

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt  
Onkologie und Hämatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mutationsanalysen der mitochondrialen DNA neuroektodermaler Tumoren

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maria Lüth

aus Wolgast

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. P. Hernáiz Driever  
2. Prof. Dr. med. M. Hasselblatt  
3. Prof. Dr. med. F. Aksu

Datum der Promotion: 05.06.2011

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Inhaltsverzeichnis
2. Abkürzungsverzeichnis
3. Zusammenfassung der Publikationspromotion
  - 3.1. Einleitung und Zielstellung
  - 3.2. Methodik
  - 3.3. Ergebnisse
  - 3.4. Diskussion
  - 3.5. Literaturverzeichnis
4. Publikation 1

Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients.(Cancer Res 2003)
5. Publikation 2

Somatic mitochondrial DNA mutations in neurofibromatosis type 1-associated tumors. (Mol Cancer Res 2004)
6. Publikation 3

Somatic mitochondrial mutations in pilocytic astrocytoma. (Cancer Genet Cytogenet 2009)
7. Publikation 4

Medulloblastoma harbor somatic mitochondrial DNA mutations in the D-loop region. (J Pediatr Hematol Oncol 2010)
8. Anteilserklärung
9. Lebenslauf
10. Publikationsverzeichnis
11. Erklärung
12. Danksagung

## 2. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenindiphosphat
ATP	Adenintriphosphat
ATP6	ATP Synthase Untereinheit 6
AIF	Apoptosis inducing factor
BRAF	B-RAF Protoonkogen
C	Cytosin
COXI	Cytochromoxidase Untereinheit I
COXII	Cytochromoxidase Untereinheit II
Cytb	Cytochrom b
Cytc	Cytochrom c
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
D-loop	Displacement loop
erbB2/HER-2/NEU	Human epidermal growth factor receptor 2
G	Guanin
GTPase	Guanintriphosphat Synthase
F1/F0 ATPase	Adenintriphosphat Synthase
H	Histidin
HIF-1 $\alpha$	Hypoxy inducing factor 1 $\alpha$
I	Isoleucin
L	Leucin
M	Methionin
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MAPK	Mitogen activated protein kinase
mtDNA	Mitochondriale DNA
myc	Protoonkogen
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form
ND4	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4

NF1	Neurofibromatose Typ 1
np	Nukleotidposition
NUMTS	Nuclear insertions of mtDNA
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
P	Prolin
PA	Pilozytisches Astrozytom
PC-3	Prostate cancer- Zelllinie
PCR	Polymerasekettenreaktion
ras	Protoonkogen
ROS	Reactive oxygen species
T	Thymin
TP53	Tumorprotein 53
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TTGE	Temporal Temperature Gel Electrophoresis
SMAC/DIABLO	Kaspaseaktivator
src	Onkogen
ssDNA	single strand/einzelsträngige DNA
V	Valin
WHO	World Health Organization
Y	Tyrosin

### 3. Zusammenfassung der Publikationspromotion

Um das Auftreten somatischer mitochondrialer Mutationen in neuroektodermalen Tumoren zu untersuchen, analysierten wir das vollständige mitochondriale Genom von Patienten mit Medulloblastom, pilozytischen Astrozytom und Neurofibromatose Typ 1 (NF1) – assoziierten Neurofibromen. Die Mutationsanalysen wurden mittels Temporal Temperature Gelelektrophorese (TTGE) und direktem Sequenzieren der mitochondrialen DNA (mtDNA) aus Tumorgewebe und korrespondierenden Blutlymphozyten und in der Gruppe der Medulloblastompatienten zusätzlich aus Liquorproben durchgeführt. In 15 von 30 Patienten mit Medulloblastom (40%), in 16 der 37 Patienten (43%) mit Neurofibromen im Rahmen einer NF1 und in 16 von 19 Patienten mit pilozytischen Astrozytom (84%) wurden somatische mtDNA Mutationen gefunden. Die Veränderungen wurden in kodierenden und nicht kodierenden Abschnitten des mitochondrialen Genoms ohne tumorspezifische Zuordnung nachgewiesen.

Sieben von acht Liquorproben der Patienten mit Medulloblastom enthielten mutierte mtDNA. Patienten, deren Liquor nach Therapie frei von mtDNA Mutationen war und deren Liquor andere Mutationen als die des Primärtumors enthielt, erlitten kein Rezidiv. Der Patient, dessen Liquor nach Ende der Therapie mtDNA Mutationen unverändert aufwies, erlitt ein Tumorrezidiv.

Wir wiesen Mutationen der mtDNA, die in verschiedenen Fibromen unterschiedlicher Lokalisation eines Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 detektiert wurden, zudem im Blut, in nicht betroffenen Hautgewebe und im Randgewebe des Tumors nach. Der Anteil der mutierten mtDNA an der gesamten mtDNA nahm mit der anatomischen Nähe zum Tumorgewebe. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass mitochondriale Mutationen bereits in Vorläuferzellen präsent sind und möglicherweise zur Fibromentwicklung beigetragen haben.

### 3.1. Einleitung und Zielstellung

#### Mitochondrien und ihre Bedeutung für die Tumorgenese

Als Otto Heinrich Warburg 1924 erkannte, dass Tumorzellen über einen deutlich höheren Anteil an Lactat im Vergleich zu gesunden Zellen besitzen, formulierte er seine Hypothese, dass Tumorzellen den größten Teil ihrer Energie durch anaerobe Glykolyse gewinnen anstatt durch die in gesunden Zellen vorherrschende oxidative Phosphorylierung (Warburg-Effekt) [1-3]. Mitochondriale Dysfunktionen können zu einer veränderten Energieversorgung der Zelle, einer Beeinträchtigung der Apoptose und zu einer erhöhten chromosomalen Instabilität im Nukleus führen [4]. Spezifische Onkogene wie *ras*, *src*, *her-2/neu*, *myc* oder des Tumorsuppressor-Gen *p53* [5-7] greifen in den Stoffwechselmetabolismus von Tumorzellen ein. Mitochondrien spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation apoptotischer Prozesse. Viele proapoptische Proteine einschließlich Cytochrom C, Apoptosis-inducing-factor (AIF), Endonuklease G und Smac/DIABLO sind in den Mitochondrien lokalisiert [8].

In den letzten Jahren wurden somatische mitochondriale mtDNA Mutationen in einer Vielzahl maligner Erkrankungen beschrieben [9-14]. Diese Mutationen treten in kodierenden und nicht kodierenden Anteilen des mitochondrialen Genoms auf. Petros et al. konnten paradigmatisch anhand eines Mausmodells den direkten Einfluss einer somatischen mtDNA Mutation auf das Tumorwachstum nachweisen [15]. Die Transfektion von mtDNA T8993G in Zellen der PC3 Prostata-Karzinom-Zelllinie führten zu einem Aminosäureaustausch in der ATP6-Untereinheit der mitochondrialen F1F0-ATPase. Nacktmäuse, die die T8993G mutierten Cybrid-Zellen trugen, zeigten ein 7-fach erhöhtes Tumorwachstum im Vergleich zu den Wildtyp-Cybriden T8993T. Die Ergebnisse dieser Arbeiten belegen nicht nur das multiple Auftreten von somatischen mitochondrialen Mutationen in malignen Erkrankungen sondern auch ihren direkten potentiellen Einfluss auf die Tumorgenese und Tumorbilogie.

#### Neuroektodermale Tumoren

##### Medulloblastom

Medulloblastome zählen zu den häufigsten malignen Hirntumoren bei Kindern und Jugendlichen [16]. Sie sind hochgradig maligne, besitzen die Tendenz über den Liquorweg zu metastasieren und neigen häufig zu Rezidiven [16]. Die Aussaat im Liquor, die einen entscheidenden negativen Risikofaktor bei der Ersterkrankung wie auch im Rezidiv darstellt, wird nach heutigen diagnostischen Kriterien durch zytopathologische und radiologische Verfahren erfasst. Diesen beiden Methoden mangelt es an Sensitivität und sie sind zudem stark vom Untersucher abhängig. Die Evaluation sensitiver und objektiver Tumormarker in

der Erkennung von Medulloblastomerkrankung im Liquor ist Ziel der heutigen Forschung.

#### Neurofibromatose Typ 1 assoziierte Tumoren

Neurofibromatose Typ 1 (NF-1) ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung [17]. Pathogenetisch sind Mutationen im *nf-1* Tumorsuppressorgen bekannt, welche zu einer verminderten Aktivität des Ras-GTPase-aktivierenden Proteins Neurofibromin führen [18-21]. Die häufigste und fast pathognomonische klinische Manifestation sind multiple niedriggradige plexiforme und kutane Neurofibrome. Charakteristisch für die NF-1 ist der variable Phänotyp der Erkrankung [22]. Eine mögliche Erklärung für diese Variabilität könnte das unabhängige Vorkommen von kokarzinogenen Mutationen wie z.B. Mutationen mitochondrialer DNA und ihr Einfluss auf die Biologie der betroffenen Zellen sein.

#### Pilozytische Astrozytome (PA)

Unter den primären Hirntumoren im Kindes und- Jugendalter stellen die pilozytischen Astrozytome mit einem Anteil von 30 % die größte Gruppe dar [16, 23]. Als häufigste genetische Veränderung ist bei PA lediglich eine Duplikation des BRAF-Protoonkogens festgestellt werden, welche mit einer aberranten Aktivierung der MAPK-Signalwege assoziiert ist [24]. Welche weiteren Faktoren die Entstehung und Biologie von PA beeinflussen, bleibt unklar.

Medulloblastome, pilozytische Astrozytome (PA) und Neurofibrome bei NF-1 sind Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter, welche abhängig von Lokalisation und therapeutischen Ansätzen mit neurologischen, kognitiven, emotionalen und endokrinologischen Defiziten einhergehen. Ziele der Forschung sind einerseits ein verbessertes Verständnis der Biologie dieser Tumoren, die neue therapeutische Ziele identifiziert und andererseits die Entwicklung neuer Biomarker, die eine zuverlässigere Diagnose und Quantifizierung der Tumorlast sowie bessere Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie ermöglichen.

#### Zielsetzung der Arbeit

Wir erwarteten, dass somatische Mutationen mitochondrialer DNA als "biologischer Fingerabdruck" der Tumore dienen und bei der Diagnosestellung und der Zuordnung zu biologischem Verhalten eine Rolle spielen können. Deshalb waren die Fragestellungen der Promotionsarbeit wie folgt:

- Lassen sich somatische Mutationen im mitochondrialem Genom der jeweiligen neuroektodermalen Tumorentitäten nachweisen?
- Lassen sich diese somatische mtDNA Mutationen tumorspezifischen Mustern zuordnen?



- Lassen sich bei Patienten der jeweiligen Tumorentitäten Keimbahnvariationen der mitochondrialen DNA nachweisen und haben diese spezifische Muster?
- Lassen sich Korrelationen zwischen Anzahl und Muster somatischer mtDNA Mutationen der Tumoren und dem klinischen Verlauf der Patienten erstellen?

In der Untersuchung der Tumoren von Patienten mit Medulloblastomen wurden folgende weitere Fragestellungen bearbeitet:

- Lassen sich mtDNA und infolgedessen somatische Mutationen der mtDNA im Liquor von Patienten mit Medulloblastom detektieren?
- Können diese Mutationen der mtDNA neue Biomarker/Tumormarker repräsentieren?

Bei der Analyse der Neurofibrome ergab sich folgende zusätzliche Fragestellung:

- Haben die somatischen Mutationen der mtDNA der Tumoren von einem Patienten einen gemeinsamen Ursprung?

### 3.2. Methodik

Für die Mutationsanalysen des gesamten mitochondrialen Genoms in Tumorgewebe, Blut- und Liquorflüssigkeit wurden drei verschiedene Verfahren angewendet: Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE), direktes Sequenzieren und Long Range PCR.

#### 3.2.1 Gelelektrophorese mit zeitlich begrenztem/definierten Temperaturgradienten

Treten Mutationen im mitochondrialen Genom auf, werden diese bei der Teilung der Mitochondrien repliziert und zufällig auf die Tochterzellen verteilt. Auf diese Weise können Tochterzellen entweder nur mutierte bzw. nur mtDNA vom Wildtyp enthalten. Hierbei sprechen wir von Homoplasmie. Liegt die mtDNA in unterschiedlicher Quantität von mutierter und normaler Form vor, bezeichnet man den Zustand als Heteroplasmie. Im denaturierenden Milieu schmilzt doppelsträngige mtDNA (dsDNA) bei bestimmten Temperaturen in Abhängigkeit ihrer Basensequenz. Dieses Prinzip wird bei der TTGE ausgenutzt. Da die jeweiligen Schmelztemperaturen von der Basenfolge abhängen, bewirkt jede Änderung der Basensequenz eine Änderung der Schmelztemperatur [25]. Durch Mutationen veränderte DNA (Punktmutationen, Deletionen und Insertionen) zeigt ein anderes Laufverhalten im Gel mit steigender Temperaturerhöhung als Wildtyp-DNA.

#### 3.2.2 Sequenzieren

Um die mittels TTGE Analyse aufgedeckten Mutationen der mtDNA zu verifizieren, wurden die aufgereinigten PCR-Produkte sequenziert. Für die PCR wurden die originalen PCR-

Primer der TTGE genutzt und anschließend die Produkte mit einem Sequenzierungskit aufgearbeitet. Die Ergebnisse wurden daraufhin mit der Cambridgesequenz für mtDNA mit Hilfe der Software Mac Vector™ 7.0 verglichen. Zeigten sich gleiche Sequenzvariationen der mtDNA im Tumorgewebe und im Blut eines Individuums im Vergleich zur Cambridge-Sequenz, wurden diese als Keimbahnvariationen interpretiert. Alle Veränderungen wurden mit der Datenbank Mitomap (<http://www.mitomap.org>) und mithilfe konventioneller Internetsuchmaschinen (Google) unter Verwendung der Schlüsselwörter „gesuchte Mutation“ AND mitochondrium AND mutation“ verglichen.

### 3.2.3 Long Range PCR

Das für die vorangegangenen Mutationsanalysen verwendete Primerset zeigte mehrfach nukleäre Sequenzentsprechungen. Durch das Vorschalten der Long-Range PCR vor die eigentliche Sequenzierung konnte dieses Problem vermieden werden.

## 3.3. Ergebnisse

### 3.3.1. Medulloblastom

In der ersten Arbeit wurden 18 somatische mtDNA Mutationen in 6 der 15 Medulloblastome detektiert (40%). 2 Mutationen resultierten in einem Aminosäureaustausch: Y496H in der Cytochrom C Oxidase Einheit I (COXI) und L96P in der NADH Einheit 4 des mitochondrialen Genoms. Ein Tumor zeigte insgesamt 11 Mutationen. Insgesamt wurden 72 distinkte Keimbahnvariationen dargestellt. Dreizehn der Keimbahnvariationen waren zum Zeitpunkt der Analysen noch nicht beschrieben. Alle gefundenen Keimbahnvariationen führten zu einem Nukleotidaustausch in den nicht kodierenden Regionen der mitochondrialen D-loop Region oder in der tRNA. Liquorflüssigkeit wurde von 10 Medulloblastompatienten untersucht. Bei einem Patienten wurde die gleiche mitochondriale Mutation, T152C, heteroplasmisch im Tumorgewebe, in der Blutprobe und in der Liquorflüssigkeit gefunden. Bei dem Patienten, bei welchem im Tumorgewebe 11 somatische Mutationen entdeckt wurden, ließen sich im Liquor nur 2 dieser Mutationen nachweisen. Eine Mutation, T15904C, wurde in einem homoplasmischen Zustand gefunden. Die zweite Mutation der mtDNA im Liquor des Patienten trat in der hypervariablen Region np303-309 Poly C auf. Sie zeigte sich heteroplasmisch C8/C7 im Blut, homoplasmisch C7 im Tumor und heteroplasmisch C9/C8 im Liquor des Patienten.

In der zweiten Arbeit wurden insgesamt 6 somatische mitochondriale Mutationen in 6 der 15 Patienten mit Medulloblastom detektiert (40%). Alle Mutationen waren Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in der mitochondrialen D-loop. Von den gefundenen 59 Keimbahnvariationen wurden 25 als distinkt gewertet.

### 3.3.2 Neurofibromatose Typ 1- assoziierte Tumoren

In 9 der 18 plexiformen Neurofibrome wurden insgesamt 27 somatische mtDNA Mutationen gefunden. Fünf der Tumoren wiesen mehr als eine Mutation auf. Unsere Untersuchungen zeigten, dass Neurofibrome von unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen eines Patienten identische somatische mtDNA Mutationen aufweisen. Unsere Beobachtungen führten uns zu der Annahme, dass tumorspezifische mtDNA Mutationen bereits in tumorfreien Zellen präsent sind und diese in Neurofibromen akkumulieren. Um diese Hypothese zu prüfen, untersuchten wir in Gewebe nicht affektierter Haut, Gewebe nahe dem Neurofibrom und Tumorgewebe direkt aus dem Neurofibrom von drei Patienten. Bei zwei Patienten konnten wir somatische Mutationen mit einem progressiven Anstieg des Anteils mutierter mtDNA in der Reihenfolge Blut zu nicht affektierter Haut zu Gewebe nahe dem Fibrom zu direktem Tumorgewebe nachweisen. Um zu untersuchen, in welchem Zelltyp der kutanen Neurofibrome die mutierten Mitochondrien dominieren, wurden S-100 positive Schwannzellen, S-100 negative Zellen und Endothelzellen der Neurofibrome mikrodissektiert. Die Ergebnisse zeigten die in den zuvor untersuchten Tumor vorherrschende Mutation in den S-100 positiven Schwannzellen und S-100 negativen Zellen, die am ehesten Fibroblasten entsprechen. In den nicht neoplastischen Endothelzellen der Neurofibrome fanden wir ausschließlich die Wildtypvariante, die ebenfalls im nicht betroffenen Hautgewebe dominierte. Insgesamt wurden 71 Keimbahnvariationen durch Sequenzieren detektiert.

### 3.3.3 Pilozytische Astrozytome

Insgesamt wurden 34 somatische Mutationen in 16 von 19 Patienten mit pilozytischen Astrozytom detektiert. 30 der somatischen Veränderungen waren Punktmutationen und die restlichen 4 Insertionen im hypervariablen Segment der D-loop Region np 303-315 poly C. Von den 18 somatischen Veränderungen in proteinkodierenden Regionen führten drei zu einem Aminosäureaustausch: M60V der ATP- Synthese Untereinheit 6, L236I im Cytochrom b-Komplex und L112M der Cytochrom c-Oxidase-Untereinheit 1. 146 distinkte Keimbahnvariationen konnten nachgewiesen werden. Fünf der Variationen konnten als „Neu“ gewertet werden und 2 führten zu einem Aminosäureaustausch. Alle aufgedeckten Keimbahnvariationen waren homoplasmische Veränderungen.

### 3.4. Diskussion

Die in dieser Promotionsarbeit zusammengefassten Arbeiten stellen eine systematische Mutationsanalyse der mtDNA in Medulloblastomen, kutanen und plexiformen Neurofibromen und pilozytischen Astrozytomen dar. Die Ergebnisse zeigen, dass ähnlich wie in anderen malignen Erkrankungen, auch bei diesen Tumoren zahlreiche somatische Mutationen der mitochondrialen DNA detektiert werden konnten. Vergleicht man die Inzidenz der auftretenden Mutationen, zeigen sich annähernd ähnliche Ergebnisse in der Medulloblastomgruppe (40%) und der NF1-Gruppe (43%). In der Gruppe mit pilozytischen Astrozytomen wurde eine deutlich höhere Patientenzahl (84%) mit somatischen mtDNA Mutationen beobachtet. Kirches et al. fanden in 7 von 17 Patienten mit Glioblastomen (41%) somatische mitochondriale Mutationen [10]. Möglicherweise zeigt diese Beobachtung, dass somatische Mutationen in den Mitochondrien unabhängig vom WHO Grad oder Proliferationsrate auftreten und ein generelles Phänomen in pilozytischen Astrozytomen präsentieren (Tabelle). Interessanterweise zeigten die Ergebnisse von Wulfert et al. parallele Beobachtungen im Auftreten von somatischen mitochondrialen Mutationen in myeloischen Erkrankungen [26]. In dieser Studie fanden sich in 56% der Patienten mit myelodysplastischen Syndrom (MDS) mtDNA Mutationen, in der Gruppe mit myeloproliferativen Erkrankungen (MPD) in 44%. Zusätzlich wurde die Frequenz mitochondrialer Mutationen von mononukleären Zellen und Granulozyten des Knochenmarks von 9 Patienten untersucht. Überraschend zeigten die Ergebnisse, dass Granulozyten weniger somatische mtDNA Mutationen als die Vorläuferzellen aufwiesen. Dieses Phänomen, so die Autoren, könnte einen Selektionsdruck reflektieren, durch welchen in der Ausreifung von sich schnell teilenden Zellen mtDNA mutierte Vorläuferzellen eliminiert werden [26].

	Medulloblastom	Neurofibrom	Pilozytisches Astrozytom	Medulloblastom	Glioblastom
Patienten	15	37	19	15	17
<b>Somatische Mutationen</b>	<b>18</b>	<b>41</b>	<b>36</b>	<b>6</b>	<b>25</b>
Homoplasmisch	17 (94%)	25 (61%)	3 (16%)	3 (50%)	18 (72%)
Heteroplasmisch	1 (6%)	16 (39%)	16 (84%)	3 (50%)	7 (28%)
Nicht codierende Regionen	11 (61%)	41 (100%)	18 (50%)	6 (100%)	17 (68%)
Codierende Regionen	7 (39%)	0 (0%)	18 (50%)	0 (0%)	8 (32%)
Patienten mit somatischen Mutationen	6 (40%)	16 (43%)	16(84%)	6 (40%)	7 (41%)
<b>Distinkte Keimbahnvariationen</b>	<b>72</b>	<b>64</b>	<b>146</b>	<b>25</b>	<b>keine Daten</b>
Nicht codierende Regionen	72(100%)	48 (75%)	69(47%)	22 (88%)	keine Daten
Codierende Regionen	0 (0%)	16 (25%)	77(53%)	3 (12%)	keine Daten
Referenzen	diese Arbeit	diese Arbeit	diese Arbeit	diese Arbeit	[10]

### *Somatische mtDNA Mutationen und Keimbahnvariationen verschiedener Tumorentitäten*

Bei den Patienten mit Medulloblastomen wurden 39%, bei den Patienten mit pilozytischen Astrozytom 50% der somatischen Mutationen in Regionen des Genoms gefunden, die für die Kodierung mitochondrialer Proteine verantwortlich sind. Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führten, waren Y496H der Cytochrom C Oxidase Untereinheit I (COX I) und L96P in ND4 (NADH Dehydrogenase Untereinheit 4) in der Medulloblastomgruppe und M60V in der Untereinheit 6 der ATP-Synthase, L236I im Cytochrom B und L112M in der Untereinheit 1 der Cytochrom C Oxidase bei den pilozytischen Astrozytomen. Die funktionellen Auswirkungen dieser Änderungen sind nicht bekannt. Es ist jedoch belegt, dass die Freisetzung von Proteinen wie Cytochrom C, Apoptose-induzierender Faktor oder Endonuclease G aus dem Mitochondrium Apoptosekaskaden induzieren kann [8]. Defekte im Cytochrom C wiederum können zur Akkumulation von ROS führen [27] und somit zur Tumorenstehung beitragen.

Die in den vorliegenden Arbeiten detektierten somatischen Mutationen sind bereits bei

anderen Erkrankungen beschrieben. Es ließen sich keine für die untersuchten Entitäten spezifische Mutationsmuster erkennen. Aufgrund der geringen DNA-Qualität der zur Verfügung stehenden Tumorproben ergaben sich nur kleine Stichproben. Infolgedessen wurde bei gleichzeitig nur unzureichenden klinischen Informationen entgegen der ursprünglichen Absicht darauf verzichtet, Korrelationen zwischen dem Genotyp somatischer mtDNA-Mutationen und dem klinischen Phänotyp abzuleiten.

Bei der Identifizierung der somatischen Mutationen zeigte sich im gesamten Kollektiv eine hohe Frequenz an Keimbahnvariationen (Tabelle). Bezüglich des Mutationsspektrums fielen in den untersuchten Tumorentitäten keine signifikanten Unterschiede auf. Interessanterweise fand sich bei Patienten mit pilozytischen Astrozytomen die höchste Anzahl an Keimbahnvariationen (Tabelle). Die meisten dieser Variationen sind bekannte Polymorphismen. Diese Polymorphismen werden mit zunehmendem Interesse mit der Ätiologie unterschiedlicher Tumorerkrankungen assoziiert. Canter et al. konnten z.B. in einer größeren Bevölkerungsstudie demonstrieren, dass die Keimbahnvariation mtDNA G10398A (codon A114T) mit einem erhöhten Risiko einer invasiven Brustkrebserkrankung bei Afroamerikanerinnen einhergeht [28]. Dieser untersuchte Polymorphismus führt zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin in der NADH-Untereinheit des mitochondrialen Komplex I. Zusätzlich führten epidemiologische Untersuchungen zu der Annahme der Autoren, dass das 10938A Allel als neuer Risikofaktor für die Genese einer Brustkrebserkrankung erhoben werden kann [28].

In der mitochondrialen DNA im Liquor der Patienten mit einem Medulloblastom mit oder ohne metastatische Erkrankung konnten die identischen Mutationen wie im Tumorgewebe detektiert werden. Bei einem Patienten identifizierte die Liquoranalyse die Mutation T152C, identisch zum Tumorgewebe. Zum Zeitpunkt der Liquorentnahme war dieser Patient in Remission und 5 Monate später zeigte sich ein Rezidiv der Erkrankung. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass das Persistieren der mtDNA Mutationsmuster sich für diesen Patienten als Biomarker für die Erkrankung erwies. Ob diese Hypothese sich als robust erweist, muss durch umfangreichere Mutationsanalysen von Tumorgewebe und Liquorflüssigkeit an einer höheren Anzahl von Medulloblastompatienten geprüft werden. Das mögliche Potential von mitochondrialen Mutationen als Tumormarker zeigen die Ergebnisse von Yu et al. in ihrer Studie [29]. Tumorgewebe von 130 Patienten mit einem Prostatakarzinom wurden auf die mtDNA Deletion bp 4977 untersucht. Als Kontrollgruppe diente Gewebe von Patienten mit einer benignen Prostatahyperplasie. 98% der Studiengruppe zeigten die somatische Mutation mtDNA4977, in der Kontrollgruppe wurde diese Veränderung nur in 14,7% der untersuchten Gewebe gefunden. Die Autoren sahen deshalb für die Deletion mtDNA4977 ein hohes Potential als tumorspezifischer Marker für Prostatakarzinome.

Interessanterweise zeigten sich bei benignen kutanen und plexiformen Neurofibromen ausschließlich Mutationen in nicht kodierenden Bereichen der hypervariablen D-loop-Region. Die Signifikanz von Mutationen in dieser Region für das biologische Verhalten ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass somatische Mutationen in der D-loop die Promoterregionen des Mitochondriums beeinflussen und somit mitochondriale Biogenese, Transkription und Proteinexpression beeinträchtigen können [30, 31]. Einen Unterschied im Mutationsspektrum der unterschiedlichen Fibromgruppen ließen unsere Ergebnisse nicht erkennen. MtDNA Mutationen können zufällig auftreten und mehrere Mutationen treten möglicherweise unabhängig voneinander auf. Eine Erklärung für das Auftreten homoplasmischer Mutationen könnten verstärkte Selektionsmechanismen für diese Mutationen sein. Eine andere Erklärung für die in Tumoren beobachtete Homoplasmie wäre die zufällige Verteilung des mitochondrialen Genoms nach einer suffizienten Anzahl von Zellteilungen [32]. Diese Ursache würde jedoch nur unzureichend die Verteilung der somatischen Mutationen in individuellen Neurofibromen erklären. Detjen et al. untersuchten die mtDNA der Blutproben von vier monozygoten an Neurofibromatose Typ 1 erkrankten Zwillingen sowie der kutanen Neurofibrome von einem dieser Zwillingspaare. In dieser Analyse wurden insgesamt 73 Polymorphismen detektiert, 12 der Keimbahnvariationen finden sich in weniger als 1% der Normalbevölkerung. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen zeigten die Mutationsanalysen der kutanen Neurofibrome keine somatischen Mutationen auf, jedoch waren nur von einem Zwillingsspaar Tumorproben für die Untersuchung vorhanden [22]. Gegen eine zufällige Verteilung sprechen unsere Ergebnisse, in denen wir das unabhängige Auftreten der gleichen somatischen mtDNA Mutationen in unterschiedlichen kutanen Neurofibromen eines Patienten demonstrierten. Unterstützt wird diese Aussage durch die Beobachtung, dass multiple Mutationen in unterschiedlichen Neurofibromen desselben Patienten fast ausschließlich homoplasmisch auftraten. Mutationen, die in den verschiedenen Fibromen unterschiedlicher Lokalisation von einem Patienten detektiert wurden ließen sich bereits im Blut, in nicht betroffenem Hautgewebe und im Randgewebe des Tumors nachweisen. Der proportionale Anteil der mutierten mtDNA an der gesamten mtDNA stieg mit der anatomischen Nähe zum Tumorgewebe. Diese Beobachtungen sprechen für die Möglichkeit, dass mitochondriale Mutationen bereits in Vorläuferzellen präsent sind. Liegen sie dort bereits in geringen Anteil heteroplasmisch vor, könnten sie im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung akkumulieren. Kutane Neurofibrome sind Mischzelltumoren. Die dominanten Zelltypen sind Schwannzellen und Fibroblasten neben Mastzellen, Endothelzellen, perineurale Zellen und Neuronen. Um die Frage zu beantworten, in welchen Zellen die mtDNA Mutationen auftreten, führten wir mit Hilfe von Mikrodissektion und immunologischen Verfahren Mutationsanalysen der einzelnen Zellarten durch. Die Ergebnisse zeigten die identischen somatischen Mutationen in S-100 positiven

(Schwanzzellen) und S-100 negativen Zellen (Fibroblasten). Diese Mutationen waren identisch zu denen im Mischgewebe detektierten Mutationen. In den nicht malignen Endothelzellen dieser Tumoren fanden wir ausschließlich den Wildtyp, der ebenfalls in Untersuchungen nicht betroffener Haut des Patienten dominierte.

#### Limitationen der zusammengefassten Arbeiten

Im nukleären Genom sind Kopien mitochondrialer Sequenzen enthalten, die während der Evolution vom Mitochondrium in den Nukleus transferiert und in die nukleäre DNA integriert wurden [33, 34]. Wallace et al. gelang der Nachweis von über 200 nukleärer Kopien mitochondrialer Sequenzen (NUMTS) beim Menschen [34]. Das für die Mutationsanalysen von Medulloblastomen und Neurofibromen verwendete Primerset zeigte mehrfach nukleäre Sequenzentsprechungen. Goios et al. konnten jedoch zeigen, dass bei der mtDNA Amplifikation mittels Routinetechniken kein erhöhtes Risiko einer Kontamination durch NUMT DNA besteht. Eine Erklärung dafür, so die Autoren, liegt in der deutlich höheren Kopienanzahl mitochondrialer DNA im Vergleich zu nukleären DNA in der Zelle [35]. Durch das Vorschalten der Long-Range PCR vor die eigentliche Sequenzierung der pilozytischen Astrozytome konnte das Risiko einer Kontamination durch nukleäre Pseudogene vermieden werden. Die für die Long Range PCR verwendeten Primer zeigten im Blast-Programm keine nukleäre Sequenzentsprechungen. Auch die experimentelle Anwendung dieser Primer bei mitochondriendepletierten Zellen ( $\rho$ -Null-Zellen) zeigte keine PCR-Produkte [36].

#### 3.5. Literaturverzeichnis

1. Warburg, O.H., Science, 1956b. **123**: p. 309-14.
2. Warburg, O.H., Oncologia, 1956c. **9**: p. 75-83.
3. Warburg, O.H., Science, 1956a. **124**: p. 269-70.
4. Singh, K.K., M. Kulawiec, I. Still, et al., *Inter-genomic cross talk between mitochondria and the nucleus plays an important role in tumorigenesis*. Gene, 2005. **354**: p. 140-6.
5. Dang, C.V. and G.L. Semenza, *Oncogenic alterations of metabolism*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(2): p. 68-72.
6. Fantin, V.R. and P. Leder, *Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4787-97.
7. Matoba, S., J.G. Kang, W.D. Patino, et al., *p53 regulates mitochondrial respiration*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1650-3.



8. Carew, J.S. and P. Huang, *Mitochondrial defects in cancer*. Mol Cancer, 2002. **1**: p. 9.
9. Tan, D.J., R.K. Bai, and L.J. Wong, *Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(4): p. 972-6.
10. Kirches, E., G. Krause, M. Warich-Kirches, et al., *High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples*. Int J Cancer, 2001. **93**(4): p. 534-8.
11. Verma, M., R.K. Naviaux, M. Tanaka, et al., *Meeting report: mitochondrial DNA and cancer epidemiology*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 437-9.
12. Brandon, M., P. Baldi, and D.C. Wallace, *Mitochondrial mutations in cancer*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4647-62.
13. Ristow, M., *Oxidative metabolism in cancer growth*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006. **9**(4): p. 339-45.
14. Baysal, B.E., R.E. Ferrell, J.E. Willett-Brozick, et al., *Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma*. Science, 2000. **287**(5454): p. 848-51.
15. Petros, J.A., A.K. Baumann, E. Ruiz-Pesini, et al., *mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 719-24.
16. Kaatsch, P., C.H. Rickert, J. Kuhl, et al., *Population-based epidemiologic data on brain tumors in German children*. Cancer, 2001. **92**(12): p. 3155-64.
17. Friedman, J.M., *Epidemiology of neurofibromatosis type 1*. Am J Med Genet, 1999. **89**(1): p. 1-6.
18. Wittinghofer, A., *Signal transduction via Ras*. Biol Chem, 1998. **379**(8-9): p. 933-7.
19. Bernards, A., *Neurofibromatosis type 1 and Ras-mediated signaling: filling in the GAPS*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1242**(1): p. 43-59.
20. Gutmann, D.H., Collins, F.S., *Neurofibromatosis 1*. New York: Mc Graw-Hill, 2001: p. 877-96.
21. Weiss, B., Bollag, G., Shannon, K., , *Hyperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1*. Am J Med Genet, 1999. **89**: p. 14-22.
22. Detjen, A.K., S. Tinschert, D. Kaufmann, et al., *Analysis of mitochondrial DNA in discordant monozygotic twins with neurofibromatosis type 1*. Twin Res Hum Genet, 2007. **10**(3): p. 486-95.
23. Kinderkrebsregister, D., 2007.
24. Pfister, S., W.G. Janzarik, M. Remke, et al., *BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas*. J Clin Invest, 2008. **118**(5): p. 1739-49.
25. Fisher, S.G., Lerman, L.S., *DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory* Proc Natl Acad Sci 1983. **80**(1579-83).

26. Wulfert, M., A.C. Kupper, C. Tapprich, et al., *Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes*. *Exp Hematol*, 2008. **36**(5): p. 577-86.
27. Li, K., Y. Li, J.M. Shelton, et al., *Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis*. *Cell*, 2000. **101**(4): p. 389-99.
28. Canter, J.A., A.R. Kallianpur, F.F. Parl, et al., *Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women*. *Cancer Res*, 2005. **65**(17): p. 8028-33.
29. Yu, J.J. and T. Yan, *Effect of mtDNA mutation on tumor malignant degree in patients with prostate cancer*. *Aging Male*, 2010.
30. Barthelemy, C., H.O. de Baulny, and A. Lombes, *D-loop mutations in mitochondrial DNA: link with mitochondrial DNA depletion?* *Hum Genet*, 2002. **110**(5): p. 479-87.
31. Tang, Y., E.A. Schon, E. Wilichowski, et al., *Rearrangements of human mitochondrial DNA (mtDNA): new insights into the regulation of mtDNA copy number and gene expression*. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(4): p. 1471-85.
32. Coller, H.A., K. Khrapko, N.D. Bodyak, et al., *High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection*. *Nat Genet*, 2001. **28**(2): p. 147-50.
33. Tsuzuki, T., Nomiya, H., Setoyama, C., *Presence of mitochondrial-DNA-like sequences in the human nuclear DNA*. *Gene*, 1983. **25**(2-3): p. 223-29.
34. Wallace, D.C., Stugard, C., Murdock, D., , *Ancient mtDNA sequences in the human nuclear genome: A potential source of errors in identifying pathogenic mutations*. *Proc Natl Acad Sci*, 1997. **94**(26): p. 14900-05.
35. Goios, A., L. Prieto, A. Amorim, et al., *Specificity of mtDNA-directed PCR-influence of NUclear MTDNA insertion (NUMT) contamination in routine samples and techniques*. *Int J Legal Med*, 2008. **122**(4): p. 341-5.
36. Parfait, B., P. Rustin, A. Munnich, et al., *Co-amplification of nuclear pseudogenes and assessment of heteroplasmy of mitochondrial DNA mutations*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **247**(1): p. 57-9.

#### 4. Publikation 1

Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients. (Cancer Res 2003)

## 5. Publikation 2

Somatic mitochondrial DNA mutations in neurofibromatosis type 1-associated tumors. (Mol Cancer Res 2004)

## 6. Publikation 3

Somatic mitochondrial mutations in pilocytic astrocytoma.  
(Cancer Genet Cytogenet 2009)

## 7. Publikation 4

Medulloblastoma harbor somatic mitochondrial DNA mutations in the D-loop region. (J Pediatr Hematol Oncol 2010)

## 8. Anteilserklärung

Maria Lüth hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

### **Publikation 1:**

Autoren: Maria Lueth, Lee-Jun Wong LJ, Li XN, Lau CC, Vogel H

Titel: Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients

Zeitschrift: Cancer Research

Erscheinungsjahr: 2003

### **35 Prozent**

Beitrag im Einzelnen:

Konzept & Fragestellung: Das Konzept wurde in Absprache mit LJW und Pablo Hernáiz Driever erstellt.

Studiendesign: siehe Konzept

Erhebung der Daten: Selbständig in Kooperation mit LJW und CCL

Verarbeitung der Daten: Selbständig in Kooperation mit LJW und HV

Statistische Analyse: Selbständig in Kooperation mit LJW und XNL

Erstellen der Publikation: Selbständig in Kooperation mit LJW

### **Publikation 2:**

Autoren: Lueth M, Kurtz A, Kluwe L, Zhang T, Foster R, Mautner VF, Hartmann M, Tan DJ, Martuza RL, Friedrich RE, Driever PH, Wong LJ

Titel: Somatic mitochondrial DNA mutations in neurofibromatosis type 1-associated tumors

Zeitschrift: Molecular Cancer Research

Erscheinungsjahr: 2004

### **30 Prozent**

Beitrag im Einzelnen:

Konzept & Fragestellung: In Kooperation mit PHD und AK

Studiendesign: wie Konzept

Erhebung der Daten: Selbständig in Kooperation mit DJT, MH, VFM und LJW

Verarbeitung der Daten: Selbständig in Kooperation mit PHD

Statistische Analyse: Selbständig in Kooperation mit PHD

Erstellen der Publikation: Selbständig in Kooperation mit PHD

### **Publikation 3:**

Autoren: Lueth M, Wronski L, Giese A, Kirschner-Schwabe R, Pietsch T, von Deimling A, Henze G, Kurtz A, Driever PH

Titel: Somatic mitochondrial mutations in pilocytic astrocytoma

Zeitschrift: Cancer Genetics and Cytogenetics

Erscheinungsjahr: 2009

### **25 Prozent**

Beitrag im Einzelnen:

Konzept & Fragestellung: Selbständig in Kooperation mit PHD, LW und GH

Studiendesign: Selbständig in Kooperation mit PHD, LW und RKS

Erhebung der Daten: Selbständig in Kooperation mit LW, AG, RKS, TP, AD und AK

Verarbeitung der Daten: Selbständig in Kooperation mit LW, AG und RKS

Statistische Analyse: Selbständig in Kooperation mit LW und RKS

Erstellen der Publikation: Selbständig in Kooperation mit PHD und LW

**Publikation 4:**

Autoren: Lueth M, von Deimling A, Pietsch T, Wong LJ, Kurtz A, Henze G, Driever PH  
Titel: Medulloblastoma harbor somatic mitochondrial DNA mutations in the D-loop region

Zeitschrift: Journal of Pediatric Hematology/Oncology

Erscheinungsjahr: 2010

**35 Prozent**

Beitrag im Einzelnen:

Konzept & Fragestellung: In Kooperation mit PHD, LJW , AK, AD,TP and GH

Studiendesign: wie Konzept

Erhebung der Daten: Selbständig in Kooperation mit LJW

Verarbeitung der Daten: Selbständig in Kooperation mit LJW

Statistische Analyse: Selbständig in Kooperation mit LJW

Erstellen der Publikation: Selbständig in Kooperation mit PHD

Maria Lüth  
Promovendin

Pablo Hernáiz Driever  
betreuender Hochschullehrer



## 9. Lebenslauf

## 10. Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten in Erstautorenschaft

- |  | <i>IF</i><br><b>(2007)</b> |
|--|----------------------------|
| 1. <b>Lueth M*</b> , Wong LJ*, Li XN, Lau CC, Vogel H:<br>Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients, <b>Cancer Res</b> , 2003, 3866-71 <b>(14)</b><br>*Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen  | <b>7,62</b>                |
| 2. <b>Lueth M*</b> , Kurtz A*, Kluwe L, Zhang T, Foster R, Mautner VF, Hartmann M, Tan DJ, Martuza RL, Friedrich RE, Driever PH, Wong LJ:<br>Somatic mitochondrial DNA mutations in neurofibromatosis type 1-associated tumors, <b>Mol Cancer Res</b> , 2004, 433-41 <b>(8)</b><br>*Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen | <b>4,31</b>                |
| 3. <b>Lueth M*</b> , Wronski L*, Giese A, Kirschner-Schwabe R, Pietsch T, von Deimling A, Henze G, Kurtz A, Driever PH: Somatic mitochondrial mutations in pilocytic astrocytoma, <b>Cancer Genet Cytogenet</b> , 2009, 30-5 <b>(1)</b> ,<br>*Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen                                       | <b>1,55</b>                |
| 4. <b>Lueth M</b> , von Deimling A, Pietsch T, Wong LJ, Kurtz A, Henze G, Driever PH.<br>Medulloblastoma harbor somatic mitochondrial DNA mutations in the D-loop region, <b>J Pediatr Hematol Oncol</b> . 2010 Feb 5.   | <b>0,72</b>                |

### Originalarbeiten in Co-Autorenschaft

1. Seifert G, Jesse P, Laengler A, Reindl T, **Lüth M**, Lobitz S, Henze G, Prokop A, Lode HN: Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. **Cancer Lett**. 2008 Jun 18;264(2):218-28. Epub 2008 Mar 7.

### Buchbeiträge

1. Pschyrembel ® Klinisches Wörterbuch 261. Auflage 2007, Stichwortbearbeitung Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Walter de Gruyter Verlag
2. Pschyrembel ® Handbuch Therapie online, Walter de Gruyter Verlag 2008, Stichwortbearbeitung Pädiatrische Onkologie und Hämatologie

## Abstracts

1. **Lueth M**, Foster R, Kurtz A, Wong LJC: Somatic mitochondrial DNA mutations are found in Neurofibromatosis Type 1, AACR Annual meeting, 43:299, Abstract no 1484 (2002)
2. **Lüth M**, Kurtz A, Henze G, Hernáiz Driever P: Proteomic Studies in CSF of Patients with Medulloblastoma, Eur J Pediatr 165: 215 (2006)
3. **Lüth M**, Henze G, Kurtz A, Hernáiz Driever P: Proteomic Studies in cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients, Ped Blood Cancer 47:408 (2006)
4. **Lüth M**, Henze G, Kurtz A, Hernáiz Driever P: Proteomic studies in CSF of patients with medulloblastoma, Neuro-Oncology 9:556 (2007)
5. **Lüth M**, Wronski L, Henze G, Pietsch T, von Deimling A, Hernáiz Driever P: Mitochondrial mutations in pilocytic astrocytomas, Neuro-Oncology 10:448 (2008)
6. **Lüth M**, Henze G, Kurtz A, Hernáiz Driever P: Decreased levels of GAPDH in csf of medulloblastoma patients detected by proteomic studies in CSF may indicate response to treatment, Neuro-Oncology 10:478 (2008)
7. **Lüth M**, Henze G, Stein H, Hernáiz Driever P: First case of a peripheral mature T-cell lymphoma otherwise unspecified of the central nervous system in a child, Neuro-Oncology 10:501 (2008)
8. Hernáiz Driever P, **Lueth M**, Wronski L, Henze G, von Deimling A, Pietsch T: Low grade glioma harbor mutations in several parts of the mitochondrial genome, Pediatr Blood Cancer DOI 10.1002/pbc, A036, (2008)

## 11. Erklärung

### Erklärung

„Ich, Maria Lüth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Mutationsanalysen der mitochondrialen DNA neuroektodermaler Tumoren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## 12. Danksagung

Herrn PD Dr. med. P. Hernáiz -Driever danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die Hilfsbereitschaft und Geduld, die er mir trotz seiner Belastung in Klinik und Forschung, in der Betreuung entgegenbrachte.

Herrn Prof. Dr. med. G. Henze sei ebenfalls für die Großzügigkeit und freundliche Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft, und das Interesse an der Arbeit gedankt.

Ebenso danke ich Dr. A. Kurtz für die Teilnahme an dieser Arbeit, die zur Vollendung derselben notwendig war.

Bei der Kind- Philipp- Stiftung für Leukämieforschung möchte ich mich für die Bewilligung des Forschungsstipendiums bedanken.

Vor allem meinen Eltern schulde ich Dank für Ihre stete Unterstützung in dieser Zeit.