderen Untersuchungsmaterialien (z.B. Blut) zu Forschungszwecken.

Die Einverständniserklärung zur Verwendung von Tumormaterial sowie das Votum der zuständigen Ethik-Kommission zu Forschungszwecken liegen im Anhang bei.

2.9 DNA aus Zellkulturen

Zellpellets aus Zellkulturen zur DNA-Extraktion wurden uns für die in Tabelle 15 aufgeführten Zelllinien freundlicherweise von Dr. rer. nat. T. Adhikary, IMT, Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

3. Methoden

3.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus Zellkulturmaterial erfolgte mithilfe des Qiagen „*DNeasy Blood & Tissue Kits*“. Dabei handelt es sich um ein Silikagel basiertes Verfahren, das sich in mehrere Abschnitte gliedern lässt. Zunächst erfolgt die Lyse der Zellen. Das Zellpellet wird in 200 μl *PBS* aufgenommen und durch die Zugabe von 20 μl *Proteinase K* lysiert. Nach Hinzufügen von 200 μl *Buffer AL* wird der Ansatz für 10 min bei 56°C im Thermomixer inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl Ethanol (96-100 %) wird der Ansatz auf die Spinfilter gegeben. Durch Zentrifugation bei 6000 x g für eine Minute wird das Lysat über die Silikaoberfläche des Spinners geführt. Dabei erfolgt die Bindung der Nukleinsäuren an den Spinfilter. Das Zentrifugat wird verworfen. Die im Filter gebundene DNA wird in zwei Schritten durch Zugabe der Puffer *AW1* und *AW2* und jeweils anschließender Zentrifugation (1 min bei 6000 x g Puffer *AW1*, 3 min bei 20000 x g, Puffer *AW2*) auf der Säule gewaschen. Anschließend wird die aufgereinigte DNA aus dem Filter eluiert. Dazu werden 100 μl *Buffer AE* auf den Spinfilter gegeben. Nach Inkubation für 1 Minute, in der sich die DNA vom Filter löst, erfolgt eine Zentrifugation für eine Minute bei 6000 x g. Die DNA befindet sich nun im Eluat (Qiagen Protocol, 2016).

3.2 DNA-Quantifizierung

Die Ausbeute an extrahierter DNA sowie die Konzentration der Tumor-DNA wurden mittels photometrischer Messung an einem Nanodrop-Gerät ermittelt. Die Absorption *A* wurde bei Licht einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eingesetzt wurde jeweils 1 μl unverdünnte DNA. Ausgehend von der Absorption lässt sich die Extinktion *E* wie folgt berechnen: $E = -\log(1-A)$. Die Extinktion bei 260 nm (E_{260}) beträgt eins für doppelsträngige DNA einer Konzentration von $50^{ng}/\mu\text{l}$. Somit berechnet sich die Konzentration *c* als Produkt aus Extinktion und Umrechnungsfaktor 50 für doppelsträngige DNA ($c = E_{260} \times 50$). Anhand dem Quotienten der Extinktion aus Absorptionsmaximum von DNA (260 nm) und Proteinen (280 nm) $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ ergibt sich die Reinheit der DNA in einem Sollbereich von 1,7-1,9 (Jansohn und Rothhämel, 2012).

3.3 PCR

3.3.1 Grundlagen der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde um 1983 von Kary B. Mullis entwickelt. Das Prinzip der PCR ähnelt den Abläufen der Replikation einer Zelle. Pro Reaktionszyklus findet nahezu eine Verdopplung der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte statt. Als Ausgangs-DNA, sogenannte Template-DNA, kann genomische gesamt-DNA, virale DNA, DNA aus vorangegangenen PCR-Reaktionen oder aus RNA mittels Reverser Transkriptase umgeschriebene cDNA verwendet werden.

Anhand bekannter DNA-Sequenzen am Rande der zur Amplifikation stehenden Bereiche, werden daran komplementär paarende Primer synthetisiert. Deren Beschaffenheit bestimmt wesentlich die Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit der gesamten PCR. Entscheidend hierfür ist die Länge der Primer, im Allgemeinen 18-30 Nukleotide, der Anteil an Guanin-Cytosin-Bindungen, welcher 40-60 % nicht überschreiten sollte, sowie die Schmelztemperatur T_M und die Sequenz am 3'-Ende der Primer.

Die Schmelztemperatur ist definitionsgemäß die Temperatur, bei der 50 % der DNA-Doppelstränge als Einzelstränge vorliegen. Sie sollte bei den in einer Reaktion verwendeten Primern möglichst identisch sein und lässt sich näherungsweise mit der Wallace-Regel [$T_M = 2^\circ\text{C} \cdot (A+T) + 4^\circ\text{C} \cdot (G+C)$] berechnen. Die Temperatur, bei welcher die Primer optimal mit ihrem spezifischen DNA-Abschnitt hybridisieren, liegt ca. 5°C unterhalb der Schmelztemperatur T_M , genannt Annealing-Temperatur.

Der Nukleotidsequenz am 3'-Ende der Primer kommt ebenfalls eine wichtige Bedeutung zu. Komplementäre Strukturen zwischen den eingesetzten Primern führen zur Dimerisierung, ebenso Wiederholungen von mehr als drei gleichen Basen hintereinander oder Pallidromsequenzen. Endet ein Primer mit einem Thymin, so erhöht dies die Rate an Basenfehlpaarungen.

Ist die Anlagerung des Primers an die Template-DNA erfolgt, kann die Polymerase am 3'-Ende des Primers beginnend einen komplementären DNA-Strang synthetisieren. Die meist verwendete Polymerase ist die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*. Ihr Temperaturoptimum beträgt 75°C und selbst bei zur Denaturierung der Doppelstränge benötigter höherer Temperatur von ca. 95°C bleibt

sie noch stabil. Die Taq-Polymerase ist Mg^{2+} -abhängig, welches in Form von $MgCl_2$ meist schon im Reaktionspuffer enthalten ist. Ein weiterer essentieller Bestandteil der PCR-Reaktion sind die Substrate der Polymerase, die Desoxy-Nukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP).

Jede PCR ist aus drei repetitiven Schritten aufgebaut. Initial erfolgt eine Denaturierung der Template-DNA bei 95°C für zwei bis fünf Minuten. Anschließend wird in jedem Zyklus nur noch 20-30s denaturiert. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer an die DNA an. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur T_M und liegt meist 5°K unterhalb der T_M , zwischen $50-70^\circ\text{C}$ für weitere 20-30s. Im dritten Schritt, der Elongation, erfolgt die Synthese des komplementären DNA-Strangs durch die Taq-Polymerase, ausgehend von den Primern bei 72°C . Die Dauer der Elongation ist ca. eine Minute pro 1000 Basenpaaren. Diese Schritte werden nun 30-45 mal wiederholt, wobei sich eine exponentielle Vermehrung nach der Formel $2^n - 2n$ ergibt (n =Anzahl der Vermehrungszyklen) (Jansohn und Rothhämel, 2012).

3.3.1.1 Grundlagen der Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine Weiterentwicklung der oben beschriebenen PCR, die einen quantitativen Nachweis der entstandenen Produkte in Echtzeit ermöglicht. Die Quantifizierung beruht auf dem Prinzip der Fluoreszenzmessung während und am Ende eines Amplifikations-Zyklus. Hierfür gibt es sehr spezifisch bindende Fluoreszenzsonden, beispielsweise *TaqManTM*-Sonden. Bei diesem Verfahren wird zusätzlich zu den zur Amplifikation notwendigen Primern ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid hinzugegeben, welches innerhalb der Ziel-DNA hybridisiert. Durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird der Quencher („Fluoreszenzauslöscher“) vom Fluoreszenz-Reporter während der Elongation getrennt und emittiert nach einer Anregung Fluoreszenz definierter Wellenlänge.

Weniger spezifisch, jedoch sensitiver ist die Methode DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoffe, wie beispielsweise *SYBR Green I*. Hierfür müssen keine spezifischen Sonden erstellt werden, der Fluoreszenzfarbstoff liegt im Reaktionsansatz vor und lagert sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA ein. Im ungünstigen Fall entsteht somit auch ein Fluoreszenzsignal ausgehend von unspezifischen PCR-Produkten und Primer-Dimeren. Daher muss bei diesem Verfahren eine Schmelzkurvenanalyse erfolgen. Hierbei wird am Ende der Vermehrungszyklen das

gesamte PCR-Produkt unter kontinuierlich ansteigender Temperatur denaturiert. Der Zerfall der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge ist abhängig von der Länge und dem Guanin-Cytosin-Gehalt des entstandenen Produkts. Der Abfall der Fluoreszenz ist somit in der ersten Ableitung der Funktion als einzelner spitzer Gipfel sichtbar. Sind mehrere Gipfel vorhanden, muss davon ausgegangen werden, dass verschiedene unspezifische Produkte oder Primer-Dimere entstanden sind.

Bei beiden Verfahren nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge an entstandenem PCR-Produkt zu. Darüber kann dann wahlweise eine absolute Quantifizierung durch den Einsatz von standardisierten DNA-Mengen, in Form einer Verdünnungsreihe oder eine relative Quantifizierung mittels Referenzgenen nach der Delta-Delta-Ct-Methode erfolgen. Der Ct-Wert (cycle threshold) gibt den PCR-Zyklus an, in welchem das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell ansteigt. Eine gleiche Effizienz der unterschiedlichen PCR-Reaktionen vorausgesetzt, ergibt die Differenz der Ct-Werte von Ziel- und Referenzgen den Delta-Ct-Wert (ΔCt). Subtrahiert man nun den Delta-Ct-Wert gesunder Kontrollen von jenem unserer Neuroblastomzellen, errechnet man den Delta-Delta-Ct-Wert ($\Delta\Delta Ct$). Eingesetzt in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ erhält man die n-Fache Expression des Zielgens im Verhältnis zum Referenzgen (Real-Time PCR for Systems Biology; Holzapfel und Wickert, 2007).

3.3.2 Durchführung der PCR

3.3.2.1 Durchführung der *LSAMP*-CNV-Real-Time-PCR (*LSAMP*-CNV-qPCR)

Die Kopienzahlbestimmung (Copy-Number-Variation, CNV) der einzelnen Exons des *LSAMP*-Gens erfolgte mittels einer selbst etablierten qPCR. Für die insgesamt 13 einzelnen PCR-Reaktionen (sieben Exons des *LSAMP*-Gens und sechs Referenzbereiche anderer Gene) wurde für jede Tumor-DNA ein Mastermix vorbereitet, bestehend aus 82 μl H_2O , 116 μl iTaq Universal SYBR Green Supermix, sowie 3 μl DNA des jeweiligen Tumors. Alle Bestandteile wurden gründlich gemischt. Jeweils 15 μl des Mastermix wurden in ein Well einer 384-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden in jedes Well 2 μl der spezifischen Primermischung („sense“ und „antisense-Primer“) hinzupipettiert. Die Platte wurde mittels Microseal B Folie verschlossen und zwei Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Durchgeführt wurde die PCR mit einem CFX384 Real-Time System der Firma BioRad. Die initiale Denaturierung erfolgte für zwei Minuten bei 95°C, in jedem weiteren Zyklus für 20s. Die Annealing-Temperatur

betrug 60°C für 20s, die Elongations-Temperatur 72°C für 45s, für insgesamt 45 Zyklen. Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse der einzelnen PCR Fragmente. Zur Auswertung der qPCR (s.u.) wurden ausschließlich Daten von PCR-Reaktionen mit einer erwartungsgemäßen Schmelzkurve verwendet. Alle PCRs wurden in Mehrfachbestimmung (s.u.) durchgeführt. Zur weiteren Berechnung wurden dann die Mittelwerte der jeweiligen Ct-Werte benutzt.

3.3.2.2 Effizienzbestimmung der *LSAMP*-CNV-qPCR

Zur Errechnung der Delta-Delta-Ct-Werte ($\Delta\Delta Ct$) ist es wie oben bereits erwähnt wichtig, dass die einzelnen PCR-Reaktionen eine nahezu gleiche Effizienz E aufweisen oder entsprechend korrigierte Werte Verwendung finden. Zur Effizienzbestimmung wurde für jede einzelne der benutzten Primerkombinationen eine DNA-Verdünnungsreihe angefertigt (1, 1/3, 1/9, 1/27, 1/81). Aus Dreifachbestimmung errechnete Ct-Werte der Verdünnungsreihe wurden graphisch dargestellt und mittels Linearer Regression die Steigung m der Geraden bestimmt. Eingesetzt in die Formel $E=10^{-1/m}$ ergibt sich eine ideale Effizienz von zwei, was einer Verdopplung der DNA-Stränge pro Zyklus entspricht. Für die hier durchgeführten PCR-Reaktionen errechneten sich durchweg Effizienzen größer 1,94 (siehe Tabelle 6). Deshalb wurde auf eine effizienzbasierte Korrektur zur Berechnung der $\Delta\Delta Ct$ -Werte verzichtet.

| Gen | <i>LSAMP</i> Exon 1 | <i>LSAMP</i> Exon 2 | <i>LSAMP</i> Exon 3 | <i>LSAMP</i> Exon 4 | <i>LSAMP</i> Exon 5 | <i>LSAMP</i> Exon 6 | <i>LSAMP</i> Exon 7 |
|---------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| PCR-Effizienz | 1,962 | 1,999 | 1,959 | 1,998 | 1,999 | 1,999 | 1,966 |
| Kontroll-Gen | <i>ALDH1L1</i> Intron 2 | <i>DCBLD2</i> Exon 2 | <i>CADM2</i> Exon 5 | <i>IGF1R</i> Exon 2 | <i>KIF2A</i> Exon 18 | <i>RELN</i> Exon 37 | |
| PCR-Effizienz | 1,964 | 1,941 | 1,979 | 1,965 | 1,999 | 1,963 | |

Tabelle 6: Darstellung der Effizienzen der einzelnen Reaktionen der *LSAMP*-CNV-qPCR. Idealerweise ergibt sich eine Effizienz der PCR-Reaktion von 2, einer Verdopplung des DNA-Materials in jedem Reaktionszyklus entsprechend.

3.3.2.3 Auswertung der *LSAMP*-CNV-qPCR

Die Generierung der Daten aus der Real-Time-PCR erfolgte nach oben beschriebener $\Delta\Delta Ct$ -Methode. Hierzu mussten zunächst Referenzwerte eines diploiden Chromosomensatzes bestimmt werden. Dazu wurden 20 Kontroll-DNA Proben (humane DNA aus Leukozyten) untersucht, für welche keine chromosomalen Veränderungen bekannt waren. Wir nahmen an, dass hier diploide Genkopien des *LSAMP*-Gens und der Referenzgene vorliegen.

Für jeden PCR-Ansatz (für jedes Gen) wurde aus den Kontrollen der Mittelwert und die Standardabweichung in Doppelbestimmung berechnet (entspricht dem grünen Bereich in der Balkendiagramm-Auswertung, siehe Abbildung 5). Unter der Annahme, dass es sich bei den PCR-Daten um eine Normalverteilung handelt, ist zu erwarten, dass 95,4 % der Werte diploider Genkopien im Bereich $MW \pm 2SA$ liegen. Mit einer Wahrscheinlichkeit von jeweils 2,3 % liegt der Wert einer diploiden Genkopie oberhalb oder unterhalb dieses Bereichs und wird in diesem Fall fälschlicher Weise als Duplikation oder Deletion eingestuft. Die Normalverteilung der PCR-Daten der 20 Kontroll-DNAs wurde mithilfe eines Kolmogorow-Smirnow-Tests überprüft. Das Vorliegen einer Normalverteilung wurde aufgrund eines Signifikanzniveaus von $p < 0,05$ angenommen.

Ct: Cycle threshold, Beginn der exponentiellen DNA-Verdopplung

$$\Delta Ct_{\text{Tumor}} = Ct(\text{LSAMP}_{\text{Tumor}}) - Ct(\text{Mittelwert der Referenzgene}_{\text{Tumor}})$$
$$\Delta Ct_{\text{Kontrolle}} = Ct(\text{LSAMP}_{\text{Kontrolle}}) - Ct(\text{Mittelwert der Referenzgene}_{\text{Kontrolle}})$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Tumor}} - \text{Mittelwert}(\Delta Ct_{\text{Kontrolle}})$$
$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Wert des Zielgens im Verhältnis zum Referenzgen}$$

Abbildung 4: Formeln zur schrittweisen Berechnung der Werte aus der Real-Time-PCR

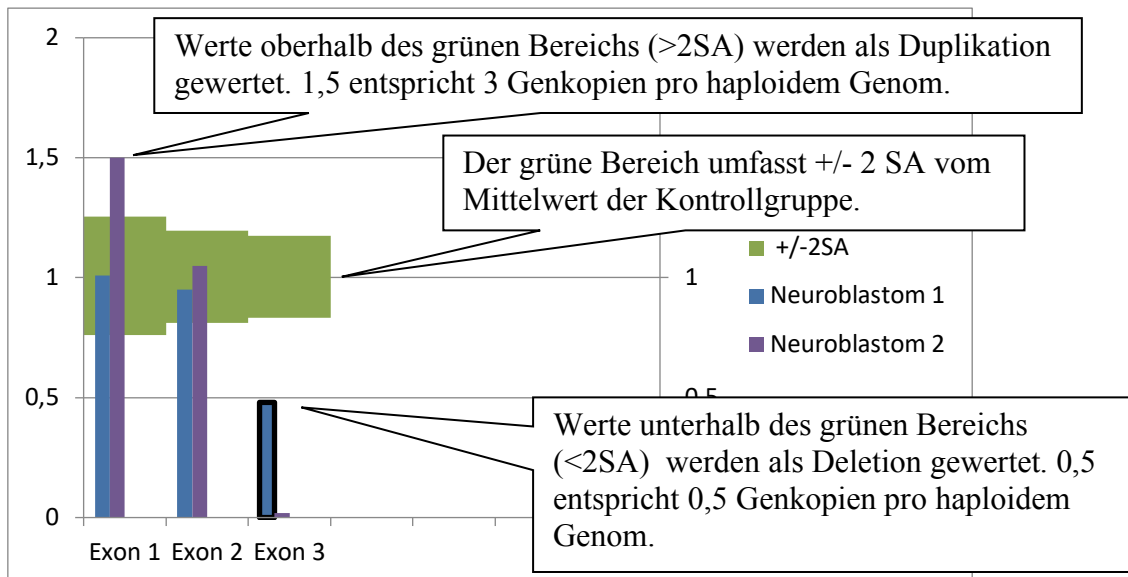


Abbildung 5: Auswertung der Ergebnisse der Real-Time-PCR. Im Balkendiagramm ist jeweils der Mittelwert aus der Doppelbestimmung einer Tumor-/Zelllinien-DNA als Balken dargestellt. Der Gesamt-Mittelwert der Kontrollgruppe liegt mittig in der grünen Fläche. Diese stellt den Bereich der ± 2 -fachen Standardabweichung (SA) dar. Ein Wert unterhalb der 2-fachen SA vom Mittelwert wird als Deletion dieses Exons/Abschnitts gewertet. Deletionen werden durch einen schwarzen Rahmen um den jeweiligen Balken hervorgehoben.

Neben der Definition der Grenzwerte für die qPCR Daten bei einer Abweichung von $> \pm 2SA$ vom Mittelwert der Kontrollen wurde noch eine zweite Methode angewendet.

Pasic und Kollegen beschreiben zur Bestimmung der *LSAMP*-Genkopienanzahl in Osteosarkomen eine Auswertung durch Runden der Werte aus der Real-Time-PCR auf die nächste ganze Zahl (Pasic et al., 2010). Diese Methode hat den Vorteil, dass die Werte einfach gerundet werden und keiner weitergehenden Interpretation bedürfen.

Der Nachteil ist jedoch die geringere Sensitivität zur Erkennung von Deletionen. Diese ist bei der Untersuchung von genetisch sehr heterogenem Tumormaterial, in dem Deletionen möglicherweise nicht alle Zellen betreffen, wichtig. Zudem berücksichtigt diese Untersuchung keine Abweichungen der Mittelwerte der Kontroll-DNA Proben vom idealen Mittelwert 1.

In dieser Arbeit wurde die oben beschriebene Methode des Rundens zusätzlich, zur Kontrolle der Auswertung anhand der doppelten Standardabweichung, durchgeführt. Durch die Verwendung einer vorbeschriebenen Methode ist zudem die Möglichkeit gegeben, Häufigkeiten von Deletionen mit dieser Arbeit zu vergleichen.

3.4 Primerdesign

Die Primersequenzen für die PCR wurden mit dem Programm „Oligo 6.71“ (www.oligo.net) entworfen. Dabei wurde insbesondere auf eine gleiche Annealing-Temperatur der unterschiedlichen Primerpaare und gleiche Schmelzbedingungen der PCR-Fragmente geachtet, da alle Reaktionen unter gleichen Thermocycler-Bedingungen durchgeführt werden sollten. Die verwendeten Primerkombinationen sind nachfolgend in Tabelle 7 aufgeführt.

| Gen und Lokalisation (Real-Time-PCR) | Sequenz |
|--|--|
| <i>LSAMP</i> Exon 1 hg19 chr3:115,521,210-116,164,385 | Ex1_1: AGTTGCCACTGGTCCTACTGAG Ex1_2: CCCGAAAGCCCTACCTGA |
| <i>LSAMP</i> Exon 2 | Ex2_1a: GCCTGGTTGAACCGTTCT Ex2_2a: CCCACACTTTCCTTACCTTGT |
| <i>LSAMP</i> Exon 3 | Ex3_1a GGCAGCAACGTGACTCTG Ex3_2a AATTCCAGGAGCATGAGCATA |
| <i>LSAMP</i> Exon 4 | Ex4_1a: AGCAGTCAGGCAAATATGAGTG Ex4_2: CCTGGGCACCTAGCACCT |
| <i>LSAMP</i> Exon 5 | Ex5_1: AATTCTAAGCACCCCGACC Ex5_2: GAGTGAAGCTTGTCGTCCTGT |
| <i>LSAMP</i> Exon 6 | Ex6_1a: CCAATGGCCTTGAGATTAAGA Ex6_2: GTAGTTGCCGTAGTGCTC |
| <i>LSAMP</i> Exon 7 | Ex7_1c: AGCCCAAGGAGGAGAAGGATTTAG Ex7_2b: ATCCATTTATTCCTCTCACCGACC |
| <i>ALDH1L1</i> Intron 2 hg19 chr3:125,822,404-125,899,645 | ALDH1L1_1: GGGACTGGGGTAGAGCA ALDH1L1_2: GGAGCAGGATTCAAGGTAGA |
| <i>DCBLD2</i> Exon 2 hg19 chr3:98,514,814-98,620,533 | DCBLD2_Ex2_1: CCCTGAGAGTGGAACCCTTAC DCBLD2_Ex2_2: TCACCAAATTTGATGCGAACT |
| <i>CADM2</i> Exon 5 hg19 chr3:98,514,814-98,620,533 | CADM2_Ex5_1a: CTCACTTCATCATTGCTTAAAT CADM2_Ex5_2a: AGCTGCAGGTTTACTACCAGAT |
| <i>IGF1R</i> Exon 2 hg19 chr15:99,192,761-99,465,671 | IGF1R_1: CGACATCCGCAACGACTATCA IGF1R_2: TCGAAGATGACCAGGGCGTAG |

| | |
|--|--|
| <i>KIF2A</i> Exon 18 hg19 chr5:61,601,989-61,683,011 | Ex18_U1: GCGTGTATATTGAATAGGCTG Ex18_L1: AGTTAAGTTCTGCTACTGATGA |
| <i>RELN</i> Exon 37 hg19 chr7:103,112,231-103,629,963 | RELN_Ex37_1: AAGGGATACAATTTTGCAAGT RELN_Ex37_2: TGTTAGCCCTTCCATACAAC |

Tabelle 7: Primer Sequenzen der Real-Time-PCR (*LSAMP*-Exons und Referenzgene)

3.5 Microarray

3.5.1 Auswertung von Microarray-Neuroblastom-Daten

Für wissenschaftliche Zwecke zugängliche Datenbanken, wie die GEO (Gene Expression Omnibus) Datenbank, bieten die Möglichkeit hinterlegte Datensätze mit z.T. einer großen Anzahl von Proben auf genetische Veränderungen hin zu untersuchen. Eine GEO Datenbank, die genetische Informationen einer großen Anzahl von primären Neuroblastomen enthält, ist die GSE45480. In sechs Serien (Platforms) mit unterschiedlichen Array Chips (Agilent-....) wurde das Genom von insgesamt 881 Neuroblastomen (Samples) untersucht. Zur Auswertung der im *LSAMP*-Gen liegenden Micro-Array-Sonden wurde das lizenzfrei verfügbare Programm GEO2R verwendet. Mit diesem Programm kann man unter Angabe der „GEO accession“(GPL45480) und der „Platform“(GPL2873, GPL4093, GPL8355, GPL8736, GPL16865, GPL16876) die Funktion „Prophile graph“ wählen. Über „View data for GPL...“gelangt man zur Beschreibung der Gensonden des verwendeten Micro-Array-Chips. Dort findet man die chromosomale Lokalisation und die dazugehörige „ID“ der im *LSAMP*-Gen liegenden Micro-Array-Sonden. Nach Eingabe der IDs erhält man die Information über die Stärke des Signals jeder Sonde, für jeden auf diesem Micro-Array-Chip untersuchten Tumor. Mit der angegebenen chromosomalen Lokalisation ermittelten wir die Lokalisation der Sonden innerhalb des *LSAMP*-Gens (welches Exon oder Intron) mit dem „UCSC Genom Browser“ unter Verwendung des Genoms hg19. Alle chromosomalen Lokalisationen wurden zuvor mit dem Programm „Lift Genome Annotations“ in hg19 (Feb.2009 GrCh37/hg19) umgeschrieben. Die Signalstärke jeder im *LSAMP*-Gen liegenden Sonde wurde in eine Microsoft Excel Tabelle überführt.

Eine Abweichung in 2 Sonden der im Array gemessenen Signalstärke unterhalb der doppelten Standardabweichung werteten wir als Hinweis auf eine vorliegende Deletion. Die DNA dieser Tumore haben wir anschließend mittels der oben beschriebenen Real-Time-PCR untersucht. In Tabelle 9 sind die Lokalisationen der Array-Sonden im

3. Methoden

LSAMP-Gen beschrieben, Tabelle 8 listet die verwendeten Micro-Array-Chips auf.

| Platform (Anzahl der damit untersuchten Neuroblastome) | Micro-Array-Chip |
|---|---|
| GSE45480 GPL2873 (56) | Agilent-012750 Human Genome CGH Microarray 44A (Feature number version) |
| GSE45480 GPL4093 (123) | Agilent-014698 Human Genome CGH Microarray 105A (G4412A) |
| GSE45480 GPL8355 (5) | Agilent-012700 Human Genome CGH Microarray 44A G4410A_beta (Feature Number version) |
| GSE45480 GPL8736 (9) | Agilent-021529 Human CGH Whole Genome Microarray 1x1M (G4447A) (Feature Number version) |
| GSE45480 GPL16865 (15) | Agilent-013282 Human Genome CGH Microarray (Feature number version) [ALT to GPL2897 minus400] |
| GSE45480 GPL16876 (673) | Agilent-020382 Human Custom Microarray 44k (Feature Number version) |

Tabelle 8: Beschreibung der Micro-Array-Chips, Series GSE45480 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE45480>, zuletzt geprüft am 06.03.2016)

| Sonden ID | Chromosomale Lokalisation | Lokalisation im <i>LSAMP</i> Gen |
|--|----------------------------------|---|
| GSE45480 GPL2873 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL2873&view=data , 06.03.2016) | | |
| 10304 | hg19:chr3:115738452-115738502 | <i>LSAMP</i> Exon 3 |
| 14617 | hg19:chr3:115571419-115571473 | <i>LSAMP</i> Exon 4 |
| 24442 | hg19:chr3:116021997-116022056 | <i>LSAMP</i> Intron 1 |
| 30047 | hg19:chr3:116116913-116116972 | <i>LSAMP</i> Intron 1 |
| 34192 | hg19:chr3:116164073-116164132 | <i>LSAMP</i> Exon 1 |
| GSE45480 GPL4093 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL4093&view=data , 06.03.2016) | | |
| 4219 | hg17:chr3:117646763-117646822 | <i>LSAMP</i> Exon 1 |
| 4619 | hg17:chr3:117456088-117456147 | <i>LSAMP</i> Intron 1 |
| 57988 | hg17:chr3:117264939-117264998 | <i>LSAMP</i> Intron 2 |
| 15051 | hg17:chr3:117221142-117221192 | <i>LSAMP</i> Exon 3 |
| 63449 | hg17:chr3:117119744-117119803 | <i>LSAMP</i> Intron 3 |

| | | |
|---|-------------------------------|-----------------------|
| 44035 | hg17:chr3:117054109-117054163 | <i>LSAMP</i> Exon 4 |
| 27326 | hg17:chr3:117037773-117037832 | <i>LSAMP</i> Intron 6 |
| GSE45480 GPL8355 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL8355&view=data , 06.03.2016) | | |
| 10304 | hg19:chr3:117059353-117059403 | <i>LSAMP</i> Exon 3 |
| 14617 | Hg19:chr3:116892320-116892374 | <i>LSAMP</i> Exon 4 |
| 24442 | Hg19:chr3:117342898-117342957 | <i>LSAMP</i> Intron 1 |
| 30047 | Hg19:chr3:117437814-117437873 | <i>LSAMP</i> Intron 1 |
| 34192 | Hg19:chr3:117484974-117485033 | <i>LSAMP</i> Exon 1 |
| GSE45480 GPL8736 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE45480&platform=GPL8736 , 06.03.2016) | | |
| 299644 | hg19:chr3:116164073-116164132 | <i>LSAMP</i> Exon 1 |
| 572507 | hg19:chr3:115805950-115806009 | <i>LSAMP</i> Intron 1 |
| 544110 | hg19:chr3:115763474-115763533 | <i>LSAMP</i> Intron 2 |
| 285327 | hg19:chr3:115738452-115738502 | <i>LSAMP</i> Exon 3 |
| 768057 | hg19:chr3:115656029-115656088 | <i>LSAMP</i> Intron 3 |
| 215106 | hg19:chr3:115571419-115571473 | <i>LSAMP</i> Exon 4 |
| 560729 | hg19:chr3:115565185-115565244 | <i>LSAMP</i> Intron 4 |
| 424613 | hg19:chr3:115540244-115540303 | <i>LSAMP</i> Intron 6 |
| GSE45480 GPL16865 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL16865&view=data , 06.03.2016) | | |
| 10304 | hg19:chr3:115738452-115738502 | <i>LSAMP</i> Exon 3 |
| 14617 | hg19:chr3:115571419-115571473 | <i>LSAMP</i> Exon 4 |
| 24442 | hg19:chr3:116021997-116022056 | <i>LSAMP</i> Intron 1 |
| 30047 | hg19:chr3:116116913-116116972 | <i>LSAMP</i> Intron 1 |
| 34192 | hg19:chr3:116164073-116164132 | <i>LSAMP</i> Exon 1 |
| GSE45480 GPL16876 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL16876&view=data , 06.03.2016) | | |
| 4214 | Hg19:chr3:117054032 | <i>LSAMP</i> Intron 1 |

Tabelle 9: Auflistung der chromosomalen Lokalisation der Microarraysonden im *LSAMP*-Gen

3.6 Auswertung von Neuroblastom Expressions-Daten der „R2: Neuroblastoma Genomics Analysis and Visualization Platform“

Um einen Eindruck zu erhalten, ob die Höhe der *LSAMP*-Expression in primären Neuroblastomen mit klinischen Eigenschaften wie Tumorstadium, Alter bei Diagnose, *MYCN*-Amplifikation oder insbesondere dem Überleben der Patienten korreliert, haben wir nach entsprechenden veröffentlichten Datensätzen gesucht. Auf der Internetseite

„R2: Genomics Analysis and Visualization Platform“ (<http://r2.amc.nl>) sind solche Datensätze hinterlegt. Ein Online-Tool zur Auswertung innerhalb der Datensätze wird ebenfalls zur Verfügung gestellt. Zur Auswertung der Korrelation der LSAMP-Expression mit dem Überleben der Patienten (overall survival, OS) wurde der „R2: Kaplan Meier Scanner (Pro)“ verwendet.

Verschiedene Datensätze mit Daten zur Expression von LSAMP in primären Neuroblastomen stehen zur Verfügung. Wir haben uns aufgrund der Größe der Untersuchungsgruppen und der Verfügbarkeit der Gesamtüberlebensdaten für folgende Datensätze entschieden: Tumor Neuroblastoma-NRC-283, -Oberthuer-251, -SEQC-498, -Versteeg-88, -TARGET-249, -Seeger-102 und -Kocak-649.

Für eine Kaplan-Meier Überlebensanalyse musste die Untersuchungsgruppe in zwei Untergruppen („hohe“ und „niedrige“ LSAMP-Expression) eingeteilt werden. Diese Eigenschaft musste zuerst aber definiert werden. In der Standard-Einstellung des Tools werden die *Cutoff*-Werte so ausgewählt, dass für jeden Datensatz der signifikanteste Überlebensunterschied dargestellt wird. Die Software verändert dabei Schritt für Schritt den jeweiligen Grenzwert innerhalb eines Datensatzes und berechnet dafür Überlebensunterschiede für alle möglichen Gruppeneinteilungen einzeln durch und stellt letztlich die Überlebensanalyse dar, bei der die beste Signifikanz erreicht wurde. Da immer nur zwei Gruppen gegeneinander berechnet werden, hat dies zur Folge, dass die Untergruppengrößen zum Teil sehr voneinander abweichen (z.B. sehr wenige Patienten in der „niedrig“ -exprimierenden Gruppe *versus* sehr viele Patienten in der „hoch“ -exprimierenden Gruppe). Da der signifikanteste Grenzwert von Datensatz zu Datensatz unterschiedlich liegen kann (einmal im oberen Expressionsbereich, einmal im unteren Expressionsbereich), ist ein Vergleich der Auswertungen unterschiedlicher Datensätze untereinander mit dieser Einstellung nicht möglich. Um hier eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, haben wir den Cutoff in allen Auswertungen bei der LSAMP-Expression entlang der ersten Quartile (*first_quartile*) gesetzt. Dies entspricht einem Vergleich der Überlebensdaten von Patienten mit hoher und mittlerer LSAMP-Expression (Gruppe 1 „high“ entsprechend den Patienten mit LSAMP-Expression in den oberen drei Vierteln) mit denen von Patienten mit niedriger LSAMP-Expression (Gruppe 2 „low“ entsprechend dem Viertel der Patienten mit der niedrigsten LSAMP-Expression). Bei dieser Einteilung befanden sich eine ausreichende Anzahl Patienten in den jeweiligen Untergruppen. Diese Einteilung entspricht der Hypothese dieser Arbeit,

dem Vergleich der Tumore mit der niedrigsten LSAMP-Expression (z.B. durch Verlust einer oder aller Genkopien) mit den übrigen Tumoren.

Alle Untersuchungen wurden bezüglich des Gesamtüberlebens durchgeführt. In allen Auswertungen wurden Patienten mit Stadium 4s ausgeschlossen, da dieses Stadium einer Besonderheit in der gesamten Tumorbiologie darstellt. Das Gesamtüberleben der Patienten mit Stadium 4s Neuroblastom beträgt in den betreffenden Datensätzen nahezu 100 %.

Die erste Auswertung umfasste jeweils alle Patienten der Stadien 1-4 nach INSS in den jeweiligen Datensätzen. Darüber hinaus folgten Auswertungen zum LSAMP abhängigen Überleben in den Untergruppen mit den Eigenschaften *MYCN*-amplifiziert, *MYCN* nicht-amplifiziert, INSS Stadien 1-3, INSS Stadium 4, sowie die Altersgruppen > und < 18 Monate.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung und Validierung der *LSAMP*-CNV-qPCR

Für drei Neuroblastomzelllinien (IMR32, KELLY und SK-N-BE) lagen bereits Daten zur Deletion einzelner oder mehrerer Exons von *LSAMP* vor (eigene Untersuchung PD Dr. Axel Weber). Mittels der beschriebenen Real-Time-PCR konnte die Deletion der betreffenden Exons in allen drei Zelllinien übereinstimmend nachgewiesen werden. Nachfolgend sind in Abbildung 6 und 7 die Resultate der Array-Untersuchung mit den Ergebnissen der von uns etablierten Real-Time-PCR gegenübergestellt.

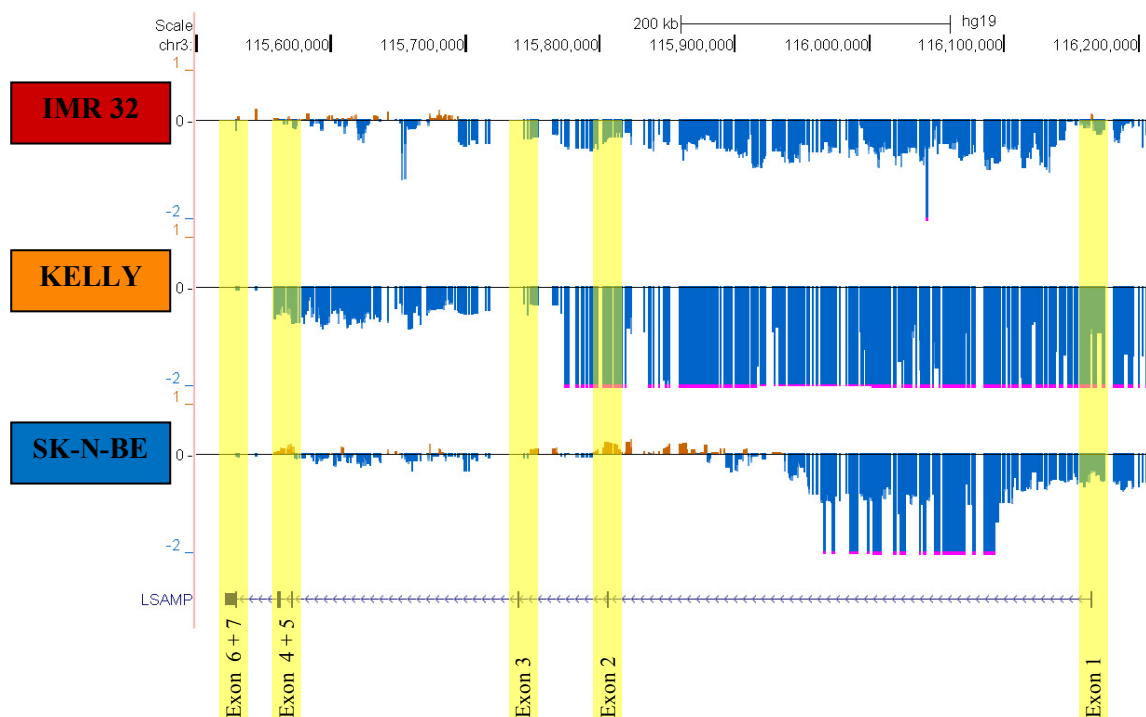


Abbildung 6: CGH-Arrayanalyse genomischer DNA der drei Neuroblastom Zelllinien IMR32, KELLY und SK-N-BE. Dargestellt ist die "Weighted Log2-Ratio" (Affymetrix Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array Software: Chromosome Analysis Suite (ChAS) / Affymetrix Version 1.2.2; Genom Annotation hg19). Die Lage der Exons des *LSAMP*-Gens sind (aufgrund besserer Sichtbarkeit breiter dargestellt) gelb gekennzeichnet. Das Gen ist auf dem anti-sense Strang der DNA kodiert (von Exon-1 rechts nach Exon-7 links). Die blauen Flächen unterhalb des 0-Wertes kennzeichnen die Bereiche der genomischen Deletionen. Werte um -1 sprechen für den Verlust einer Kopie pro diploidem Genom, Werte um -2 zeigen einen Verlust von beiden Genkopien pro diploidem Genom an (entsprechend einem vollständigen Verlust des Genabschnittes).

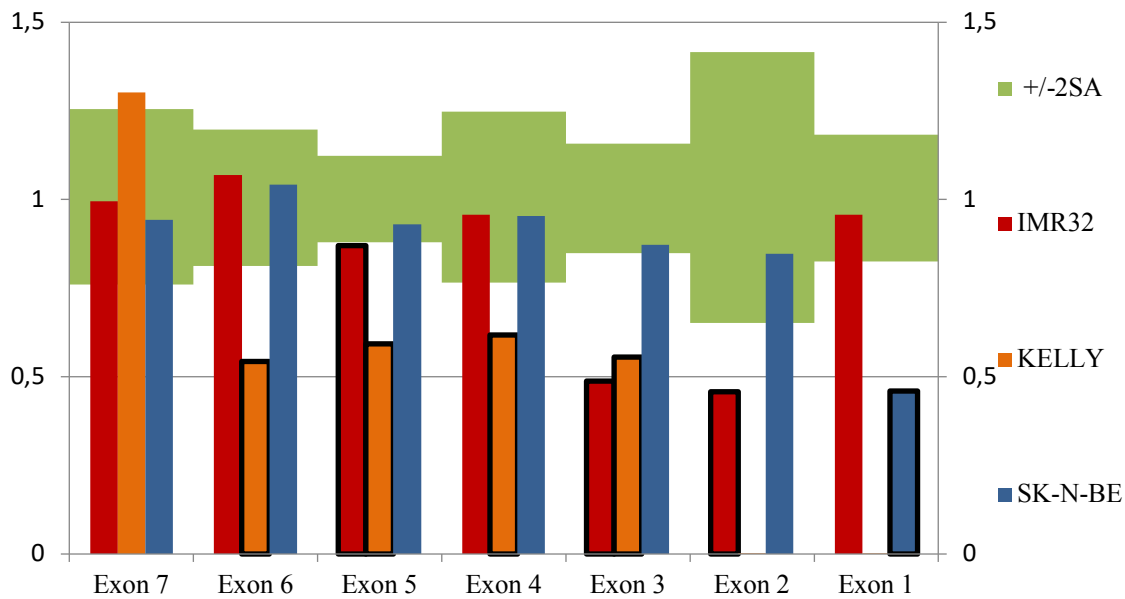


Abbildung 7: Darstellung von *LSAMP* Exon 1-7 der Zelllinien IMR32, KELLY und SK-N-BE mit der Real-Time-PCR nach der +/-2SA-Methode (siehe Abbildung 5). Grün hinterlegt ist die doppelte Standardabweichung der Kontroll-Daten des jeweiligen Exons dargestellt. Ein Wert von 1 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom. Deletionen sind durch schwarze Umrandungen der Balken hervorgehoben.

4.2 Untersuchung primärer Neuroblastome auf genomische Veränderungen im *LSAMP*-Gen

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Untersuchung primärer Neuroblastome aus verschiedenen Quellen beschrieben. Die Neuroblastome wurden von Arbeitsgruppen in Köln und Leipzig teilweise bereits mit anderen gentechnischen Methoden voruntersucht, siehe 2.8 Tumormaterial.

4.2.1 Neuroblastome mit Verdacht auf Veränderungen im *LSAMP*-Gen im Rahmen einer NGS-Studie

Neun untersuchte DNA-Proben aus der Gruppe der NGS-Proben (siehe 2.8 und Tabelle 3) zeigten in der Real-Time-PCR für das *LSAMP*-Gen Daten innerhalb des +/-2SA-Intervalls. Diese Proben besitzen nach unserer Methode eine Kopie des *LSAMP*-Gens pro haploidem Genom und somit keine Deletion eines oder mehrerer Exons. Drei Tumore (2972140, 2972242, 2972536) wiesen in einzelnen Exons Werte unterhalb und ein Tumor (2972361) oberhalb des +/-2SA-Intervalls auf (siehe Abbildung 8 und 9).

Die Auswertung der Daten nach Pasic und Kollegen zur Bestimmung der Anzahl der Genkopien ergab mit einer Ausnahme in allen Fällen ein vorliegendes *LSAMP*-Gen pro

4. Ergebnisse

haploidem Genom. Im Neuroblastom 2972242 wurde für Exon 6 nur eine Genkopie pro haploidem Genom errechnet (siehe Tabelle 10).

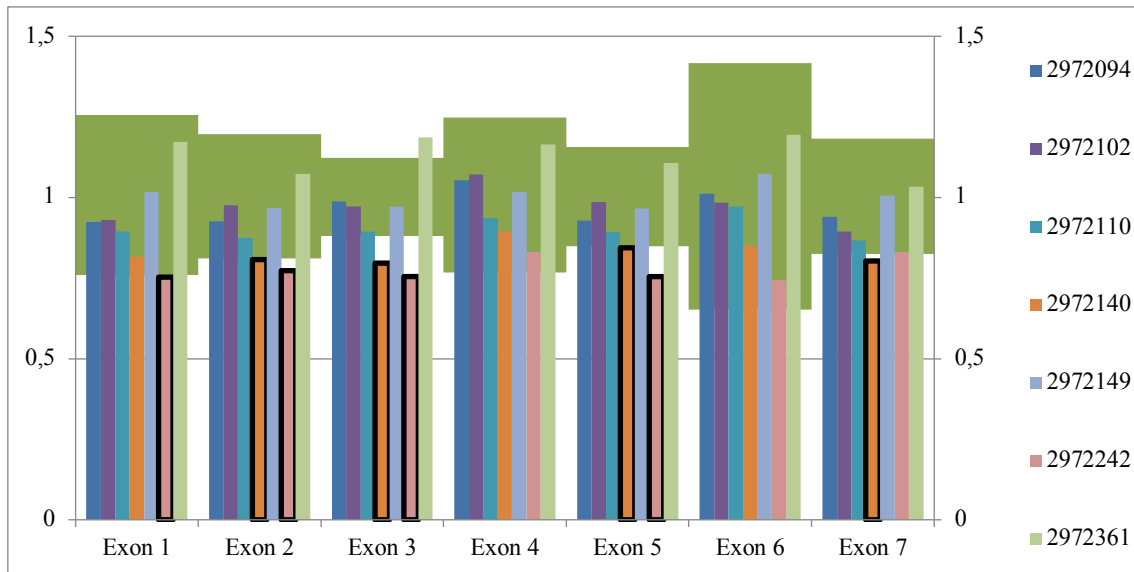


Abbildung 8: Auswertung der im Next-Generation-Sequencing auffälligen Tumoren (Teil 1). Darstellung von *LSAMP* Exon 1-7. Auswertung der Real-Time-PCR nach der +/-2SA-Methode. Grün hinterlegt ist die doppelte Standardabweichung der Kontroll-Daten des jeweiligen Exons dargestellt. Ein Wert von 1 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom. Deletionen sind durch schwarze Umrandungen der Balken hervorgehoben.

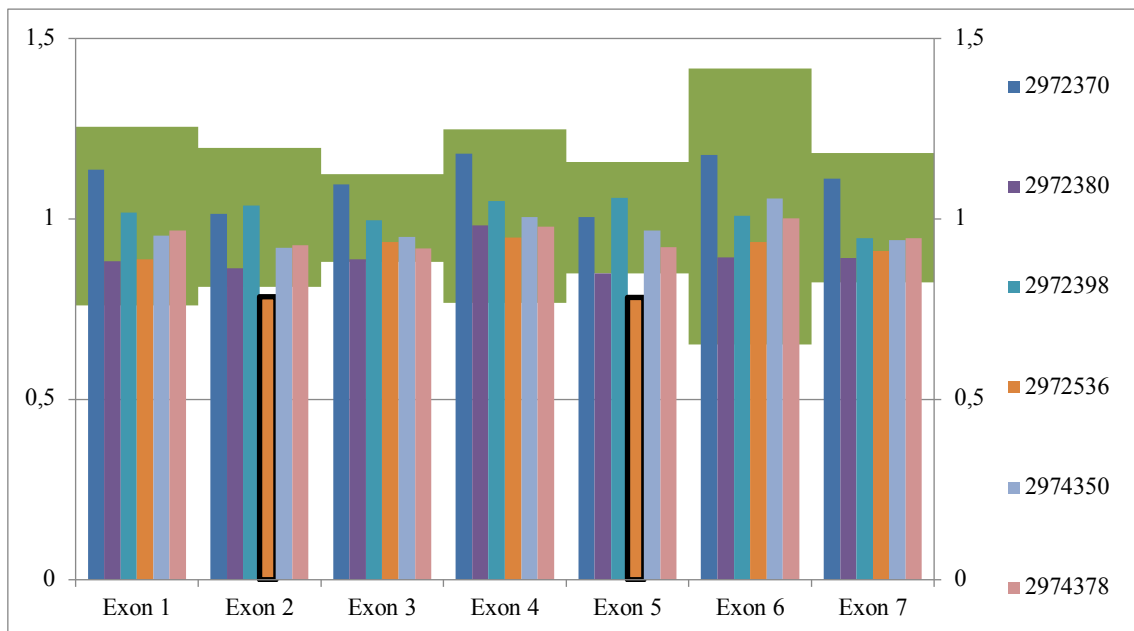


Abbildung 9: Auswertung der im Next-Generation-Sequencing auffälligen Tumoren (Teil 2). Darstellung von *LSAMP* Exon 1-7. Auswertung der Real-Time-PCR nach der +/-2SA-Methode. Grün hinterlegt ist die doppelte Standardabweichung der Kontroll-Daten des jeweiligen Exons dargestellt. Ein Wert von 1 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom. Deletionen sind durch schwarze Umrandungen der Balken hervorgehoben.

| Neuroblastom | <i>LSAMP</i> Exon 1 | <i>LSAMP</i> Exon 2 | <i>LSAMP</i> Exon 3 | <i>LSAMP</i> Exon 4 | <i>LSAMP</i> Exon 5 | <i>LSAMP</i> Exon 6 | <i>LSAMP</i> Exon 7 |
|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 2972094 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2972102 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2972110 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2972140 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2972149 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2972242 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 2972361 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2972370 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2972380 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2972398 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2972536 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2974350 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2974378 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

Tabelle 10: Auswertung der im Next-Generation-Sequencing auffälligen Tumoren: Anzahl der Genkopien nach Pasic et al. (2010). 2 Genkopien entsprechen einer Genkopie pro haploidem Genom.

4.2.2 Neuroblastome mit Verdacht auf Veränderungen im *LSAMP*-Gen innerhalb veröffentlichter Microarraydatensätze (GEO2R Daten)

In der NCBI Datenbank GEO sind genomische Micro-Array-Daten von insgesamt 881 Neuroblastomen hinterlegt. Je nach zur Untersuchung eingesetztem Micro-Array-Chip, sind eine bis acht Sonden im *LSAMP*-Gen lokalisiert (siehe Tabelle 9). Um mögliche Deletionen im *LSAMP*-Gen zu detektieren, wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus den Werten der Sonden errechnet. In vier Neuroblastomen zeigte sich eine Häufung (≥ 2 Werte) unterhalb der zweiten Standardabweichung. Zu diesen vier Tumoren konnten wir freundlicherweise DNA aus der Tumorbank der Uniklinik Köln zur Untersuchung mittels Real-Time-PCR bekommen.

Diese auffälligen Tumore wurden auf zwei Micro-Array-Chips mit unterschiedlicher Sondenabdeckung untersucht. NB22 und NB29 wurden auf GEO2R_GSE45480_GPL2873 untersucht, NB147 und NB183 auf GEO2R_GSE45480_GPL4093 (siehe Tabelle 5).

NB 22 zeigte in allen auf diesem Micro-Array-Chip im *LSAMP*-Gen liegenden Sonden Werte kleiner der zweiten Standardabweichung. Die Real-Time-PCR Ergebnisse von NB 22 ergaben keinen Hinweis auf Deletionen (siehe Abbildung 10).

4. Ergebnisse

In der Micro-Array-Untersuchung von **NB29** fielen Sonden in Exon 3 und 4 durch Werte kleiner der zweiten Standardabweichung auf. Die Real-Time-PCR lieferte keinen Anhalt für Deletionen in sämtlichen *LSAMP*-Exons. Exon 3 zeigte einen Wert größer der zweiten Standardabweichung.

Für **NB 147** sind uns Sonden in Intron 1 und 2 des *LSAMP*-Gens durch Werte kleiner 2 Standardabweichungen aufgefallen. Mit unserer Real-Time-PCR konnten wir lediglich die 7 Exons untersuchen. Exon 1 und 3 zeigten dabei Werte oberhalb der zweiten Standardabweichung. Gemäß der Auswertung nach Pasic und Kollegen spricht dies für das Vorliegen von 3 Genkopien pro haploidem Genom in Exon 1 und 3. In keiner PCR konnte eine Deletion nachgewiesen werden (Pasic et al., 2010).

NB 183 zeigte in der Micro-Array-Untersuchung in Sonden in Exon 4 und 6 Werte unterhalb der zweiten Standardabweichung. In der Real-Time-PCR stellten wir für Exon 2, 5 und 6 Werte unterhalb von zwei Standardabweichungen fest. Exon 3 und 4 imponierten hingegen durch Werte oberhalb von zwei Standardabweichungen. Nach oben genannter Methode ergeben sich Abweichungen in der Genkopien-Anzahl für folgende Exons: Exon 3 liegt mit 3 Genkopien vor, Exon 4 mit 5 Genkopien. In Exon 6 liegt mit einer verbliebenen Genkopie pro haploidem Genom eine Deletion vor.

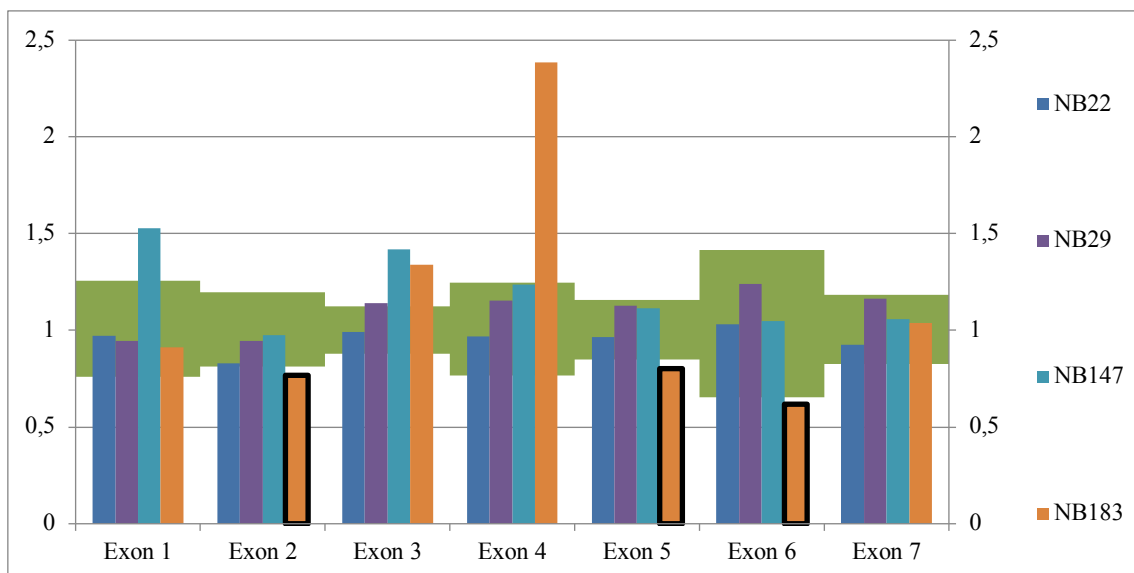


Abbildung 10: Auswertung der in der GEO2R-Datenbank auffälligen Tumoren. Darstellung von *LSAMP* Exon 1-7. Auswertung der Real-Time-PCR nach der ± 2 SA-Methode. Grün hinterlegt ist die doppelte Standardabweichung der Kontroll-Daten des jeweiligen Exons dargestellt. Ein Wert von 1 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom. Deletionen sind durch schwarze Umrandungen der Balken hervorgehoben.

| | <i>LSAMP</i> Exon 1 | <i>LSAMP</i> Exon 2 | <i>LSAMP</i> Exon 3 | <i>LSAMP</i> Exon 4 | <i>LSAMP</i> Exon 5 | <i>LSAMP</i> Exon 6 | <i>LSAMP</i> Exon 7 |
|-------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| NB22 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| NB29 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| NB147 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| NB183 | 2 | 2 | 3 | 5 | 2 | 1 | 2 |

Tabelle 11: Auswertung der in der GEO2R-Datenbank auffälligen Tumore. Anzahl der Genkopien nach Pasic et al., 2010. 2 Genkopien entsprechen einer Genkopie pro haploidem Genom.

4.2.3 Untersuchung primärer Neuroblastome ohne Information zum *LSAMP*-Gen

Genomische DNA 37 primärer Neuroblastome (freundliche Gabe Prof. Dr. H. Christiansen, NBL Labor Universitäts-Kinderklinikum Leipzig) wurde auf Deletionen im *LSAMP*-Gen untersucht. In 7 Fällen lag uns zusätzlich DNA aus Rezidivtumoren zur Untersuchung vor. In 6 Tumoren errechneten sich in der Auswertung der Real-Time-PCR Werte in einzelnen Exons unterhalb von zwei Standardabweichungen vom Mittelwert. In vier Fällen konnten zwei Exons mit erniedrigten Werten pro Neuroblastom nachgewiesen werden, in den anderen beiden Neuroblastomen lag lediglich ein Exon unterhalb von zwei Standardabweichungen. Weitere Abweichungen zeigten sich in den Exons 2 und 5 (siehe Abbildung 11).

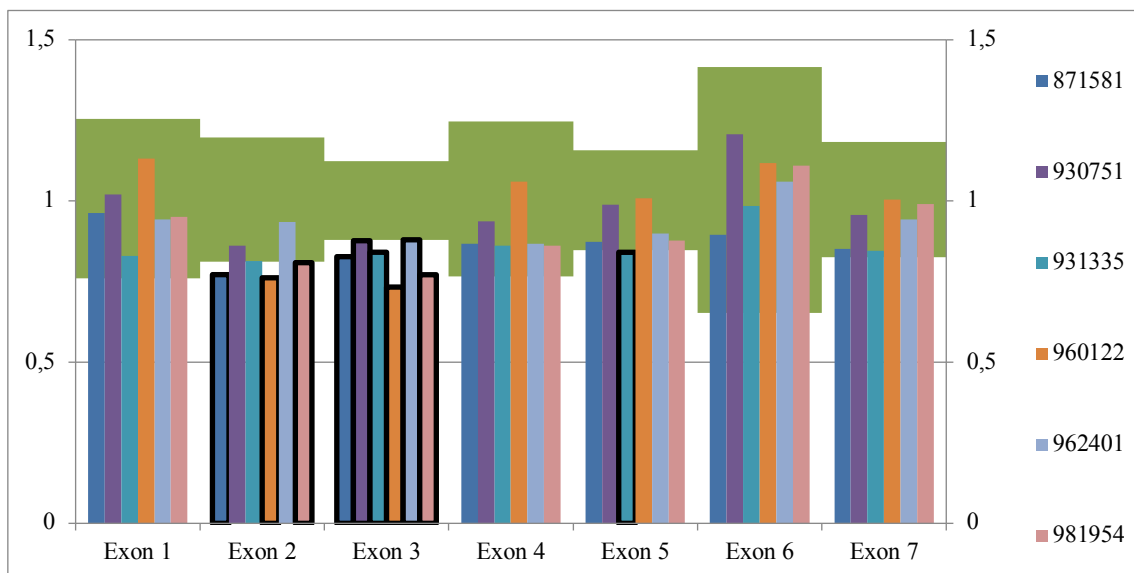


Abbildung 11: Auswertung der primären Neuroblastome. Dargestellt sind nur die Tumore mit Hinweis auf Vorliegen einer Deletion. Darstellung von *LSAMP* Exon 1-7. Auswertung der Real-Time-PCR nach der +/-2SA-Methode. Grün hinterlegt ist die doppelte Standardabweichung der Kontroll-Daten des jeweiligen Exons dargestellt. Ein Wert von 1 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom. Deletionen sind durch schwarze Umrandungen der Balken hervorgehoben.

4. Ergebnisse

In 7 Tumoren stellten sich in der Real-Time-PCR Auswertung Werte einzelner Exons oberhalb von zwei Standardabweichungen vom Mittelwert dar. In keinem primären Neuroblastom lagen gleichzeitig Werte einzelner Exons oberhalb und unterhalb von zwei Standardabweichungen vor. In fünf von sieben Neuroblastomen mit erhöhten Werten in der Berechnung der Genkopien-Anzahl, trat dies in mehr als einem *LSAMP*-Exon auf. In diesen Fällen handelte es sich mindestens um zwei nebeneinander liegende Exons (siehe Abbildung 12).

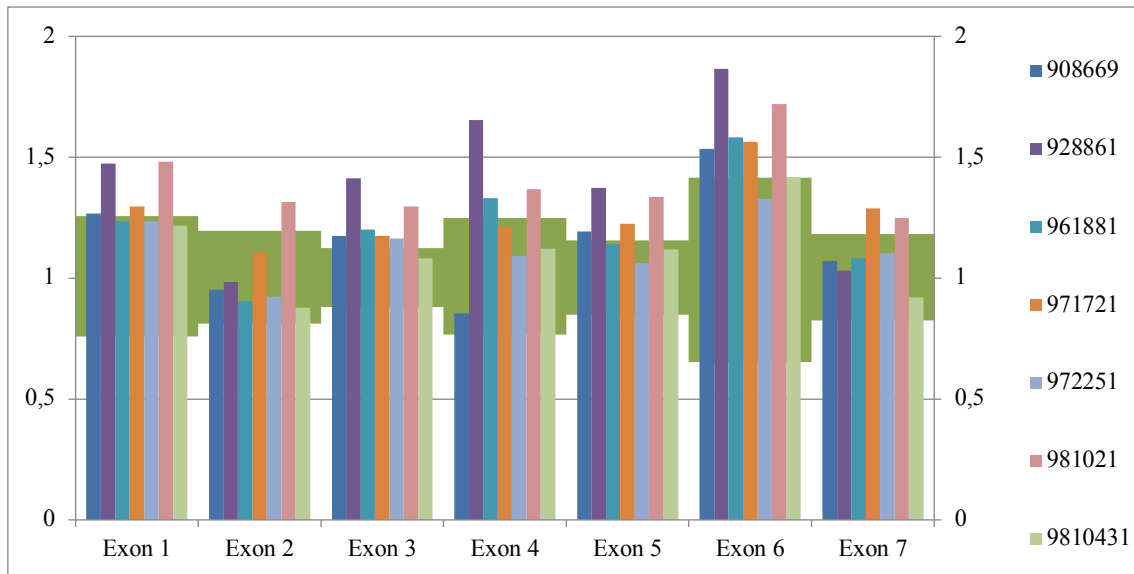


Abbildung 12: Auswertung der primären Neuroblastome. Dargestellt sind nur die Tumore mit Hinweis auf Vorliegen einer Duplikation. Darstellung von *LSAMP* Exon 1-7. Auswertung der Real-Time-PCR nach der ± 2 SA-Methode. Grün hinterlegt ist die doppelte Standardabweichung der Kontroll-Daten des jeweiligen Exons dargestellt. Ein Wert von 1 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom.

Zudem zeigten drei der sieben untersuchten Rezidive in einzelnen Exons eine andere Einordnung innerhalb der durch die Standardabweichungen abgegrenzten Bereiche (siehe Tabelle 12). Die Änderungen der jeweiligen absoluten Werte waren dabei nicht groß. Eine mögliche Ursache kann die anteilmäßige Veränderung von Zellen mit *LSAMP*-Deletionen über die Zeit oder unterschiedliche Chromosomenanzahlen innerhalb der Zellen eines Tumors sein.

| Tumor ID: | <i>LSAMP</i> Exon 1 | <i>LSAMP</i> Exon 2 | <i>LSAMP</i> Exon 3 | <i>LSAMP</i> Exon 4 | <i>LSAMP</i> Exon 5 | <i>LSAMP</i> Exon 6 | <i>LSAMP</i> Exon 7 |
|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| PT: 90866 2 | 1,133 | 0,967 | 1,028 | 0,928 | 1,036 | 1,149 | 1,103 |
| Rez: 90866 9 | 1,266 | 0,951 | 1,175 | 0,854 | 1,192 | 1,534 | 1,070 |
| PT: 93133 21 | 1,001 | 0,994 | 0,966 | 0,969 | 1,036 | 1,097 | 1,004 |
| Rez: 93133 5 | 0,830 | 0,814 | 0,841 | 0,861 | 0,841 | 0,984 | 0,846 |
| PT: 97225 1 | 1,235 | 0,922 | 1,164 | 1,092 | 1,062 | 1,329 | 1,103 |
| Rez: 97225 4 | 1,066 | 1,005 | 0,990 | 0,981 | 0,983 | 1,072 | 0,937 |

Tabelle 12: Unterschiedliche Einordnung bei Primär- (PT) und Rezidivtumoren (Rez) innerhalb der Auswertung nach Standardabweichung: **>2SA**; **<2SA** Ein Wert von 1,0 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom.

4.3 Untersuchung verschiedener Zelllinien

Zur Abklärung der Häufigkeit von Deletionen im *LSAMP*-Gen in Zelllinien, wurden zwölf Neuroblastom-Zelllinien und siebzehn Zelllinien anderer Ursprungsgewebe mittels Real-Time-PCR untersucht. Die Untersuchung der Zelllinien, die nicht von Neuroblastomen abstammen, soll klären, ob es sich bei der Deletion von Genabschnitten des *LSAMP*-Gens um eine neuroblastomspezifische Veränderung handelt oder ob diese Mutationen auch bei anderen Tumorerkrankungen gefunden werden können.

4.3.1 Ergebnisse der Neuroblastom-Zelllinien

Bei den Neuroblastom-Zelllinien handelt es sich um neun *MYCN*-amplifizierte und drei nicht *MYCN*-amplifizierte Zelllinien. Der Ursprung dieser Zelllinien und die in der Real-Time-PCR deletierten *LSAMP*-Exons werden in Tabelle 13 aufgeführt.

4. Ergebnisse

| Zelllinie | Ursprungsgewebe, Alter in Monaten, Geschlecht | Stadium nach INSS | Karyotyp | MYCN-Status | LSAMP-Deletion |
|-----------------|---|-------------------|-----------|--------------|----------------|
| CHP 212 | Neuroblastom, 20 ♂ | - | - | amplifiziert | Exon 1-6 |
| CHP134 | Lymphknoten-metastase, 13 ♂ | Stadium 4 | - | amplifiziert | Exon 1-7 |
| IMR32 | Abdominales Neuroblastom, 13 ♂ | - | 2n=46 | amplifiziert | Exon 2+3 |
| KELLY | Gehirn | - | 46-47X | amplifiziert | Exon 1-6 |
| LAN1 | Knochenmark, 24 ♂ | Stadium 4 | 47-87 | amplifiziert | - |
| LAN5 | Knochenmark, 4 ♂ | - | - | amplifiziert | - |
| NMB | Knochenmark, 10 ♀ | - | - | amplifiziert | - |
| SKN DZ | Knochenmark, ♀ | - | 44XX | amplifiziert | - |
| SK-N- BE (2) | Knochenmark, 22 ♂ | Stadium 4 | 44 | amplifiziert | Exon 1 |
| CLB-GA | Knochenmark, ♂ | Stadium 4 | - | single copy | Exon 2+3 |
| SK-N- AS | Knochenmark, ♀ | Stadium 4 | 46 | single copy | Exon 1-5 +7 |
| SK-N-FI | Knochenmark, ♂ | - | Aneuploid | single copy | - |

Tabelle 13: Beschreibung der Neuroblastom-Zelllinien. Ergänzt nach Thiele CJ. (1998). Die Angaben zu den Karyotypen entstammen aus Beschreibungen von Zelllinien zum kommerziellen Erwerb, nicht jedoch den direkt untersuchten Zellen. Die Quellen sind im Literaturverzeichnis unter der Zelllinienbezeichnung hinterlegt. Die Spalte „LSAMP-Deletion“ beschreibt die in der Real-Time-PCR festgestellten Deletionen.

Die Auswertung der Real-Time-PCR zeigte in fünf MYCN-amplifizierten und in zwei nicht amplifizierten Zelllinien Werte unterhalb der zweiten Standardabweichung im LSAMP-Gen. In zwei MYCN-amplifizierten Zelllinien konnten in einem einzelnen Exon Werte oberhalb von zwei Standardabweichungen vom Mittelwert nachgewiesen werden.

Die übereinstimmenden Auswertungen nach der +/-2SA-Methode und nach Pasic und Kollegen ergaben Deletionen der MYCN-amplifizierten Neuroblastom-Zelllinien CHP212, CHP143P3, IMR32, KELLY und SK-N-BE 2 (siehe auch Tabelle 14).

4. Ergebnisse

Die nicht *MYCN*-amplifizierten Zelllinien CLB-GA und SKN-AS zeigen ebenfalls Deletionen im *LSAMP*-Gen (siehe Abbildung 13 und 14).

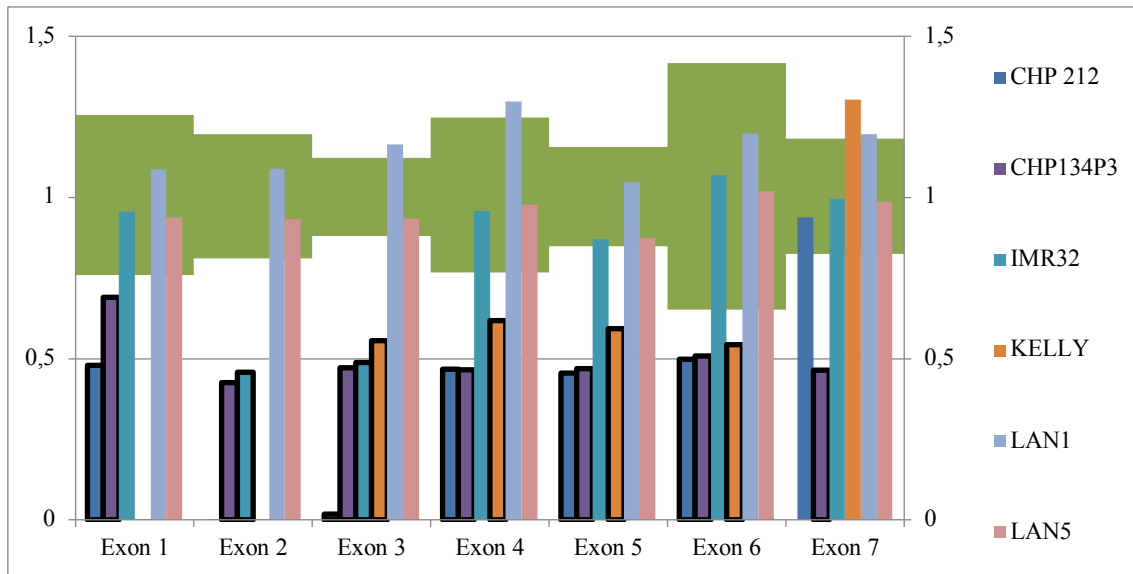


Abbildung 13: Auswertung der Neuroblastom-Zelllinien (Teil 1). Darstellung von *LSAMP* Exon 1-7. Auswertung der Real-Time-PCR nach der +/-2SA-Methode. Grün hinterlegt ist die doppelte Standardabweichung der Kontroll-Daten des jeweiligen Exons dargestellt. Ein Wert von 1 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom. Deletionen sind durch schwarze Umrandungen der Balken hervorgehoben.

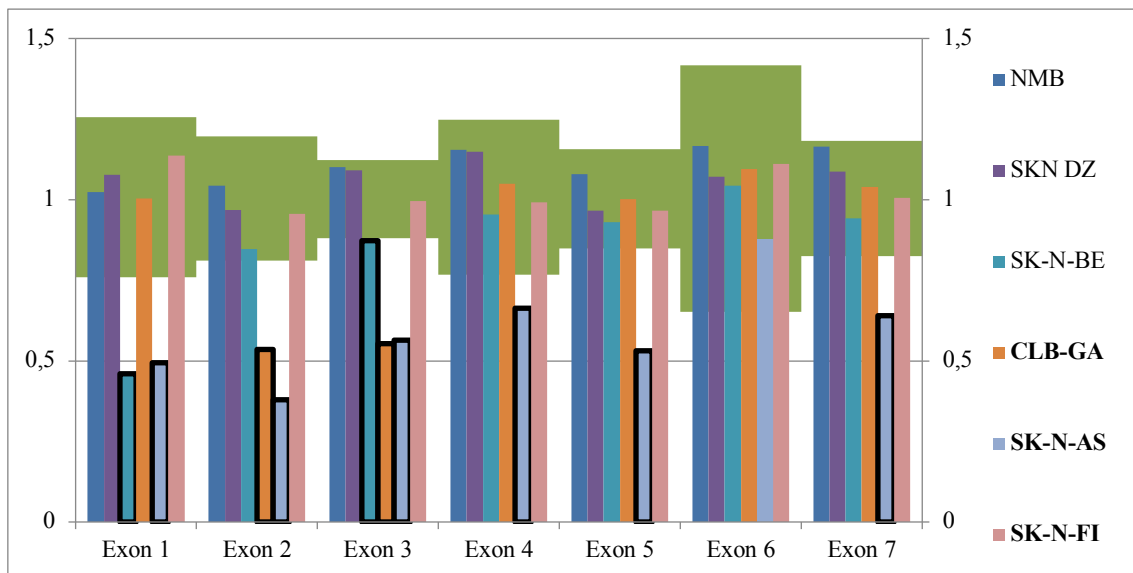


Abbildung 14: Auswertung der Neuroblastom-Zelllinien (Teil 2). Darstellung von *LSAMP* Exon 1-7. Auswertung der Real-Time-PCR nach der +/-2SA-Methode. Bei den in der Legende FETT gedruckten Zelllinien handelt es sich um nicht *MYCN*-amplifizierte Zelllinien. Grün hinterlegt ist die doppelte Standardabweichung der Kontroll-Daten des jeweiligen Exons dargestellt. Ein Wert von 1 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom. Deletionen sind durch schwarze Umrandungen der Balken hervorgehoben.

| Zelllinie | <i>LSAMP</i> Exon 1 | <i>LSAMP</i> Exon 2 | <i>LSAMP</i> Exon 3 | <i>LSAMP</i> Exon 4 | <i>LSAMP</i> Exon 5 | <i>LSAMP</i> Exon 6 | <i>LSAMP</i> Exon 7 |
|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| CHP 212 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| CHP134P3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| IMR32 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| KELLY | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| LAN1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| LAN5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| NMB | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| SKN DZ | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| SK-N-BE 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| CLB-GA | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| SK-N-AS | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SK-N-FI | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

Tabelle 14: Auswertung der Neuroblastom-Zelllinien: Anzahl der Genkopien nach Pasic et al., 2010. Bei den in der Legende FETT gedruckten Zelllinien handelt es sich um nicht *MYCN*-amplifizierte Zelllinien. Ein Wert von 2 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom.

4.3.2 Ergebnisse der Zelllinien verschiedener Ursprungsgewebe

Weitere 17 Zelllinien unterschiedlichen Ursprungsgewebes (siehe Tabelle 15) wurden auf Deletionen des *LSAMP* Gens untersucht (freundliche Gabe Dr. rer. nat. T. Adhikary, IMT, Philipps-Universität Marburg). Tabelle 15 listet das Ursprungsgewebe, das Geschlecht und Alter der Patienten zum Entnahmzeitpunkt des Zellmaterials, den Karyotyp und die in der Real-Time-PCR detektierten *LSAMP*-Deletionen auf. Die Abbildung 15 und 16 zeigen die Anzahl der Genkopien der 7 *LSAMP*-Exons der Zelllinien verschiedener Ursprungsgewebe nach der Auswertung mit der +/- 2SA Methode. In Tabelle 16 ist die Auswertung der Anzahl der Genkopien nach Pasic und Kollegen derselben Zelllinien dargestellt.

| Zelllinie | Ursprungsgewebe, Alter in Jahren, Geschlecht | Karyotyp | <i>LSAMP</i> Deletion |
|-----------|--|--------------------------------|-----------------------|
| (HCT116) | Kolonkarzinom, ♂ | 44-46X/XY | Exon 2+3+5 |
| (HT29) | Kolonkarzinom, 46 ♀ | 63-74XX | - |
| (HeLaP7) | Zervixkarzinomepithelien ♀ | 76-88XX | - |
| (HaCaT) | Keratinozyten, 62 ♂ | Hypotetraploid | - |
| (Caki) | Nierenzellkarzinom, 69 ♂ | Hypentaploid bis Hypohexaploid | - |
| (HEK293) | Embryonale Nierenzellen ♀ | 64-69XX | Exon 2 |
| (WPHV1) | Myofibroblasten aus Prostatastroma, ♂ | - | - |

4. Ergebnisse

| | | | |
|-------------|-------------------------|----------------------------------|------------|
| (KG1) | Knochenmark, 59 ♂ | 42-47X/XY | - |
| (THP1) | Monozytenleukämie, 1 ♂ | 88-96XY/XXY | Exon 2+5 |
| (IGROV1) | Ovarialkarzinom, 47 ♀ | Pseudodiploid | - |
| (SK-OV-3) | Ovarialkarzinom, 64 ♀ | Hypodiploid bis Hypotetraploid | - |
| (OVCAR) | Ovarialkarzinom, ♀ | 65-69XX | Exon 1 |
| (MDA-MB231) | Mammakarzinom, ♀ | 62-64XX | Exon 1-3+5 |
| (MDA-MB468) | Mammakarzinom, ♀ | 62-65XX | - |
| (MCF7) | Mammakarzinom, 69 ♀ | 80-87XX | Exon 1-5+7 |
| (LN229) | Glioblastom | Hypertriploid bis Hypotetraploid | Exon 2 |
| (HEPG2) | Leberzellkarzinom, 15 ♂ | 47-54XY | - |

Tabelle 15: Beschreibung der Zelllinien aus anderen Ursprungsgeweben. Die Angaben zu den Karyotypen entstammen aus Beschreibungen von Zelllinien zum kommerziellen Erwerb, nicht jedoch den direkt untersuchten Zellen. Die Quellen sind unter dem Namen der Zelllinie im Literaturverzeichnis aufgelistet. Die Spalte „LSAMP-Deletion“ beschreibt die in der Real-Time-PCR festgestellten Deletionen.

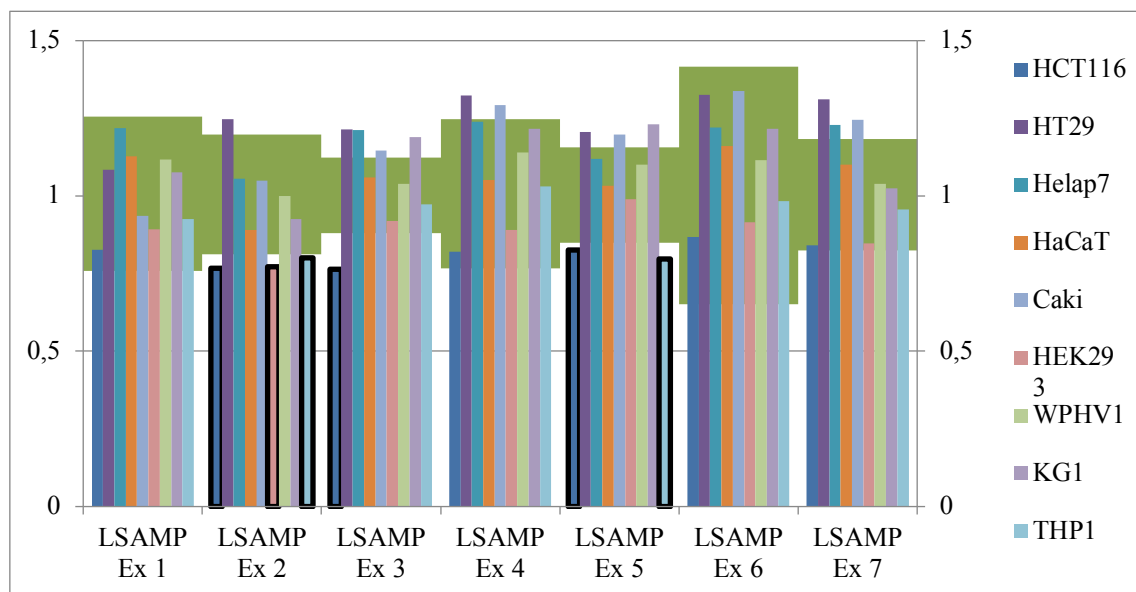


Abbildung 15: Auswertung der Zelllinien verschiedener Ursprungsgewebe (Teil 1). Darstellung von LSAMP Exon 1-7. Auswertung der Real-Time-PCR nach der +/-2SA-Methode. Grün hinterlegt ist die doppelte Standardabweichung der Kontroll-Daten des jeweiligen Exons dargestellt. Ein Wert von 1 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom. Deletionen sind durch schwarze Umrandungen der Balken hervorgehoben.

4. Ergebnisse

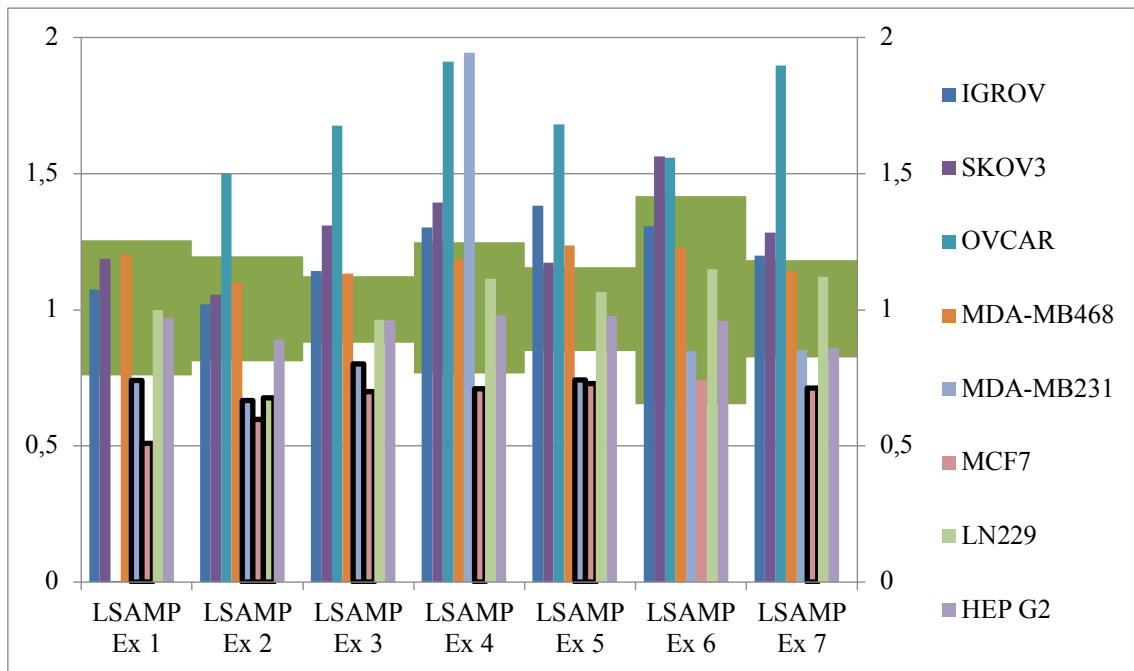


Abbildung 16: Auswertung der Zelllinien verschiedener Ursprungsgewebe (Teil 2). Darstellung von *LSAMP* Exon 1-7. Auswertung der Real-Time-PCR nach der +/-2SA-Methode. Grün hinterlegt ist die doppelte Standardabweichung der Kontroll-Daten des jeweiligen Exons dargestellt. Ein Wert von 1 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom. Deletionen sind durch schwarze Umrandungen der Balken hervorgehoben.

| Zelllinie | <i>LSAMP</i> Exon 1 | <i>LSAMP</i> Exon 2 | <i>LSAMP</i> Exon 3 | <i>LSAMP</i> Exon 4 | <i>LSAMP</i> Exon 5 | <i>LSAMP</i> Exon 6 | <i>LSAMP</i> Exon 7 |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| (HCT116) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| (HT29) | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| (HeLaP7) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| (HaCaT) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| (Caki) | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| (HEK293) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| (WPMY1) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| (KG1) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| (THP1) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| (IGROV1) | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| (SK-OV-3) | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| (OVCAR) | 0 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 |
| (MDA-MB231) | 1 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 2 |
| (MDA-MB468) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| (MCF7) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| (LN229) | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| (HEPG2) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

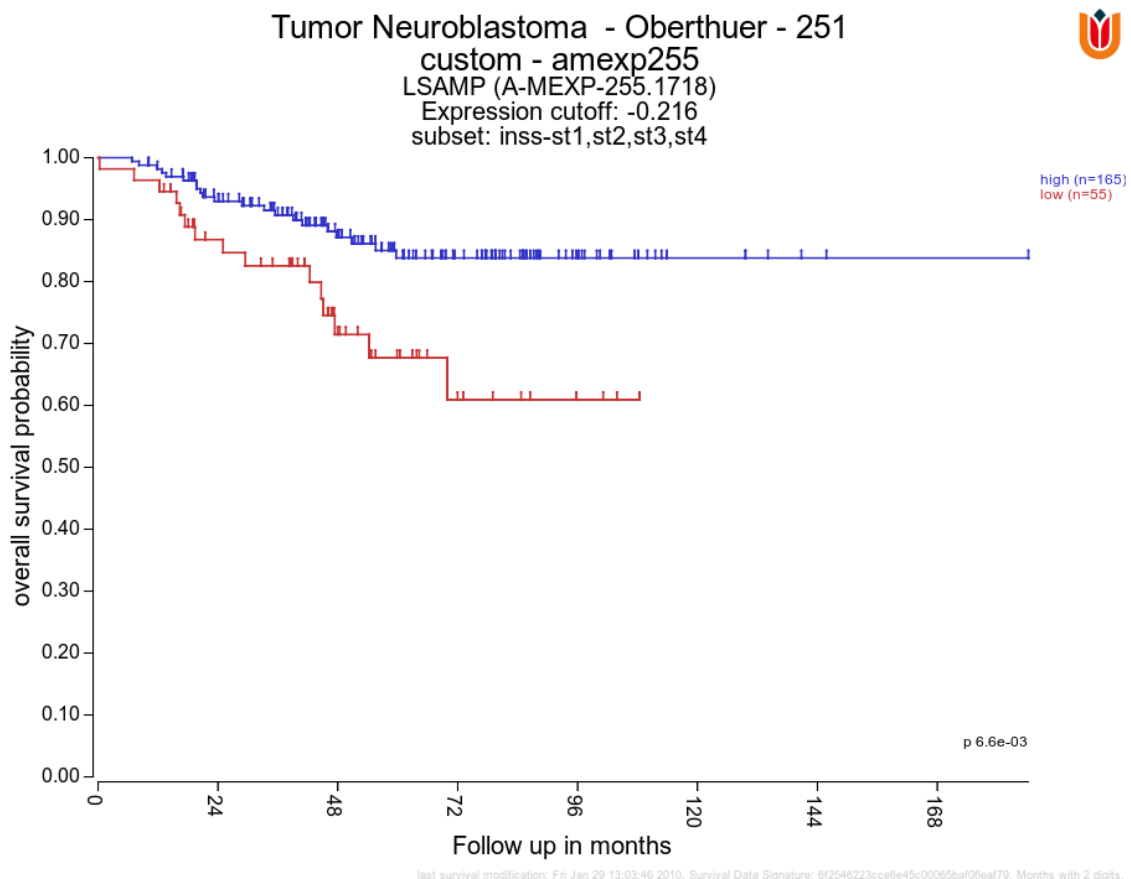
Tabelle 16: Auswertung der Zelllinien verschiedener Ursprungsgewebe: Anzahl der Genkopien nach Pasic et al., 2010. Ein Wert von 2 entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom.

4.4 Ergebnisse der Neuroblastom-Expressions-Datensätze

Für diese Arbeit wurden die folgenden sieben Neuroblastom-Expressions-Datensätze ausgewertet: Tumor Neuroblastoma-NRC-283, -Oberthuer-251, -SEQC-498, -Versteeg-88, -TARGET-249, -Seeger-102 und -Kocak-649. Die Kriterien der Auswertung werden in Kapitel 3.6 erläutert.

4.4.1 Gesamtüberleben der Patienten mit Neuroblastom Stadium 1-4 nach INSS

In den Datensätzen NRC-238 und TARGET-249 konnte kein Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens zwischen Patienten mit hoher und niedriger LSAMP-Expression festgestellt werden. In den Datensätzen Oberthuer-251 (siehe Abbildung 17), SEQC-498 und Versteeg-88 zeigen Patienten mit hoher LSAMP-Expression ein signifikant ($p < 0,05$) längeres Gesamtüberleben. Der Datensatz Kocak-649 ergibt einen nicht signifikanten Gesamtüberlebensvorteil für Patienten mit hoher LSAMP-Expression. Seeger-102 besteht aus nicht-*MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen und lässt keine Untergruppenanalyse zu. Der gesamte Datensatz zeigt jedoch ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben für Patienten mit hoher LSAMP-Expression (siehe Tabelle 17).



4. Ergebnisse

Abbildung 17: Darstellung zum Gesamtüberleben der Neuroblastom-Stadien 1-4 nach INSS. Der Datensatz Oberthuer-251 zeigt einen signifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit hoher LSAMP-Expression. Der Cutoff zwischen hohem und niedrigem Überleben wurde bei der ersten Quartile gesetzt. Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch Herrn J. Koster, siehe 12.3 (R2: Genomics Analysis and Visualization Platform; Oberthuer-251 INSS 1-4)

4.4.2 Gesamtüberleben der Patienten mit Neuroblastom Stadium 1-3 nach INSS

In den Datensätzen SEQC-498 und TARGET-249 konnte kein Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens zwischen Patienten mit hoher und niedriger LSAMP-Expression festgestellt werden. In den Datensätzen NRC-283, Versteeg-88 und Kocak-649 (siehe Abbildung 18) zeigen Patienten mit hoher LSAMP-Expression ein nicht signifikant ($p > 0,05$) schlechteres Gesamtüberleben. Oberthuer-251 ergibt ein nicht signifikant besseres Gesamtüberleben bei Patienten mit hoher LSAMP-Expression. Seeger-102 ist diesbezüglich nicht auswertbar (siehe auch Tabelle 17).

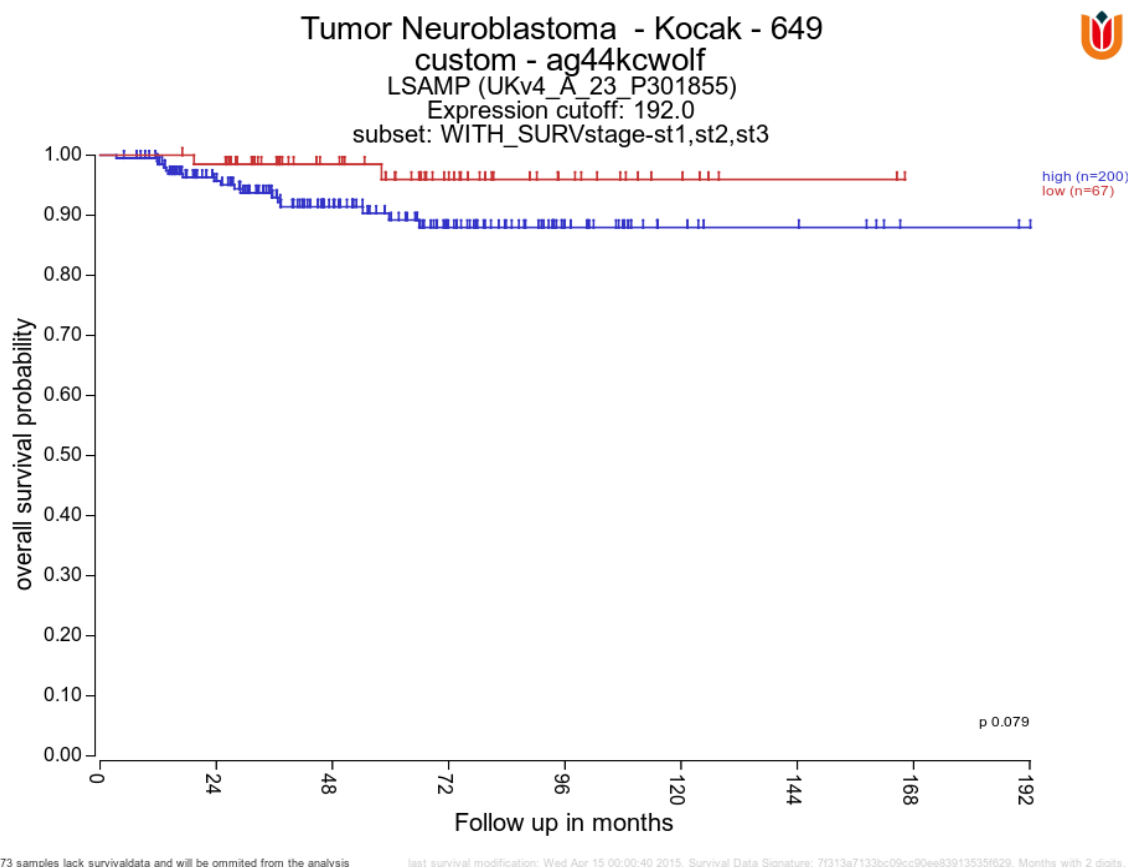


Abbildung 18: Darstellung zum Gesamtüberleben der Neuroblastom-Stadien 1-3 nach INSS. Der Datensatz Kocak-649 zeigt einen nicht signifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger LSAMP-Expression. Der Cutoff zwischen hohem und niedrigem Überleben wurde bei der ersten Quartile gesetzt. Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch Herrn J. Koster, siehe 12.3 (R2: Genomics Analysis and Visualization Platform; Kocak-649 INSS 1-3).

4.4.3 Gesamtüberleben der Patienten mit Neuroblastom Stadium 4 nach INSS

In den Datensätzen NRC-283 und TARGET-249 konnte kein Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens zwischen Patienten mit hoher und niedriger LSAMP-Expression festgestellt werden. In SEQC-498 zeigen Patienten mit hoher LSAMP-Expression ein höheres Gesamtüberleben, allerdings ist das Ergebnis knapp nicht signifikant ($p=0,058$) (siehe Abbildung 19). In Oberthuer-251 kann ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit hoher Expression dargestellt werden. Die Datensätze Versteeg-88 und Kocak-649 zeigen einen leichten, jedoch nicht signifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit hoher LSAMP-Expression. Seeger-102 ist diesbezüglich nicht auswertbar.

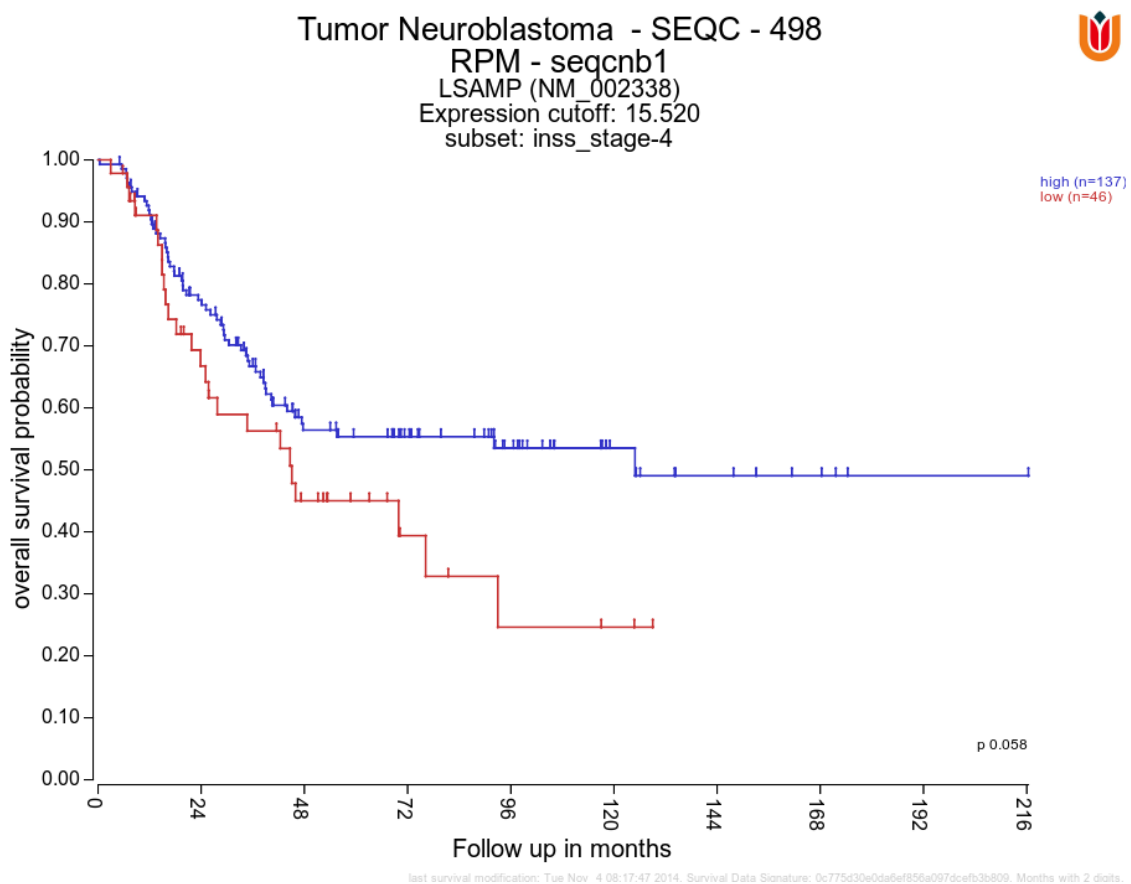


Abbildung 19: Darstellung zum Gesamtüberleben des Neuroblastom-Stadiums 4 nach INSS. Der Datensatz SEQC-498 zeigt einen nicht signifikanten ($p=0,058$) Überlebensvorteil für Patienten mit hoher LSAMP-Expression. Der Cutoff zwischen hohem und niedrigem Überleben wurde bei der ersten Quartile gesetzt. Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch Herrn J. Koster, siehe 12.3 (R2: Genomics Analysis and Visualization Platform; SEQC-498 INSS 4).

4.4.4 Gesamtüberleben von Patienten ohne *MYCN*-Amplifikation

In Oberthuer-251 zeigen Patienten mit hoher LSAMP-Expression ein signifikant ($p < 0,05$) höheres Gesamtüberleben. In allen anderen Datensätzen (siehe beispielhaft Abbildung 20) ist ein nicht signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit hoher LSAMP-Expression ersichtlich. Seeger-102 ist diesbezüglich nicht auswertbar.

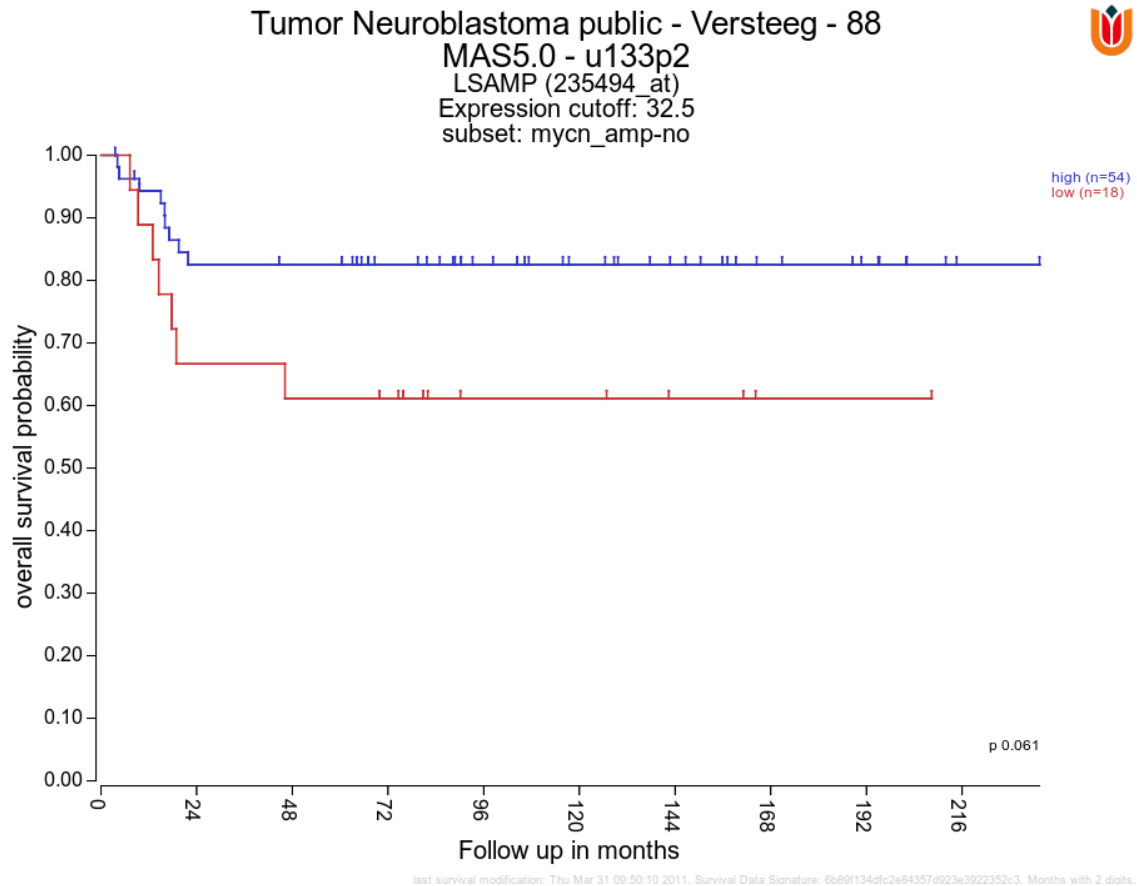


Abbildung 20: Darstellung zum Gesamtüberleben von Patienten ohne *MYCN*-Amplifikation. Der Datensatz Versteeg-88 zeigt einen nicht signifikanten ($p=0,061$) Überlebensvorteil für Patienten mit hoher LSAMP-Expression. Der Cutoff zwischen hohem und niedrigem Überleben wurde bei der ersten Quartile gesetzt. Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch Herrn J. Koster, siehe 12.3 (R2: Genomics Analysis and Visualization Platform; Versteeg-88 *MYCN* single copy).

4.4.5 Gesamtüberleben von Patienten mit *MYCN*-Amplifikation

In Versteeg-88 und TARGET-249 konnte kein Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens zwischen Patienten mit hoher und niedriger LSAMP-Expression festgestellt werden. In den Datensätzen Oberthuer-251, SEQC-498 und Kocak-649, zeigen Patienten mit hoher LSAMP-Expression einen nicht signifikanten Überlebensvorteil. In NRC-283 (siehe Abbildung 21) kann ein nicht signifikanter Überlebensnachteil einer hohen LSAMP-Expression festgestellt werden. Seeger-102 ist diesbezüglich nicht auswertbar.

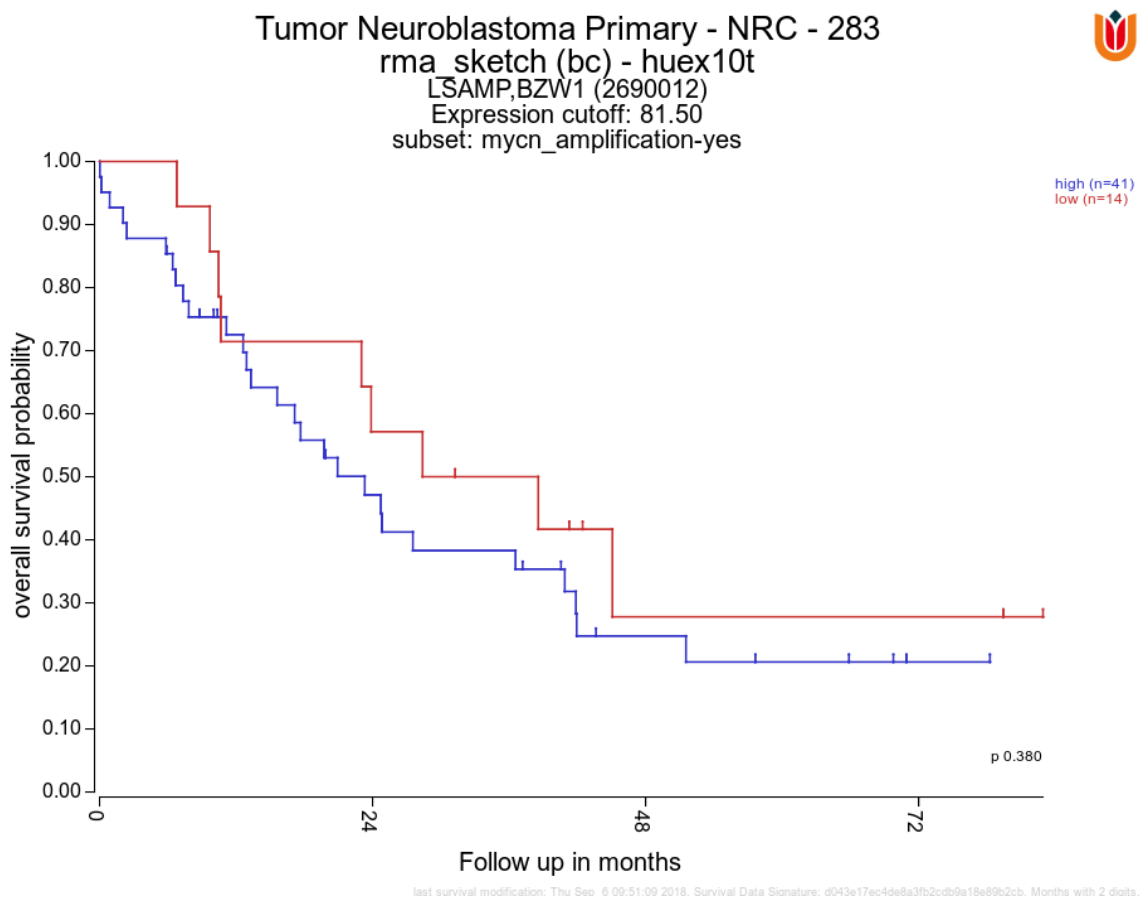


Abbildung 21: Darstellung zum Gesamtüberleben von Patienten mit *MYCN*-Amplifikation. Der Datensatz NRC-283 zeigt einen nicht signifikanten ($p=0,38$) Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger LSAMP-Expression. Der Cutoff zwischen hohem und niedrigem Überleben wurde bei der ersten Quartile gesetzt. Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch Herrn J. Koster, siehe 12.3 (R2: Genomics Analysis and Visualization Platform; NRC-283 *MYCN* amplifiziert).

4.4.6 Gesamtüberleben von Patienten $>/<18$ Monaten bei Erstdiagnose

Lediglich die Datensätze Kocak-649 und Versteeg-88 können diesbezüglich ausgewertet werden. Sie zeigen gegenteilige, jeweils nicht signifikante Überlebensvorteile der jeweiligen Altersgruppen bei Erstdiagnose.

4. Ergebnisse

| Datensatz (Gesamt- gruppe n=) | Überlebens- vorteil im Stadium 1-4 nach INSS | Überlebens- vorteil im Stadium 1-3 nach INSS | Überlebens- vorteil im Stadium 4 nach INSS | Überlebens- vorteil ohne <i>MYCN</i> - Amplifikation | Überlebens- vorteil mit <i>MYCN</i> - Amplifikation | Überlebens- vorteil >18 Monate | Überlebens- vorteil <18 Monate |
|-------------------------------------|--|---|---|---|--|---|---|
| NRC (283) | kein Unterschied | niedrige Expression p=0,35 | kein Unterschied | hohe Expression p=0,69 | niedrige Expression p=0,38 | | |
| Oberthuer (251) | hohe Expression p=6,6 e ⁻³ | hohe Expression p=0,344 | hohe Expression p=6,1 e ⁻³ | hohe Expression p=0,025 | hohe Expression p=0,61 | | |
| SEQC (498) | hohe Expression p=0,032 | kein Unterschied | hohe Expression p=0,058 | hohe Expression p=0,4 | hohe Expression p=0,21 | | |
| Versteeg (88) | hohe Expression p=7 e ⁻³ | niedrige Expression p=0,29 | hohe Expression p=0,69 | hohe Expression p=0,06 | kein Unterschied | niedrige Expression p=0,45 | hohe Expression p=0,09 |
| TARGET (249) | kein Unterschied | kein Unterschied | kein Unterschied | hohe Expression p=0,56 | kein Unterschied | | |
| Seeger (102) | Gesamtdatensatz: niedrige Expression p=0,036 | keine Untergruppierung | keine Untergruppierung | keine Untergruppierung | keine Untergruppierung | | |
| Kocak (649) | hohe Expression p=0,82 | niedrige Expression p=0,079 | hohe Expression p=0,37 | hohe Expression p=0,68 | hohe Expression p=0,41 | hohe Expression p=0,91 | niedrige Expression p=0,42 |

Tabelle 17: Übersicht zur Auswertung bezüglich des Gesamtüberlebens der Patienten nach Kaplan-Maier, abhängig von der LSAMP-Expression der Untergruppen. Die Datensätze wurden gesamt und in den Untergruppen Stadium 1-3 nach INSS, Stadium 4 nach INSS, mit und ohne *MYCN*-Amplifikation und abhängig vom Alter bei Erstdiagnose gebildet. Aufgrund der Datenlage konnten nur 2 Datensätze bezüglich Überlebensvorteile abhängig vom Alter bei Erstdiagnose ausgewertet werden, für den Datensatz Seeger (102) werden aufgrund fehlender Möglichkeit zur Untergruppierung die Daten des gesamten Datensatzes angegeben. Die Tabelle stellt für jeden Datensatz und jede Untergruppe dar, ob Patienten mit hoher oder niedriger LSAMP-Expression einen Überlebensvorteil haben. Überlebensvorteile durch eine hohe Expression sind blau und durch eine niedrige Expression rot hinterlegt. Signifikante Unterschiede werden zusätzlich durch FETT geschriebene p-Werte gekennzeichnet.

5. Diskussion

Das Neuroblastom geht von Zellen des sympathischen Nervensystems aus und wird den embryonalen Tumoren zugeordnet. Es ist mit 7,2 % der Malignome bei Kindern im Alter unter 15 Jahren der häufigste, solide, extrakraniell auftretende Tumor. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei etwa 15 Monaten. Die teils erheblichen Unterschiede in der Symptomatik der Patienten und die oft altersbedingt eingeschränkte Beurteilbarkeit der Beschwerden stellen eine Herausforderung bei der Diagnosestellung dar. Etwa 30 % der Neuroblastome werden in Deutschland bei Routineuntersuchungen diagnostiziert (Powell et al., 1998). Von prognostischer Bedeutung ist die Stadieneinteilung nach INSS, nach der sich auch die Stratifizierung der Therapiegruppen richtet. Die INSS Einteilung erfolgt anhand der Tumorlokalisation und -ausdehnung, dem Lymphknotenstatus und dem Patientenalter.

Neben dem klinischen Stadium stellen molekulargenetische Marker hoch relevante Faktoren hinsichtlich Therapie und Prognose dar. Hier spielt vor allem der *MYCN*-Status eine große Rolle. In den vergangenen Jahren wurden viele weitere molekulargenetische Eigenschaften der Tumorzellen in Hinblick auf deren Relevanz für den Verlauf der Neuroblastomerkrankungen untersucht (Aygün, 2018). Ein Beispiel ist die Untersuchung der Rolle von Tyrosinkinase Rezeptoren. Neuroblastomzelllinien, die Tyrosin Kinase Rezeptor A (TrkA) exprimieren, sind in Abwesenheit von Nerve Growth Factor (NGF) in ihrem Zellwachstum gehemmt und Neuroblastompatienten die TrkA exprimieren weisen unabhängig von anderen Risikofaktoren ein signifikant höheres Gesamtüberleben auf (Eggert et al., 2000; de Souza et al., 2011). Neben der Amplifikation von *MYCN* oder dem LOH 1p spielen die weiteren molekularen Marker jedoch eine untergeordnete Rolle in den Therapieempfehlungen für Neuroblastome der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) (Simon et al., 2017).

5.1 Genomische Veränderungen von *LSAMP* in primären Tumoren

Das LSAMP Protein wird zu den IgLONs gezählt, einer Immunglobulin-Unterfamilie, welche aus LSAMP, OBCAM (Opioid-binding cell adhesion molecule, auch OPCML genannt) und Neurotrimin bestehen (Pimenta et al., 1996). Zu den IgLONs werden weiterhin NEGR1 (Neuronal Growth Regulator 1, auch KILON Kindred of IgLON) und IgLON5 gezählt (Funatsu et al., 1999; Vanaveski et al., 2017). Untersuchungen haben gezeigt, dass IgLONs eine wichtige Rolle beim Wachstum von Neuronen und der

Ausbildung von Synapsen spielen (Mann et al., 1998; Hashimoto et al., 2009; Vanaveski et al., 2017).

IgLONs wurden in verschiedenen Tumorgeschehen als Tumorsuppressorgene identifiziert. Die Rolle von OBCAM wurde in epithelialen Ovarialkarzinomen und Hirntumoren beschrieben (Sellar et al., 2003; Reed et al., 2007). Die Reexpression von NEGR1 in einer Zelllinie führte zu vermindertem Zellwachstum auf Agarplatten und im Flüssigmedium (Kim et al., 2014).

Umfangreiche Daten zur Rolle von LSAMP im Rahmen einer Tumorerkrankung liegen für das Osteosarkom vor. Eine das *LSAMP*-Gen betreffende Deletion auf Chromosom 3q13.31 konnte in Osteosarkomen nachgewiesen werden. Eine heterozygote Deletion betraf dabei 56 % der untersuchten Osteosarkom-Proben (n=36). In 11 % der Fälle lag eine homozygote Deletion vor. Diese Daten weisen auf eine Tumorsuppressorfunktion von *LSAMP* und eine Rolle in der Genese von Osteosarkomen hin. In Hinblick auf die Prognose korreliert eine niedrige LSAMP-Expression mit einem kürzeren Gesamtüberleben bei Osteosarkompatienten (Kresse et al., 2009).

Interessanterweise konnten wir in einer genomweiten CGH-Array-Untersuchung der Neuroblastom-Zelllinien IMR32, Kelly und SK-N-BE in allen drei Fällen Deletionen einzelner oder mehrere Exons des *LSAMP*-Gens nachweisen (siehe Abbildung 6). Es stellte sich nun die Frage, ob und in welcher Häufigkeit genomische Kopienzahlveränderungen innerhalb des *LSAMP*-Gens auch bei primären Neuroblastomen vorliegen und ob ein Funktionsverlust von *LSAMP* einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung und die Prognose für die betreffenden Neuroblastompatienten bedeutet. In primären Neuroblastomen wurden Deletionen im Bereich des *LSAMP*-Gens zuvor nicht beschrieben. Es bestand die Möglichkeit, genomische DNA aus Gewebeproben primärer Neuroblastome zu untersuchen. Die Proben stammen aus unterschiedlichen Quellen (siehe 2.8 Tumormaterial).

Zur Untersuchung einer größeren Anzahl von Proben bei geringem Material und Kostenaufwand wurde eine semiquantitative Real-Time PCR etabliert. Die Validierung der Methode wurde anhand der Zelllinien durchgeführt, von denen die Daten aus der CGH-Array-Untersuchung vorlagen. Als Kontrollen wurde humane Leukozyten-DNA von insgesamt 20 gesunden Personen verwendet. Neben *LSAMP* wurden Bereiche aus 6 Kontrollgenen untersucht. Diese wurden auf 4 unterschiedlichen Chromosomen liegend

ausgewählt, um den Einfluss einer möglicherweise veränderten Kopienanzahl eines einzelnen Chromosoms auf das Ergebnis zu minimieren. Mit diesem PCR Verfahren konnten in allen drei Zelllinien Deletionen der Exons nachgewiesen werden, die auch in der Arrayanalyse detektiert wurden (siehe Abbildung 7). Die semiquantitative Realtime PCR stellt damit ein Verfahren dar, mit dem zuverlässig Deletionen im *LSAMP*-Gen nachgewiesen werden können.

Eine erste Gruppe von Neuroblastomen waren n=13 Tumore, bei denen im Rahmen einer NGS-Genom-Studie (n=201, Universitätskinderklinik Köln, Abteilung Experimentelle Kinderonkologie) Auffälligkeiten im Bereich des *LSAMP*-Gens festgestellt wurden. Diese Auffälligkeiten waren jedoch unspezifisch, da in dem genomischen Bereich um *LSAMP* teilweise keine gute Coverage vorlag und zur Kopienzahlbestimmung die Signale über relativ große Genabschnitte gemittelt werden mussten (persönliche Kommunikation mit Frau Dr. Ackermann, Universitätskinderklinik Köln). Die Untersuchung dieser 13 Proben mittels Real-Time-PCR ergab in 9 Fällen keinen Hinweis auf eine Deletion des *LSAMP*-Gens. In 3 Fällen (Neuroblastome 2972140, 2972242 und 2972536) fanden sich Hinweise auf Deletionen im *LSAMP*-Gen. Ein Tumor (2972361) zeigte einen Wert oberhalb des +/-2SA-Intervalls (siehe Abbildung 8 und 9).

Bei genauer Betrachtung der Real-Time-PCR Ergebnisse der Neuroblastome 2972536 und 2972242 fiel auf, dass die Kontroll-Gene um den Wert 1 (entspricht einer Genkopie pro haploidem Genom, Werte nicht dargestellt) und die *LSAMP*-Exons alle zwischen 0,7 und 0,9 liegen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Tumore einen triploiden Chromosomensatz besitzen, mit einer Deletion im Bereich des *LSAMP*-Gens in einer der drei Genkopien. Demnach würden die zu erwartenden Werte zwischen 0,5 und 1 liegen. Uns liegen leider keine Daten zur Ploidie der Tumore vor. Da es sich bei den genannten Tumoren um nicht *MYCN*-amplifizierte handelt, ist ein (near)-triploider-Chromosomensatz wahrscheinlich (Look et al., 1991; Lundberg et al., 2013). Auch zur Etablierung der PCR hatten wir keine Proben von sicher triploiden Tumoren oder Zelllinien mit bekannter Deletion in einer der drei Genkopien. Daher konnte die Methode diesbezüglich nicht zuvor kalibriert werden.

Um neben der durch die Standardabweichung festgelegten Grenzen zur Detektion einer Deletion noch einen alternativen Ansatz zur Interpretation der Daten zu nutzen, wurde

die Auswertung durch „Runden“ durchgeführt. Mithilfe dieser einfach zu interpretierenden Methode (Rundung der Genkopienanzahl auf die ganze Zahl) wurde bereits bei Osteosarkomen die Anzahl der Genkopien bestimmt (Pasic et al., 2010). Hiernach ergab sich nur für Neuroblastom 2972242 eine Deletion.

Die Auswertung durch Runden ist einfach durchzuführen und zu interpretieren und liefert insbesondere bei der Auswertung von Zelllinienergebnissen mit nur geringen Rundungsdifferenzen valide Ergebnisse. Jedoch ist sie weniger sensitiv, da sie in einem Intervall von $\sim 0,5$ (0,75-1,249 Genkopien pro haploidem Genom) eine unveränderte Genkopienanzahl ergibt und die Datenverteilung nicht berücksichtigt. Das Intervall von $\pm 2SA$ (die doppelte Standardabweichung oberhalb und unterhalb des Mittelwerts) beträgt in unseren Untersuchungen je nach untersuchtem Exon zwischen 0,24 und 0,76. Da das $\pm 2SA$ -Intervall jedoch in 6 der 7 Exons kleiner als das Rundungsintervall (von 0,5) war, wurden in primären Neuroblastomen mehr Deletionen detektiert.

Weitere Neuroblastom-Datensätze sind in der „Gene Expression Omnibus“ Datenbank (GEO) hinterlegt. Für diese Arbeit wurden genomische Micro-Array-Daten von insgesamt 881 Neuroblastomen ausgewertet (siehe 3.5.1). Eine Untersuchung mittels qPCR war aufgrund der hohen Fallzahl nicht in allen Fällen möglich. Darum haben wir versucht anhand der Arraydaten eine Vorauswahl an Tumoren zu treffen, bei denen die Werte im Bereich des *LSAMP*-Gens für eine Deletion sprechen könnten. Ein Problem in der Detektion von kleinen, intragenischen Deletionen mittels Micro-Array stellt die Sondenabdeckung dar. Im Falle des *LSAMP*-Gens, wurde bei den uns zur Verfügung stehenden Datensätzen nicht jedes Exon durch eine Sonde erfasst (siehe Tabelle 9).

In nur vier Neuroblastomen ließen die Micro-Array-Daten aufgrund der von uns angewandten Kriterien auf eine mögliche Deletion im *LSAMP*-Gen schließen (siehe 3.5.1). Die Untersuchung mittels Real-Time-PCR und Auswertung nach der Standardabweichung ergab für Neuroblastom NB183 Hinweise auf Deletionen in Exon 2, 5 und 6 (siehe Abbildung 10). Für Exon 6 bestätigte sich dies auch in der oben beschriebenen Auswertung mittels Runden (siehe Tabelle 11).

Für Neuroblastom NB147 lagen die auffälligen Sonden, die uns zur Durchführung einer PCR veranlassten, in Introns (siehe Tabelle 5). Hier ergab die Auswertung der Real-Time-PCR keinen Hinweis auf eine Deletion eines Exons. In NB22 und NB29 konnten die in der Micro-Array-Auswertung festgestellten, potentiellen Deletionen ebenfalls

nicht bestätigt werden. Ursächlich für die abweichenden Daten aus der Micro-Array-Untersuchung könnten Fehler im Rahmen der Hybridisierung oder beim Scannen des Arrays sein. Solche Abweichungen können jedoch auch durch das Mitteln über größere Genabschnitte entstehen (Nguyen et al., 2002; Victor et al., 2005).

In einem weiteren Schritt erfolgte die Untersuchung von primären Neuroblastomen, zu denen uns keine Informationen bezüglich des *LSAMP*-Gens vorlagen. Innerhalb einer Gruppe von $n=37$ primären Neuroblastomen konnten bei 6 Tumoren (16 %) Hinweise auf Deletionen innerhalb des *LSAMP*-Gens festgestellt werden. In 4 der 6 Tumoren waren 2 Exons betroffen, in 2 nur jeweils ein Exon. In Exon 2 stellten wir in 3 primären Neuroblastomen eine potentielle Deletion fest, in Exon 5 in einem. Alle 6 Neuroblastome zeigten Auffälligkeiten in Exon 3, was möglicherweise mit der im Vergleich zu den anderen Exons geringeren Standardabweichung der qPCR dieses Exons zusammenhängt.

In der Auswertung zeigt sich, dass die Zahlenwerte der potentiell deletierten Exons in allen Fällen relativ knapp unterhalb des durch die doppelte Standardabweichung festgelegten Bereichs liegen (siehe Abbildung 11). Die Wahrscheinlichkeit einer falsch-positiven Einordnung als Deletion liegt bei Werten unterhalb der zweiten Standardabweichung bei 2,3 % (siehe 3.3.2.3 Auswertung der Real-Time-PCR). Im Unterschied zur $\pm 2SA$ -Methode (6 Deletionen) ergaben sich mittels der Auswertungsmethode durch Runden erwartungsgemäß in weniger Fällen eine Deletion. Hiernach zeigte sich nur in einem Neuroblastom (960122) eine Deletion in Exon 3. Es ist möglich, dass eine Abweichung von einem diploiden Chromosomensatz zu den nur knapp unterhalb der zweiten Standardabweichung gemessenen Werten beiträgt.

In 7 primären Neuroblastomen zeigten einzelne oder mehrere Exons in der Real-Time-PCR Werte oberhalb der zweiten Standardabweichung, was für eine Duplikation der betreffenden Abschnitte sprechen würde (siehe Abbildung 12). Die Abweichungen von der Standardabweichung waren hier tendenziell größer, allerdings konnten wir unsere Real-Time-PCR nicht bezüglich Duplikationen validieren, da uns kein Untersuchungsmaterial, z.B. aus Zelllinien mit gesicherter Duplikation (z.B. im Rahmen einer Arrayuntersuchung) vorlag. Kein Neuroblastom zeigte in unserer Untersuchung gleichzeitig eine mögliche Duplikation und Deletion in verschiedenen

Exons.

In der Auswertung der Real-Time-PCR-Daten nach der doppelten Standardabweichung (+/- 2SA-Methode) sind in den primären Neuroblastomen insgesamt mehr Deletionen detektiert worden, als in der Auswertung mittels Runden nach Pasic und Kollegen. In der Auswertung der Zelllinien zeigten beide Methoden (+/-2SA- und die Methode nach Pasic und Kollegen) hingegen größtenteils übereinstimmende Ergebnisse und nur geringe Rundungsdifferenzen. Wir führen dies auf die zelluläre Heterogenität der primären Neuroblastome zurück, wohingegen die DNA aus den untersuchten Zelllinien sehr homogenes Untersuchungsmaterial bzgl. genomischer Veränderungen darstellt. Die Methode nach Pasic und Kollegen weist eine geringere Sensitivität dafür aber auch eine geringere Falsch-Positiv Rate auf. Die zelluläre Heterogenität des Untersuchungsmaterials stellt einen entscheidenden Faktor bei der Detektion von Deletionen dar.

Aufgrund genetisch unterschiedlicher Zellklone innerhalb eines primären Neuroblastoms, kann angenommen werden, dass aus einer einzelnen Probe eines primären Neuroblastoms keine Darstellung aller genetischen Veränderungen zu gewinnen ist. Es ist also möglich, dass auch aus diesem Grund genetische Veränderungen in einem Tumor nicht erkannt werden, die in einem Teil der Tumorzellen bereits vorliegen. So konnten in Rezidivtumoren typischerweise vorkommende genetische Veränderungen im Primarius häufig nur vereinzelt oder gar nicht nachgewiesen werden (Schulte et al., 2018).

Neuroblastom-Rezidiv-Proben und Metastasen weisen im Vergleich zu den Tumoren bei Erstdiagnose mehr genetische Veränderungen auf (Schleiermacher et al., 2010). Es ist anzunehmen, dass sich Zellklone mit genetischen Eigenschaften, die diese z.B. besonders widerstandsfähig gegen den Einsatz bestimmter Medikamentengruppen machen, im Krankheitsverlauf und durch eine stattfindende Therapie herausselektionieren. Zusätzlich zur Selektion solcher Zellklone, können in Tumorzellen auch im Laufe der Zeit und über die Therapie hinweg neue Mutationen entstehen, die bei Erstdiagnose noch in keiner Tumorzelle vorlagen. Bei Neuroblastom-Rezidiven konnte eine signifikant höhere Zahl genomischer Veränderungen und sogar eine *de novo* MYCN-Amplifikation im Vergleich zum jeweiligen primären Neuroblastom nachgewiesen werden (Schramm et al., 2015). In dieser Studie ergab die

Untersuchung der 16 Paare aus unbehandelten primären Neuroblastomen und den jeweiligen Rezidiven eine signifikante Zunahme der Allelfrequenz einzelner Mutationen in den Rezidivproben.

Für unsere Untersuchung stand uns DNA von Rezidivtumoren von insgesamt 7 Patienten zur Verfügung. Bei 3 Neuroblastom-Patienten ergab die Untersuchung des Rezidivtumor-Materials eine andere Genkopienanzahl als die Untersuchung der Erstprobe (siehe Tabelle 12). Da ein Verlust von *LSAMP* auch häufig in kultivierten Tumorzelllinien (siehe Tabelle 15) und in fortgeschrittenen Stadien anderer Tumorarten gefunden werden kann (Petrovics et. al., 2015), lässt dies die Vermutung zu, dass dadurch ein Selektionsvorteil für die betreffenden Zellklone vorliegt.

Dabei weicht die Genkopienanzahl nach unserer Auswertung in den Rezidiven zwar vom Primärtumor ab, allerdings unterscheiden sich die absoluten Ct-Werte nur leicht von den gemessenen Werten am Primärtumormaterial.

Dies kann zum einen durch eine veränderte Anzahl der Genkopien in den Rezidivproben im Vergleich zu den Primärtumoren, aber auch durch eine hohe intratumorale genetische Inhomogenität ohne Änderung über die Zeit bedingt sein (Schulte et al., 2018). Einzelne Zellklone können initial einen sehr geringen Anteil an der Gesamtzahl der Tumorzellen haben. Durch den Einsatz neuer Sequenzierungsverfahren („deep sequencing“) können Zellpopulationen identifiziert werden, welche nur einen Anteil von einer von 5000 Tumorzellen haben (Campbell et al., 2008). In zukünftigen Untersuchungen könnte mithilfe moderner Sequenzierungsverfahren des genomischen Bereichs um *LSAMP* untersucht werden, ob ein geringer Anteil von Tumorzellen bereits bei Erstdiagnose eine *LSAMP*-Kopienanzahlveränderung besitzt.

5.2 Genomische Veränderungen von *LSAMP* in Zelllinien

In dieser Arbeit wurden 12 Neuroblastomzelllinien mit und ohne *MYCN*-Amplifikation und weitere 17 Zelllinien unterschiedlicher Ursprungsgewebe auf Deletionen im *LSAMP*-Gen hin untersucht.

Eine etablierte, immortale Zelllinie eines Tumors stellt die Extremform eines Selektionsprozesses dar (Selektion eines Einzelklons). Diese Zelllinien teilen sich über viele Zellgenerationen hinweg. Für einen Tumor typische genetische Veränderungen

sind in den entsprechenden Zelllinien oft ausgeprägt nachweisbar und werden teilweise auch als Modell für die jeweilige Tumorgenese verwendet (Domcke et al., 2013; Kasai et al., 2016). Allerdings können in einem solchen Zelllinienmodell auch nicht alle in einem Tumor auftretenden Prozesse nachgebildet werden.

In unserer Untersuchung zeigten sich in 5 von insgesamt 9 *MYCN*-amplifizierten und in zwei von insgesamt 3 nicht amplifizierten Neuroblastom-Zelllinien Deletionen einzelner oder mehrerer Exons im *LSAMP*-Gen (siehe Abbildung 13 und 14). Die Ergebnisse der Untersuchungen der Zelllinien sind dabei deutlich einfacher zu interpretieren als die Ergebnisse der primären Neuroblastome, da die Werte der Real-Time-PCR oft sehr dicht um „0“, „0,5“ oder „1“ Genkopie pro haploidem Genom liegen (siehe Abbildung 13 und 14). Dies lässt sich dadurch erklären, dass genomische Veränderungen in Zelllinien alle untersuchten Zellen gleichförmig betreffen (Klonalität) und die Deletion eines Allels gut detektierbar machen. Sind hingegen nur einzelne Zellen in einer Tumorprobe von einer Deletion betroffen, ist dies in einer Untersuchung mit einem Durchschnittsverfahren wie der Real-Time-PCR schwieriger nachzuweisen.

Für Osteosarkome konnte eine große Übereinstimmung der genetischen Veränderungen und Häufigkeiten zwischen Tumoren und Zelllinien nachgewiesen werden (Kresse et al., 2009). Deletionen, die das *LSAMP*-Gen beinhalteten, konnten in den Tumoren sogar häufiger nachgewiesen werden als in den untersuchten Zelllinien. Dies konnten wir in unseren Untersuchungen für Neuroblastome nicht zeigen. Hier waren *LSAMP*-Deletionen in den zur Untersuchung vorliegenden Zelllinien deutlich häufiger als in den untersuchten primären Neuroblastomen zu finden.

Darüber hinaus zeigte die Untersuchung von 17 Zelllinien unterschiedlicher Ursprung-Tumorgewebe (keine Neuroblastome) auch in 7 Fällen (41 %) Deletionen im *LSAMP*-Gen. Betroffen waren die Zelllinien HCT116 (Ursprung: Kolonkarzinom), THP1 (Ursprung: Monozytenleukämie), HEK293 (Ursprung: transformierte embryonale Nierenzellen), OVCAR (Ursprung: Ovarialkarzinom), MDA-MB231, MCF7 (Ursprung: Mammakarzinom) und LN229 (Ursprung: Glioblastom). Darüber hinaus konnte in 6 Zelllinien ein Zugewinn der Kopienzahl einzelner Exons des *LSAMP*-Gens festgestellt werden. Veränderungen des *LSAMP*-Genlokus sind somit in Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten nachweisbar. Es handelt sich daher nicht um neuroblastom- oder osteoblastomspezifische Veränderungen. Insgesamt wurden in unseren Untersuchungen

LSAMP-Deletionen seltener in Zelllinien anderen Ursprungs als in Neuroblastom-Zelllinien nachgewiesen. Dies kann jedoch nicht verallgemeinert werden, da wir nur eine begrenzte Anzahl (n=17) von Zelllinien anderer Tumorentitäten untersucht haben.

5.3 *LSAMP*-Expression

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung primärer Neuroblastome auf genomische Veränderungen im *LSAMP*-Gen. Hierfür standen uns aus verschiedenen Quellen DNA-Proben zur Verfügung (siehe Material und Methodenteil). Die Möglichkeit einer mRNA-Expressionsmessung bestand aus dem vorliegenden Probenmaterial nicht. Wir haben daher auf die Möglichkeit zurückgegriffen, bereits existierende Expressionsdatensätze bezüglich der *LSAMP*-Expression in primären Neuroblastomen auszuwerten.

Die von uns ausgewerteten Neuroblastom-Expressions-Datensätze zeigten untergruppenabhängige Unterschiede der *LSAMP* Expression.

In vier der sieben ausgewerteten Datensätze (Oberthuer-251, SEQC-498, Versteeg-88 und Seeger-102) konnten statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen einer hohen/niedrigen Expression von *LSAMP* und dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden (R2: Genomics Analysis and Visualization Platform; siehe Tabelle 16).

Betrachtet man das Gesamt-Überleben von Neuroblastompatienten in den INSS Stadien 1-4 in Abhängigkeit von der *LSAMP*-Expression, so ist in 5 von 7 Datensätzen ein Überlebensvorteil bei einer hohen Expression zu beobachten (siehe Tabelle 17 und bspw. Abbildung 17, 19 und 20). In 3 dieser Datensätze ist dieser Unterschied statistisch signifikant (siehe Tabelle 17). Der Datensatz Seeger-102 besteht ausschließlich aus nicht *MYCN*-amplifizierten, metastasierten Neuroblastomen und lässt keine Untergruppenanalyse zu, zeigt jedoch insgesamt ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben von Patienten mit hoher *LSAMP*-Expression. In einem weiteren Datensatz (TARGET-249) war kein Unterschied dieser Gruppe im Gesamtüberleben ersichtlich.

Interessant ist die Untersuchung von Subgruppen bezüglich der *LSAMP*-Expression und deren Einfluss auf das Gesamtüberleben. Patienten mit „high-risk“-Stadium 4 (Metastasierung bei Diagnosestellung) zeigten in 4 von 7 Datensätzen ein mit einer hohen *LSAMP*-Expression einhergehendes besseres Gesamtüberleben, in einem

Datensatz war der Unterschied sogar signifikant.

Die Auswertung von Patienten in Stadien ohne primäre Metastasierung bei Diagnosestellung (Stadium 1-3 nach INSS) ergab dagegen in 3 von 7 Datensätzen einen Trend zu einem Überlebensvorteil bei niedriger LSAMP-Expression. Nur ein Datensatz zeigte einen gegenteiligen Trend bei dem Patienten mit hoher LSAMP Expression einen Überlebensvorteil hatten.

Es ist möglich, dass sich ein Überlebensvorteil durch eine hohe LSAMP-Expression vor allem bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien und damit einer schlechteren Gesamtprognose bemerkbar macht. Die prognostische Relevanz der Expression verschiedener Gene in Stadium 4 Neuroblastomen wurde anhand eines Expressionsmusters von 18 Genen (18-gene Stage4NB risk score) beschrieben (Formicola et al., 2016). Anhand dieses Scores können Patienten mit längerem Gesamtüberleben innerhalb der Stadium 4 Neuroblastome identifiziert werden. Ob sich daraus in Zukunft eine klinische Relevanz ergibt, bleibt abzuwarten. *LSAMP* ist jedoch, wie auch interessanterweise *MYCN*, nicht Teil dieser 18 Gene.

Auch in Bezug auf die *MYCN*-Amplifikation können die Beobachtungsgruppen noch einmal unterteilt werden (Tumore mit und Tumore ohne *MYCN*-Amplifikation) Dies kann im Verständnis für die Tumorpathologie durchaus sinnvoll sein, da Neuroblastome mit Amplifikation des *MYCN*-Gens eine molekular distinkte Gruppe zu den Tumoren ohne Amplifikation bilden.

In den nicht *MYCN*-amplifizierten Tumoren beobachteten wir in allen diesbezüglich auswertbaren Datensätzen ein längeres Gesamtüberleben bei Patienten mit höherer LSAMP-Expression, in einem Fall ist dies statistisch signifikant. Patienten mit *MYCN*-Amplifikation zeigten in 3 von 7 Datensätzen ebenfalls einen nicht signifikanten Überlebensvorteil mit hoher LSAMP-Expression. Ein Datensatz (NRC-283) ergab einen gegenteiligen Trend, hier wurden bei genauer Betrachtung nur sehr wenig Neuroblastompatienten der Gruppe mit niedriger LSAMP-Expression zugeordnet, was möglicherweise Einfluss auf diesen Trend hat. 3 weitere Datensätze ließen aufgrund fehlender Untergruppierung und zu kleiner Untergruppen (Mindestgröße je Untergruppe n=8) keine Aussage zu.

Die LSAMP-Expression unterscheidet in den Untergruppen der jungen (<18 Monate bei Diagnosestellung) und älteren Patienten (>18 Monate bei Diagnosestellung) nicht

bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit.

Insgesamt ist aufgrund unserer Auswertung keine eindeutige Aussage bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der Höhe der LSAMP-Expression und dem Gesamtüberleben der Neuroblastom-Patienten möglich. Jedoch ergab gerade die Auswertung der Expressionsdaten von Patienten in den Stadien 1-4 nach INSS einen durch mehrere signifikante Ergebnisse bestätigten Trend: Patienten mit hoher LSAMP-Expression weisen in den meisten der untersuchten Datensätzen ein längeres Gesamtüberleben auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen bei Osteosarkompatienten bei denen Patienten mit niedrigerer LSAMP-Expression (n=11) ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben ($p=0,011$) als Patienten mit normaler Expression (n=17) zeigten (Kresse et al., 2009). Bei rund 21 % (6 von insgesamt 29) der Osteosarkome mit niedriger LSAMP-Expression lagen dabei Deletionen im *LSAMP*-Gen vor. Allerdings konnte auch bei 36 % (5 von 14) der Osteosarkome ohne Deletion eine niedrige LSAMP-Expression nachgewiesen werden (Kresse et al., 2009). Die Deletion von *LSAMP* ist somit eine häufige, aber nicht die einzige Ursache einer verminderten LSAMP-Expression in Osteosarkomen. Als weitere Ursache einer verminderten Expression konnte in dieser Arbeit bei 10 % (3 von 30) der untersuchten Osteosarkome eine Methylierung der CpG-Insel im Promotorbereich von *LSAMP* nachgewiesen werden. Zudem konnte ein Abbruch der Translation als Grund einer verminderten LSAMP-Expression festgestellt werden (Yen et al., 2009). Dieser trat aufgrund einer Deletion in *LSAMP* Exon 1 mit daraus resultierender Verschiebung des Leserasters und Entstehung eines Stopp-Codons auf und konnte in einer von 37 Osteosarkomproben sowie in der Osteosarkomzelllinie HOS nachgewiesen werden.

In einer anderen Studie zeigte die Anzahl der *LSAMP*-Genkopien keinen direkten Zusammenhang mit der Genexpression. Eine verminderte Expression trat in der Untersuchungsgruppe (n=42) sowohl in Osteosarkomen mit verminderter, normaler, als auch erhöhter Genkopien-Anzahl auf (Barøy et al., 2014).

Neben den Studien zu Osteosarkomen, konnte auch in anderen Tumorentitäten eine verminderte LSAMP-Expression nachgewiesen werden. In Klarzelligen Nierenzellkarzinomen und daraus hervorgegangenen Zelllinien konnte eine verminderte LSAMP-Expression im Vergleich zu normalem Nierengewebe, v.a. in Verbindung mit einer Promotor-Methylierung des Gens gezeigt werden (Chen et al., 2003).

Eine verminderte LSAMP-Expression konnte in allen histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms festgestellt werden. Eine statistisch signifikant ($p < 0,05$) verminderte Expression wurde für das Endometroide Ovarialkarzinom im Vergleich zu normalem Ovarialgewebe nachgewiesen (Ntougkos et al., 2005). Zudem wurde ein signifikanter Unterschied der LSAMP-Expression in Abhängigkeit vom Grading festgestellt. Undifferenzierte Karzinome haben dabei niedrigere LSAMP-Expressionslevel als mittelgradig- und gut differenzierte. Stadienabhängige, statistisch signifikante Unterschiede der LSAMP-Expression wurden bei Ovarialkarzinomen nicht nachgewiesen (Ntougkos et al., 2005).

Die Beobachtung, dass eine niedrige LSAMP-Expression einen schlechten prognostischen Faktor in verschiedenen Tumorentitäten darstellt, wird durch funktionelle Daten unterstützt. So zeigte eine Osteosarkom-Zelllinie (IOR/OS14) mit homozygoter *LSAMP*-Deletion nach Reexpression von LSAMP im Anschluß ein vermindertes Wachstum (Barøy et al., 2014). Zusätzlich konnte in Zellen mit einer Reexpression von LSAMP, welche auch eine messbare LSAMP-Proteinexpression hatten, eine veränderte Expression anderer Gene nachgewiesen werden. Die Gene *hairy and enhancer of split 1 (HES1)*, *cancer/testis antigen 2 (CTAG2)* und *kruppel-like factor 10 (KLF10)* waren nach Reexpression von LSAMP hochreguliert (Barøy et al., 2014). Für *KLF10* wird eine proapoptotische und antiproliferative Funktion beschrieben (Spittau und Krieglstein, 2017). Für *HES1* ist eine Tumorsuppressorfunktion in Neuroblastomen bereits beschrieben (Zage et al., 2012). Eine indirekte Regulierung anderer Gene ist somit ein möglicher Mechanismus der Tumorsuppression von LSAMP.

Eine weitere Arbeit untersuchte den Effekt der *LSAMP*-Gen-Stilllegung (Knock-Down mittels small interfering RNA, siRNA) auf den Zellzyklus und auf Zellproliferationsgene von Osteoblasten (Pasic et al., 2010). Ein Knock-Down von *LSAMP* führte zu einer signifikanten Zunahme des Zellwachstums (im MTT-Test, $p=0,007$) und einer Zunahme der sich in der S-Phase befindlichen Zellen. Passend zu den vermehrt auftretenden S-Phase-Zellen, konnte hier auch eine vermehrte Cyclin A2 Expression nachgewiesen werden. Somit kann die Regulierung des Zellzyklus als ein weiterer möglicher Weg der Tumorsuppression von *LSAMP* vermutet werden.

In dieser Arbeit konnten *LSAMP*-Deletionen als ein häufiges Phänomen in Zelllinien verschiedener Ursprungs-Tumorgewebe nachgewiesen werden. Auch in einem geringen

Anteil primärer Neuroblastome konnte eine Deletion verschiedener Exons des *LSAMP*-Gens gezeigt werden. Es ist möglich, dass genomische Veränderungen des *LSAMP*-Gens bei der Entstehung einer Chemotherapieresistenz und der Ausbildung von Rezidivtumoren eine Rolle spielen. Die Auswertung von Neuroblastom-Expressionsdaten zeigt einen Überlebensvorteil von Patienten mit höherer *LSAMP*-Expression. Dieser Zusammenhang zeigt sich insbesondere bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien.

Ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen genomischen Veränderungen im *LSAMP*-Gen, der Expression von *LSAMP* und einem funktionellen Einfluss auf das Tumorzellwachstum und die Prognose von Neuroblastompatienten muss durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

Anhand einer größeren Anzahl primärer Neuroblastome wäre zu untersuchen, ob *LSAMP*-Deletionen gehäuft in fortgeschrittenen Tumorstadien im Rahmen eines Tumorzell-Selektionsprozesses zu finden sind. In Osteosarkomen und Nierenzellkarzinomen wurden als weitere Ursache einer Inaktivierung des *LSAMP*-Gens Promotor-Methylierungen und ein Translationsabbruch beschrieben. In einem weiteren Schritt wäre zu untersuchen, ob solch inaktivierende Mechanismen auch in Neuroblastomen auftreten.

6. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor und das häufigste, solide, extrakraniell auftretende Malignom im Kindesalter. Klinisch äußern sich Neuroblastome abhängig von ihrer Lokalisation durch verschiedenste Symptome. Am häufigsten treten abdominale Schmerzen auf, jedoch sind frühe Erkrankungsstadien oft asymptomatisch. Über 30 % der Erkrankungen werden in Deutschland im Rahmen von Routine-Untersuchungen gestellt. Das Neuroblastom wird in die Krankheitsstadien 1-4 und 4S nach INSS eingeteilt. Die Einteilung in die Behandlungsgruppen erfolgt anhand klinischer und molekulargenetischer Parameter.

Das *LSAMP*-Gen besteht aus 7 Exons und liegt auf Chromosom 3q13.2-q21. Es ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Proteine dieser Familie bilden funktionelle Einheiten, sogenannte Diglons aus. Diese konnten in kortikalen und subkortikalen Regionen des limbischen Systems nachgewiesen werden. Sie scheinen eine wichtige Rolle bei der Verbindung funktioneller Systeme während der Entwicklung des Gehirns zu spielen. Das Gen wurde im Zusammenhang mit verschiedenen Tumoren (Nierenzellkarzinom, Ovarialkarzinom, Osteosarkom) untersucht. Insbesondere beim Osteosarkom sind Deletionen im *LSAMP*-Gen häufig zu finden. Für das *LSAMP*-Gen wird eine Funktion als Tumorsuppressorgen diskutiert.

In dieser Arbeit wurden 54 primäre Neuroblastome, 12 Neuroblastomzelllinien und 17 Zelllinien anderer Ursprungsgewebe auf Deletionen im *LSAMP*-Gen mittels einer Real-Time-PCR untersucht. In 16 % (6 aus 37) der untersuchten primären Neuroblastome konnten potentielle Deletionen nachgewiesen werden. Aus der Datenbankrecherche bestätigten sich in der Real-Time-PCR *LSAMP*-Deletionen in 3 (von 13) Neuroblastom-NGS-Datensätzen und in einem (von 4) Micro-Array-Datensätzen. Häufiger konnten *LSAMP*-Deletionen in Neuroblastomzelllinien (58 %) und Zelllinien anderer Ursprungsgewebe (41%) nachgewiesen werden. Möglicherweise stellt der Verlust von *LSAMP* einen Selektionsvorteil im Rahmen der Etablierung der Zelllinien dar. Es ist möglich, dass solche Selektionsprozesse auch bei Neuroblastompatienten im Rahmen von Chemotherapien stattfinden und damit eine Rolle bei Rezidiverkrankungen spielen.

In der R2-Datenbank verfügbaren Neuroblastom Datensätzen kann der Trend zu einem längeren Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier für Patienten mit hoher *LSAMP*-Expression festgestellt werden.

7. Summary

Neuroblastoma is an embryonic tumor and the most common, solid, extracranial malignancy in childhood. Clinically, neuroblastomas express different symptoms depending on their location. Abdominal pain is most common, but early stages of the disease are often asymptomatic. In Germany, more than 30% of neuroblastomas are diagnosed during routine examinations. Neuroblastoma is classified into disease stages 1-4 and 4S according to INSS. The classification into the treatment groups is based on clinical and molecular genetic parameters.

The *LSAMP* gene consists of 7 exons and is located on chromosome 3q13.2-q21. It is a member of the immunoglobulin superfamily. Proteins of this family form functional units, so-called diglons. These could be detected in cortical and subcortical regions of the limbic system. They seem to play an important role in the connection of functional systems during brain development. The gene has been described in association with various tumors (renal cell carcinoma, ovarian carcinoma, osteosarcoma). Especially in osteosarcoma, deletions are frequently found in the *LSAMP* gene. For the *LSAMP* gene, a function as a tumor suppressor gene is discussed.

In this work, 54 primary neuroblastomas, 12 neuroblastoma cell lines and 17 cell lines of another source tissue were examined for deletions in the *LSAMP* gene using a real-time PCR. Potential deletions could be detected in 16 % (6 out of 37) of the investigated primary neuroblastomas. From the database search, real-time PCR confirms *LSAMP* deletions in 3 (out of 13) neuroblastoma NGS datasets and in one (out of 4) microarray datasets. More frequently, *LSAMP* deletions were detected in neuroblastoma cell lines (58%) and cell lines from other tissue sources (41%). The loss of *LSAMP* may be a selection advantage in the context of the establishment of cell lines. It is possible that such selection processes also take place in neuroblastoma patients in the context of chemotherapy and thus play a role in recurrent diseases.

In the neuroblastoma datasets available in the R2 database, there is a trend towards longer Kaplan-Meier overall survival for patients with high *LSAMP* expression.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| A | Adenin |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| cDNA | Copy-DNA |
| CGH | Comparative genomic hybridization |
| CNV | Copy number variation |
| CpG | 5'-C-Phosphat-G-3' |
| Ct | Cycle threshold |
| DI | DNA-Index |
| dmins | double minutes |
| DNA | Desoxy-Ribonuklein-Säure |
| DSMZ | Leibniz Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| ECACC | European Collection of Authenticated Cell Cultures |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| GEO | Gene Expression Omnibus |
| GPOH | Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie |
| HSR | homogeneously staining regions |
| IDRF | Image Defined Risk Factors |
| INPC | International Neuroblastoma Pathology Committee |
| INRGSS | International Neuroblastoma Risk Group Staging System |
| INSS | International Neuroblastoma Staging System |
| K | Kelvin |

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| l | Liter |
| LOH | Loss of Heterozygosity |
| LSAMP | Limbic System Associated Membrane Protein |
| m | Milli (10^{-3}) |
| M | Molar |
| min | Minute |
| MKI | Mitose Karyorrhexis Index |
| MTT | Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid |
| NGS | Next Generation Sequencing |
| μ | Mikro (10^{-6}) |
| o.g. | oben genannt |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| qPCR | quantitative PCR |
| RAAS | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System |
| RNA | Ribo-Nuklein-Säure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| s | Sekunde |
| SRO | Smallest Region of Overlap |
| s.u. | siehe unten |
| T | Thymin |
| v.a. | vor allem |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung in Behandlungsgruppen..... 8

Abbildung 2: Darstellung des *LSAMP*-Gens von Exon 1-7 (e!Ensembl).13

Abbildung 3: Tertiärstruktur des *LSAMP*-Proteins 14

Abbildung 4: Formeln zur Berechnung der Werte aus der Real-Time-PCR.....30

Abbildung 5: Auswertung der Ergebnisse der Real-Time-PCR.31

Abbildung 6: CGH-Arrayanalyse genomischer DNA der drei Neuroblastom Zelllinien
.....38

Abbildung 7: Darstellung von *LSAMP* Exon 1-7 der Zelllinien IMR32, KELLY und
SK-N-BE mit der Real-Time-PCR.....39

Abbildung 8: Auswertung der im Next-Generation-Sequencing auffälligen Tumoren
(Teil 1).40

Abbildung 9: Auswertung der im Next-Generation-Sequencing auffälligen Tumoren
(Teil 2).40

Abbildung 10: Auswertung der in der GEO2R-Datenbank auffälligen Tumoren.42

Abbildung 11: Auswertung der primären Neuroblastome. Dargestellt sind nur die
Tumore, mit Hinweis auf Vorliegen einer Deletion.....43

Abbildung 12: Auswertung der primären Neuroblastome. Dargestellt sind nur die
Tumore, mit Hinweis auf Vorliegen einer Duplikation.....44

Abbildung 13: Auswertung der Neuroblastom-Zelllinien (Teil 1).47

Abbildung 14: Auswertung der Neuroblastom-Zelllinien (Teil 2).47

Abbildung 15: Auswertung der Zelllinien verschiedener Ursprungsgewebe (Teil 1). ...49

Abbildung 16: Auswertung der Zelllinien verschiedener Ursprungsgewebe (Teil 2). ...50

Abbildung 17: Darstellung zum Gesamtüberleben der Neuroblastom-Stadien 1-4.....52

Abbildung 18: Darstellung zum Gesamtüberleben der Neuroblastom-Stadien 1-3.....52

Abbildung 19: Darstellung zum Gesamtüberleben des Neuroblastom-Stadiums 4.....53

Abbildung 20: Darstellung zum Gesamtüberleben von Patienten ohne MYCN-
Amplifikation.....54

Abbildung 21: Darstellung zum Gesamtüberleben von Patienten mit MYCN-
Amplifikation.....55

10. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: INSS Klassifikation aus der Neuroblastomstudie NB 97 | 7 |
| Tabelle 2: Prognoseeinschätzung von Neuroblastom-Patienten | 10 |
| Tabelle 3: Beschreibung der Tumorproben aus dem NGS, Universitätskinderklinik Köln, Abteilung Kinderonkologie und –hämatologie, Experimentelle Kinderonkologie (08/2016)..... | 22 |
| Tabelle 4: Patientendaten der Tumorproben aus dem NBL-Labor Universitätskinderklinik Leipzig..... | 23 |
| Tabelle 5: Beschreibung der Neuroblastome mit auffälligem LSAMP-Gen-Lokus..... | 24 |
| Tabelle 6: Darstellung der Effizienzen der einzelnen Reaktionen der LSAMP-CNV- qPCR. Idealerweise ergibt sich eine Effizienz der PCR-Reaktion von 2, einer Verdopplung des DNA-Materials in jedem Reaktionszyklus entsprechend. | 29 |
| Tabelle 7: Primer Sequenzen der Real-Time-PCR (LSAMP-Exons und Referenzgene) | 33 |
| Tabelle 8: Beschreibung der Micro-Array-Chips, Series GSE45480 | 34 |
| Tabelle 9: Auflistung der chromosomalen Lokalisation der Microarraysonden im LSAMP-Gen | 35 |
| Tabelle 10: Auswertung der im Next-Generation-Sequencing auffälligen Tumoren:.... | 41 |
| Tabelle 11: Auswertung der in der GEO2R-Datenbank auffälligen Tumore..... | 43 |
| Tabelle 12: Unterschiedliche Einordnung bei Primär- (PT) und Rezidivtumoren (Rez).. | 45 |
| Tabelle 13: Beschreibung der Neuroblastom-Zelllinien. | 46 |
| Tabelle 14: Auswertung der Neuroblastom-Zelllinien: Anzahl der Genkopien..... | 48 |
| Tabelle 15: Beschreibung der Zelllinien aus anderen Ursprungsgeweben..... | 49 |
| Tabelle 16: Auswertung der Zelllinien verschiedener Ursprungsgewebe:..... | 50 |
| Tabelle 17: Übersicht zur Auswertung bezüglich des Gesamtüberlebens der Patienten nach Kaplan-Maier | 56 |

11. Literaturverzeichnis

Alexandrov, L. B.; Nik-Zainal, S.; Wedge, D. C.; Aparicio, S.; Behjati, S.; Biankin, A. V. et al. (2013): Signatures of mutational processes in human cancer. In: *Nature* 500 (7463), S. 415–421.

Attiyeh, E. F.; London, W. B.; Mosse, Y. P.; Wang, Q.; Winter, C.; Khazi, D. et al. (2005): Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. In: *The New England journal of medicine* 353 (21), S. 2243–2253.

Aygun, N. (2018): Biological and Genetic Features of Neuroblastoma and Their Clinical Importance. In: *Current pediatric reviews* 14 (2), S. 73–90.

Barøy, T.; Kresse, S. H.; Skårn, M.; Stabell, M.; Castro, R.; Lauvrak, S. et al. (2014): Reexpression of LSAMP inhibits tumor growth in a preclinical osteosarcoma model. In: *Molecular cancer* 13, S. 93.

Berthold, F.; Simon, T. (2005): Clinical Presentation. In: Nai-Kong V. Cheung und Susan L. Cohn (Hg.): Neuroblastoma. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (Pediatric Oncology).

Berthold, F. (2002): Neuroblastomstudie NB 97-2002. Online verfügbar unter https://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/studienportal/abgeschlossene_studien_register/nb_97/index_ger.html, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

Bienert, S.; Waterhouse, A.; de Beer, T.; Tauriello, G.; Studer, G.; Bordoli, L.; et al. (2017): The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. In: *Nucleic acids research* 45 (D1), D313-D319.

Bordow, S. B.; Norris, M. D.; Haber, P. S.; Marshall, G. M.; Haber, M. (1998): Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16 (10), S. 3286–3294.

Bown, N.; Cotterill, S.; Lastowska, M.; O'Neill, S.; Pearson, A. D.; Plantaz, D. et al. (1999): Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. In: *The New England journal of medicine* 340 (25), S. 1954–1961.

Brodeur, G. M.; Fong, C. T. (1989): Molecular biology and genetics of human neuroblastoma. In: *Cancer genetics and cytogenetics* 41 (2), S. 153–174.

Caki. Online verfügbar unter http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93120819&collection=ecacc_gc, zuletzt geprüft am 10.10.2017.

Campbell, P. J.; Pleasance, E. D.; Stephens, P. J.; Dicks, E.; Rance, R.; Goodhead, I. et al. (2008): Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (35), S. 13081–13086.

Chen, J.; Lui, W.-O.; Vos, M. D.; Clark, G. J.; Takahashi, M.; Schoumans, J. et al. (2003): The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas. In: *Cancer cell* 4 (5), S. 405–413.

De Souza, D. R. V.; Sanabani, S. S.; de Souza, A. C. M. F.; Filho Odone, V.; Epelman, S.; Bendit, I. (2011): Prognostic impact of MYCN, DDX1, TrkA, and TrkC gene transcripts expression in neuroblastoma. In: *Pediatric blood & cancer* 56 (5), S. 749–756.

Deutsches Kinderkrebsregister (2016). Online verfügbar unter <http://www.unimedizin-mainz.de/index.php?id=22802>, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

Domcke, S.; Sinha, R.; Levine, D. A.; Sander, C.; Schultz, N. (2013): Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. In: *Nature communications* 4, S. 2126.

Eggert, A.; Ikegaki, N.; Liu, X. G.; Brodeur, G. M. (2000): Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma. In: *Klinische Padiatrie* 212 (4), S. 200–205.

e!Ensembl. Online verfügbar unter http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000185565;r=3:115802388-116445531;t=ENST00000490035, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

Formicola, D.; Petrosino, G.; Lasorsa, V. A.; Pignataro, P.; Cimmino, F.; Vetrella, S. et al. (2016): An 18 gene expression-based score classifier predicts the clinical outcome in stage 4 neuroblastoma. In: *Journal of translational medicine* 14 (1), S. 142.

Funatsu, N.; Miyata, S.; Kumanogoh, H.; Shigeta, M.; Hamada, K.; Endo, Y. et al. (1999): Characterization of a novel rat brain glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (Kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (12), S. 8224–8230.

Gatta, G.; Ferrari, A.; Stiller, C. A.; Pastore, G.; Bisogno, G.; Trama, A.; Capocaccia, R. (2012): Embryonal cancers in Europe. In: *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990) 48 (10), S. 1425–1433.

Gene Expression Omnibus. Online verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>, zuletzt geprüft am 02.10.2019.

HaCaT. CLS Cell Lines Service, 300493. Online verfügbar unter <http://clsgmbh.de/pdf/hacat.pdf>, zuletzt geprüft am 10.10.2017.

Hann, H. W.; Evans, A. E.; Siegel, S. E.; Wong, K. Y.; Sather, H.; Dalton, A. et al. (1985): Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. In: *Cancer research* 45 (6), S. 2843–2848.

Hashimoto, T.; Maekawa, S.; Miyata, S. (2009): IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons. In: *Cell biochemistry and function* 27 (7), S. 496–498.

HCT116. Online verfügbar unter https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-581.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

HEK293. Online verfügbar unter https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-305.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

HeLaP7. In: Macville, M.; Schröck, E.; Padilla-Nash, H.; Keck, C.; Ghadimi, B. M.; Zimonjic, D. et al. (1999): Comprehensive and definitive molecular cytogenetic

characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. In: *Cancer research* 59 (1), S. 141–150.

HEPG2. Online verfügbar unter <http://www.hepg2.com/>, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

Holzappel, B.; Wickert, L. (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. In: *Biol. Unserer Zeit* 37 (2), S. 120–126.

Horton, H. L.; Levitt, P. (1988): A unique membrane protein is expressed on early developing limbic system axons and cortical targets. In: *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 8 (12), S. 4653–4661.

HT29. Online verfügbar unter https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-299.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

Hu, Y.; Ru, N.; Xiao, H.; Chaturbedi, A.; Hoa, N. T.; Tian, X.-J. et al. (2013): Tumor-specific chromosome mis-segregation controls cancer plasticity by maintaining tumor heterogeneity. In: *PloS one* 8 (11), e80898.

Huang, M.; Weiss, W. A. (2013): Neuroblastoma and MYCN. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (10), a014415-a014415.

IGROV1. Online verfügbar unter <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/90013101?lang=de®ion=DE>, zuletzt geprüft am 10.10.2017.

IMR32. Culture Collections. Online verfügbar unter http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86041809&collection=ecacc_gc, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

Jansohn, M.; Rothhämel, S. (Hg.) (2012): Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Aufl. Elsevier GmbH, München.

Kanayama, H.; Lui, W. O.; Takahashi, M.; Naroda, T.; Kedra, D.; Wong, F. K. et al. (2001): Association of a novel constitutional translocation t(1q;3q) with familial renal cell carcinoma. In: *Journal of medical genetics* 38 (3), S. 165–170.

Kasai, F.; Hirayama, N.; Ozawa, M.; Iemura, M.; Kohara, A. (2016): Changes of heterogeneous cell populations in the Ishikawa cell line during long-term culture: Proposal for an in vitro clonal evolution model of tumor cells. In: *Genomics* 107 (6), S. 259–266.

Keller, F.; Rinvall, K.; Barbe, M. F.; Levitt, P. (1989): A membrane glycoprotein associated with the limbic system mediates the formation of the septo-hippocampal pathway in vitro. In: *Neuron* 3 (5), S. 551–561.

Kelly. Online verfügbar unter https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-355.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

KG1. Online verfügbar unter https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-14.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

Kim, H.; Hwang, J.-S.; Lee, B.; Hong, J.; Lee, S. (2014): Newly Identified Cancer-Associated Role of Human Neuronal Growth Regulator 1 (NEGR1). In: *Journal of Cancer* 5 (7), S. 598–608.

Kocak-649 INSS 1-3. Online verfügbar unter <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi> zuletzt geprüft am 02.10.2019.

Kresse, S. H.; Ohnstad, H. O.; Paulsen, E. B.; Bjerkehagen, B.; Szuhai, K.; Serra, M. et al. (2009): LSAMP, a novel candidate tumor suppressor gene in human osteosarcomas, identified by array comparative genomic hybridization. In: *Genes, chromosomes & cancer* 48 (8), S. 679–693.

La Quagila, M. P. (2005): The Role of Surgery in the Treatment of Neuroblastoma. In: Nai-Kong V. Cheung und Susan L. Cohn (Hg.): *Neuroblastoma*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (Pediatric Oncology).

LA-N-1. Online verfügbar unter <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/06041201?lang=de®ion=DE>, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

Lastowska, M.; Cotterill, S.; Pearson, A. D.; Roberts, P.; McGuckin, A.; Lewis, I. et al. (1997): Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. U.K. Children's Cancer Study Group and the U.K. Cancer Cytogenetics Group. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 33 (10), S. 1627–1633.

Levitt, P. (1984): A monoclonal antibody to limbic system neurons. In: *Science (New York, N.Y.)* 223 (4633), S. 299–301.

LN229. Online verfügbar unter https://cansar.icr.ac.uk/cansar/cell-lines/LN-229/copy_number_variation/, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

Look, A. T.; Hayes, F. A.; Nitschke, R.; McWilliams, N. B.; Green, A. A. (1984): Cellular DNA Content as a Predictor of Response to Chemotherapy in Infants with Unresectable Neuroblastoma. In: *The New England journal of medicine* 311 (4), S. 231–235.

Look, A. T.; Hayes, F. A.; Shuster, J. J.; Douglass, E. C.; Castleberry, R. P.; Bowman, L. C. et al. (1991): Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. In: *JCO* 9 (4), S. 581–591.

Lundberg, G.; Jin, Y.; Sehic, D.; Øra, I.; Versteeg, R.; Gisselsson, D. et al. (2013): Intratumour Diversity of Chromosome Copy Numbers in Neuroblastoma Mediated by On-Going Chromosome Loss from a Polyploid State. In: *PloS one* 8 (3), e59268.

Mann, F.; Zhukareva, V.; Pimenta, A.; Levitt, P.; Bolz, J. (1998): Membrane-associated molecules guide limbic and nonlimbic thalamocortical projections. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (22), S. 9409–9419.

Marris, J. M.; Brodeur, G. M.: Genetics. In: Cheung, N.-K. V.; Cohn, S. L. (Hg.) (2005): *Neuroblastoma*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (Pediatric Oncology).

Mashino, K.; Sadanaga, N.; Tanaka, F.; Yamaguchi, H.; Nagashima, H.; Inoue, H. et al. (2001): Expression of multiple cancer-testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas. In: *British journal of cancer* 85 (5), S. 713–720.

MCF7. Online verfügbar unter https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-115.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

MDA-MB231. Online verfügbar unter <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/92020424?lang=de®ion=DE>, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

MDA-MB468. Online verfügbar unter https://physics.cancer.gov/docs/bioresource/breast/NCI-PBCF-HTB132_MDA-MB-468_v1.0_SOP-508.pdf, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

National Cancer Institute (US) (2002): PDQ Cancer Information Summaries. Neuroblastoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. Bethesda (MD). Updated 04.06.2019. Online verfügbar unter http://www.cancer.gov/types/neuroblastoma/hp/neuroblastoma-treatment-pdq#section/_14, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

NB2004 (2016). Online verfügbar unter https://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/studienportal/abgeschlossene_studien_register/nb2004/index_ger.html, abgeschlossen am 31.12.2016, zuletzt geprüft am 01.10.2019.

Nguyen, D. V.; Arpat, A. B.; Wang, N.; Carroll, R. J. (2002): DNA microarray experiments: biological and technological aspects. In: *Biometrics* 58 (4), S. 701–717.

NRC-283 MYCN amplifiziert. Online verfügbar unter <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>, zuletzt geprüft am 02.10.2019.

Ntougkos, E.; Rush, R.; Scott, D.; Frankenberg, T.; Gabra, H.; Smyth, J. F. et al. (2005): The IgLON family in epithelial ovarian cancer: expression profiles and clinicopathologic correlates. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11 (16), S. 5764–5768.

Oberthuer-251 INSS 1-4. Online verfügbar unter <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>, zuletzt geprüft am 02.10.2019.

Olshan, A. F. (2005): Epidemiology. In: Cheung, N.-K. V. und Susan L. Cohn (Hg.): Neuroblastoma. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Pediatric Oncology).

OVCAR. Online verfügbar unter https://physics.cancer.gov/docs/bioresource/ovary/NCI-PBCF-HTB161_OVCAR-3_SOP-508.pdf, zuletzt geprüft am 02.10.2019.

Pasic, I.; Shlien, A.; Durbin, A. D.; Stavropoulos, D. J.; Baskin, B.; Ray, P. N. et al. (2010): Recurrent focal copy-number changes and loss of heterozygosity implicate two noncoding RNAs and one tumor suppressor gene at chromosome 3q13.31 in osteosarcoma. In: *Cancer research* 70 (1), S. 160–171.

Petrovics, G.; Li, H.; Stümpel, T.; Tan, S.-H.; Young, D.; Katta, S. et al. (2015): A novel genomic alteration of LSAMP associates with aggressive prostate cancer in African American men. In: *EBioMedicine* 2 (12), S. 1957–1964.

Pimenta, A. F.; Fischer, I.; Levitt, P. (1996): cDNA cloning and structural analysis of the human limbic-system-associated membrane protein (LAMP). In: *Gene* 170 (2), S. 189–195.

Pimenta, A. F.; Tsui, L. C.; Heng, H. H.; Levitt, P. (1998): Assignment of the gene encoding the limbic system-associated membrane protein (LAMP) to mouse chromosome 16B5 and human chromosome 3q13.2-q21. In: *Genomics* 49 (3), S. 472–474.

- Powell, J. E.; Estève, J.; Mann, J. R.; Parker, L.; Frappaz, D.; Michaelis, J. et al. (1998): Neuroblastoma in Europe: differences in the pattern of disease in the UK. SENSE. Study group for the Evaluation of Neuroblastoma Screening in Europe. In: *Lancet (London, England)* 352 (9129), S. 682–687.
- Pugh, T. J.; Morozova, O.; Attiyeh, E. F.; Asgharzadeh, S.; Wei, J. S.; Auclair, D. et al. (2013): The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. In: *Nature genetics* 45 (3), S. 279–284.
- Qiagen Quick-StartProtocol. DNeasy Blood & Tissue Kit (2016). Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/at/resources/resourcedetail?id=63e22fd7-6eed-4bcb-8097-7ec77bcd4de6&lang=en>, zuletzt geprüft am 01.10.2019.
- R2: Genomics Analysis and Visualization Platform. Online verfügbar unter <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>, zuletzt geprüft am 01.10.2019.
- Real-Time PCR for Systems Biology. Online verfügbar unter <http://www.sabiosciences.com/manuals/RT-PCR-article.pdf>, zuletzt geprüft am 09.12.2015.
- Reed, J. E.; Dunn, J. R.; Du Plessis, D. G.; Shaw, E. J.; Reeves, P.; Gee, A. L. et al. (2007): Expression of cellular adhesion molecule 'OPCML' is down-regulated in gliomas and other brain tumours. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 33 (1), S. 77–85.
- Rößler, J. (2017): Treatment of newly diagnosed Neuroblastoma after the end of clinical trials. In: *Klinische Padiatrie* 229 (3), S. 111–112.
- Schilling, F. H.; Spix, C.; Berthold, F.; Erttmann, R.; Sander, J.; Treuner, J. et al. (2003): Children may not benefit from neuroblastoma screening at 1 year of age. Updated results of the population based controlled trial in Germany. In: *Cancer Letters* 197 (1-2), S. 19–28.
- Schleiermacher, G.; Janoueix-Lerosey, I.; Ribeiro, A.; Klijanienko, J.; Couturier, J.; Pierron, G. et al. (2010): Accumulation of segmental alterations determines progression in neuroblastoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (19), S. 3122–3130.
- Schramm, A.; Köster, J.; Assenov, Y.; Althoff, K.; Peifer, M.; Mahlow, E. et al. (2015): Mutational dynamics between primary and relapse neuroblastomas. In: *Nature genetics* 47 (8), S. 872–877.
- Schulte, M.; Köster, J.; Rahmann, S.; Schramm, A. (2018): Cancer evolution, mutations, and clonal selection in relapse neuroblastoma. In: *Cell and tissue research* 372 (2), S. 263–268.
- Schwab, M. (2005): Molecular Cytogenetics. In: Cheung, N.-K. V.; Cohn, S. L. (Hg.): Neuroblastoma. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (Pediatric Oncology).
- Sellar, G. C.; Watt, K. P.; Rabiasz, G. J.; Stronach, E. A.; Li, L.; Miller, E. P. et al. (2003): OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. In: *Nature genetics* 34 (3), S. 337–343.
- SEQC-498 INSS 4. Online verfügbar unter <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>, zuletzt geprüft am 02.10.2019.

- Shimada, H.; Ambros, I. M.; Dehner, L. P.; Hata, J.; Joshi, V. V.; Roald, B. et al. (1999): The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). In: *Cancer* 86 (2), S. 364–372.
- Shimada, H.; Ambros, I. M. (2005): Pathology of Peripheral Neuroblastic Tumors. In: Cheung, N.-K. V.; Cohn, S. L. (Hg.): Neuroblastoma. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (Pediatric Oncology).
- Simon, T.; Hero, B.; Schulte, J. H.; Deubzer, H.; Hundsdoerfer, P.; Schweinitz, D. von et al. (2017): 2017 GPOH Empfehlungen für Diagnostik und Therapie von Patienten mit neuroblastischen Tumoren. In: *Klinische Padiatrie* 229 (3), S. 147–167.
- Simon, T.; Niemann, C. A.; Hero, B.; Henze, G.; Suttorp, M.; Schilling, F. H. et al. (2012): Short and longterm outcome of patients with symptoms of spinal cord compression by neuroblastoma. In: *Developmental Medicine & Child Neurology* 54 (4), S. 347–352.
- SK-N-AS. Culture Collections. Online verfügbar unter http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/cellines/generalcell/detail.jsp?refId=94092302&collection=ecacc_gc, zuletzt geprüft am 02.10.2019.
- SK-N-BE(2). Culture Collections. Online verfügbar unter http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/cellines/generalcell/detail.jsp?refId=95011815&collection=ecacc_gc, zuletzt geprüft am 02.10.2019.
- SK-N-DZ. Culture Collections. Online verfügbar unter http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/cellines/generalcell/detail.jsp?refId=94092305&collection=ecacc_gc, zuletzt geprüft am 02.10.2019.
- SK-N-F1. Culture Collections. Online verfügbar unter http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/cellines/generalcell/detail.jsp?refId=94092304&collection=ecacc_gc, zuletzt geprüft am 02.10.2019.
- SK-OV-3. Online verfügbar unter http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/cellines/generalcell/detail.jsp?refId=91091004&collection=ecacc_gc, zuletzt geprüft am 02.10.2019.
- Spittau, B.; Krieglstein, K. (2012): Klf10 and Klf11 as mediators of TGF-beta superfamily signaling. In: *Cell and tissue research* 347 (1), S. 65–72.
- Storlazzi, C. T.; Lonoce, A.; Guastadisegni, M. C.; Trombetta, D.; D'Addabbo, P.; Daniele, G. et al. (2010): Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors. Origin and structure. In: *Genome Research* 20 (9), S. 1198–1206.
- Thiele, C. J. (1998): Neuroblastoma Cell Lines. In (Ed.) Masters, J.: Human Cell Culture. Lancaster, UK: Kluwer Academic Publishers. 1, S. 21–53.
- THP1. Online verfügbar unter https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-16.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192, zuletzt geprüft am 02.10.2019.
- Tolbert, V. P.; Coggins, G. E.; Maris, J. M. (2017): Genetic susceptibility to neuroblastoma. In: *Current opinion in genetics & development* 42, S. 81–90.
- Tonini, G. P.; Boni, L.; Pession, A.; Rogers, D.; Iolascon, A.; Basso, G. et al. (1997): MYCN oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage 4s: the Italian experience with 295 children. In: *JCO* 15 (1), S. 85–93.

Tumor Neuroblastoma - Kocak - 649. Online verfügbar unter <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>, zuletzt geprüft am 25.11.2018.

Tumor Neuroblastoma - Oberthuer - 251. Online verfügbar unter https://hgserver1.amc.nl/r2/graph/kaplanscan_nb251_LSAMP_A_MEXP_255_1718-15417769291545.png, zuletzt geprüft am 25.11.2018.

Tumor Neuroblastoma Primary - NRC - 283. Online verfügbar unter <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>, zuletzt geprüft am 25.11.2018.

Tumor Neuroblastoma public - Versteeg - 88. Online verfügbar unter https://hgserver1.amc.nl/r2/graph/kaplanscan_nbadam88_LSAMP_235494_at-15417767021114.png, zuletzt geprüft am 25.11.2018.

Tumor Neuroblastoma - SEQC- 498. Online verfügbar unter <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>, zuletzt geprüft am 25.11.2018.

Vanaveski, T.; Singh, K.; Narvik, J.; Eskla, K.-L.; Visnapuu, T.; Heinla, I. et al. (2017): Promoter-Specific Expression and Genomic Structure of IgLON Family Genes in Mouse. In: *Frontiers in neuroscience* 11, S. 38.

Versteeg-88 MYCN single copy. Online verfügbar unter <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>, zuletzt geprüft am 02.10.2019.

Victor, A.; Klug, S. J.; Blettner, M. (2005): cDNA-Microarrays – Strategien zur Bewältigung der Datenflut. In: *Deutsches Ärzteblatt* 102 (6), A355-360.

WPMY1. Online verfügbar unter https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2854.aspx?geo_country=de, zuletzt geprüft am 10.10.2017.

Yen, C.-C.; Chen, W.-M.; Chen, T.-H.; Chen, W. Y.-K.; Chen, P. C.-H.; Chiou, H.-J. et al. (2009): Identification of chromosomal aberrations associated with disease progression and a novel 3q13.31 deletion involving LSAMP gene in osteosarcoma. In: *International journal of oncology* 35 (4), S. 775-788.

Zage, P. E.; Nolo, R.; Fang, W.; Stewart, J.; Garcia-Manero, G.; Zweidler-McKay, P. A. (2012): Notch pathway activation induces neuroblastoma tumor cell growth arrest. In: *Pediatric blood & cancer* 58 (5), S. 682–689.

12. Anhang

12.1 Votum der Ethikkommission Köln zur Neuroblastomstudie 2004



12.2 Einwilligung zur Studienteilnahme

NB2004 Einwilligung zur Studienteilnahme

| | | | |
|---------------------|------------------------|----------------|------------------|
| ----- | ----- | ----- | ----- |
| Patient Name | Patient Vorname | geboren | NB Nummer |

Studiename: Kooperative multizentrische Therapieoptimierungsstudie für die Behandlung von Säuglingen, Kindern und Jugendlichen mit Neuroblastom (NB2004)

Studienleiter: Prof. Dr. F. Berthold

Studienbüro: Zentrum für Kinderonkologie und -hämatologie, Universitätsklinikum zu Köln, Kerpener Straße 62, 50924 Köln

Wir sind von Dr. ----- ausführlich und verständlich über die Art der Erkrankung, die durchzuführende Behandlung, deren Wirkungen und Nebenwirkungen, deren mögliche Spätfolgen und Risiken sowie über Ziel und Bedeutung der oben genannten Therapieoptimierungsstudie informiert worden.

Oben genannter Patient wurde folgender Behandlungsgruppe zugeordnet.

- Beobachtungsgruppe (Informationsschreiben Seite 187 bis 193)
- Mittlere Risikogruppe (Informationsschreiben Seite 194 bis 201)
- Hochrisikogruppe (Informationsschreiben Seite 202 bis 210)

Auf andere Behandlungsmethoden außerhalb dieser Studie wurden wir hingewiesen. Über die mündliche Aufklärung hinaus haben wir den Text der Patienteninformation und diese Einwilligungserklärung gelesen und verstanden.

Ich/wir hatten Gelegenheit, Fragen zu stellen. Aufgetretene Fragen wurden uns vom behandelnden Arzt verständlich und ausreichend beantwortet. Ein Ansprechpartner für weitere zukünftige Fragen wurde uns benannt.

Folgende Themen wurden zusätzlich im mündlichen Aufklärungsgespräch behandelt:

.....
.....
.....

Wir wurden darüber aufgeklärt, dass regelmäßige Nachuntersuchungen unter Umständen über viele Jahre durchgeführt werden müssen. Hierdurch sollen rechtzeitig Rückfälle, Zweittumore und therapiebedingte Beeinträchtigungen erkannt werden. Wir wurden ebenfalls darüber informiert, dass die in der Studie eingesetzten Substanzen möglicherweise das ungeborene Leben schädigen können. Bei Mädchen im gebärfähigen Alter muss deshalb durch sicheren Empfängnischutz für die Dauer der Behandlung eine Schwangerschaft ausgeschlossen werden.

Wir wurden über die bestehende Patientenversicherung bei HDI Versicherungen sowie über die sich daraus für uns ergebenden Anforderungen aufgeklärt.

Datenschutz:

Wir wurden über unsere Datenschutzrechte informiert. Wir erklären uns einverstanden mit der im Rahmen von NB2004 erfolgenden Aufzeichnung und Speicherung von krankheits- und behandlungsrelevanten Daten und ihrer nichtanonymisierten Weitergabe an die Studienzentrale in Köln zur Auswertung. Alle Personen, die Einblick in die gespeicherten Daten haben, sind zur Wahrung des Datenschutzes verpflichtet. Der Name des Patienten wird zu keinem Zeitpunkt öffentlich gemacht. Wir erklären uns einverstanden mit der anonymisierten Weitergabe von Krankheitsdaten/Studiendaten zur Überprüfung an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesoberbehörde und, soweit es sich um personenbezogene Daten handelt, mit deren Einsichtnahme durch zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte der Behörden.

Folgende Zentren erhalten im Rahmen der Studie Zugang zu Patientendaten:

- Studienleitung NB2004: Prof. Dr. F. Berthold,
- Tumorbank Embryonale Tumoren der GPOH: Prof. Dr. F. Berthold
(Zentrum für Kinderonkologie und -hämatologie, Kerpener Str. 62; D-50924 Köln),
- Kinderkrebsregister für die Bundesrepublik Deutschland
(IMBEI, Universität Mainz, Obere Zahlbacher Straße 69, D-55101 Mainz),
- Referenzpathologie: Dr. K. Ernestus
(Institut für Pathologie, Universität zu Köln, Kerpener Str. 62, D-50924 Köln),
- Referenzpathologie: Dr. U. Jänig und PD Dr. I. Leuschner (Institut für Pathologie, Universität des Landes Schleswig-Holstein, Michaelisstraße 11, D-24105 Kiel),
- Molekulargenetisches Referenzlabor: Prof. Dr. H. Christiansen
(Universitätskinderklinik, Deutschhausstraße 12, D-35055 Marburg),
- Molekulargenetisches Referenzlabor: PD Dr. Niggli
(Universitätskinderklinik, Steinwiesstraße 75, CH-8032 Zürich),
- Molekulargenetisches Referenzlabor: Dr. F. Schilling (Olgahospital, Bismarckstraße 8, D-70176 Stuttgart),
- Molekulargenetisches Referenzlabor: Prof. Dr. M. Schwab
(Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg)
- Molekulargenetisches Referenzlabor: Dr. R. Spitz
(Zentrum für Kinderonkologie und -hämatologie, Kerpener Str. 62, D-50925 Köln),
- Projektgruppe Spätfolgen nach Strahlentherapie maligner Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter: Prof. Dr. Willich, Dr. Schuck (Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum, Albert-Schweitzer-Str. 33; D-48149 Münster),

- Pädiatrisches Register für Stammzelltransplantationen: Prof. Dr. T. Klingebiel (Klinikum der Johann W. Goethe Universität, Theodor Stern Kai 7, D-60590 Frankfurt a. M.).

Wir erklären hiermit die Teilnahme unseres Kindes an der oben genannten Studie. Wir wurden darauf hingewiesen, dass die Teilnahme freiwillig ist und dass wir das Recht haben, diese jederzeit ohne Angabe von Gründen zu beenden, ohne dass sich dadurch Nachteile für die Behandlung unseres Kindes ergeben. Eine Kopie dieser Einverständniserklärung und der dazugehörigen Patienteninformation haben wir erhalten.

Wir sind einverstanden mit der Weitergabe behandlungsrelevanter personenbezogener Daten an das Studienbüro der Studie NB2004 und die oben genannten kooperierenden Einrichtungen der Studie.

Wir sind damit einverstanden, dass Tumorgewebe unseres Kindes ausschließlich zur Erforschung der Krankheit in ihren molekularen, genetischen, immunologischen und anderen Eigenschaften untersucht wird und ggf. auch für die Entwicklung neuer Behandlungsverfahren eingesetzt wird. Die Entnahme des Tumorgewebes erfolgt schmerzlos im Rahmen der für mein Kind notwendigen chirurgischen Tumorentfernung bzw. während der zur Diagnosestellung erforderlichen Probeentnahme aus dem Tumor. Falls bei der Tumorentfernung aus medizinisch chirurgischen Notwendigkeiten gesundes Gewebe mitentfernt werden muss, darf dieses als Vergleichsgewebe für die Tumoreigenschaften eingesetzt werden. Eine medizinisch nicht notwendige Erweiterung des chirurgischen Eingriffs erfolgt dazu nicht.

Zugestimmt wird der Entnahme einer Blutprobe während der Narkose (je nach Alter 2-10 ml) als Vergleichsmaterial für die Eigenschaften des Tumors. Tumor, Vergleichsgewebe und Vergleichsblut werden zentral in einer Tumorbank der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) gelagert und anonymisiert Wissenschaftlern, die in universitären Einrichtungen oder in Krankenhäusern tätig sind und in GPOH-Studie kooperativ eingebunden sind, für die oben genannten krankheitsbezogenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Auf diese Weise sollen die Diagnosestellung sicherer gemacht werden, das biologische Verständnis der Erkrankung verbessert und neue therapeutische Ansätze gefunden werden.

Wir sind darüber informiert, dass wir jederzeit und ohne Angabe von Gründen unsere Einwilligung zur wissenschaftlichen Erforschung an dem Tumor- und Vergleichsgewebe auch später beschränken oder ganz widerrufen und die Vernichtung der gelagerten Untersuchungsproben verlangen können.

Ort und Datum

Unterschrift aufklärender Arzt

Ort und Datum

Unterschrift Vater

Ort und Datum

Unterschrift Mutter

Ort und Datum

Unterschrift Patient

(wenn angemessen)

Ort und Datum

Unterschrift Zeuge

12.3 Lizenz für Abbildungen aus der "R2: genome analysis and visualization platform"

Am 27.10.19, 20:43, r2-support <r2-support@amc.uva.nl> schrieb:

Dear Lucas,

Congratulations on getting you thesis ready for publication 😊

You have permission to use R2 generated images in your thesis. We would appreciate a web-citation to the R2 platform.

All the best,

Jan Koster

13. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Lucas Mösle

14. Danksagung

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. Axel Weber für die Vergabe des Themas, die Betreuung und Unterstützung sowie die kritischen Anmerkungen beim Verfassen dieser Arbeit.

Dem Institut für Humangenetik danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien sowie für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit.

Vielen Dank an meine Familie und meine Freunde für ihre Unterstützung, ihre Ermutigungen, das Korrekturlesen und ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit.