

ABSTRACT

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist ein hochmalignes B-Zell Non Hodgkin-Lymphom, das weltweit mit regional sehr unterschiedlicher Häufigkeit auftritt. Selten führt das BL zu einem höhergradigem Knochenmarkbefall, so dass dann per Definitionem eine „Burkitt-Leukämie“ (ALL vom Burkitt-Typ, „B-ALL“) vorliegt. Die differentialdiagnostische Abgrenzung der B-ALL zu anderen leukämischen Non Hodgkin-Lymphomen bzw. z.T. auch zu B-Vorläuferzell-Neoplasien ist häufig schwierig, jedoch von großer klinischer Bedeutung, da die entsprechende Behandlung anders aussieht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Patientenproben mit B-ALL molekulargenetisch auf das Vorliegen einer Translokation $t(8;14)(q24;q32)$ mit MYC-IgH-Fusion untersucht. Zum Nachweis dieser Translokation musste eine spezielle *long range* PCR-Methode etabliert werden. Es wurden insgesamt 56 Patientenproben, die klinisch-diagnostisch einer B-ALL entsprachen, identifiziert. In 29 Fällen (52.8%) war eine $t(8;14)$ mittels PCR nachweisbar. Verglichen mit der konventionellen Zytogenetik und Molekularzytogenetik erschien die PCR bzgl. des Nachweises einer $t(8;14)$ überlegen. Insgesamt zeigte sich eine bemerkenswerte Heterogenität in den immunphänotypischen, zytomorphologischen und genetischen Merkmalen im untersuchten Patientenkollektiv. Klinisch-prognostisch zeigte kein wesentlicher Unterschied zwischen Patienten mit und ohne $t(8;14)$. Durch die PCR war eine genauere Charakterisierung der Chromosomenbruchpunkt-Regionen möglich. Die mittels PCR gewonnenen Daten vermitteln ein vertieftes Verständnis der molekularen Grundlagen dieser Aberration.

Verwendete Abkürzungen:

ALL: akute lymphatische Leukämie

BL: Burkitt-Lymphom

GMALL: German Multicenter ALL (Studiengruppe)

IgH: Immunglobulin-Schwerkettengenlocus (*immunoglobulin heavy chain*)

FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung

EBV: Epstein-Barr Virus

HHV-8: Humanes Herpesvirus Typ 8

EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist ein hoch malignes B-Zell Non Hodgkin-Lymphom (NHL), das weltweit mit regional sehr unterschiedlicher Häufigkeit auftritt. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterscheidet 3 Unterformen: das endemische BL, das vor allem im tropischen Afrika zu finden ist, das sporadische BL in gemäßigten Klimaten und das HIV-assoziierte BL, das gelegentlich bei HIV-Infizierten auftritt [3]. Histologisch unterscheiden sich die genannten Formen wenig, es gibt jedoch charakteristische genetische Unterschiede und Unterschiede hinsichtlich der Assoziation mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Primär wird die Diagnose, der REAL-Klassifikation [4] und der daran anknüpfenden WHO-Klassifikation [3] folgend, basierend auf einer Kombination von charakteristischen histologischen, immunologischen und genetischen Merkmalen gestellt. Typisch für das BL sind genetische Veränderungen, die das MYC-Onkogen betreffen. In der Regel findet man Chromosomentranslokationen, die MYC in die Immunglobulin-Regionen translozieren. Die bei weitem häufigste Translokation ist dabei die $t(8;14)(q24;q32)$, bei der eine Translokation von MYC in den Immunglobulin-Schwerketten (IgH-)Locus auf Chromosom 14 vorliegt.

Gelegentlich kommt es zu einem höhergradigen Knochenmarkbefall durch das BL, so dass in diesen Fällen von einem leukämischen BL, einer „Burkitt-Leukämie“ oder einer „akuten reifen B-lymphatischen Leukämie“ (kurz: B-ALL) gesprochen wird. Die B-ALL wird grundsätzlich anders behandelt als die B-Vorläufer-ALL. Klinisch-diagnostisch ist die Abgrenzung der B-ALL von anderen leukämischen NHLs oft schwierig. Gelegentlich bereitet auch die Abgrenzung zur B-Vorläuferzell-ALL diagnostische Schwierigkeiten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein verlässliches PCR-basiertes Detektionssystem für die Translokation $t(8;14)$ zu etablieren und damit Patientenproben mit klinisch diagnostizierter B-ALL zu untersuchen. Die diagnostische Wertigkeit der PCR im Vergleich zur konventionellen Zytogenetik sollte ermittelt werden. Es sollten die Prävalenz dieser Translokation, Einsichten in die molekulare Genetik sowie Korrelationen zwischen Zytomorphologie, Immunologie und Klinik erarbeitet werden. Insbesondere sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob dem Nachweis dieser Translokation möglicherweise eine prognostische Bedeutung zukommt.

METHODIK, ERGEBNISSE UND DISKUSSION

METHODIK

Patientenmaterial

Untersucht wurden Patientenproben, die zu diagnostischen Zwecken eingesandt wurden. Die Untersuchungen erfolgten größtenteils retrospektiv anhand von in Flüssigstickstoff archiviertem Material, z.T. jedoch auch prospektiv. Die große Mehrheit der Proben wurde im Rahmen der deutschen multizentrischen Therapiestudie für die akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen (GMALL) eingesandt. Bei allen untersuchten Proben erfolgte eine Immunphänotypisierung und, falls sich dort der Verdacht auf Infiltration durch ein B-NHL ergab, auch eine molekulargenetische Untersuchung auf die Translokation t(8;14) und auf Epstein-Barr Virus DNA.

PCR-Methodik

Die Methodik der *long range* PCR für t(8;14), der quantitativen *real time* PCR für EBV und der Immunphänotypisierung sind ausführlich *en detail* in der beigefügten Publikation [2] beschrieben, so dass im Folgenden nur kurz auf die Grundzüge eingegangen wird. Die t(8;14)-PCR wurde im wesentlichen angelehnt an die Methodik von Akasaka *et al.* (1996) [1] entwickelt. Primersequenzen und PCR-Bedingungen wurden jedoch modifiziert bzw. anders gestaltet. Die Lokalisation der Primer im Immunglobulin-Schwerketten-Locus ist in Abbildung 1 anschaulich dargestellt. Insgesamt konnten mit einer Kombination aus 5 Immunglobulin-Primern und einem MYC-Primer alle potentiellen Translokationen im untersuchten Bereich erfasst werden. Für die Untersuchung einer einzigen Probe waren damit insgesamt 11 *long range* PCRs durchzuführen (5 PCRs für die Probe, 5 PCRs für Positivkontrollen, 1 Kontroll-PCR zur Erfassung der DNA-Qualität). Die Detektion von EBV-DNA erfolgte zunächst per nested PCR. Die positiven Fälle wurden dann im *real-time* PCR-Format unter Verwendung eines kommerziellen Kits (RealArt EBV RG PCR Kit, Artus Inc., Hamburg) nachuntersucht. Nur Fälle mit einer höheren Viruslast (>1000 Kopien) wurden als EBV-positiv gewertet.

Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung erfolgte nach Standard-Methoden anhand von Fluorochrom-markierten, kommerziell erhältlichen Antikörpern und mittels der FACScan und Cell Quest Software von Becton Dickinson. Zelloberflächen-Antigene wurden als positiv bewertet, wenn >20% der Zellen eine größere Fluoreszenz-Aktivität als entsprechende Negativkontrollen hatten. Bei intrazytoplasmatischen oder intranukleären Färbungen (z.B. TdT) lag dieser Schwellenwert bei 10%. Proben wurden als "BL-ähnlich" klassifiziert, wenn sie pan-B-Zell- und reife B-Zell-Marker exprimierten (z.B. CD19, CD20), sowie Oberflächen-Immunglobulin (slg) und CD10, und wenn TdT nicht nachweisbar war. Außerdem mußten Antigene, die typischerweise bei anderen B-NHLs zu finden sind, fehlen (z.B. CD5, CD23, CD34). Fälle, die CD10 negativ, slg negativ oder TdT positiv waren, wurden als "BL nicht ausgeschlossen" klassifiziert.

Zytomorphologie

Die zytomorphologische Untersuchung erfolgte, sofern Ausstrichpräparate hier im Hause verfügbar waren, vor Ort, ansonsten fand die zytomorphologische Beurteilung in Kooperation mit der zentralen Referenz-Morphologie der GMALL-Therapiestudie an der Universität Kiel durch PD Dr. H.-A. Horst statt.

ERGEBNISSE

Es wurden insgesamt 56 Patientenproben identifiziert, bei denen immunzytologisch der Verdacht auf eine Burkitt-ALL bzw. ein Burkitt-Lymphom bestand. Die Proben waren etwa seit Beginn der 90er Jahre zur Diagnostik eingesandt worden und übriggebliebenes Material war in Flüssigstickstoff archiviert worden. Diese Proben wurden molekulargenetisch weiter untersucht. Außerdem wurden die zytogenetischen und zytomorphologischen Daten sowie die immunzytologischen Parameter dieser Patienten zusammengetragen. Dazu mussten in vielen Fällen die betreffenden Kliniken kontaktiert werden. Sofern es sich um dokumentierte Studienpatienten handelte, wurden in Zusammenarbeit mit der Studienzentrale der Deutschen Multizentrischen Therapiestudie

für die ALL des Erwachsenen in Frankfurt/Main die klinischen Verlaufsdaten analysiert um die prognostische Bedeutung der gefundenen Veränderungen zu ermitteln.

Molekulargenetik

Mittels der neu etablierten *long range* PCR für t(8;14) ergab sich in 29 Fällen der Nachweis dieser Translokation (siehe Abb. 1). Die PCR-Ergebnisse erlaubten dabei eine Zuordnung der Chromosomenbruchpunkte zu bestimmten Region des Immunglobulin-Schwerketten-Locus. 30% der Patienten zeigten einen Chromosomenbruchpunkt im Bereich der *joining*-Region (IgHJ), die restlichen 70% zeigten Chromosomenbruchpunkte im Bereich der *switch*-Regionen der verschiedenen Immunglobulin-Schwerkettengene. Dabei waren Chromosomenbrüche im Bereich der IgM-*switch*-region am häufigsten zu finden, danach folgten Chromosomenbrüche in einer der 4 IgG-*switch*-Regionen. Besonders interessant war der Umstand, dass auch Chromosomenbrüche in der IgE-*switch*-Region nachzuweisen waren. In der wissenschaftlichen Literatur waren diese bisher noch nie beschrieben worden.

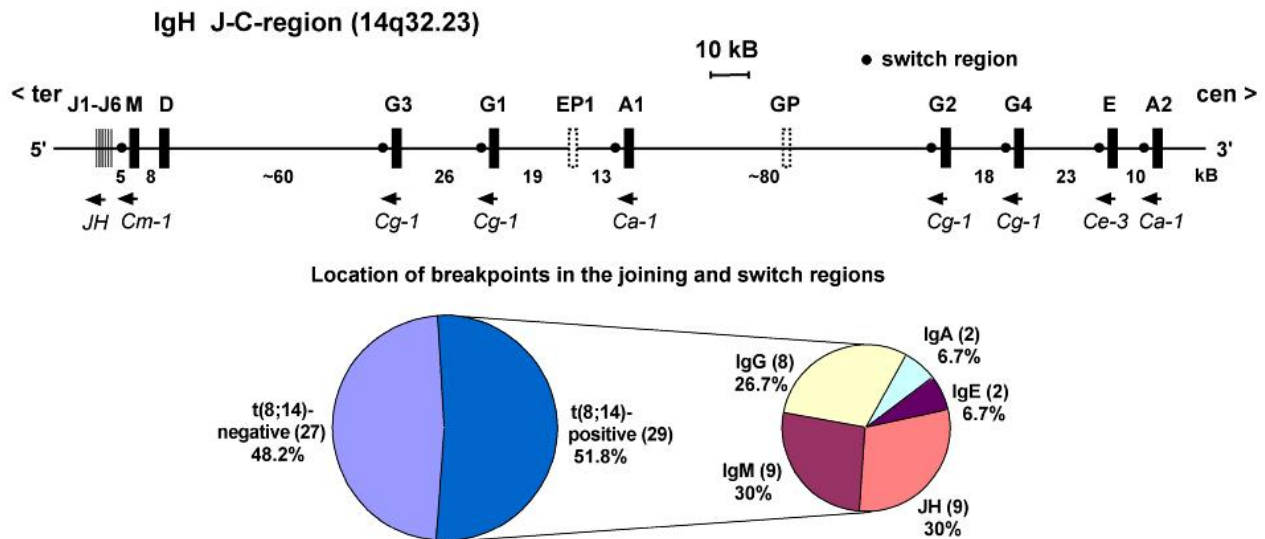


Abb. 1: Schematische Darstellung der *joining* und konstanten (C-) Region des Immunglobulin-Schwerketten (IgH)-Locus auf Chromosom 14. Die Region erstreckt sich über knapp 300 kB. Chromosomenbruchpunkte finden sich jeweils unmittelbar 5'wärts der (6 funktionalen) *joining*-Segmente sowie im Bereich der *switch*-Regionen (letztere mit • markiert). Die PCR-Primer wurden dementsprechend gewählt um alle möglichen Bruchpunkte detektieren zu können. Das untenstehende Kreisdiagramm zeigt die Verteilung der PCR-Produkte.

Bei 27 Patienten, die immunzytologisch als „B-ALL-möglich“ klassifiziert worden waren, ergab sich mittels *long range* PCR kein Nachweis einer t(8;14).

Der Vergleich mit zytogenetischen Daten (die leider nicht bei jedem Patienten erhoben worden waren) zeigte, dass die verwendete *long range* PCR der klassischen Zytogenetik bzgl. des Nachweises einer Translokation t(8;14) mindestens ebenbürtig war. Es gab keinen Fall, der zytogenetisch eine t(8;14) auswies, die nicht auch in der PCR detektiert worden wäre. In 4 Fällen konnte mittels *long range* PCR eine Translokation t(8;14) nachgewiesen werden, die in der zytogenetischen Analyse nicht sichtbar gewesen war.

„Variante“ Translokationen: t(2;8) und t(8;22)

Die Zytogenetik und Molekularzytogenetik (Fluoreszenz in situ-Hybridisierung, FISH) zeigte in 9 t(8;14)-negativen Fällen variante Translokationen von MYC in die Leichtketten-Loci lambda und kappa.

Herpesviren: EBV und HHV-8

Die Analyse mittels PCR auf EBV zeigte in nur zwei Fällen den Nachweis einer hohen Virus-Kopienzahl. Beide Fälle wiesen eine t(8;14) mit Translokation in von MYC in die *joining* Region auf. Alle Fälle wurden außerdem auf das humane Herpesvirus Typ 8 (HHV-8) mittels nested PCR untersucht. Dabei ergab sich in keinem Fall der Nachweis von HHV-8.

Zytomorphologie

Ausstrichpräparate von ausreichender Qualität waren in 48 Fällen verfügbar. Die Klassifikation der dort sichtbaren lymphatischen Blasten erfolgte in 3 Kategorien: typische L3-Morphologie, kompatibel mit L3-Morphologie, keine L3-Morphologie. 25 Fälle zeigten dabei eine L3-typische oder zumindest L3-kompatible Morphologie [2].

DISKUSSION

Die B-ALL ist ein sehr seltenes Krankheitsbild. Sie macht etwa 3-5% aller ALL-Fälle aus. Bei geschätzt etwa 500 Fällen bei Erwachsenen und noch einmal so vielen bei Kindern kommt man damit auf eine Zahl von ca. jeweils 15-25 Fällen pro Jahr in ganz Deutschland. Die differentialdiagnostische Abgrenzung der B-ALL-Patienten von den B-Vorläufer-ALL-Patienten ist von essentieller Bedeutung, da die Behandlung eine wesentlich andere ist. Die bisherige Diagnose der B-ALL beruhte auf einer Kombination von immunologischen Merkmalen und der Zytomorphologie und einem evtl. vorhandenem zytogenetischen Befund. Die klinische Erfahrung hatte jedoch gezeigt, dass sich hier oft Probleme in der Differentialdiagnose ergaben. Die immunologische Abgrenzung zu anderen reifzelligen B-NHLs (z.B. follikuläres Lymphom) war schwierig. Z. T. zeigten sich atypische Immunphänotypen. Die Korrelation mit der typischen FAB-L3-Morphologie war häufig unbefriedigend.

Diagnostische Wertigkeit der neu etablierten PCR

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine PCR-Methode zum Nachweis der Translokation t(8;14) etabliert und bei einem größerem Kollektiv von B-ALL-Proben angewendet. Dabei zeigte sich im Vergleich zur zytogenetischen Analyse insgesamt mindestens eine Gleichwertigkeit der PCR bzgl. der Detektion von t(8;14). Es wurden mehrere Fälle identifiziert, in denen diese Translokation zytogenetisch nicht nachweisbar war, jedoch mittels PCR identifiziert werden konnte, der umgekehrte Fall trat jedoch nie auf. Dies konnte als Hinweis dafür genommen werden, dass diese PCR tatsächlich alle relevanten Bruchpunkt-Regionen im Bereich von MYC und IgH erfasste. Ein Vorteil der PCR gegenüber der Zytogenetik ist zudem die höhere Empfindlichkeit (in Zelllinien-Verdünnungsreihen bis ca. 10^{-3}) und die geringeren Ansprüche an das Untersuchungsmaterial (keine teilungsfähigen vitalen Zellen notwendig).

Immunphänotyp

Bzgl. des Immunphänotyps zeigten sich keine eindeutigen Korrelationen mit dem per PCR ermittelten Genotyp. Auffällig war, dass auch bei BL-untypischem Immunphänotyp (z. B.

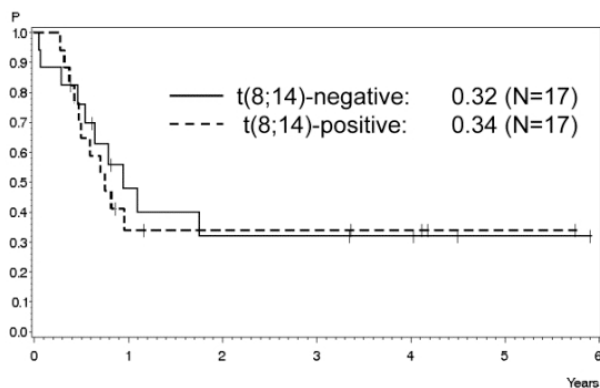
Fehlen von Oberflächen-Immunglobulin, CD10-Negativität oder Positivität von TdT) gelegentlich eine Translokation t(8;14) und/oder eine typische L3-Morphologie zu finden war.

Zytomorphologie

Zytomorphologische Untersuchungen waren bei 48 B-ALL Patienten möglich. Dabei zeigte sich, dass eine L3-Morphologie im Sinne der FAB-Klassifikation prädiktiv für das Vorliegen einer MYC-Translokation (t(8;14) oder variante Translokationen) war. Jedoch zeigte sich eine signifikante Zahl von Fällen, die trotz L3-Morphologie weder zytogenetisch noch molekulargenetisch einen Hinweis auf MYC-Translokation zeigten.

Klinisch-prognostische Bedeutung

In den Anfangszeiten der GMALL-Therapiestudiengruppe wurden B-ALL-Patienten genau



so wie B-Vorläufer-ALL-Patienten behandelt [5]. Dies zeigte jedoch katastrophale Therapieergebnisse (die ersten so behandelten 9 B-ALL-Patienten verstarben alle innerhalb von 1 1/2 Jahren im Rezidiv). Die Therapie wurde daraufhin geändert und pädiatrischen Burkitt-Lymphom-Therapieprotokollen angepasst, die insgesamt 6 alternierende Chemotherapieblöcke beinhalteten. Wesentliches neues Therapieelement war hochdosiertes Methotrexat. Dadurch kam es zu einer dramatischen Verbesserung der Prognose auf ein Gesamtüberleben von annähernd

	MYC/IgH-negative	MYC/IgH-positive
Evaluable	17	17
Male	11 (65%)	10 (59%)
Age	44 (16-59)	47 (17-67)
WBC (N=28, med.)	15 (0.9-584)	23 (1.6-84)
> 30	2 (13%)	4 (24%)
LDH med., U/l	2889 (130-17010)	2870 (1030-14973)
N=26	N=13	N=13
EBV+	0 (0%)	2 (12%)

50% [5]. Eine zusätzliche deutliche Verbesserung zumindest des Ansprechens brachte die Hinzunahme des monoklonalen CD20-Antikörpers Rituximab in der neues-

Abb. 2: Gesamtüberleben von 34 Patienten, die nach dem Studienprotokoll der GMALL behandelt wurden. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen t(8;14)-positiven und t(8;14)-negativen Patienten. Auch die klinischen Charakteristika sind zwischen beiden Gruppen nicht wesentlich unterschiedlich.

ten Therapiestudie ab 2002. Die Analyse der klinischen Verläufe von 34 gut dokumentierten und einheitlich nach GMALL-B-ALL-Protokoll behandelten Patienten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte keinen Unterschied im Gesamtüberleben und keinen signifikanten Unterschied in den klinischen Basis-Parametern zwischen t(8;14)-positiven und t(8;14)-negativen Patienten (Abb. 2).

ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die untersuchten diagnostischen Parameter (Zytomorphologie, Immunphänotyp, Genetik) im untersuchten Patientenkollektiv in einem erheblichen Teil der Fälle nicht 100% konkordant waren. Z.B. gab es atypische Immunphänotypen trotz typischer Genetik und Immunologie, ebenso Fälle mit untypischer Morphologie trotz typischer Immunologie und Genetik oder Fälle mit typischer L3-Morphologie und Immunologie ohne Nachweis einer MYC-Translokation. Die neu entwickelte PCR erwies sich der konventionellen Zytogenetik als überlegen, was den Nachweis einer Translokation t(8;14) anging. Die zytogenetische Untersuchung bei Diagnosestellung bleibt jedoch weiterhin obligat, zum einen zur differentialdiagnostischen Abgrenzung gegen andere B-NHLs (z. B. Nachweis der Translokationen t(14;18) oder t(11;14)) und zum anderen zum Nachweis der „varianten“ Translokationen t(2;8) und t(8;22). Die durch die PCR mögliche genauere Zuordnung der Chromosomenbrüche zu bestimmten Regionen des IgH-Locus unterstreicht die Hypothese, dass diese Chromosomentranslokation als Folge fehlerhafter VDJ-Rekombination bei der Reifung des variablen Anteils der Schwereketten oder fehlerhafter switch-Rekombination beim Isotypenwechsel auftritt. Die vorliegende Arbeit hat hierzu weitere molekulare Details beigesteuert, die zu einem vertieften Verständnis der molekularen Grundlagen dieser Aberration führen. Interessant war dabei die erstmalige Identifizierung von Fällen mit Translokation von MYC in die IgE switch Region. Außerdem zeigte sich, dass die Feststellung der REAL- und WHO-Klassifikation [3,4], dass nämlich MYC-Translokationen in die switch-Regionen nur beim sporadischen Burkitt-Lymphom und solche in die joining Region nur beim endemischen Burkitt-Lymphom auftreten, offensichtlich nicht korrekt ist,

da beide Translokationen bei den hier untersuchten (sämtlich sporadischen) Fällen zu finden waren (siehe Abb. 1).

LITERATUR

- [1] Akasaka T, Muramatsu M, Ohno H, Miura I, Tatsumi E, Fukuhara S, Mori T, Okuma M. Application of long-distance polymerase chain reaction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-cell neoplasms. *Blood* 1996; 88:985-994
- [2] Burmeister T, Schwartz S, Horst HA, Rieder H, Gökbüget N, Hoelzer D, Thiel E. Molecular heterogeneity of adult Burkitt-type leukemia/lymphoma as revealed by PCR and cytogenetics: correlation with morphologic, immunologic and clinical features. *Leukemia* 2005; 19:1391-1398
- [3] Diebold J, Jaffe ES, Raphael M, Warnke RA. Burkitt lymphoma. In: Pathology and genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, eds: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, IARC Press, Lyon, 2001, pp 181-184
- [4] Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84(5):1361-1392
- [5] Hoelzer D, Ludwig WD, Thiel E, Gassmann W, Löffler H, Fonatsch C, Rieder H, Heil G, Heinze B, Arnold R, Hossfeld D, Büchner T, Koch P, Freund M, Hiddemann W, Maschmeyer G, Heyll A, Aul C, Faak T, Kuse R, Ittel TH, Gramatzki M, Diedrich H, Kolbe K, Überla K. Improved outcome in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 87:495-508

Erklärung über die selbstständige Durchführung

Ich, Thomas Burmeister, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Untersuchungen zur Molekulargenetik der akuten lymphatischen Leukämie vom Burkitt-Typ und des Burkitt-Lymphoms* 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.

Berlin, im September 2006

Thomas Burmeister

Erklärung zur Vorlage im Promotionsbüro der Charité über den Anteil an den folgenden 3 Publikationen

- [1] Burmeister T, Schwartz S, Horst HA, Rieder H, Gökbüget N, Hoelzer D, Thiel E. Molecular heterogeneity of adult Burkitt-type leukemia/lymphoma as revealed by PCR and cytogenetics: correlation with morphologic, immunologic and clinical features. *Leukemia* 2005; **19**:1391-1398
- [2] Burmeister T, MacLeod RAF, Reinhardt R, Mansmann V, Loddenkemper C, Marinets O, Drexler H, Thiel E, Blau IW. A novel sporadic Burkitt lymphoma cell line (BLUE-1) with a unique t(6;20)(q15;q11.2) rearrangement. *Leukemia Research* 2006; **30** (in press)
- [3] Jahnke K, Burmeister T, Korfel A, Coupland SE, Thiel E. Long distance polymerase chain reaction of ascites lymphoma cells aids diagnosis establishment of abdominal Burkitt's lymphoma and Burkitt-like lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*. 2005; **46(1)**:83-86

Hiermit bestätigen die Unterzeichnenden, dass Herr Thomas Burmeister die ersten beiden Arbeiten in größtmöglicher Eigenverantwortlichkeit und Selbstständigkeit durchgeführt und zur Publikationsreife gebracht hat. Bei der dritten genannten Publikation zeichnet er verantwortlich für den genetischen Anteil dieser Arbeit, den er ebenfalls selbstständig und eigenverantwortlich erledigt hat.

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Eckhard Thiel
(Doktorvater)

Dr. rer. nat. Thomas Burmeister
(Doktorand)