Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genexpression in primär kutanen B-Zell-Lymphomen mittels custom-made Microarrays

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kim Christian Jasch

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. S. Gellrich

2. Prof. Dr. med. A. Fischer

3. Priv.-Doz. Dr. med. Chr. Voit

Datum der Promotion: 30. Januar 2009

1. EINLEITUNG

1.1 Primär kutane B-Zell Lymphome

1.1.1 Keimzentrums-Lymphome

1.1.2 Das Marginalzonen-Lymphom

1.1.3 Das diffuse großzellige B-Zell Lymphome

1.2 Das lymphozytäre System

1.2.1 Bedeutung von B-Lymphozyten

1.2.2 Entwicklung der B-Lymphozyten

1.3 Ätiopathologische Hypothesen der Lymphomgenese

1.3.1 Immundyregulation

1.3.2 Assoziation mit Helicobacter pylori

1.3.3 Assoziation mit Borrelien

1.4 Die Technik des Microarray

2. AUFGABENSTELLUNG

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patienten

3.2 Referenzprobe

3.3 Charakterisierung der Chipgene

3.4 Methoden

3.4.1 Isolation der Gene zur Herstellung der DNA-Chips

3.4.2 Klonierung der PCR-Produkte

3.4.3 Direktsequenzierung

3.4.4 Auswertung der Sequenzen

3.4.5 Amplifikation der verifizierten Gensequenzen

3.4.6 Herstellung des Microarray

3.4.7 RNA-Isolation aus Hautbiopsien

3.4.8 RNA-Isolation aus peripherem Blut / Lymphozyten

3.4.9 Markierung der umgeschriebenen cDNA (Labeling)

3.4.10 Hybridisierung

3.4.11 Auswertung der Microarrays

3.5 Geräte, Reagenzien und Chemikalien

3.5.1 PCR

3.5.2 Klonierung

3.5.3 Sequenzierung

3.5.4 RNA-Isolation

3.5.5 SMART-Kit / Labeling

4. ERGEBNISSE

4.1 Gene mit Überexpression

4.1.1 Funktion und Bedeutung der Gene

4.2 Gene mit Unterexpression

4.2.1 Funktion und Bedeutung der Gene

5. DISKUSSION

5.1 Zur Methode

5.2 Genexpression in kutanen B-Zell Lymphomen

6. ZUSAMMENFASSUNG

7. LITERATURVERZEICHNIS

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

9. DANKSAGUNG

10. LEBENSLAUF

11. ERKLÄRUNG

1. EINLEITUNG

1.1 Primär kutane Lymphome

Primär kutane Lymphome sind insgesamt selten und machen bei einer Inzidenz von ca. 0,5-1 : 100.000 nur ca. 5% aller Lymphome aus (Willemze, 1997).

Zeigen neoplastische Proliferationen der Lymphozyten mindestens sechs Monate eine ausschließliche Manifestation an der Haut, werden diese als primär kutane Lymphome (PCL) bezeichnet. Diese können sowohl der B- als auch der T-Zelllinie entstammen, wobei T-Zell-Lymphome mit ca. 75% gegenüber den 25% B-Zell-Lymphomen überwiegen.

Als die primär kutanen Lymphome als eigene Entitäten anerkannt worden waren zeigte sich die Einordnung in die gebräuchlichen Klassifikationen als problematisch, da hauptsächlich histologische Merkmale zur Einteilung genutzt wurden (Schmoeckel,1979) und eine klinische Unterscheidbarkeit der Hautläsionen sich im wesentlichen nur bei dem T-Zell-Lymphom der Mycosis fungoides finden lässt.

Nachdem die zuerst maßgebliche Kiel-Klassifikation (Lennert, 1974; Gerard-Marchant, 1974) 1982 von der amerikanisch dominierten Working Formulation abgelöst wurde (Cancer, 1982), wurde im Jahre 1994 die REAL-Klassifikation als gemeinsame Einteilung der Lymphome von der *International Lymphoma Study Group* entwickelt (Harris, 1994), sie bot die erste Basis für international vergleichbare Studien und ermöglichte den gemeinsamen Erfahrungsaustausch.

1997 übernahm die WHO eine überarbeitete Version der REAL-Klassifikation, die sich an der Herkunft der Lymphomzellen, aber auch am Differenzierungsgrad bzw. Reifegrad orientiert, jedoch die primär kutanen Lymphome nicht als eigene Entitäten und deren Verlausformen berücksichtigt. Auch in den nachfolgenden Fassungen wurden die primär kutanen Lymphome nicht mit ihren Besonderheiten ausreichend berücksichtig. Eine Einteilung in indolente und aggressive Formen der CTCL fehlte z.B. vollständig (Virginia, 1997).

Da in allen bis dato genannten Klassifikationen eine Zuordnung der PCL nicht, oder nur schwierig, möglich war, wurde ebenfalls im Jahr 1997 von der *Cutaneous Lymphoma Group* der EORTC (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) ein eigenes Klassifikationssystem veröffentlicht, in dem prognostische, immunhistochemische, zytogenetische und molekularbiologische Charakteristika der primär kutanen Lymphome erstmals konkret berücksichtigt wurden (Willemze, 1997).

Im Jahre 2005 wurde eine Konsensus-Klassifikation gemeinsam von der WHO und EORTC herausgegeben (siehe Tab. 1), in der die Besonderheiten der primär kutanen Lymphome berücksichtigt werden (Willemze, 2005). Diese Klassifikation ist zur Zeit für die Dermatoonkologie maßgeblich.

Alle Lymphomzellen eines Tumors entstammen einer einzigen entarteten Zelle, sie unterliegen einem klonalen Rearrangement (Gellrich, 2000). Anhand der exprimierten Immunglobuline der B-Zellen kann eine Zuordnung zu den einzelnen Unterarten erfolgen (Keimzentrumslymphom, Immunozytom, Mantelzelllymphom).

Kutane B-Zell Lymphome	Kutane T-Zell und NK-Zell Lymphome
• Primär kutane Marginalzonen B-Zell-Lymphome • Primär kutane Keinzentrumslymphome • Primär kutanes diffus-grosszelliges B-Zell-Lymphom (leg type) • Primär kutanes diffus-grosszelliges B-Zell-Lymphom, andere Typen • Primär kutanes intravaskuläres grosszelliges B-Zell-Lymphom **Hämatologische Vorläuferneoplasien** • CD4+, CD56+ hämatodermische Neoplasien	• Mycosis fungoides (MF) • Mycosis fungoides Varianten und Subtypen - Follikulotropische MF - Pagetoide Retikulose - Granulomatous slack skin • Sézary-Syndrom • Adult T-cell leukemia/lymphoma • Primär kutanes CD30+ lymphoproliferative Störungen - Primär kutanes anaplastisches grosszelliges Lymphom - Lymphomatoide Papulose • Subkutanes Pannikulitis-artiges T-Zell-Lymphom • Extranodales NK/T-Zell-Lymphom, nicht genauer spezifiziert - Primär kutanes aggressives epidermotrophes CD8+ T-Zell-Lymphom (provisorisch) - Kutanes γ/δ T-Zell-Lymphom (provisorisch) - Primär kutanes klein- und mittelgrosszelliges pleomorphes T-Zell-Lymphom (provisorisch)

Tab. 1: Klassifikation der primär kutanen Lymphome nach WHO-EORTC, 2005

1.1.1 Keimzentrums-Lymphome

Die Keimzentrums-Lymphome stellen unter den indolenten PCBCL den größten Anteil dar (Hallermann, 2004). Sie werden als juckende erythematöse Nodi, typischerweise an Kopf und Stamm beschrieben, welche bei Progression ulzerieren und periläsional neue Knoten und Plaques zeigen können. Die sogenannte B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und schnellem Gewichtsverlust findest sich jedoch nur selten (Cerroni, 2001).

Histologisch zeigen sie ein noduläres bzw. diffuses tumoröses Wachstum aus Follikelzentrumszellen, welche zumeist eine Mischung aus kleinen, schmalen Zentrozyten mit gekerbtem Kern und großen Zentroblasten mit prominenten Kern bestehen. Eine epidermale Beteilung wird nicht beobachtet.

Sie bestehen sowohl aus reaktiven Infiltraten, als auch aus Tumorzellen, wobei die Anzahl der malignen B-Zellen mit der Dauer der Erkrankung ansteigt.

Obwohl die Prognose der PCFCL nicht mit der Zellmorphologie korreliert (Gellrich, 2000), ist die 5-JÜR mit über 95% als sehr positiv anzusehen (Willemze, 2005; Grange 2001; Vermeer, 1996).

Immunhistochemisch sind die Tumorzellen CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, sIg+, CD5-, CD45- und BCL6+, jedoch zumeist negativ für BCL2, allerdings gilt die Expression des bcl-2-Gens durch die Translokation t[14;18] als spezifisch, jedoch zeigt sie sich häufiger bei großzelligen Lymphomes des Beines als bei anderen Untertypen der PCBCL (Geelen, 1998; Grange, 2001).

CD10 ist gelegentlich positiv, jedoch nicht bei Entitäten mit diffusem Wachstumsmuster (Hoefnagel, 2003), der immunhistologische Nachweis von MUM1/IRF4 ist negativ (Hoefnagel, 2005).

1.1.2 Das Marginalzonen-Lymphom / Das Immunozytom

Das Marginalzonen-Lymphom und das Immunozytom wurden in der Klassifikation der EORTC als indolente Verlaufsform zusammen aufgeführt, da sie eine gemeinsame Ursprungszelle haben (EORTC), jedoch konnte gezeigt werden, dass sie unterschiedliche Infiltrationsmuster aufweisen und ca. 50% aller indolenten PCBL stellen (Cerroni, 1997 et 2002).

In der WHO-EORTC Klassifikation werden die vormals designierten primär kutanen Immunozytome und kutane lymphomatoide Hyperplasien monotypischer Plasmazellen,

sowie die seltenen primär kutanen Plasmozytome ebenfalls dieser Entität zugeordnet, da sie zahlreiche Überschneidungen zeigen (Willemze, 2005; Rijlaarsdam, 1993; Schmid, 1995; Torne, 1990).
Die primär kutanen Marginalzonen-Lymphome werden der großen Gruppe der extranodalen Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen, der sogenannten MALT-Lymphome, (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma) zugeordnet (Willemze, 2005).
Klinisch imponieren sie als kleine, meist multiple erythematös bis livide Papeln und Plaques bzw. Nodi, die sich vornehmlich an den Extremitäten und dem Stamm, seltener am Kopf manifestieren. Ulzerationen sind selten.
In der Histologie zeigen sich beim Marginalzonen-Lymphom überwiegend monozytoide und zentrozyten-ähnliche B-Zellen, gelegentlich auch Zentroblasten, Zentrozyten und Immunoblasten. Bilden sich reaktive Follikel, so sammeln sich die Tumorzellen in der sogenannten *Marginalzone*, d.h. der Randzone, jedoch ist auch eine follikuläre Kolonisation, eine Infiltration in die Keimzentren möglich. Dies entspricht den MALT-Lymphomen.
In der immunhistologischen Darstellung sind die Tumorzellen als sIg+, cIg+/- CD79a+,CD20+,CD5-,CD10-,BCL2+, BCL6- charakterisiert.
Als spezifische Translokation gilt t[14;18] und die Trisomie 3 (Harris, 1994), die PCR zeigt ein klonales Rearrangement für IgH (EORTC).
Die für MALTome typische Translokation t[11;18] lässt sich in primär kutanen Formen nicht finden (Hallermann, 2004).
Immunozytome zeigen zumeist diffuse Infiltrate aus Lymphozyten, lymphoplasmozytoide Zellen, sowie Plasmazellen. Die Charakterisierung in der Immunhistologie zeigt cIg+, CD79+, CD20+/-, CD5-, bcl2-; spezifische Translokationen sind nicht bekannt, auch hier findet sich ein klonales Rearrangement für IgH in der PCR (EORTC).

1.1.3 Das diffuse großzellige B-Zell Lymphome

Diese Entität der primär kutanen Lymphome befällt überwiegend die untere Extremität und bevorzugt ältere Patienten über 70 Jahre. Klinisch imponieren sie als schnell entwickelnde, erythematös bis livide Plaques und Nodi, welche sich unscharf von der Umgebung abheben und meist schmerzlos sind. Sie manifestieren sich unbehandelt schnell extrakutan und infiltrieren tiefe Gewebeschichten, wie z.B. die Skelettmuskulatur. Ebenfalls findet sich häufig ein Befall der Leistenlymphknoten, die

sonographisch, szintigraphisch und histologisch abgeklärt werden sollten. Insgesamt hat diese Entität die schlechteste Prognose aller PCBCL mit 5-JÜR zwischen 100% (bei solitären Läsionen) und 36% (multiple Läsionen), bei negativer Korrelation mit Anzahl der Läsionen (Willemze, 2005; Grange 2001).
Lichtmikroskopisch zeigen sich diffus verteilte große B-Zellen (meist Immunoblasten, seltener Zentroblasten bzw. Zentrozyten).
Die immunhistochemische Charakterisierung zeigt: CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, cIg+ und/oder sIg+, da sich die Translokation t[14;18] fast immer nachweisen lässt, wird das BCL2-Protein deutlich häufiger als bei den anderen Entitäten exprimiert (Geelen, 1998; Grange 2001). Hallermann konnte in Studien zeigen, dass sich nicht selten Rearrangements bzw. Translokationen im Bereich IgH finden lassen (Hallermann, 2004).

1.2 Das lymphozytäre System

1.2.1 Bedeutung der B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten stellen den wesentlichen Teil der humoralen Immunantwort dar. Die auf ihrer Oberfläche befindlichen spezifischen B-Zell-Rezeptoren reagieren mit extrazellulären Antigenen und werden nach interner Prozessierung an der Zelloberfläche mit Hilfe des MHC-II-Komplexes (*major histocompatibility complex*) präsentiert. Zu diesen antigenpräsentierenden Zellen gehören ebenfalls die Makrophagen, da auch sie Träger des MHC-II-Komplexes sind. Inflammatorische T-Zellen und T-Helfer-Zellen erkennen den Komplex aus MHC-II und dem Antigen und veranlassen entweder die Aktivierung von Makrophagen bzw. die Umwandlung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen, welche wiederum für die Sekretion von Immunglobulinen bzw. Antikörpern verantwortlich sind.

1.2.2 Entwicklung der B-Lymphozyten

Die Stammzellen der Lymphozyten befinden sich im Knochenmark, von wo die T-Lymphozyten zur Reifung entweder in den ***T****hymus* wandern, oder im Falle der B-Lymphozyten im Knochenmark bleiben (***b****one marrow*), um dort ihre Antigenspezifität auszubilden.

Entscheidend für die Funktion und das Überleben der B-Zellen ist die Ausbildung des Antigenrezeptors bzw. des B-Zell-Rezeptors. Vollständige Immunglobuline, die im Gegensatz zu den löslichen Antikörpern eine zusätzliche schwere Kettendomäne besitzen verankern sich in der Zellmembran und übernehmen die Aufgabe des Antigenrezeptors.
Mit der Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche ist der Reifegrad der unreifen B-Zelle abgeschlossen.
In der anschließenden Selektion werden solche B-Zellen in die Apoptose getrieben, deren Rezeptor sich gegen körpereigene Strukturen richten würde und damit die Selbsttoleranz des Körpers nicht gewährleisten werden könnte. Anschließend verlassen die Zellen das Knochenmark um in periphere Lymphgewebe auszuwandern.
Um eine Variabilität bzw. Spezifität gegenüber eine theoretisch unendliche Anzahl von Antigenen (Tonegawa, 1983; Dorner, 1997) zu gewährleisten, müssen aus den vorhandenen für die V-Region codierende Gene immer neue rearrangements und Mutationen stattfinden. Dazu kommt es während der Reifung der B-Zellen im Knochenmark zu Umlagerungen der Keimbahn-Gene der schweren Kette auf Chromosom 14, bzw. Chromosom 2 für die kappa-Kette und Chromosom 22 für die lambda-Kette. Diese Umlagerung findet jedoch nicht durch Splicing, sondern durch Deletion statt. Aus den in der Keimbahn befindlichen Genen ($V_{H:}$ 51 Gene, D: 27 Gene, $J_{H:}$ 6 Gene; Vκ: 40 Gene, Jκ: 5 Gene; Vλ: 29 Gene, Jκ: 4 Gene) wird zufällig ein V, (ein D) und ein J-Segment ausgewählt, diese zusammengefügt, wobei an den Schnittstellen durch Addition oder Subtraktion einzelner Nukleotide zu den sogenannten N-Regionen kommt, die eine weitere Variabilität ermöglichen. Eine weitere Erhöhung der Anzahl möglicher Spezifitäten wird durch nachfolgende somatische Mutationen ermöglicht. Die physiologische Mutationsrate wird mit einem Basenpaar pro Kilobasenpaar für physiologische B-Zellen und mit 1 Basenpaar pro 10^{10} BP für somatische Zellen angegeben (Berek, 1991).

1.3 Ätiopathologische Hypothesen der Lymphomgenese

1.3.1 Immundysregulation

Ein derzeit favorisierter Ansatz zur Entstehung von Lymphomen ist die Hypothese der Immundysregulation durch chronische Infekte. Durch die tagtägliche subklinische Auseinandersetzung des Immunsystems mit Mikroorganismen kommt es zu einer ständigen Stimulation der B- und T-Zellen. Im Rahmen der Mutationen bei der Zellreife und –teilung kommt es auch zu fehlerhaften Prozessen, die im Regelfall durch apoptotische und/oder zelluläre Prozesse erkannt und kontrolliert werden. Jedoch scheint es möglich zu sein, dass einzelne Lymphozyten sich der Kontrolle des Immunsystems entziehen können und bei Vorhandensein weiterer genetischer Faktoren entarten können. Vermutet wird diese These insbesondere bei den mit Helicobacter pylori assoziierten MALTomen, den PCBCL und den MALTomen bei einheimischer Sprue. Solange die Stimulation der Lymphozyten von diesen Faktoren getriggert wird, kann die Lymphomentwicklung durch Ausschaltung dieser Trigger, z.B. durch eine antibiotische Therapie, unterbrochen bzw. verhindert werden.
Unterstützend bei dieser These ist das gelegentliche Erreichen von Vollremission bei antiobiotischen Therapien (Hornstein , 1992; Mozzanica, 1993; Rijlaarsdam, 1996). Hat sich die entartete Zellpopulation jedoch erst etabliert ist die Lymphomenstehung auch unter Ausreizung der antientzündlichen Therapie bzw. der Ausschaltung der unterhaltenden Faktoren zumeist nicht mehr zu beeinflussen (Du, 2002; Isaacson, 1999; Dummer, 2000).

1.3.2 Assoziation mit Helicobacter pylori

Seit der Entdeckung von Helicobacter pylori (HP) im Jahre 1984 (Marshall, 1984) wurden neben dem allgemein akzeptierten Zusammenhang von HP mit Ulzera im Gastrointestinaltrakt, insbesondere im Bereich des Duodenums, auch verschiedene andere Assoziationen mit diversen Erkrankungen wie z.B. mit der Urtikaria gefunden bzw. vermutet (Rebora, 1995; Tebbe 1996).
Die von Isaacson getätigten Beobachtungen das chronische Entzündungen die Lymphomgenese begünstigen (Isaacson, 1999), konnte auch durch klinische Beobachtungen untermauert werden. Bei 28% aller Patienten mit Typ B Gastritis, d.h. mit HP assoziierter Gastritis konnte im Magen lymphatisches bzw. MALT-Gewebe gefunden werden (Wotherspoon, 1991). Andererseits konnte in 92% aller untersuchten

MALTome des Magens Helicobacter pylori gefunden werden, während die Besiedelung des Magens bei Gesunden zwischen 50% und 60% beträgt (Wotherspoon, 1993). Eine weitere Bestätigung lässt sich aus der klinischen Beobachtung ableiten, dass nach erfolgreichem Abschluß einer (Triple-)Eradikationstherapie (i.d.R. zwei Antibiotika plus einem Protonenpumpenhemmer) nicht nur Regressionen, sondern auch komplette Remissionen der MALT-Lymphome auftreten (Wotherspoon, 1993).

1.3.3 Assoziation mit Borrelien

Ähnlich wie durch den chronischen Entzündungsreiz durch Helicobacter pylori wird auch die Möglichkeit der Lymphomentstehung durch eine chronische Infektion mit Borrelia burgdorferi diskutiert (Cerroni, 1997; Dummer, 2000; Zehnahlik, 2000; Hofbauer, 2001). Interessanterweise konnten die in Europa beobachtete Assoziation mit B. burgdorferi und der Entstehung von primär kutanen Lymphomen in den USA nicht bestätigt werden (Woods, 2001), eine mögliche Erklärung besteht in der schon bei der Einführung der Vakzinationstherapie gegen Borrelien gemachte Erfahrung, dass sich in Europa und USA unterschiedliche Borrelien-Spezies finden lassen bzw. dominieren. Jedoch zeigt sich dadurch, dass neben dem chronischen Entzündungsstimulus noch andere Faktoren, wie z.B. genetische Dispositionen an der Lymphomgenese beteiligt sein müssen.

1.4 Die Technik des Microarray

Die DNA-Microarray-Technik bedient sich vielfältiger Phänomene der Biochemie und könnte in Zukunft eine größere Bedeutung als viele andere Errungenschaften wie z.B. die DNA Sequenzierung oder die PCR erlangen (Kurian, 1999).
Das zugrunde liegende Prinzip des Microarray besteht darin, dass komplementäre Desoxyribonukleinsäure-Stränge Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den hydrophoben Purin- und Pyrimidinbasen eingehen, um den Kontakt mit Wasser so gering wie möglich zu halten. Diese Form der Hybridisierung entspricht der bereits von Watson und Crick beschriebenen Bindung (Watson, Crick, 1953).
Die Technologien zur Herstellung der Arrays lassen sich grob in die zwei Kategorien „Synthese“ und „Anlieferung“ (*delivery*) unterteilen. Bei der erstgenannten werden die Sequenzen *in situ* Base für Base auf dem Chip aufgebaut, währenddessen bei dem zweiten Ansatz durch Methoden wie PCR gewonnene Proben an definierten Loci auf dem Chip immobilisiert werden.

Zur Zeit existieren im wesentlichen drei Herstellungsmethoden, welche jeweils einen der dargestellen Ansätze verfolgen (Abb. 1).
Fodor et al. (Fodor, 1991) entwickelte eine photolithographische Methode, wie sie ganz ähnlich auch in der Halbleiterindustrie verwendet wird. Eine Glassoberfläche wird dazu mit einer photolabilen Schicht überzogen und durch eine Fotomaske belichtet.
Die belichteten Areale sind nun in der Lage photostabile DNA-Basen zu binden, anschließend werden mit weiteren Fotomasken und Belichtungen erneut Bereiche bindungsfähig gemacht und so Base für Base an das wachsende Oligonukleotid, vom 3' Ende ausgehend, gebunden. Mittels dieser Methode ist es möglich, bis zu 400.000 Oligonukleotidgruppen auf einer Fläche von ca. 1,6 cm^2 unterzubringen. (Schena, 1995)
Der größte Vorteil dieses Ansatzes ist, dass Chips direkt aus Datenbanken mit bekannten Basenfolgen synthetisiert werden können, und damit die aufwendige und unsichere Handhabung und Gewinnung der zu untersuchenden Proben entfällt, sowie einer Sicherstellung von Quantität und Qualität der Proben gegenüber „klassischen" Isolationsmethoden.
Als Nachteil stellen sich die notwendigen Fotomasken dar, welche zeit- und kostenaufwenig entworfen und hergestellt werden müssen.
Ein Vertreter des „*delivery*"-Ansatzes ist das sogenannte *microspotting* (Shalon, 1996), welches auf den früheren DNA-spotting Methoden beruht. Hier werden die vorher isolierten, amplifizierten und gereinigten Produkte in winzigen Einheiten in Mikrokapillaren aufgezogen und auf der Oberfläche auf definierte Bereiche durch direketen Oberflächenkontakt aufgedruckt und immobilisiert.
Neben der einfachen Anwendung und der schnellen Implementierung in die Laborroutine stellen sich die geringen Kosten und die Vielseitigkeit der Methode dar und wurde somit Technik der Wahl für die meisten Arbeitsgruppen.
Als Nachteil ist neben dem Aufwand für Herstellung, Aufbereitung und Lagerung der Proben auch die Divergenz der jeweiligen Proben in Qualität und Konzentration durch die manuelle Herstellung zu berücksichtigen. Die so hergestellten Arrays umfassen ca. 10.000 cDNAs auf einer Fläche von ca. 3,6 cm^2 .
Die dritte gängige Methode gehört ebenfalls zur delivery-Kategorie und bedient sich einer Technik, wie sie auch in modernen Tintenstrahl-Druckern zur Anwendung kommt. Mittels Piezoelektronik werden winzige Tropfen aus kleinen Düsen direkt, ohne Kontakt, auf die Oberfläche gedruckt und gewährleisten dadurch einen hohen Durchsatz. Zur

Zeit lassen sich mit dieser auch „*drop-on-demand*“ genannten Methode in etwa 10.000 „spots“ (d.h. Gene) pro Quadratzentimeter herstellen.
Eine Übersicht der Vor- und Nachteile der vorgestellten Methoden ist in Tabelle 2 dargestellt.
Zur Analyse der gebundenen DNA-Moleküke werden fluoreszenzmarkierte Nukleinsäuren benutzt, ein Prinzip was bereits Ed Southern bei dem nach ihm benannten Blot-Verfahren benutzte. Gegenüber der früher verwendeten radioaktiven Markierung lassen sich so jeweils zwei unabhängige Proben simultan und zeitsparend analysieren.
Der große Vorteil des Microarray gegenüber anderen Expressionsanalysen wie z.B. LightCycler® besteht darin, dass in einem Experiment mehr als 40.000 Gene – und somit ganze Genome – analysiert werden können (sog. DNA-Chip bzw. Genom-Chip). Auf einer Matrix, meist beschichtete Glas-slides oder Nylon- bzw. Nitrocellulose-Membranen, werden an festgelegten Positionen sogenannte Proben-DNA, zumeist aus cDNA, aber auch PCR-Produkte genomischer DNA oder auch Oligonukleotide, mittels UV-crosslinking immobil befestigt („*spotting*“).
Aus den zu untersuchenden Geweben/Zellen und der entsprechenden Referenzprobe wird total RNA (tRNA) extrahiert und in cDNA mittels reverser Transkriptase umgeschrieben und mit Fluoreszenz-Farbstoffen bzw. radioaktiv markiert. Die markierte cDNA beider Spezies werden gemischt und auf das Array gegeben, wobei komplementäre Nukleinsäuren hybridisieren; ungebundene cDNA wird im folgenden Waschvorgang vom Chip entfernt. Die auf dem Array bekannten Positionen werden mit speziellen Scannern ausgelesen und das Verhältnis (*mean ratio*) der gebundenen cDNA gemessen, wobei die *ratio* mit der Expression des entsprechenden Genes korreliert und die Variationen der DNA-Konztentration in unterschiedlichen Isolationen und Hybridisationseffizienzen kompensiert.

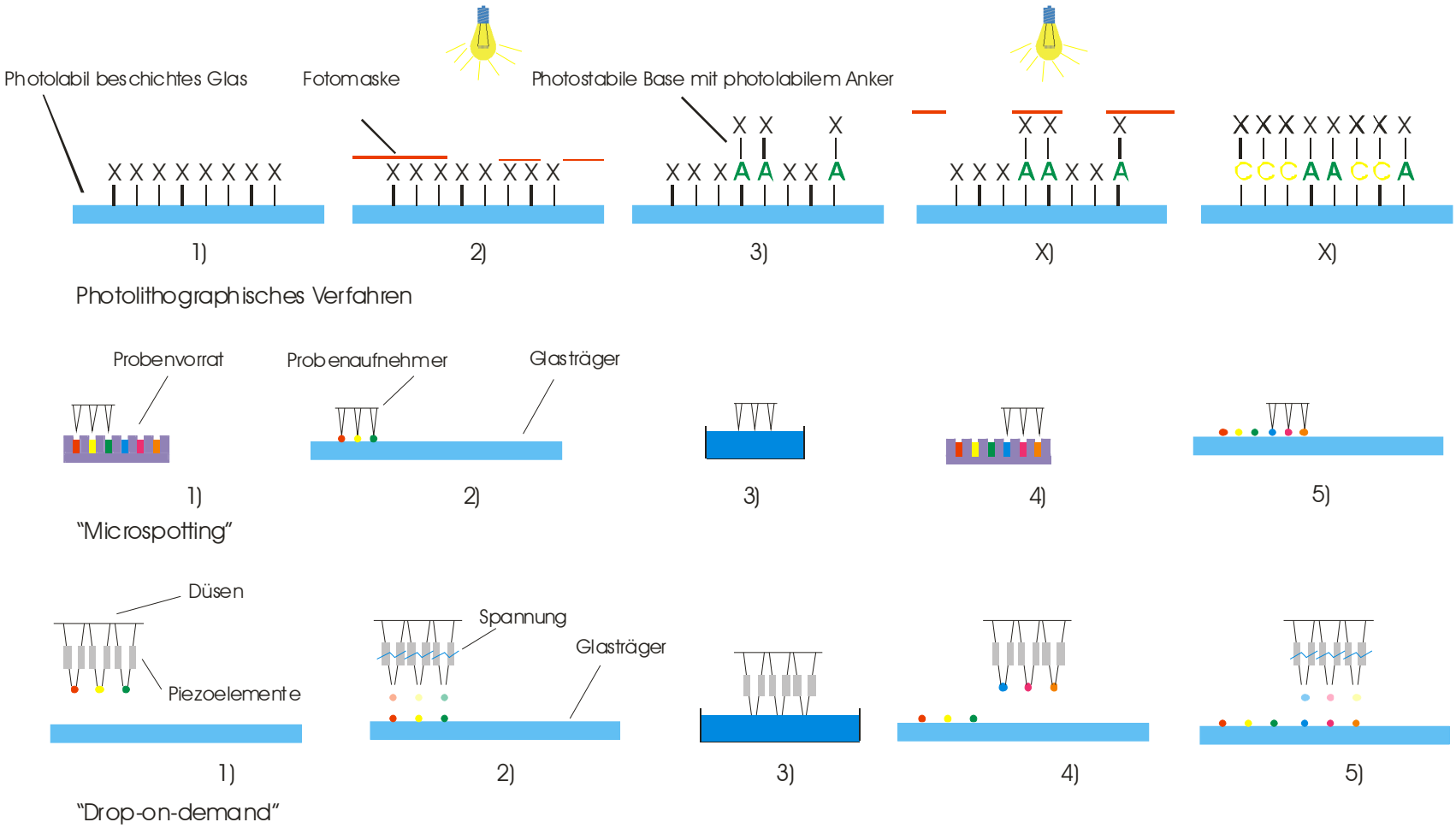


Abb. 1: Übersicht der unterschiedlichen Herstellungsverfahren von Microarrays

	Photolitographie	Microspotting	Ink-Jet
Spots / Fläche	400.000 / 1,6 cm^2	10.000 / 3,6 cm^2	10.000 / cm^2
Vorteile	- Herstellung direkt aus Datenbanken - Gleichbleibendende Qualität und Quantität der Proben	- Einfache Implementierung - Geringe Kosten - Vielseitigkeit	- Einfache Implementierung - Hoher Durchsatz - Vielseitigkeit
Nachteile	- Zeit- und kostenaufwendig - Hoher technischer Aufwand	- Aufwand für Herstellung, Reinigung und Lagerung der Proben	- Aufwand für Herstellung, Reinigung und Lagerung der Proben

Tab. 2: Übersicht der Vor- und Nachteile der Herstellungsmethoden für Microarray

2. AUFGABENSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von eigens angefertigten Microarrays („*custom-made microarray*“) Genexpressionsmuster der unterschiedlichen Lymphomentitäten im Vergleich zum Expressionsmuster gesunder Probanden zu beurteilen.

Die Methode des Microarrays und des cDNA-Labeling musste dazu zunächst etabliert werden.

Folgende Gesichtspunkte sollten dabei besonders untersucht werden:

1. Lassen sich die einzelnen Entitäten anhand ihres Expressionsmusters unterscheiden ?
2. Lassen sich im Vergleich zu gesunden Probanden typische Genexpressionen finden ?
3. Lassen diese Muster Rückschlüsse bezüglich Ätiologie und Pathogenese zu ?
4. Inwieweit lassen sich die Ergebnisse perspektivisch in der Routine nutzen ?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patienten

Für die Isolation der RNA aus Tumorgewebe wurden ausschließlich kryokonservierte (-80°C) Hautbiopsien von Patienten mit PCBCL verwendet, die in der Lymphomsprechstunde der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Charité Universitätsmedizin Berlin behandelt wurden.
Sämtliche Patienten erfüllten die WHO-EORTC Definitionen für primär kutane Lymphome, d.h. daß sich z.B. für mindestens sechs Monate eine ausschließliche Infiltration der Haut ohne systemischen bzw. anderen Organbefall nachweisen lassen musste.
Eine Übersicht über die epidermologischen Daten der Patienten zeigt Tabelle 3.

3.2 Referenzprobe

Als Referenzprobe bzw. Normalkontrolle dienten periphere Lymphozyten, die von einer gesunden Spenderin aus deren Blut isoliert wurden.

3.3 Charakterisierung der Chipgene

Basierend auf einer Arbeit von Alizadeh et al. (Alizadeh, 2000) und dem durch diese Arbeitsgruppe entwickelten „Lymphochip“ (Alizadeh, 1999) isolierten wir aus gesunden Zelllinien rund fünfzig Gene, welche aufgrund der genannten Veröffentlichungen eine zumindest mutmaßliche Rolle in der Tumorgenese von Lymphomen spielen. Ungefähr die Hälfte der isolierten Gene sind bis heute in ihrer Funktion unbekannt, sie tragen den Namen „*unknown*“ bzw. „unk“.
Tabelle 4 zeigt Namen und Funktion der verwendeten Gene.

Patient	Geschlecht	Geburtsjahr	Alter bei ED	Biopsie	Diagnose [1]	Therapie [2]	Ansprechen [3]
I	weiblich	1958	41	Stirn	PCFCL	OP / Radiatio	CR
II	weiblich	1922	77	Rücken	PCFCL	OP / Radiatio	CR / CR DOC
III	männlich	1935	66	Rücken	PCFCL	Rituximab / CT	CR
IV	männlich	1939	63	Kopfhaut	PCFCL	OP / CT / Radiatio IFN α Rituximab	PD
V	männlich	1950	47	Rücken	PCFCL	OP IFN α/ IL-2 Radiatio	CR
VI	weiblich	1910	91	Untere Extremität	DLBCL	Keine	DOC
VII	weiblich	1923	74	Untere Extremität	DLBCL	OP / Radiatio Rituximab	DOD
VIII	weiblich	1915	83	Untere Extremität	DLBCL	Rituximab / CT	CR / CR DOD
IX	weiblich	1922	80	Rücken	DLBCL	OP	CR
X	männlich	1962	36	Obere Extremität	PCMZL	OP Radiatio	CR

1) PCFCL: Primär kutanes Keimzentrums-Lymphom, DLBCL: Diffus großzelliges Lymphom, PCMZL: Primär kutanes Marginalzonen Lymphom; ED: Erstdiagnose - Klassifikation nach WHO-EORTC
2) OP: Operation, CT: Chemotherapie, IFN α: Interferon alpha, IL-2: Interleukin 2
3) CR: vollständige Remission, PD: fortschreitende Erkrankung, DOC: aus anderem Grund verstorben, DOD: an der Erkrankung verstorben

Tab. 3: Übersicht der Patientendaten

Genname	Funktion	Chromosom
Cyt	Cytosin 2 Kinase	Xp22.3-p22.2
Tyr	Tyrosin Phosphatase	11q14-q21
Cycd	Cyclin D2	12p13
Pot	High voltage potassium channel (KCNA3)	1p13.3
Irf	Lymphocyte specific interferon regulatory factor 4	6p25-p23
Aml	Runt related transcription factor / Acute myeloid leukaemia gene 1	21q22.3
Erk	ERK3 proteinkinase	18q12-q21
Map	mitogen-activated protein kinase	6p21.3-p21.2
Dup	Dual specifity phosphatase	17q21
Fli	FADD apoptosis regulator (FLICE like)	2q33-q34
Ptp	Protein tyrosine phosphatase	20q13.1-q13.2
Pak	p21-activated kinase	11q13-q14
Sma	Mothers against decapentaplegic homolog	13q12-q14
Bmi	B Lymphoma Mo-MLV insertion region	10p11.23
Edg	Entothelial differentiation	1p21
Bak	BCL2-antagonist/killer 1	6p21.3
Cd44	CD44 Antigen	11q13
Tgf	Transforming growth factor	3p24-p22
Pde2	Phophodiesterase 2	11q13.4
Bcl6	B-Cell CLL/lamphoma 6 zinc finger	3q27
Iso	Prot. Inhibitor mRNA	2q32.1
Ned	Neural precursor cell	15q15-q21.2
Bcl7	B-Cell CLL/lymphoma 7a	12q24.13
Calla	Membrane enkephalinase CD10	3q25.1-q25.2
Cych	Cyclin H	5q13.3-q14
Jaw	Lymphoid-restricted membrane protein	12p12.1
Rpd	Histone deacetylation	1p34.3
Rhom	LIM Domain (rhombotin-like 1)	11p13
Fmr	Fragile X menral retardation	Xq27.3
Amyb	DNA-binding transactivator	8q22

Tab. 4: Funktion und Chromosomenzuordnung der Gen-Produkte

3.4 METHODEN

3.4.1 Isolation der Gene zur Herstellung der DNA-Chips

Ausgangsmaterial für die Genisolation waren neben stimulierten B-Zellen und Tumor-Zell-Linien (aus der Klinik für Dermatologie, Phlebologie und Venerologie der Charité Universitätsmedizin Berlin), auch Gewebeschnitte von Tonsillen, die freundlicherweise vom pathologischen Institut der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte zur Verfügung gestellt wurden.

Im ersten Schritt wurden aus den Ursprungsgeweben RNA analog der in 3.4.7 und 3.4.8 dargestellten Methode mit TRIzol als Lösungsmittel gewonnen.

Anschließend wurde zur cDNa-Synthese 1 µl RNA mit 5,6 µl DEPC (Diethylpyrocarbonate, Sigma, St. Louis, USA), jeweils 1 µl cDNA-5'-Primer und cDNA-3'-Primer (siehe Tabelle 5) versetzt und diese Mischung für zwei Minuten bei 70°C erhitzt, anschliesend sofort auf Eis gegeben und kurz zentrifugiert.

Zur Vervollständigung des Ansatzes folgten 4 µl 5'-first-strand buffer, 2,4 µl Magnesiumchlorid, jeweils 2 µl DTT und dNTP, sowie 1 µl Superscript 2, das Gemenge wurde zur Katalysation der Reaktion für eine Stunde bei 42 °C gelagert, anschließend mit Aqua destilata auf 80 µl aufgefüllt und für 7 Minuten auf 72°C erhitzt. Zum Beenden der Reaktion wurden die Ansätze dann auf Eis gegeben und die enstandenen Produkte bei -20°C gelagert.

1 µl	cDNA-5	AAG CTG TGG TAA CAA CGC AGA GTC GAC GCG GG	50 µM
1 µl	cDNA-3	AAG CTG TGG TAA CAA CGC AGA GTC GAC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT VN	50 µM

Tab. 5: cDNA - Primer

Zur Synthese von cDNA-Bibliotheken wurde zu 10 µl cDNA aus der oben beschriebenen Reaktion jeweils 8 µl dNTP und TMACL, sowie 1 µl c-DPCR gegeben und der Ansatz mit 63 µl Aqua dest. aufgefüllt. Die folgende Polymerase Kettenreaktion (PCR) startete mit 94°C für 3 Minuten, nach der Zugabe von 1 µl Thermophilus aquaticus-Polymerase und 5 Minuten bei 70°C folgten 23 Zyklen 57°C für 90 Sekunden, 72°C über 4 Minuten und 92°C für 45 Sekunden. Nach Abschluß der Vervielfältigungs-Zyklen beendete sich die PCR mit 57°C über 90 Sekunden und 72°C für 30 Minuten.
Um aus den hergestellten cDNA-Bibliotheken die einzelnen Gene zu isolieren, folgte eine weitere PCR mit gen-spezifischen Primern im Ansatz von 5 µl 10x-Puffer, 4 µl dNTP, 4 µl TMACL, 1 µl des jeweiligen spezifischen 3'- und 5'-Primers, 1 µl cDNA und Taq-Polymerase, aufgefüllt mit 33 µl Aqua dest. Der initiale Schritt der PCR lief für 3 Minuten bei 94°C zum Denaturieren der DNA, nach fünf Minuten bei 70°C wurde die Taq-Polymerase zugegeben, da diese die anfänglichen hohen Temperaturen nicht unbeschadet standhalten würde; es folgten 33 Amplifikations-Zyklen mit 90 Sekunden bei einer individuellen Annealing-Temperatur zwischen 58 und 62°C, zwei Minuten 72°C und 45 Sekunden 92°C. Beendet wurde das Programm mit 57°C für 90 Sekunden sowie 72°C über 30 Minuten. Anschließend schaltete der Amplifier dauerhaft auf 4°C.
Nach Ende der Reaktion wurde parallel mit einem bekannten „ladder" 2 µl des Produkts auf einem 2%igen Etidiumbromid-Agarose-Gel transluminiert, um anhand der Bandenhöhe bzw. -größe den Erfolg der PCR primär abschätzen zu können.
Tabelle 6 zeigt die verwendeten Primer in 5'- und 3'-Lesung, sowie die Länge der resultierenden Produkte in bp.

Genname	5'-Primer	3'-Primer	Länge
Cyt	TTAATGGGGACGAGCAGACAC	CACAATCCACTCACGGGATAGG	550
Tyr	ATCTGGCTCCTTGAACCCTGAC	CCTCTGTTTCATCTGCTGCACC	511
Cycd	ATGAAACGGAGGCAGATGGAG	AACAAAATGCCACACCCTGATG	543
Pot	GCACCACGAACAATAATCCCAAC	AGGTCCATCAAACCGAAGCATC	488
Unk7	GTAGTGTCCGGGGAAAGAGC	TGCTGTCACTGTCAGAATTTTCAC	338
Irf	CTTTTTTCCCGAGCCCAAATTCTCC	CTCCTGAGACAGACTTCCAAGAC	473
Unk12	GGAAACTAATACACTTAAAGAACACA	CACCATCTTACCACTCTTCCA	223
Aml	TGGCAATGATGAAAACTACTCGGC	TGCACAGAAGGAGAGGCAATGG	489
Erk	GCTAGAGGAAGCATCACAGCAAC	GCTTGTTAAAGAGGAACTCCCCAC	500
Map	CCCTCTCATTCTCACTCCTCCTTG	ATCAGCCATGAAAGGCCCTCTC	509
Dup	GGGCTGCCGACTTCATTGAC	CCCCCATCTCAGGGAAAAGAC	503
Fli	AGGCAAGATAAGCAAGGAGAAGAG	CGGGCATACAGGCAAATTGG	536
Ptp	AAACCACACTTCTTGAAACAGCC	ATATAGCAGAGCAGCTCGCTAC	533
Pak	GAGCAGAAGAAAAACCCGCAG	GCCTGAAGCACCTTGTCCAATC	501
Unk35	AGAAACAGGAAGAGGTAAATGAAC	GCTGCAAAGAAAAGCTCCC	406
Sma	CATAACAGCACTACCACCTGGAC	TGACACTGACGCAAATCAAAGAC	548
Bmi	CCTCCACCTCTTCTTFTTTGCC	GCCCAATGCTTATGTCCACTGC	504
Edg	GGAAAAAAATCTCTGGGCTTCGAC	TCCAAACCATCTTCATCTTCCCAC	549
Bak	CCCATTCCCACCATTCTACCTG	GATGAACTCCCTACTCCTTTTCCC	537
Unk43	TCCGCAGACATGGAATGATGG	CCACCTTTGGACAGCTCTAACAC	529
Cd44	ACCAAGACACATTCCACCCCAG	TCGCAATGAAACAATCAGTAGCAC	521
Tgf	CCAACAACATCAACCACAACACAG	AAAGTCACACAGGCAGCAGGTTAG	500
Pde2	TTTCCCTGCCTGAGTTGCTAC	GTCATGCACATTTGTGCCATTTTC	541
Unk51	CCAGACAACAGATTATGGACCGAG	GCCATCGAATCTGAAGATGTGCC	370
Unk52	AAGAGATGCCCAGGTTTCTCG	AAAAAGTCCTCTCAGCTATTCCCC	310
Unk53	TGGAAACGTGGGGTCACAATAAC	AGGAGTAGCTTACCTTTGGGTGC	373
Bcl6	CACCAACACCAAGGTGCAATAC	AGCCCTCTCTTTGACAACATACTG	500
Iso	GTTGGCAGGTTTGACTGTTCC	CGTTGAAGGTGGTGGGTGTAAG	511
Ned	GGCGTAAGCAGAATAAGGCAAAAG	CACATGGCTGGTGAGATATCAAAC	507

Genname	5'-Primer	3'-Primer	Länge
Unk57	GCTTGGCTATTTACGTGGTACTTAAC	TCAGAAGAAGACATGAAAGTCCAGAG	290
Bcl7	GCCTCTCAACAAAACTCCGAAG	GGGATGTAAGAACCACCAGGATAC	500
Calla	AAAGGATCGGCTATCCTGATGAC	GCTCTGTATGCTTGACCAAGACC	550
Cych	CAACCGCAAATTCAGATGCAAAG	GGTAAGCATCCGTCAATGCAATTC	536
Unk63	ACCTAAATTAGTTGTTTTTCACTCC	GCACAAACCAAACTTACAGTC	432
Jaw	TGTAAAAAGACAACACAAGTGCCC	CTCCACCTCCTTCTCATTAGCAG	541
Unk71	GCTAGAAATTTGCATTTTCATAC	AGTCTTTGCCTCGGCTTTAGG	368
Unk72	TCTCTAAACCAGGGATGGTG	GCAGTTACTTCATAACTGATCTCC	349
Rpd	TTAACCTGCCTATGCTGATGCTG	GCTTCTCCTCCTTGGTTTTCTCC	537
Unk76	CAACAAAACTTFAAFCCAACC	TGAAGAGACCTTCCTGGATG	394
Rhom	TGAGATGACAATGCGGGTGAAAG	GCAAGCGTCAAAGTCACAACAAG	536
Unk78	AAAAGATGCTGTTCACCCACCC	GCTTGTCTTCTTCCTCCCAAAGGG	525
Fmr	ACAAAACCCAAGCGTCAGACAG	CAATGGCAGTAGCAGTGACAGTAG	508
Amyb	GGATGTAATGTCAAAAAATGAGCC	TTACAAAAGCTGCAAACAAGAG	453
Unk83	GGGAAAACCGTGAAAAAGTATC	TTGACCATCCCTTATTTTGGC	536
Unk84	CACATTTAAGGATTTTCATGATG	TCAGGAGGCTTATTACTAAC	475
Unk86	GACCTATTTGTTGTTCAGGAGTC	GGATCAACTCACCAAGAAAATACG	472
Unk88	AGAAAAAATAGCCAACTCTCCC	TCCCAGCTCAGTGAAAAGC	317
Unk91	GGTATTTCCATTTTATTTTATGC	GCTGATGAATAATTCTGAATTTTTAC	266
Unk92	GGCTTTCTTAGTTCTGTGCTC	GAAGACAGATCCATGATCTTAACC	254
Unk93	AGTAACTTTCCAAGATCAATAG	CGGATAAGGTCAGTCAATAG	350
Unk95	TGAACCACCTAAGCATAGCC	CCCATTGTTTTGCTGAAGCC	476
Unk97	GATGCCTTTCAGGGAACAAC	CTCCCCCCCAAAATTAAATAGAC	532

Tab. 6: Primer und Länge der verwendeten Gen-Produkte

3.4.2 Klonierung der PCR-Produkte

Um jeweils nur ein Gen-Arrangement bzw. Spliceprodukt zur Amplifikation verwenden zu können, wurden die isolierten Gen-Produkte kloniert. Die Klonierung ist ähnlich wie die PCR ein Verfahren zur Vermehrung von DNA-Produkten, hat bei erhöhtem technischen Aufwand jedoch den Vorteil, sauberere Produkte zu liefern.
Gleichzeitig wird die anschließende Sequenzierung vereinfacht.
Die zu klonierenden Produkte werden in Plasmide mittels Ligation eingebracht und anschließend in kompetenten Escherischia coli-Bakterien transformiert. Die verwendeten Plasmide kodieren eine Ampicillin-Resistenz, so dass sich nur erfolgreich transformierte Bakterien auf dem Ampicillin-haltigen Nährboden vermehren. Zusätzlich enthalten die Plamide ein β-Galaktosidase-kodierendes Gen, dessen Expression durch die Ligation der PCR-Produkte unterbrochen wird und so das als Indikator enthaltende X-Gal sich nicht mehr zu einem blauen Farbstoff umwandeln kann.
Zur Verwendung kam das *TOPO TA Cloning® Kit* (Invitrogen, Leek, Netherlands) bei welchem 2 µl gereinigtes PCR-Produkt (ca. 10 ng/µl) in den *pCR®2.1-TOPO*-Vektor ligiert und anschließend 2 µl der Ligationsreaktion in *TOP10F´OneShot™*-E. coli transformiert werden. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis folgt ein anschließender 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C um die Reaktion zu unterbrechen.Die transformierten Bakterien werden jeweils in 250 µl SOC-Medium aufgenommen und 50µl der Suspension auf Ampicillin-X-gal-IPTG-Agar (2%) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.
Die bei erfolgreichem Einbau der Produkte weiß erscheinenden E.coli-Kolonien wurden dann in einem PCR-Ansatz analog zur ersten Runde wie in 3.4.5 beschrieben amplifiziert, einer Säulenreinigung mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) unterzogen und erneut mittels Direktsequenzierung auf ihre Authenzität und Reinheit kontrolliert. Anschließend erfolgte die Amplifizierung auf 2 ml (siehe 3.4.5).

3.4.3 Direktsequenzierung

Um sicherstellen zu können, dass bei keinem der vielfältigen Arbeitsschritte Kontaminationen entstehen und gegebenenfalls amplifiziert werden, wurde nach der ersten PCR, nach der Klonierung und nach der Amplifikation auf zwei Milliliter jeweils eine Sequenzierung zur Kontrolle der korrekten Basensequenz auf einem DNA-Sequenzierer *ABI 373A* (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) nach der nicht radioaktiven Methode nach Sanger und Coulson (1977) mittels fluoreszenzmarkierter dideoxygenierter

NTP durchgeführt. Vor Ablauf der Sequenzierung wurde anhand eines 2%igen Agarose-Gels überprüft, ob das verwendete PCR-Produkt in etwa die entsprechende erwartete Basengröße aufweist.

Zur Verwendung kam der *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer, Foster City, USA). Je nach Bandenstärke in der Agarose-Visualisation des entsprechenden Produkts wurden 4-10 µl PCR-Produkt mit 5 µl Ready Mix aus obigem Kit, jeweils 1 µl der entsprechenden Primer versetzt und mit Aqua bidest. auf 20 µl aufgefüllt. Da Thermocycler ohne beheizbare Deckel verwendet wurden, wurde der Ansatz jeweils mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die anschließende Sequenzierungs-PCR begann mit einem initialen Denaturierungsschritt für 2 min. bei 96°C gefolgt von 25 Zyklen mit 30 s für 96°C, 15 s bei 55°C und vier Minuten bei 60°C. Den Zyklen folgte eine konstante Temperatur von 4°C um die Proben bis zur Weiterverarbeitung zu kühlen.

Das unter dem Mineralöl befindliche amplifizierte und markierte Produkt (20 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, und zur Fällung der DNA mit 2 µl Natriumacetat (3 M) und 50 µl 95%igem Ethanol versetzt und für ca. 10 min. auf Eis aufbewahrt. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 14.000 rpm wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 250 µl 70%igem gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die DNA aus dem Pellet wurde durch Erhitzen für zwei Minuten bei 90°C in 4 µl Ladepuffer aus Formamid und EDTA (50 mM) (im Verhältnis 5:1) wieder in Lösung gebracht und auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Zum Gießen des Sequenzierungsgels wurde 30 g Harnstoff in 7,125 ml 40%igem Acrylamid, 6 ml 10x TBE-Puffer und 25,375 ml Aqua bidest. gelöst und anschließend in einem 0,2 um Filter für 10-15 min. entgast. Zum Start des Polymerisationsvorgangs wurde 180 µl 10%iges Ammoniumpersulfat und 24 µl TEMED dazupippetiert und die Mischung zügig luftblasenfrei zwischen zwei gereinigte Glasplatten mit einem 0,4 mm Spacer gegossen und für ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.4.4 Auswertung der Sequenzen

Die vom Sequenzierer bereitgestellten Rohdaten wurden auf Apple Macintosh Computern mit Hilfe der Software *Sequence Navigator®* (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) bearbeitet und die gewonnenen Sequenzen bei den namentlich bekannten Genen mit der *EMBL gene bank* (Heidelberg, Germany) verglichen. Die unbekannten Gene (Unk xx) wurden anhand der vorliegenden Gensequenzen mit Hilfe des „zwei Sequenzen-

Vergleichs“ auf korrekte Basenfolge kontrolliert. Zusätzlich wurden alle Produkte mit einer internen Gendatenbank abgeglichen und neue Gene dort eingetragen um eventuelle und zukünftige Kontaminationen vermeiden bzw. erkennen zu können.

3.4.5 Amplifikation der verifizierten Gensequenzen

Um bei individuellen Ansätzen mögliche Inhomogenitäten bzw. Mutationen in den isolierten Gensequenzen vermeiden zu können, wurden die gereinigten Produkte aus der Klonierungs-PCR mittels einer aus zwei Runden bestehenden Standard-PCR auf jeweils 2 ml amplifiziert. Der Ansatz für die erste Runde bestand aus 1 µl DNA-Plasmid, 1 µl Primer-Mix (siehe Tabelle xx), je 5 µl dNTP (2 mM), $MgCl_2$ (25 mM) und 10x PCR-Puffer sowie 1 µl *Expand High Fidelity Taq-Polymerase* (Boehringer, Mannheim, Germany), aufgefüllt mit Aqua bidest. auf 50 µl pro Ansatz. Im *Personal Cycler* (Biometra, Göttingen, Germany) wurde folgendes Programm ausgeführt: 94°C für 3 min. (Denaturierung), 70°C für 2 min. (*Hotstart* der Taq-Polymerase), gefolgt von 35 Zyklen bei 57°C für 90 s (Primer annealing), 72°C für 2 min. (Extension) und 92°C für 45 s (erneutes Schmelzen der DNA) und je einem finalen Annealingschritt bei 57°C für 90 s sowie einer Extension bei 72°C für 5 min. Nach Ablauf des Programms schaltete das Gerät automatisch auf eine Pausentemperatur von 4°C.

1 µl	Seq F	AGG CGA TTA AGT TGG GTA AC	50 µM
1 µl	Topo R	CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	50 µM

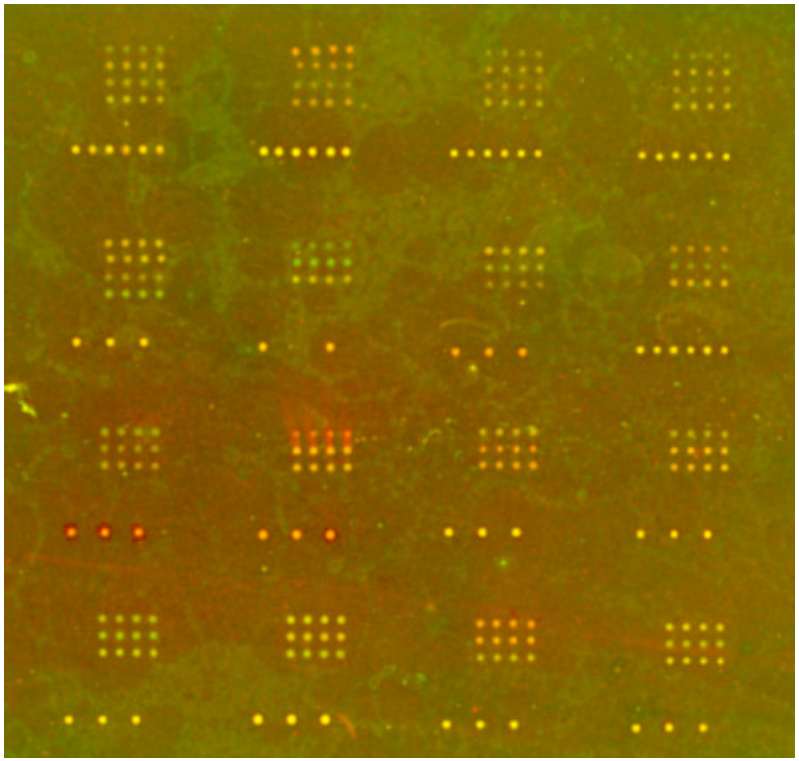
Tab. 7: Zusammensetzung des Primermix für die erste Runde

In der zweiten Runde erfolgte die eigentlich Amplifikation auf 2 ml. Für jedes Gen wurden jeweils 10 Reaktionsansätze a 200 µl mit dem entsprechenden template aus der ersten Runde vorbereitet.
Der Mastermix der zweiten Runde wurde wie folgt angesetzt: 1280 µl Aqua bidest., 200 µl $MgCl_2$ (25 mM), 200 µl dNTP (2 mM), je 10 µl des dem zu amplifizierenden Gens entsprechenden 3’ und 5’-Primers (50 µM) und 40 µl *Expand High Fidelity Taq-Polymerase* (Boehringer, Mannheim, Germany) – 1:4 mit Aqua bidest. verdünnt.
Mit diesem Mastermix wurden zehn Reaktionsgefäße mit jeweils 198 µl befüllt und zu jedem Ansatz 2 µl des templates der ersten Runde pippetiert und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Das PCR-Programm im *Personal Cycler* (Biometra, Göttingen, Germany) erfolgte analog zur ersten Runde.
Die entstandenen Produkte wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß gesammelt und in einer Gelelektrophorese (2%iges Agarosegel) anhand der Bandenhöhe einer kurzen Plausibilitätskontrolle unterzogen.
Die enstandene DNA wurde anschließend in einer Phenol/Chloroform-Reinigung von freien Nukleotiden etc. gereinigt. Dazu wurde Phenol und Chloroform im Verhältnis 1:1 gemischt und im gleichen Volumenverhältnis zur amplifizierten DNA gegeben und kräftig geschüttelt. Nach einer zehnminütigen Zentrifigation bei 14.000 rpm bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und das gleiche Volumen Chloroform nochmals dazugegeben, nach einer weiteren Zentrifugation bei 14.000 rpm und RT für 2 Minuten wurde wiederum die obere Phase in ein neues pippetiert und mit 1/10 Volumen Acetat und 2,5 Volumenteile Ethanol abs. versetzt und für 30 min. bei -80°C inkubiert und anschließend für 10 min. bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das enstandene Pellet in 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung des Pellets wurde dieses in 100 µl Aqua bidest. in Lösung gebracht nach einer Verdünnung 1:100 mit Aqua bidest. die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt.
Es folgte eine erneute Direktsequenzierung, wie bereits beschrieben, um Kontaminationen ausschließen und die korrekte Basensequenz des zu amplifizierenden Gens sicherstellen zu können.

3.2.6 Herstellung des Microarray

Sowohl die Herstellung der DNA-Arrays mittels spotting, als auch die Hybridisierungen erfolgten durch das „Labor für Funktionelle Genomforschung/Charite“ (LFGC) der Charité Universitätsmedizin Berlin. Die angelieferten cDNA-Proben wurden jeweils in vier mal vier Blöcken a vier Wiederholungen pro Gen auf Objektträger aus Glas gespottet. Zusätzlich wurden zur Qualitätssicherung einzelne unbekannt sogenannte „Housekeeping“ Gene aufgetragen. Abbildung 2 und 3 zeigen die Orientierung auf den Chips als auch das Spotting Muster.



4	4	4	4		3	3	3	3		2	2	2	2		1	1	1	1
20	20	20	20		19	19	19	19		18	18	18	18		17	17	17	17
36	36	36	36		35	35	35	35		34	34	34	34		33	33	33	33
52	52	52	52		51	51	51	51		50	50	50	50		49	49	49	49
5	5	5	5		6	6	6	6		7	7	7	7		8	8	8	8
21	21	21	21		22	22	22	22		23	23	23	23		24	24	24	24
37	37	37	37		38	38	38	38		39	39	39	39		40	40	40	40
53	53	53	53															
12	12	12	12		11	11	11	11		10	10	10	10		9	9	9	9
28	28	28	28		27	27	27	27		26	26	26	26		25	25	25	25
44	44	44	44		43	43	43	43		42	42	42	42		41	41	41	41
13	13	13	13		14	14	14	14		15	15	15	15		16	16	16	16
29	29	29	29		30	30	30	30		31	31	31	31		32	32	32	32
45	45	45	45		46	46	46	46		47	47	47	47		48	48	48	48

Abb. 2 und 3: Spotting-Muster und Gen-Orientierung

3.2.7 RNA-Isolation aus Hautbiopsien

Die für die Hybridisierung ausgesuchten Gewebeproben stammten alle aus der Kryobank der Lymphomsprechstunde der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Charité. Es handelt sich dabei um chirurgisch entnommene Hautbiopsien aus Läsionen der entsprechenden Entitäten. Vor Beginn der RNA Isolation wurde die jeweilige Diagnose histologisch gesichert und es wurde anhand der Krankenakte überprüft, dass sich der betroffene Patient nicht zum Zeitpunkt der Entnahme unter bzw. im direkten Anschluß einer Therapie befand.
Die vorsichtig aufgetauten Gewebezylinder wurden mit 1 ml TRIzol (Gibro BRL) überschichtet und für ca. 30 s mit einem mechanischen Shreddermesser homogenisiert. Dem Gemisch wurde entsprechend den gängigen Protokollen 200 µl Chloroform (Merck) zugegeben und das ganze für 15 s kräftig gemischt. Nach 3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte der erste Zentrifugationschritt für 15 Minuten bei 12.000 rpm und 4°C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der oben beschriebene Schritt wiederholt um eine möglichst hochgereinigte RNA zu erhalten. Zu der erneut entnommenen oberen wässrigen Phase wurde 500 µl Isopropanol (Acros Organics) pippetiert und das ganze für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 12.000 rpm für 15 Minuten und 4°C wurde nach Abgießen des Überstandes das entstandene Pellet mit 75%igem Ethanol (J.T. Baker) (mit DEPC-Aqua angesetzt) gewaschen und wiederum für fünf Minuten und 7.500 rpm zentrifugiert.
Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde das RNA-Pellet für ca. 10 Minuten luftgetrocknet und mit 30-100 µl DEPC-Aqua im Thermocycler (Stuart Scientific, UK) in Lösung gebracht. Der Erfolg der Isolation wurde anhand eines 1%igen Agarosegels durch Darstellung der 28S- und 18S-Ribosom-RNA als typisches Zwei-Banden-Musters für tRNA bestätigt (siehe Abbildung 4).

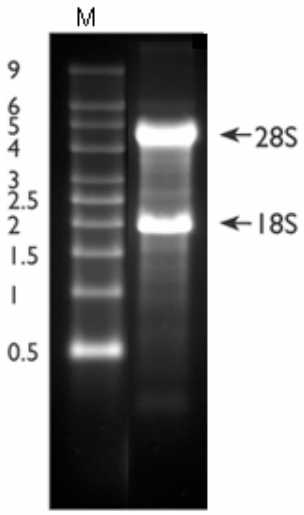


Abb. 4: RNA mit den typischen Banden der 28S- und 18S-rRNA (M = Marker)

3.4.8 RNA-Isolation aus peripherem Blut / Lymphozyten

Um eine relative Über- bzw. Unterexpression verschiedener Gene in kutanen B-Zell Lymphomen erkennen zu können, ist es erforderlich eine Vergleichsprobe gleichzeitig auf den Chip zu hybridisieren. Als Normalkontrolle wurden aus peripherem Blut stammende Lymphozyten gewählt, da in den Hautbiopsien der Patienten Lymphozyten als dominierende Zellspezie gefunden werden. Aufgrund der geringen Anzahl von Leukozyten in gesunder Haut und ethischen Gründen wurde auf die Biopsie gesunder Haut verzichtet.

Peripheres venöses Blut wurde unter Wahrung aseptischer Bedingungen in mit Citrat versetzten Röhrchen (Monovette®) entnommen und jeweils mit gleichem Volumen PBS Salzlösung (Gibco) vermischt.

Jeweils 3 ml Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences) wurden mit 4 ml Blut/Salzlösung überschichtet und für 30-40 Minuten bei 400 x g und 18-20°C zentrifugiert. Die obere Plasma-Phase wurde vorsichtig abpippetiert. Für den anschließenden Waschvorgang wurden die in der Interphase befindlichen Lymphozyten vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Mindestens das dreifache Volumen (6 ml) der Salzlösung wurde dazugegeben, gut gemischt und bei 100 x g für 10 Minuten bei 18-20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen erneut in 6-8 ml Salzlösung vorsichtig gelöst. Nach einer weiteren, wie oben beschriebenen, Zentrifugation wurde erneut der Überstand verworfen und die gereinigten Lymphozyten konnten für die folgende RNA-Isolation verwendet werden.

Die gereinigten Zellen aus jeweils 40 ml Blut wurden in 1 ml TRIzol® (Invitrogen) gelöst und auf die Membran eines QiaShredder® (Qiagen) pippetiert und für 2 Minuten bei maximaler Geschwindkeit (13.200 rpm) und 4°C zentrifugiert um das Gemisch für eine möglichst große RNA-Ausbeute zu homogenisieren. Die folgenden Schritte entsprechen dem TRIzol Standardprotokoll:
Das Zentrifugat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform (Merck) gemischt, für 15 s kräftig geschüttelt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach einer Zentrifugation über 15 Minuten bei 12.000 rpm und 4°C wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pippetiert. Gegebenfalls, insbesondere wenn die obere Phase noch einen leichten Rotstich zeigte, wurde der erste Schritt wiederholt. Zur abgenommenen Phase wurden 500 µl Isopropanol (Acros Organics) gegeben und die Mischung über Nacht bei –20°C zur Präzipitation der RNA aufbewahrt.
Das durch erneutes Zentrifugieren bei 12.000 rpm für 15 Minuten und 4°C gewonne Pellet wurde nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes in 75%igen, mit DEPC-Aqua angesetztem, Ethanol (J.T. Baker) gewaschen und wieder bei 7.500 rpm für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für ca. 10 Minuten vollständig luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 30-60 µl DEPC-Aqua bzw. RNAse-freiem Wasser durch auf- und abpippetieren, oder erwärmen im Thermocycler (Stuart Scientific, UK) bei 55°C gelöst. Die RNA kann bei –80°C über längeren Zeitraum ohne Degradation aufbewahrt werden.
Zur Kontrolle der Isolation wurde 1 µl RNA mit 2 µl Laufpuffer (6 ml Puffer, 3 ml Glycerol, 1 ml 2,5% Bromphenol-Blau) versetzt und auf einem 1%igen Agarose-Gel zusammen mit einem Standard-*Ladder* zur Lage- bzw. Größenkontrolle visualisiert; bei erfolgreicher Isolation zeigt sich das für tRNA typische Bandenmuster mit jeweils einer Bande bei ca. 4,5 kb (28S Ribosom-RNA) und ca. 1,9 kb (18S Ribosom-RNA) (siehe Abbildung 4).

3.4.9 Markierung der umgeschriebenen cDNA (Labeling)

Da RNA äußerst empfindlich ist, wurde zum Hybrisieren der Proben fluoreszenz-markierte cDNA gewählt. Zur Anwendung kam der BD Atlas SMART Fluorescent Probe Amplification Kit (BD Clontech). Vorteil der SMART-Technologie ist, dass geringste Startmengen von ca. 1000 Zellen bzw. 0,1 mg Gewebe zum Erstellen der Arrayproben genügen.

Doppelsträngige cDNA wurde durch reverse Transkription aus 10-100 ng tRNA und anschließender Amplifikation der Einzelstrang-cDNA synthetisiert. Um maximale Ausbeute und repräsentative cDNA zu erhalten, wurde den Herstellerangaben in erster Auflage gefolgt und in einer Optimierungs-PCR die Anzahl der Zyklen bestimmt, in denen sich die PCR noch in der exponentiellen Amplifikationsphase befindet bzw. die Reaktion ein Plateau erreicht. Der Probe wurde jeweils nach 15,18, 21, 24,27 und 30 Zyklen ein 5 ul Aliquot entnommen, welche auf einem 1% Agarose-Gel zur Dastellung gebracht wurden. Den Angaben des Herstellers folgend stellt sich cDNA als kräftiger Fleck zwischen 0,5 und 6 kb mit einzelnen Banden dar (siehe Abbildung 5).

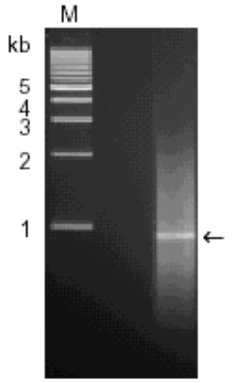


Abb 5: cDNA aus humaner tRNA mit typischer fleckförmiger Aufspaltung und prominenter Bande bei ca. 900 kb. M = Marker

Eine vorher entnommene Reaktionsprobe wurde anschließend mit ensprechender Zyklenanzahl amplifiziert und mit dem QIAQuick PCR Purifikation Kit (Qiagen, Germany), dem SMART-Protokoll folgend, gereinigt. Zum Markieren mit den Fluoreszenzfarbstoffen wurden zunächst aliphatische Aminogruppen durch Verwendung eines speziellen dNTP-Mixes in die cDNA inkorporiert. Anschließend wurden die monofunktionalen Fluoreszenz-Farbstoffe Cy3 (Referenzprobe) bzw. Cy5 (Patientenprobe) (beide Amersham) durch Reaktion mit den Aminogruppen an die cDNA gebunden. Eine weitere Reinigung mit QIAQuick PCR Purifikation Kit (Qiagen, Germany), erneut nach Angaben des SMART-Kits, befreite die Probe von ungebundenen Farbstoffen.

3.4.10 Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurden die Cy3-gefärbte Referenzprobe als auch die pro Experiment unterschiedliche Cy5-gefärbte Patientenprobe auf ein angewärmtes Array gegeben und unter Lichtabschluß über Nacht inkubiert. Ein abschließender Waschvorgang entfernte nicht gebundene cDNA um das Hintergrundrauschen auf ein Minimum zu reduzieren.

3.4.11 Auswertung der Microarrays

Neben Herstellung und spotting wurde auch die computergesteuerte Auswertung der Microarrays durch das „Labor für Funktionelle Genomforschung/Charite“ (LFGC) der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl der Experimente war „*clustern*“, d.h. das Gruppieren einzelner Proben nach Gemeinsamkeiten bezüglich der Genexpression, nicht möglich.
Abbildung 6 zeigt die photographische Darstellung der Hybridisierungen.
Zur Auswertung kam daher die „*Significance Analysis of Microarrays*“ (SAM) zur Anwendung, welche an den Stanford University Labs basierend auf einer Arbeit von Tusher et al. entwickelt wurde (Tusher, 2001). Es handelt sich dabei um eine Ergänzung („*plug-in*“) für Microsoft® Excel®, welches direkt aus den Daten von cDNA- oder Oligo-Microarrays jedem Gen einen Wert zuweist, der aus wiederholten Messungen in Relation zur Stanardabweichung bei wiederkehrenden Messungen besteht. Überschreitet dieser Wert einen wählbaren Grenzbereich, werden anhand der gemessenen Werte Permutationen durchgeführt, um falsch positive Gene aussondern zu können (*false discovery rate*, FDR).
Im Vergleich zu etablierten Methoden der Auswertung soll die SAM bis zu fünffach weniger falsch positive Gene ermitteln (Tusher, 2001).

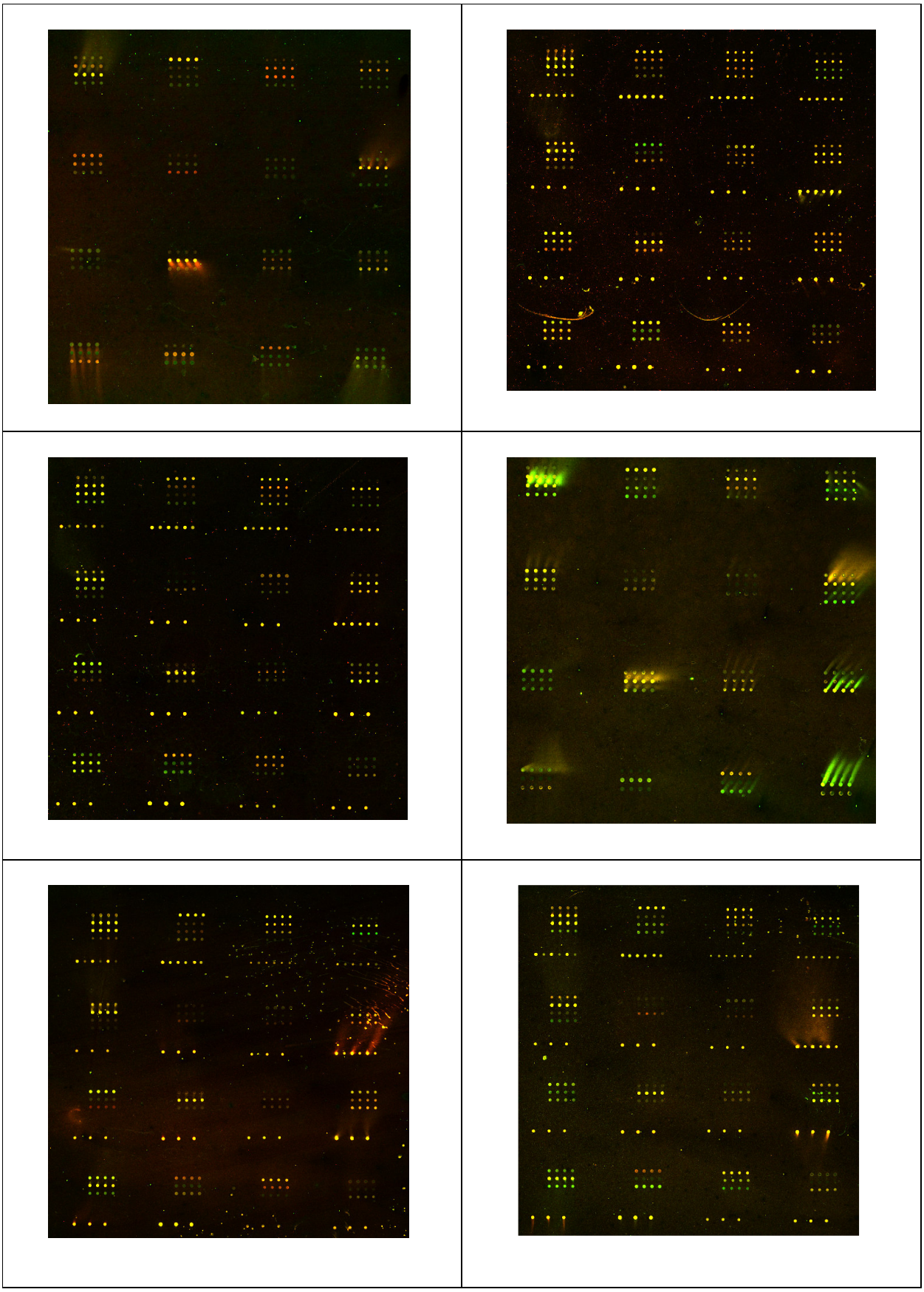


Abb 6: Fluoreszenz-Aufnahmen der Microarrays I-VI

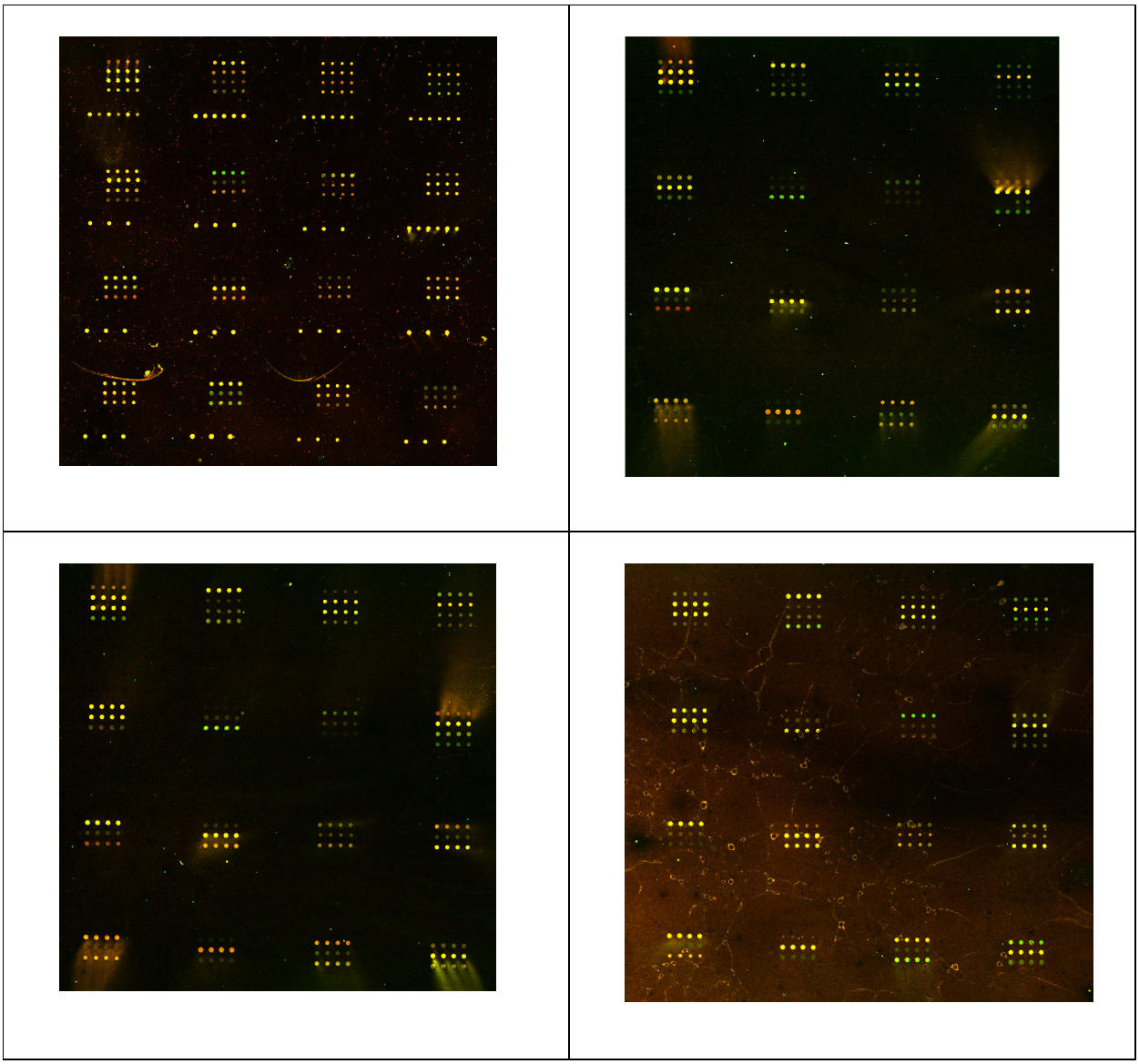


Abb. 6: Fluoreszenz-Aufnahmen der Microarrays VII-X

3.5 Geräte, Reagenzien und Chemikalien

3.5.1 PCR

Personal Cycler	Biometra, Göttingen, Germany
Multi Ultra PCR Tubes (1.Runde PCR)	Sorenson, Salt Lake City, USA
Mineral Oil	Sigma, Deisenhofen, Germany
RNA, 5S-ribosomal	Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany
Proteinase K	Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany
Expand High Fidelity PCR System (für PCR 1.Runde)	Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany
AmpliTaq®DNA Polymerase with GeneAmp® (für alle übrigen PCRs)	Roche Molecular Systems, Branchburg, USA
JumpStart™ dNTP	BioVentures, Murfreesboro, USA
Oligonukleotid-Primer	Biotez, Berlin, Germany
Agarose (UltraPure™)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Germany
Ethidiumbromid (UltraPure™)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Germany
TBE 5x (ad 1l):	
Tris Base 54 g	Sigma, Deisenhofen, Germany
Borsäure 27,5 g	Merck, Darmstadt, Germany
EDTA 0,5 M, pH 8,0 40 ml	Merck, Darmstadt, Germany
1 kb DNA-Leiter	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Germany
PCR Purification Kit	Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany
Agarose Gel DNA Extraction Kit	Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany

3.5.2 Klonierung

TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Leek, Netherlands
TOP10F´ One Shot™ competent cells	Invitrogen, Leek, Netherlands
Ampicillin-X-Gal-IPTG-Agar (2%):	
Bacto-Agar 4 g	Difco Laboratories, Detroit, USA
LB Broth Base [20 g/l] 200 ml	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Germany

Ampicillin [50 mg/ml] 200 µl	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Germany
X-gal [20 mg/ml] 400 µl	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
IPTG 100 µl	Sigma, Deisenhofen, Germany
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, Germany
EcoRI [10 U/µl]	Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany
SuRE/Cut Buffer H	Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany

3.5.3 Sequenzierung

373A DNA Sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany
Sequence Analysis & Sequence Navigator Software	Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany
ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*	Perkin Elmer, Foster City, USA
Ethanol 95%	J.T. Baker, Deventer, Netherlands
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Germany
Formamid	Merck, Darmstadt, Germany
EDTA	Merck, Darmstadt, Germany

Sequenziergel:

Harnstoff 30 g	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Germany
Acrylamid 40% 7,125 ml	Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germany
10x TBE 6 ml	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Germany
Ammoniumpersulfat (APS)10% 180 µl	Sigma, Deisenhofen, Germany
TEMED 24 µl	Amresco, Solon, USA

3.5.4 RNA – Extraktion

TRIzol	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe, Germany

3.5.5 Labeling / SMART-Kit

SMART Kit	BD BioSciences, Heidelberg, Germany
Qiagen PCR Purification kit	Qiagen, Hilden, Germany
Ethanol 70%	Qiagen, Hilden, Germany
Ethanol 95%	J.T. Baker, Deventer, Netherlands

SUPERase-In RNase Inhibitor	Ambion
EDTA 0.5 M (pH 8,0)	
UV Spectrometer	
10ul Quartz Küvette	
Cy3 Mono-Reactive Dye Pack	Amersham Biosciences, Freiburg, Germany
Cy5 Mono-Reactive Dye Pack	Amersham Biosciences, Freiburg, Germany

4. ERGEBNISSE

Nach über 100 Einzelexperimenten wurden zehn Patientenproben einer Hybridisation auf den custom-made Microarrays unterzogen. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente war, neben der Herstellung der cDNA-Arrays, insbesondere das Labeling mittel Fluoreszenz-Farbstoffen ist industriell verhältnismäßig wenig etabliert und die einzelnen kommerziellen Kits in der Anwendung schwierig und langwierig, hier sind dankenswerter Weise vielfältige Verbesserungen unternommen worden.
War bei den in den dargelegten Experimenten verwendeten Kits noch eine durchschnittliche Arbeitszeit von zwei bis drei Tagen notwendig, kann heute ein komplettes Labeling innerhalb von ca. fünf Stunden erfolgen. Im Wesentlichen sind die Zeiten bis zur Bindung der Farbstoffe und die mehrmals durchzuführenden PCRs deutlich verkürzt worden. Weiterhin ist mittlerweile die Anzahl der zu verwendenden Chemikalien und die Anzahl der nötigen Reaktionsschritte reduziert worden.
Zum Zeitpunkt der Experimente waren aufgrund der Neuheit der Microarray-Technik nur einzelne kommerzielle Kits erhätlich, das verwendete SMART-Kit stellte für uns die beste Methode dar, da bis auf wenige Reagenzien sämtliches Material vom Hersteller mitgeliefert wurde.
Eine Übersicht der Expressionsmuster zeigt Tabelle 7; Tabellen 8, 9 und 10 zeigen die Expressionsmuster sortiert nach Alter der Patienten, nach Geschlecht und von Überexpression zu Unterexpression.

4.1 Gene mit Überexpression

4.1.1 Keimzentrums-Lymphome

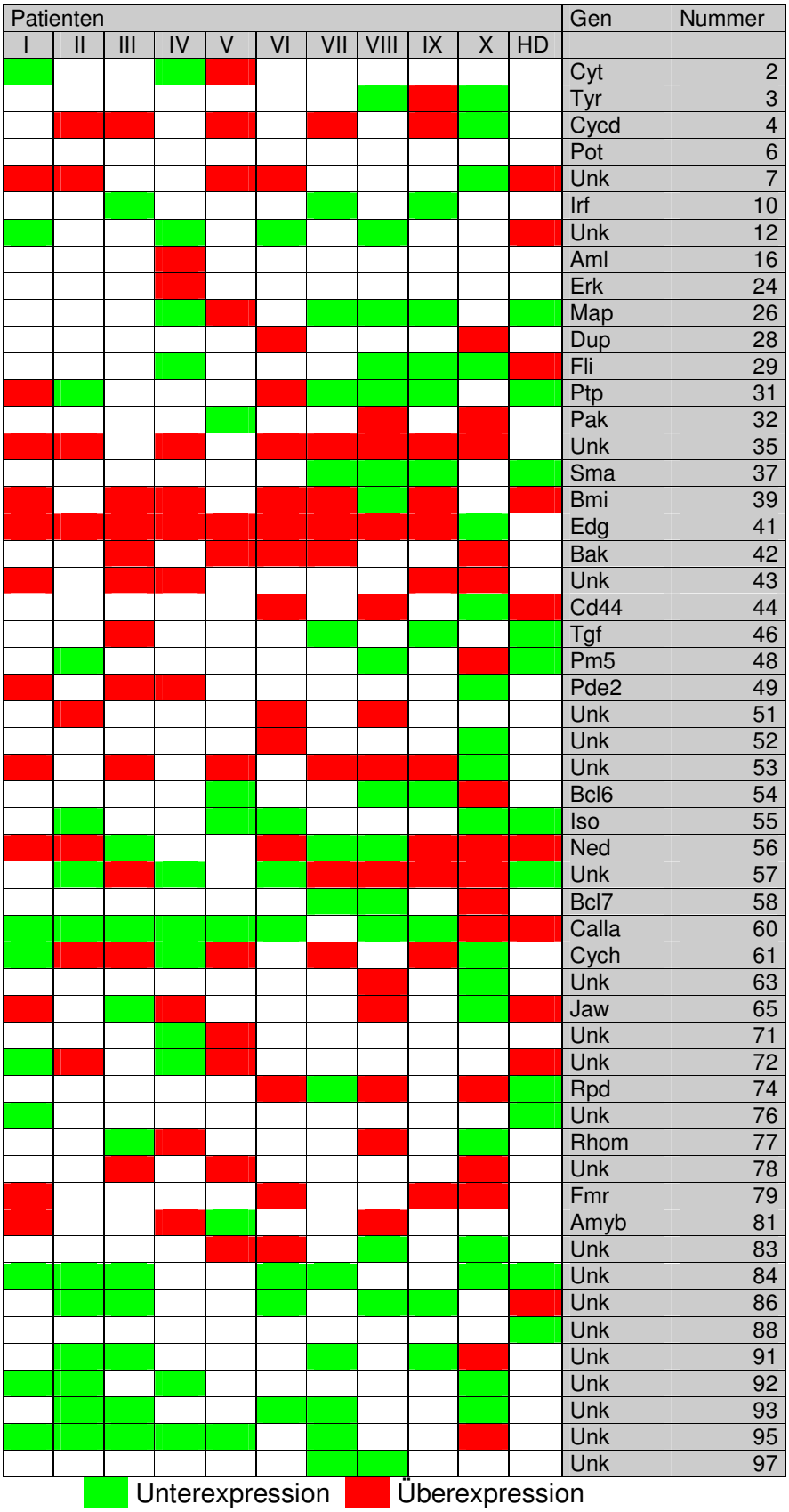
Im Kollektiv der fünf Patienten mit Keimzentrums-Lymphomen fand sich als einziges Gen, welches bei allen untersuchten Patienten überexprimiert war EDG. Bei insgesamt drei Patienten konnten die Gene CYCD, CYCH, BMI, PDE2, sowie die unbekannten Gene unk7, unk35, unk43, und unk53 in Überexpression nachgewiesen werden.

4.1.2 Großzelliges B-Zell-Lymphom

Im Patientengut der vier Patienten mit DLBCL war neben dem schon bei den PCFCL gefundenen EDG noch das unbekannte Gen unk35 bei allen Probanden überexprimiert. Die Gene BMI, unk53, unk57 waren bei drei der vier Patienten vertreten.

4.1.3 Marginalzonen-Lymphom

Da bei dieser Entität nur von einem Patienten Material untersucht wurde, sind keine Aussagen hinsichtlich eines Verteilungsmusters möglich. Jedoch wurden das Expressionsmuster im Gesamtkontext aller Experimente gewertet.

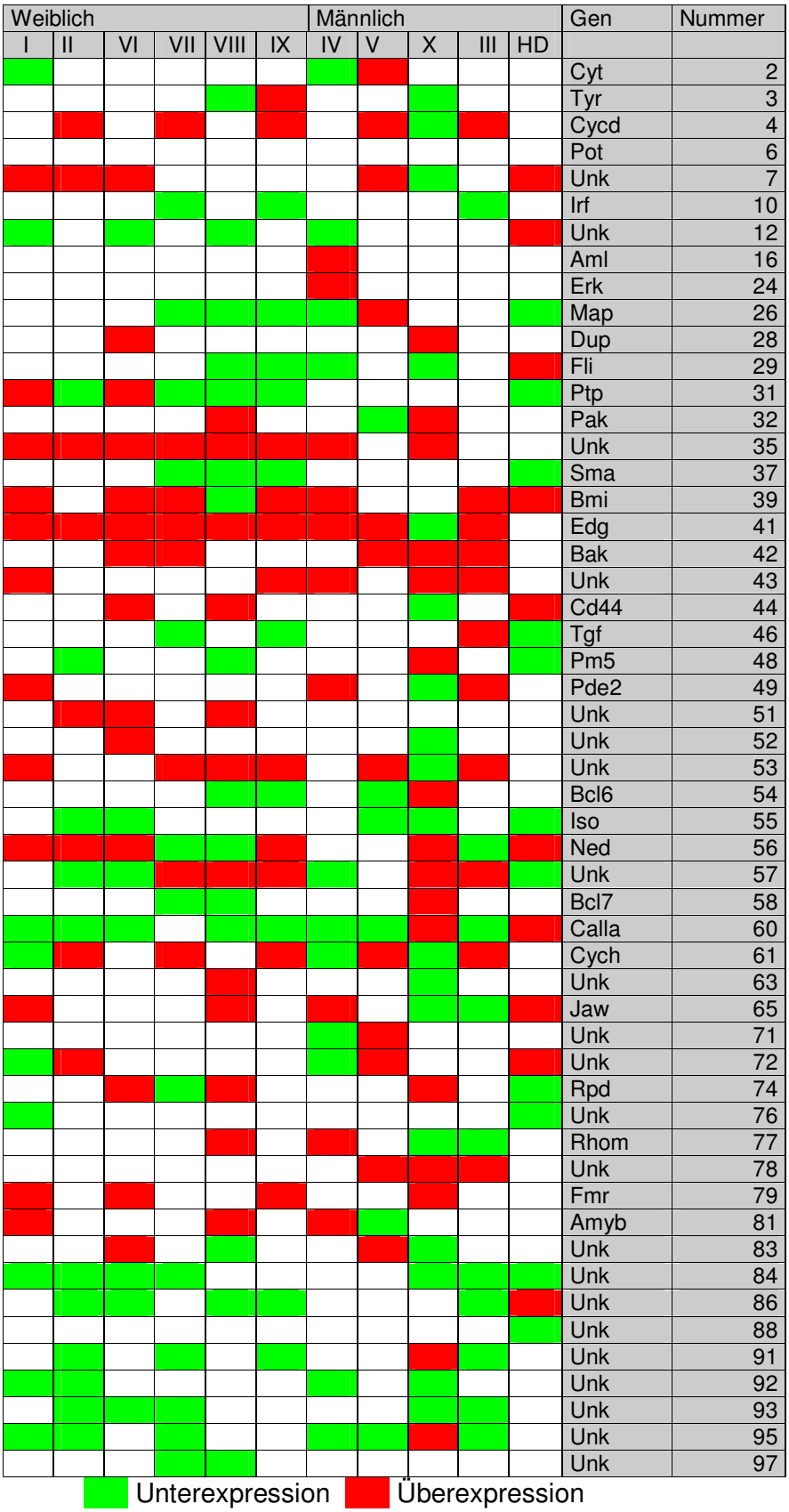


Tab. 7: Auswertungsschema der Microarrays

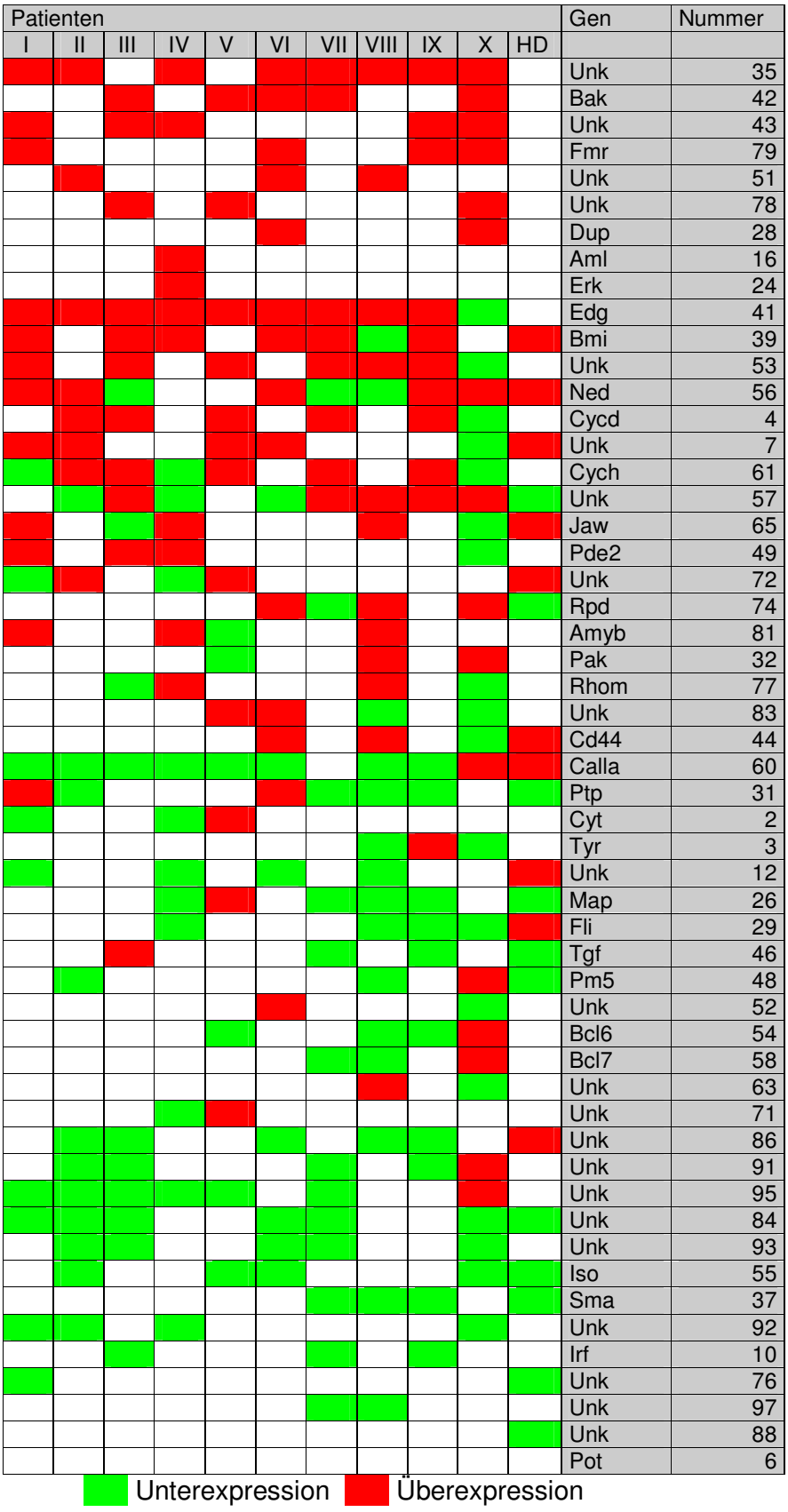
Zunehmendes Alter											Gen	Nummer
VI	VIII	IX	II	VII	III	IV	V	I	X	HD		
											Cyt	2
											Tyr	3
											Cycd	4
											Pot	6
											Unk	7
											Irf	10
											Unk	12
											Aml	16
											Erk	24
											Map	26
											Dup	28
											Fli	29
											Ptp	31
											Pak	32
											Unk	35
											Sma	37
											Bmi	39
											Edg	41
											Bak	42
											Unk	43
											Cd44	44
											Tgf	46
											Pm5	48
											Pde2	49
											Unk	51
											Unk	52
											Unk	53
											Bcl6	54
											Iso	55
											Ned	56
											Unk	57
											Bcl7	58
											Calla	60
											Cych	61
											Unk	63
											Jaw	65
											Unk	71
											Unk	72
											Rpd	74
											Unk	76
											Rhom	77
											Unk	78
											Fmr	79
											Amyb	81
											Unk	83
											Unk	84
											Unk	86
											Unk	88
											Unk	91
											Unk	92
											Unk	93
											Unk	95
											Unk	97

Unterexpression Überexpression

Tab. 8: Auswertungsschema der Microarrays nach Alter bei Erstdiagnose



Tab. 9: Auswertungsschema der Microarrays nach Geschlecht (weiblich-männlich)



Tab. 10: Auswertungsschema der Microarrays nach Expressionsmuster

4.2 Gene mit Unterexpression

4.2.1 Keimzentrums-Lymphome

Neben dem Gen CALLA, welches sich bei allen Patienten der untersuchten Lymphomvariante nachweisen ließ, dominierten die unbekannten Gene unk95 (alle Patienten), unk84 und unk92 bezüglich einer Unterexpression.

4.2.2 Großzelliges B-Zell-Lymphom

Im Gegensatz zu den bisherigen Aussagen, konnte hinsichtlich der DLBCL kein Gen nachgewiesen werden, welches bei allen untersuchten Proben weniger stark exprimiert war. In jeweils drei von vier Experimenten zeigten sich MAP, PTP, SMA und CALLA, sowie das nicht bezeichnete Gen unk86.

4.2.3 Marginalzonen-Lymphom

Die Aussagen aus der Analyse der Überexpression gelten analog für die Unterexpression.

4.3 Funktion und Bedeutung der Kandidatengene

4.3.1 Überexpression

Über alle untersuchten Entitäten gemittelt, lassen sich die Gene EDG, BMI und das unbekannte Gen unk35 als Kandidatengene bezüglich der Lymphomgenese erkennen.

4.3.1.1 EDG-1

Das Gen EDG-1 (*Endothelial differentiation gene*) ist auf Chromosom 1 an der Position 1p21 lokalisiert und besitzt zwei Exons und ein Intron (Liu, 1997), bei einer Gesamtgröße von 4,53 kbp.

Es handelt sich um einen Sphingolipid G-Protein gekoppelten Rezeptor, welcher sich in der Plasmamembran befindet. Das Gen ist in vielen Geweben wie Herz, Leber, Pankreas, ZNS und Lungen exprimiert, jedoch besonders stark in Lymphknoten und Endothelzellen. Insgesamt besteht die EDG-Rezeptor-Familie aus bisher acht beschriebenen Typen (Fukushima, 2001), welche entweder Sphingosin-1-Phosphat- oder Lysophosphatsäure als Substrat haben (Lee, 1998).

Alle EDG-Rezeptoren aktivieren unterschiedliche und zum Teil überlappende G-Protein-gekoppelte intrazelluläre Signalprozesse (Liu, 2000). EDG-1 ist direkt an das Protein G_i gekoppelt.

Die Hauptfunktionen von EDG-1 sind Beteiligung an der Differenzierung von Endothelzellen bezüglich Proliferation, Überleben, Migration, Morphogenese, Expression der Adhäsionsmoleküle und Veränderungen des Zytoskeletts (Liu, 2000; Hla, 1990; Goetzl, 1998; Spiegel, 2000; Chun, 1999; Moolenaar, 1999).
In EDG-1-knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Gen eine erhebliche Rolle in der Angiogenese im Rahmen von Proliferation, Migration und Strukturbildung, sowie Verzweigung insbesondere im arteriellen System und damit entsprechend auch in der Vaskularisierung von Tumoren (Liu, 2000) besitzt. Eine weitere wichtige Funktion besteht in der Lymphozytenmigration (Dorsam, 2003).

4.3.1.2 BMI-1

BMI-1 (B *lymphoma Mo-MLV insertion region*) ist ein Gen auf Chromosom 10 (10p11.23) mit einer Größe von ca. 10 kbp, es besitzt mindestens 10 Exons. Es wird in vielen Geweben exprimiert, hauptsächlich jedoch in Nerven- und lymphatischen Gewebe. Es bestimmt die Proliferation normaler und leukämischer Stammzellen. Seine Expression ist notwendig für die Erneuerung hämapoetischer und neuraler Stammzellen (Gennadi, 2005; Lessard, 2003; Park, 2003; Molofsky, 2003). Der Zusammenhang einer Überexpression des Gens mit dem Auftreten von myeloischen Leukämien (Lessard, 2003; Lessard, 1998), NSC-Bronchialkarzinomen (Vonlanthen, 2001), Mammakarzinomen (Dimri, 2002), Prostatakarzinomen (Gennadi, 2005), Medulloblastomen (Leung, 2004) und der neoplastischen Entartung von Lymphozyten (Haupt, 1993; Alkema 1997) ist in der Literatur beschrieben.
Als Bestandteil der „Polycomb group“ Proteine (PcG) ist BMI-1 neben der Zellproliferation (Jacobs, 1999) auch für das „Zellgedächtnis“ und zur Wahrung der Zellidentität verantwortlich (Voncken, 2004; Hernández-Munoz, 2005).

4.3.1.3 unk35

Das in seiner Funktion unbekannte Gen mit der internen Ordnungsnummer 35 befindet sich auf Chromosom 11. Ein Teil des Produkts an der Position 11p15.4 hat eine Größe von 217.092 Basenpaaren und kodiert für das Gen Synaptotagmin IX, dessen Produkt als Membranprotein in der Ca^{++} abhängigen Exozytose von Vesikeln über die Verbindung zu Microtubuli beteiligt sein soll (Habermann, 2003). Die Familie der Synaptotagmine besteht aus 15 Isoformen, die in einer Vielzahl von Lebensformen nachgewiesen werden konnten (Südhoff, 2002; Fukuda, 2004). Obwohl die Funktion und Lokalisation der meisten

Isoformen bis heute nicht vollständig geklärt ist (Fukuda, 2004), ist die Rolle von Synaptotagmin IX bei der Ca^{++}-abhängigen Insulinsekretion aus Pankreas-β-Zellen beschrieben (Iezzi, 2004).
Eine eventuelle Beteiligung in der Tumorgenese lässt sich aus der aktuellen Literatur zur Zeit nicht entnehmen.

4.3.2 Unterexpression

In den meisten untersuchten Proben ließen sich die Gene CALLA, unk84 und unk95 nachweisen. Weitere Kandidatengene sind sowie die benannten Gene MAP, PTP, SMA, da sie bei beiden untersuchten Hauptentitäten und dem gesunden Spender unterexprimiert sind.

4.3.2.1 CALLA

CALLA (*common acute lymphoblastic leukemia antigen*) ist auch als CD10 bzw. *membrane metallo-endopeptidase* (MME) bekannt. Seine Position ist auf Chromosom 3, genauer an 3q25.1-q25.2 bei einer Größe von 103.440 kb bei insgesamt 27 Exons.
Die Proteinprodukte sind sowohl Bestandteil der Plasmamembran, als auch intrazellulärer Produkte.
Wie vom Namen ableitbar spielt es eine große Rolle in der Diagnostik der akuten lymphatischen Leukämie als Oberflächenmarker auf leukämischen prä-B-Zellen (Letarte, 1988), jedoch lässt es sich auch in anderen Zellen wie Monozyten, Granulozyten, Fibroblasten (Cossmann, 1983; Braun, 1983; Newman, 1981) , fetalen Leberzellen, Knochenmark, Thymus (Neudorf, 1984), Melanom (Carrel,1983), Gliomzellen (Carrel, 1982), und insbesondere in Niere (Metzgar, 1981; Quackenbush 1986) und Prostata sowie einigen Lymphomen nachweisen.
CD10 wurde von Biasoli als Marker für ein positiveres outcome bei Patienten mit DLBCL gefunden. Ein Nachweis von CD10 war mit einer exzellenten 8-Jahres-Überlebensrate assoziiert (92% versus 45%, $P = 0.06$) (Biasoli, 2005).

4.3.2.2 unk84

Bei der erneuten Abgleichung der Gensequenzen mit den NCBL-Datenbanken zeigte sich, dass die Sequenz des verwendeten Gens unk84 vollständiger Bestandteil des LRMP-Gens ist. LRMP steht für *lymphoid-restricted membrane protein* und befindet sich auf Chromosom 12 an Position 12p12., das Gen hat eine Länge von ca. 52 kbp.

LRMP kodiert für ein aus 555 Aminosäuren bestehendes Protein des endoplasmatischen Retikulums von prä-T-, prä-B- und maturen B-Zellen, in Plasmazellen wird es nur gering exprimiert (Behrens, 1994 et 1996).
Als Hauptfunktion wird dem Protein eine Rolle im Transport oder Zusammensetzen der Antigenrezeptoren der B- und T-Zellen zu gesprochen, andere, bisher ungeklärte, Funktionen in der Lymphozytenentwicklung werden diskutiert (Behrens, 1996).
Bisher sind vier Isoformen des Proteins bekannt, wobei zwei als lösliche Form und zwei als membrangebunden gelten (Behrens, 1994 et 1996).
In Keimzentrums-Lymphomen als auch in großzelligen B-Zell-Lymphomen wurden hohe Expressionsraten von LRMP gefunden, jedoch nicht in T-Zell-Lymphomen. Weiterhin positiv waren Hodgkin-Lymphome und einige Fällen von chronisch lymphathischer Leukämie (Tedoldi, 2006).
Zusätzlich wird ihm eine supportive Funktion im Wechsel von Follikelzentrumszell-Lymphomen zu aggressiveren großzelligen Lymphomen bei BCL6-positiven mit der Translokation t(3;14(q27;q32) und t(3;22)(q27;q11) zugesprochen (Akasaka, 2003).

4.3.2.3 unk95

Das Gen unk95 stellte sich im Verlauf der Datenerhebung als Teil des mittlerweile benanntes Gen SAMD12 (sterile alpha motif domain 12) heraus und befindet sich auf Chromosom 8 (8q24.12), welches eine Gesamtgröße von ca. 250.000 Basen besitzt.
Die Funktion des Gens ist noch nicht bekannt. Die aus über 60 Proteinen (Ponting, 1995) bestehende Gruppe der sterile alpha motif domänen (SAM) zeigten sich jedoch experimentiell als evolutionär alte Strukturen (Schultz, 1996), die Einflüsse auf die Proteinbindung, Zell-Zell-Kontakte und Signaltransduktion, als auch in der Zellmigration und Zelldifferenzierung haben sollen (Hynes, 1992).
Für die SAMD9 konnte gezeigt werden, daß sich in Kolon- und Mamma-Karzinomen niedrige Expressionmuster zeigen und das Gen einen regulierenden Einfluß auf die Zellproliferation und Unterdrückung neoplastischer Zellen besitzt (Li, 2007). Eine ähnliche Funktion der SAMD12 ist somit als möglich zu erachten.

4.3.2.4 unk86

Das Gen stellt sich als Bestandteil bzw. alternatives Spliceprodukt des LRMP-Gens, wie in unk84 beschrieben, dar. Es befindet sich ebenfalls an Position 12p12.1.

4.3.2.6 MAP

MAP konnte als mitogen-activated kinase 3, ein Gen mit einer Gesamtlänge von 9204 Basenpaaren auf Chromosom 16 (16p11.2), identifiziert werden.
Hauptfunktionen dieses Gen sind die Initiation und Regulation der Meiose und Mitose. In differenzierten Zellen ist eine wichtige Funktion die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und die Einleitung der Translation.

4.3.2.7 PTP

Aus der Familie der über 100 Protein-Thyrosin-Phosphatasen wurde PTP1B ausgewählt. Die kodierende Sequenz befindet sich auf Chromosom 20 (20q13.1-q13.2), insgesamt besteht sie aus 74.197 Basenpaaren.
PTP ist insbesondere für seine Überexpression in Patienten mit insulinresistentem Diabetes mellitus bekannt (Ahmad, 1997; Di Paola, 2002). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, das PTP-knockout-Mäuse weder Diabetes mellitus, noch Adipositas bekommen, wenn sie einer kalorienreichen Diät ausgesetzt werden (Elchebly, 1999).
Eine weitere wichtige Funktion besteht in der Regulation der B-Zell-Rezeptor-Signal-Kaskade. Wichtig für Ausbildung und Dauer der Signalwege ist ein Gleichgewicht zwischen Aktivierung der Protein-Thyrosin-Kinasen (PTK) und der Hemmung der Protein-Thyrosin-Phosphatasen (PTP). Die Überexpression von PTPs hemmt die Lymphomzellproliferation und induziert die Apoptose (Chen, 2006).
Weitere wichtige Signalwege, an den denen PTPs beteiligt sind, wie Zellwachstum, Mitogenese, Zell-Zell-Interaktion, Gentranskription sind weiterhin Gegenstand der Forschung (Burke, 1998).

4.3.2.8 SMA

Das auf Chromosom 13 (13q12-q14**)** gefundene Gen „*Mothers against decapentaplegic homolog*“ ist das homologe Gen eines bei Drosophila melanogaster gefundenen Gens. Es befindet sich in unmittelbarer Nähe von BRCA2 und anderen Oncogenen (Watanabe, 1997).
Die dadurch codierten Proteine sind intrazelluläre Bestandteile die vielfältige Aufgaben in der Signaltransduktion des Transformations-Wachstums-Faktors beta (TGF-β) (Miyazono, 2000). Als Hauptaufgabe wird die Tumorsuppression postuliert (Watanabe, 1997), jedoch wird den Genen der SMAD-Familie auch aufgrund ihrer Möglichkeit direkt an DNA zu binden, einen Einfluß auf die Genexpression zugesprochen (Verschueren, 1999).

Mutationen in den TGF- β -Signalwegen sind Ursache für verschiedene Karzinomentwicklungen (Massaque, 1998).

5. DISKUSSION

5.1. Zur Methode

Schena et al. waren 1995 die ersten, die die Methode des Microarray vorstellten (Schena, 1995, Lockhardt, 1996). Viel früher erfolgten jedoch bereits ähnliche Verfahren um DNA auf Oberflächen zu hybridisieren (Khrapko, 1991; Maskos, 1992). Alle diese Methoden beruhen auf Prinzipien der Basenpaarung wie sie neben Watson und Crick (1953) auch Edward Southern in dem nach ihm benannten Blotverfahren zur Anwendung brachte. Einzelne Autoren sprechen der Microarray-Technologie ähnliche Verbreitung und Bedeutung wie der Polymerase-Chain-Reaction zu, bzw. das diese noch überragt werden könnte und schließlich mehr DNA-Chips als Computerchips verkauft werden (Schena, 1998).

Der große Vorteil der Microarray-Technologie im Vergleich zu den älteren Verfahren besteht in der Möglichkeit der parallelen Datengewinnung und –verarbeitung und der damit verbundenen Schnelligkeit, sowie der Automatisierung (Schena, 1998). Mehr als 1000 Experimente lassen sich so annähernd vollkommen automatisiert in kurzer Zeit durchführen. Postuliert wird die Möglichkeit in der Zukunft das gesamte menschliche Genom auf einem Chip in einer Reaktion analysieren zu können (Schena, 1998). Für einzelne Hefengenome ist dies bereits gelungen (Lashkari, 1997; DeRisi, 1997).

Durch Vergleiche mit etablierten Genexpressionsanalyseverfahren wie Northern Blot und quantitative reverse-transcriptase-PCR (RT-PCR) konnte gezeigt werden, dass die mittels Microarrays gewonnen Ergebnisse gut korrelieren (Alizadeh, 1999, DeRisi, 1996, Iyer, 1999). Gleiche Ergebnisse im Vergleich mit semiquantitativer RT-PCR und real-time-PCR bei p-Werten unter 0,01 bestätigen die Aussagekraft der Microarray-Technologie (Nishiu, 2002).

Selbstverständlich hängt der Erfolg bzw. Erkenntnisgewinn durch Microarrays von der Auswahl der gespotteten Gene ab (Alizadeh, 1999). Verwendung finden können hier auch nur bereits Gene, von denen PCR-Produkte oder ihre Basensequenz bekannt ist (Alizadeh, 1999). Einschränkungen in der Aussagekraft der durch Microarrays gewonnenen Ergebnisse bestehen in der aufgrund der zeit- und kostenaufwendigen Herstellung oft vernachlässigten Replikation der Experimente. Lee et al. konnten zeigen, dass Ergebnisse singulärer Experimente beträchtliche Variabilität aufweisen und die Ergebnisse von mindestens drei Wiederholungen gepoolt werden sollten (Lee, 2000). Verschiedene Ursachen wurden diskutiert, zum einen zeigte sich, dass die Lokalisation

der gespotteten Gene mit der Hybridisationsrate korreliert, aber auch die Möglichkeit besteht, dass die zu untersuchenden Sequenzen sich nicht in der untersuchten Probe befinden (bis zu 5%), oder nicht hybridisiert werden (bis zu 10%) (Lee, 1999).
Stark umstritten ist die Auswirkung genabhängiger Präferenzen für einen der verwendeten Label-Farbstoffe (Martin-Magniette, 2005). Im allgemeinen wird der *dye-swap* d.h. der Austausch der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (meist Cy3 und Cy5, Amersham) empfohlen, um farbstoffspezifische Einflüsse auf die Hybridisation zu vermeiden (Kerr, 2002; Churchill 2002) . Sterrenburg et al. behaupten, dass in Referenzdesigns ein *dye-swap* nicht notwendig sei (Sterrenburg, 2002), während Dombowski zeigen konnte, dass es farbstoff-abhängige Unterschiede von signifikantem Einfluß bis zu 20% in diesen Experimenten ohne Farbwechsel geben kann (Dombowski, 2004). Die Ursache dieser gen- und farbstoffspezifischen Abweichungen sind bis heute noch nicht verstanden (Martin-Magniette, 2005; Dombowski, 2004).
Eine weitere mögliche Anwendung, speziell im Bereich der Lymphome, ist die Möglichkeit, neue und bessere Klassifikationen zu spezifizieren. Innerhalb der letzten 20 Jahre gab es unterschiedliche Versuche eine möglichst präzise Einteilung der Lymphome zu finden (Alizadeh, 1999), welche sich im Wesentlichen auf histopathologische und zum Teil einiger immunhistologischer Markerproteine stützen (Alizadeh, 1999; Harris, 1994). Die dadurch bedingten Beschränkungen konnten 1997 in der Studie *The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project* gezeigt werden, in der einzelne Lymphomentitäten nicht reproduzierbar von Fachpathologen diagnostiziert werden konnten (Alizadeh, 1999). Alizadeh konnte 2000 mittels Microarrays zwei eindeutig unterscheidbare Entitäten des großzelligen B-Zell-Lymphoms nachweisen, welche sich histopathologisch nicht unterscheiden lassen (Alizadeh, 2000). Gleiche Beobachtungen wurden hinsichtlich der B-Zell-assoziierten chronischen lymphatischen Leukämie gemacht, bei welcher verschiedene Entitäten hinsichtlich Krankheitsaktivität und Prognose anhand der unterschiedlichen Genexpression unterschieden werden können (Stilgenbauer, 2000; Jarosova, 2001; Ito, 2002).
Bezüglich der Prognose der Lymphome wird zur Zeit der International Prognostic Index (IPL) angewendet (*The international NHL Prognostics Project*, 1993) welcher neben dem Patientenalter, der Serum-Laktatdehydrogenase auch das klinische Stadium und die Anzahl der extranodalen Läsionen berücksichtigt (Nishiu, 2002). Das klinische Tumorstadium nach dem Ann Arbor System gilt als hauptsächlicher Prognosefaktor (Nishiu, 2002; Carbone, 1971). Wie aus Abbildung 7 erkennbar ist, gilt auch die

Prognosestellung als Anwendungsmöglichkeit des Microarray. Hier wird der bereits erwähnte Vorteil evident, dass auf molekularer bzw. genetischer Ebene gearbeitet wird und so auch (gegebenenfalls noch unbekannte) Entitäten berücksichtigt werden können und so wesentliche objektivere Faktoren zur Anwendung kommen (Golub, 1999; Alizadeh, 2000; Perou, 2000).

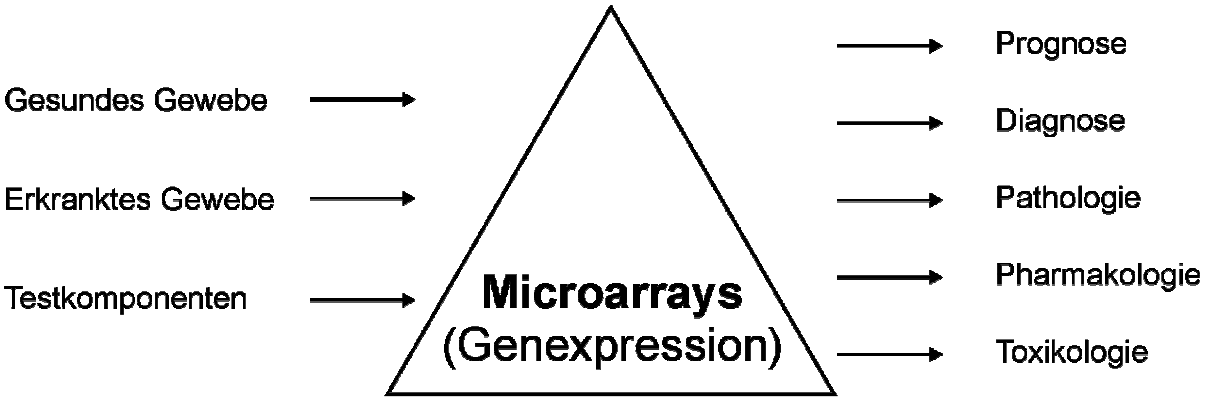


Abb 7: Anwendungsmöglichkeiten der Microarrays (mod. nach Schena)

Möglichkeiten der pharmakologischen Anwendung bestehen in der Erforschung neuer Tumormarker, Angriffpunkte für neue Chemotherapien, als auch das prätherapeutische Screening ob geplante Chemotherapien Wirkung zeigen würden, da aufgrund der genetischen Diversität nicht alle Tumorentitäten gleichartig auf die jeweiligen Therapeutika reagieren. (Nishiu, 2002).

Im Vergleich mit der bereits länger etablierten FISH (f*luorescent in situ hybridization*), bei der sich in fixiertem Gewebe zwar das Vorhandensein gesuchter Gensequenzen bestimmen läßt, ist nur eine qualitative Bestimmung der Existenz einer gesuchten Sequenz möglich, bei der Microarray-Technik jedoch auch eine quantitative Aussage hinsichtlich der Genexpression. Aufgrund der Beschränkung auf nur wenige unterschiedliche Farbstoffe (zur Zeit bis zu sieben) ist die Anzahl nachzuweisender Gene stark eingeschränkt (Bolzer, 2005).

Eine andere vergleichbare Methode stellt die *real time quantitative PCR* (RT-PCR) dar, bei der während der Amplifikation (also in Echtzeit, „real time“) mittels fluoreszenzmarkierter Sonden eine quantitative Messung der Genexpression möglich ist. Die einfachste Möglichkeit dazu stellen Farbstoffe dar, die während der Amplifikation interkalieren und damit die Fluoreszenz ansteigt; der größte Nachteil dabei ist die nur sehr geringe Spezifität, welche durch Schmelzkurvenanlysen gesteigert werden kann.

Eine Weiterentwicklung der dargestellten Methode stellt die Verwendung von LightCylcer®-Sonden, welche eine spezifische Genexpression nachweisbar machen. Bei der Verwendung der RT-PCR handelt es sich jedoch wieder um einen sequentiellen Ansatz, d.h. für jedes nachzuweisende Gen muß ein individuelles Experiment durchgeführt werden, die Verwendung von Microarrays erlaubt dagegen die parallele Durchführung tausender Experimente gleichzeitig.
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Technik des Microarrays im Gegensatz zu vergleichbaren Methoden den breitesten Indikationsbereich abdeckt, jedoch u.a. aufgrund der relativen Neuheit der Methode verhältnismäßig kosten- und resourcenintensiv ist.
Die dargestellten Experimente benutzten, auch im Sinne eines „*proof of concept*“ (Machbarkeitsbeweis), eine Vielzahl von Genen mit zum Teil bis zum Abschluss der Untersuchungen unbekannten Funktionen bzw. unklarem Einfluss auf die Lymphomgenese.
Im Anschluß werden weitere Untersuchungen mit Microarrays aus ausgesuchten Genen des dargestellten Genpools nötig sein, um die Funktionen und Interaktionen der gefundenen Kandidatengene in Bezug auf die Entstehung von primär kutanen Lymphomen präzisieren zu können.

5.2 Genexpression in kutanen B-Zell Lymphomen

Ursächlich für maligne Entartungen sind genetische Alterationen wie die Aktivierung von Onkogenen und / oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen (Mao, 2002).
Seit Einführung der Microarray-Technologie werden weltweit Experimente zur Genexpression in Malignomen aller Art untersucht. Problematisch ist die Vergleichbarkeit der jeweiligen Experimente aufgrund unterschiedlichem Aufbau, Probenaufbereitung, Auswertungssoftware und –verfahren (Jeffery, 2006).
Die ersten, die die Genexpression in primär kutanen B-Zell Lymphomen durch Microarray-experimente untersuchten, waren Storz und Mitarbeiter (Storz, 2003).
In dem aus über 40.000 Genen bestehendem Array bildeten primär und sekundär kutane Keimzentrums-Lymphome einen Cluster, unabhängig einer Expression von BCL2, welche sich typischerweise eher in nicht-primär kutanen Entitäten findet. Aufgrund der geringen Anzahl an Proben konnten Storz et al. ebenso wenig wie in der vorliegenden Arbeit Heterogenitäten im Expressionsmuster der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome ausmachen, wie sie von Alizadeh et al. beschrieben wurden (Alizadeh, 2000).

Dijkman, Tensen und Mitarbeiter untersuchten in 2006 Patientenproben von Patienten mit PCLBCL und PCFCL mittels Microarray-Untersuchungen, um die klinische Relevanz genomischer Unterschiede und insbesondere dadurch prognostische Marker dieser beiden Entitäten herausfinden zu können. Sie konnten dabei deutliche Unterschiede in den chromosomalen Veränderungen und der daraus resultierenden Genexpression zeigen, welche die Einordnung als zwei eigenständige Entitäten entsprechend der WHO-EORTC-Klassifikation unterstützt (Dijkman, 2006). Diese Unterscheidung ist hinsichtlich der Prognose, aber besonders auch im Rahmen der Therapieoptionen entscheidend (Willemze, 2005). Aufgrund des unterschiedlichen Studiendesigns können die dort gefundenen Expressionsmuster nicht mit den hier gezeigten Ergebnissen verglichen werden.

Die in den vorliegenden Experimenten beobachteten Über- und Unterexpressionen sind in sich schlüssig, jedoch nur sehr begrenzt mit anderen Experimenten vergleichbar, da der Ansatz mittels custom-made Microarray bisher noch nicht in der Literatur beschrieben ist (Stand 2007) und in den kommerziell erhältlichen Arrays Gene in wesentlich größerer Anzahl und Funktion benutzt werden.

Das in Überexpression gefundene Gen EDG ist an intrazellulären Signalprozessen, Lymphozytenmigration und Angiogenese beteiligt (Liu, 2000; Dorsam, 2003). Insbesondere die Angiogenese ist eine für maligne Tumoren unabdingbare Voraussetzung.

Das ebenso überexprimierte Gen BMI-1 findet sich insbesondere in lymphatischen Geweben und ist neben der Stimulation von Stammzellen (Gennadi, 2005; Lessard, 2003; Park, 2003; Molofsky, 2003) auch für die Entartung von Lymphozyten (Haupt, 1993; Alkema 1997) und deren Zellproliferation (Jacobs, 1999) verantwortlich und macht es somit zu einem wichtigen potentiellen Partner in der Lymphomgenese. Seine Rolle in der Genese diverser anderer Tumoren ist ebenfalls beschrieben (Lessard, 2003; Vonlanthen, 2001; Dimri, 2005; Gennadi, 2005; Leung, 2004).

Die zu den überexprimierten Genen gemachten Bemerkungen lassen sich analog zu denen mit Unterexpression machen.

Das Produkt des Gens CALLA respektive CD10 ist in der Literatur als prognostischer Faktor für ein besseres outcome und einer höheren Überlebensrate in diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen beschrieben (Diasoli, 2005); ob dies ebenso für primär kutane Formen dieser Entität gilt, sollte Ansatz für weitere Untersuchungen sein.

Gen unk84, bzw. mittlerweile als LRMP bekannt, ist ein vor allem in B-Zellen exprimiertes Gen (Behrens, 1994), welches Funktionen im Aufbau der Antigenrezeptoren der B- und T-Zellreihe aufweist (Behrens, 1996), jedoch auch als Marker für einen Wechsel von FCL zu den als aggressiver angesehenen BCL6-positiven großzelligen B-Zell Lymphomen gilt (Akasaka, 2003). Die in den vorliegenden Experimenten untersuchten Proben von DLBCL zeigten in zwei von vier Proben eine Unterexpression und waren auch BCL6-negativ, die untersuchten PCFCL zeigten eine Unterexpression von unk84/LRMP bzw. keine Überexpression und keine Überexpression für BCL6.

Chen und Mitarbeiter zeigten, dass PTP als eine Art Lymphomsuppressor-Gen verstanden werden kann, da es die Lymphomzellproliferation hemmt und die Apoptose induziert (Chen, 2006), die in den vorliegenden Ergebnissen dargestellte Unterexpression bestätigt dies.

Gleiches gilt für das ebensfalls unterexprimierte SMA-Gen, welches physiologisch ein Tumorsuppressorgen darstellt (Watanabe, 1997).

Die genaue Funktion von unk95, bzw. jetzt SAMD12, ist noch nicht vollständig geklärt, aufgrund der Einflussnahme auf Zell-Zell-Kontakte und der Signaltransduktion und der Zelldifferenzierung (Hynes, 1992) als auch der beobachteten Unterexpression verwandter Gene in verschiedenen Malignomen (Li, 2007) läßt eine Rolle in der Lymphomgenese zumindest als möglich erscheinen, hier werden weitere Untersuchungen notwendig sein.

Die bisher unbekannten bzw. nur postulierten Gene werden in weiteren Untersuchungen ihre Funktion bzw. Beteiligung an der Lymphomentstehung zeigen müssen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Genexpressionsmuster von zehn Patienten mit primär kutanen B-Zell-Lymphomen untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Methode des cDNA-Labeling in der Arbeitsgruppe etabliert.

Fünfzig Gene, deren Funktion bei systemischen Lymphomen bekannt war, bzw. postuliert wurde, wurden isoliert und aus diesen ein sogenanntes „custom-made“ Microarray angefertigt.

Aus kryokonservierten Biopsien der Patienten wurde RNA gewonnen und diese nach Umschreiben in cDNA fluoreszenzmarkiert. Ebenso wurde mit RNA aus den Lymphozyten eines gesunden Spenders verfahren.

Die markierten Proben wurden nach Inkubation auf dem Array bezüglich ihrer Expressionsmuster verglichen und im Vergleich als Über- oder Unterexpression bewertet.

Aufgrund der geringen Fallzahl konnten keine Unterschiede in den einzelnen Entitäten der PCBCL gefunden werden, jedoch zeigten sich einzelne Gene als Kandidaten für weitere Untersuchungen, die an Signalprozessen der Zelle, der Angiogenese oder der Tumorsuppression beteiligt sind.

Durch weitere Experimente mit spezialisierten Microarrays bzw. vergleichbaren Methoden wie RT-PCR werden die dargestellten Kandidatengene in ihrer Funktion und Interaktion im Zusammmenhang mit der Genese primär kutaner Lymphome überprüft werden müssen.

Die dargestellte Verfahrensweise ist für primär kutane Lymphome noch nicht beschrieben und stellt ein mögliches Screeningverfahren für die Genexpression dieser Tumoren dar, insbesondere wenn weitere in der Lymphomgenese beteiligten Gene bekannt werden. Weitere Einsatzmöglichkeiten stellt neben der Therapiekontrolle die Möglichkeit der weiteren Forschung bezüglich neuer an der der Entstehung von Lymphomen beteiligter Gene und deren unterschiedliche Expression in den unterschiedlichen Entitäten und im Vergleich mit systemischen Lymphomen dar.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad F. et al. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. J Clin Invest. Jul 1997; 15;100(2):449-58.

Akasaka T., et al. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. Blood 2003;102:1443-1448.

Alizadeh, AA., et al. The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1999; 64:71-8.

Alizadeh, AA., et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000; 403(6769):503-11.

Behrens TW., et al. Jaw1, A lymphoid-restricted membrane protein localized to the endoplasmic reticulum. J Immunol. 1994; 153(2):682-90.

Behrens TW., et al. Carboxyl-terminal Targeting and Novel Post-translational Processing of JAW1, a Lymphoid Protein of the Endoplasmic Reticulum. J Biol Chem. 1996; 271(38):23528-34.

Berek, C., et al. Maturation of the immune response in germinal centers. Cell 1991; 67(6):1121-1129.

Biasoli I., et al. CD10 and Bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index can identify subgroups of patients with diffuse large-cell lymphoma with very good or very poor prognoses. Histopathology 2005; 46**,** 328–333.

Bolzer, A., et al. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. PLoS Biol. 2005; 3(5):e157.

Braun, M. P., et al. Granulozytes and cultured human fibroblasts express common lymphoblastic leukemia-assosciated antigens. Blood. 1983; 61:718.

Burke TR Jr, et al. Protein-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery. Biopolymers. 1998;47(3):225-4.

Carbone, PP., et al. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. Cancer Res. 1971; 31(11):1860.

Carrel, S., et al. Expression of HLA-DR and common acute lymphoblastic leukemia antigens on glioma cells. Eur. J. Immunol. 1982; 12:354.

Carrel, S., et al. Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) on human malignant melanoma cells. J. Immunol. 1983; 130:2456.

Cerroni, L. et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a recently described entity of low-grade malignant cutaneous B-cell lymphoma. Am J surg Pathol. 1997; 21(11):1307-1315.

Cerroni, L., et al. Infection by Borrelia burgdorferi and cutaneous B-cell lymphoma.
J Cutan Pathol. 1997; 24(8):457-61.

Cerroni, L., et al. Primary cutaneous follicle center cell lymphoma.
Leuk Lymphoma. 2001; 42(5):891-900.

Chen L., et al. Protein Tyrosine Phosphatase Receptor-Type O Truncated (PTPROt) Regulates SYK Phosphorylation, Proximal B-Cell Receptor Signaling and Cellular Proliferation. Blood. 2006;108(10):3428-33.

Chun, J., et al. A growing family of receptor genes for lysophosphatic acid and other phospholipids. Cell Biochem. Biophys. 1999; 30:213-242.

Churchill, G. Fundamentals of experimental designs for cDNA microarray.
Nat. Genet. 2002; 32:490-495.

Cossmann, J., et al. Polymorphonuclear neutrophils express the common lymphoblastic leukemia antigen. J. Exp. Med. 1983; 157:1064.

DeRisi, J., et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. Nat. Genet. 1996; 14:457.

DeRisi J., et al. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science 1997; 278(5338):680-6.

Dijkman, R., et al. Array-Based Comparative Genomic Hybridization Analysis Reveals Recurrent Chromosomal Alterations and Prognostic Parameters in Primary Cutaneous Large B-Cell Lymphoma. J Clin Oncol 2006; 24:296-305.

Dimri, G.P., et al. The BMI-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithel cells. Cancer. Res. 2002; 62:4736-4745.

Di Paola R., et al. A variation in 3' UTR of hPTP1B increases specific gene expression and associates with insulin resistance.
Am J Hum Genet. 2002; 70(3):806-12.

Dombowski, A., et al. Gene-specific dye bias in microarray reference designs.
FEBS Lett. 2004; 560:120-124.

Dorner, T., et al. Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations with non-productively rearranged human variable heavy chain genes.
J Immunol. 1997; 158(6):2779-2789.

Dorsam, G., et al. Transduction of multiple effects of sphingosine 1-phosphate in T Cell functions by the S1P1 G-protein-coupled receptor. J mmunol. 2003;171(7):3500-7.

Du, MQ., Isaacson, PG. Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment.
Lancet Oncol. 2002; 3(2):97-104.

Dummer, R., et al. Pathogenesis of cutaneous lymphomas.
Semin Cutan Med Surg. 2000; 19(2):78-86.

Elchebly M., et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. Science 1999; 5:283.

Fodor, SP., et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis.
Science 1991; 251:767-73.

Fukuda, M. RNA interference-mediated silencing of synaptotagmin IX, but not Synaptotagmin I, inhibits dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells.
Biochem J. 2004; 380(Pt 3):875-9.

Fukushima N., et al. Lysophospholipid receptors.
Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001; 41:507-34.

Geelen, FA., et al. Bcl-2 protein expression in primary cutaneous large B-cell lymphoma is site-related. J Clin Oncol. 1998; 16(6):2080-5.

Gellrich, S. et al. Primär kutane B-Zell Lymphome. Hautarzt 2000; 51(5):363-373.

Gennadi, V., et al. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer.
J. Clin. Invest. 2005; 115:1503-1521.

Gerard-Marchant, R., et al. Classification of non-Hodgkin lymphomas.
Lancet 1974 ; 2: 406-408.

Goetzl, E.J., et al. Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatatidic acid and sphingosine-1-phosphate.
FASEB J. 1998 ; 12:1589-1598.

Golub, TR., et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999; 286(5439):531-7.

Grange, F., et al. Prognostic factors in primary cutaneous large B-cell lymphomas: a European multicenter study. J Clin Oncol. 2001; 19(16):3602-10.

Habermann, Y., et al. Synaptotagmin IX, a possible linker between the perinuclear endocytic recycling compartment and the microtubules.
J Cell Sci. 2003; 116(Pt 21):4307-18.

Hallermann, C., et al. Molecular cytogenetic analysis of chromosomal breakpoint in the IGH, MYC, BCL6 and MALT1 gene loci in primary cutaneous B-cell lymphomas.
J Invest Dermatol. 2004; 123:213-219.

Hallermann, C., et al. Chromosomal aberration patterns differ in subtypes of primary cutaneous B cell lymphomas. J Invest Dermatol. 2004; 22:1495-502.

Harris, NL. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 1994; 84(5):1361-1392.

Haupt, Y., et al. BMI-1 transgene induces lymphomas and collaborates with Myc in tumorgenesis.. Oncogene 1993; 8:3161-3164.

Hernandez-Munoz, I., et al. Assosciation of BMI-1 with Polycomb Bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the Maintenance DNA Methyltransferase DNMT1. Mol Cell Biol. 2005; 25(24):11047-58.

Hla, T., et al. An abundant transcript induced in differentiating human endothel cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled rezeptors. J. Biol. Chem. 1990; 265:9308-9313.

Hla, T., et al. Sphingosine-1-phosphate: extracellular mediator or intracellular second messenger? Biochem. Pharmacol. 1999; 58:201-207.

Hoefnagel JJ., et al. Bcl-2, Bcl-6 and CD10 expression in cutaneous B-cell lymphoma: further support for a follicle centre cell origin and differential diagnostic significance. Br J Dermatol. 2003; 149:1183-1191.

Hoefnagel JJ., et al. Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Blood 2005; 3671-78.

Hofbauer, GF., et al. Multilesional primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma responsive to antibody treatment. Dermatology 2001; 203(2):168-170.

Hornstein, OP. [Comment on the contribution by C Garbe: Borreliosis of the skin – progress of knowledge since the discovery of Lyme disease.] Hautarzt 1992; 43:165.

Hynes RO., et al. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. Cell 1992; 68:303-322.

Iezzi, M., et al. Synaptotagmin V and IX isoforms control Ca2+ -dependent insulin exocytosis. J Cell Sci. 2004; 117(Pt 15):3119-27.

Isaacson, PG. Gastrointestinal lymphomas of T- and B-cell types. Mod Pathol. 1999; 12(2):151-158.

Ito, M., et al. MUM1/IRF4 expression is an unfavorable prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)/small lymphocytic lymphoma (SLL). Jpn J Cancer Res. 2002; 93:685-694.

Iyer, VR., et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. Science 1999; 283:83.

Jacobs, J.J.L., et al. The oncogene and polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. Nature 1999; 397:164-168.

Jarosova, M., et al. Contribution of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization to the detection of chromosomal abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Onkologie 2001; 24:60-65.

Jeffery, IB., et al. Comparison and evaluation of methods for generating differentially expressed gene lists from microarray data. BMC Bioinformatics 2006; 26;7:359.

Kerr, M.K., et al. Statistical analysis of a gene expression microarray experiment with replication. Statist. Sin. 2002; 12:203-217.

Khrapko, KR., et al. A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix. Mol Biol 1991; 25:581-591.

Kurian, KM., et al. DNA chip technology. J Pathol. 1999; 187(3):267-71.

Lashkari D., et al. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94(24):13057-62.

Lee, M.J., et al. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. Science 1998; 279:1552-1555.

Lee, ML., et al. Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations.
Proc Natl Acad Sci 2000; 97(18):9834-9.

Lennert, K., et al. Histological classification and occurrence of Hodgkin's disease] Internist (Berl). 1974; 15(2):57-65.

Lessard, J., et al. Stage-specific expression of polycomp group genes in human bone marrow cells. Blood 1998; 91:1216-1224.

Lessard, J., et al. BMI-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. Nature 2003; 423:255-260.

Leung, C., et al. BMI-1 is essentialfor cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. Nature 2004; 428:337-341.

Letarte, M., et al. 1988. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J Exp Med. 1;168(4):1247-53.

Li, C., et al. Human sterile alpha motif domain 9, a novel gene identified as down-regulated in aggressive fibromatosis, is absent in the mouse. BMC Genomics 2007; 8:92.

Liu, C.H. and Hla, T. The mouse gene for the inducible G-protein-coupled receptor edg-1. Genomics 1997; 43:15-24.

Liu, Y., et al. Edg-1, the G protein-coupled rezeptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. J. Clin. Invest. 2000; 106:951-961.

Lockhart, DJ., et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nat. Biotechnol. 1996; 14:1675.

Mao, X., et al. Comparative genomic hybridization analysis of primary cutaneous B-cell lymphomas: Identification of common genomic alterations in disease pathogenesis. Genes Chromosomes Cancer 2002; 35(2):144-55.

Maskos, U., Southern EM. Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ. Nucleic Acids Res. 1992; 20:1679-1684.

Martin-Magniette, M.L., et al. Evaluation of the gene-specific dye bias in cDNA microarray experiments. Bioinformatics 2005; 9(21):1995-2000.

Massaque J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem. 1998;67:753-91.

Marshall, BJ., Warren, JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984; 1: 311-1315.

Metzgar, R.S., et al. Distribution of common acute lymphoblastic antigen in nonhematopoetic tissues. J. Exp. Med. 1981; 154:1249.

Miyazono, K. TGF-beta signaling by Smad proteins. Cytokine Growth Factor Rev. 2000 Mar-Jun; 11(1-2):15-22.

Molofsky., et al. BMI-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. Nature 2003; 426:962-967.

Moolenaar, W.H. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. Exp. Cell. Res. 1999; 253:230-238.

Mozzanica, N., et al. Posttransplantation cutaneous B-cell lymphoma with monoclonal Epstein-Barr virus infection, responding to acyclovir and reduction in immunosuppression. J Heart Lung Transplant 1997; 16:964-968.

Neudorf, S., et al. Characterization of thymocytes expressing the common acute lymphoblastic antigen. Leuk. Res. 1984; 8:173.

Newman, R.A., et al. The biochemical characterization of a cell surface antigen associated with acute lymphoblastic leukemia and lymphocyte precursors. J. Immunol. 1981; 126:2024.

Nishiu, M., et al. Microarray analysis of gene-expression profiles in diffuse large B-cell lymphoma: identification of genes related to disease progression. Jpn J Cancer Res. 2002; 93(8):894-901.

Park, L.-K., et al. BMI-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoetic stem cells. Nature 2003; 423:302-305.

Perou, CM., et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000; 406(6797):747-52.

Ponting CP., et al. SAM: A novel motif in yeast sterile and Drosophila polyhomeotic proteins. Protein Sci 1995; 41928-1930.

Quackenbush, E.J., et al. Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. J. Immunol. 1986; 136:118.

Rebora, A., et al. May Helicobacter pylori be important for dermatologists? Dermatology 1995; 191(1):6-8.

Rijlaarsdam JU, van der Putte SCJ, Berti E, et al. Cutaneous immunocytomas: a clinicopathologic study of 26 cases. Histopathology 1993; 23:119-125.

Rijlaarsdam, JU., et al. Treatment of primary cutaneous B-cell lymphoma of follicle center cell origin: a clinical follow-up study of 55 patients treated with radiotherapy or polychemotherapy. J Clin Oncol 1996; 14:549-555.

Sanger, F., et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Biotechnology 1977; 24:104-8.

Schena, M., et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995;270(5235):467-70.

Schena M., et al. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. Tibtech 07/1998 (Vol 16).

Schmid U, Eckert F, Griesser H, et al. Cutaneous follicular lymphoid hyperplasia with monotypic plasma cells. A clinicopathologic study of 18 patients. Am J Surg Pathol. 1995; 19:12-20.

Schmoeckel, C. et al. Quantitative analysis of lymphoid cells in cutaneous low-grade malignant B-cell lymphomas. Arch Dermatol Res. 1979; 266(3):239-251.

Schultz, J., et al. SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. Protein Sci. 1997; 6: 249-253.

Shalon, D., et al. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. Genome Res. 1996; 6(7):639-45.

Spiegel, S., et al. Functions of a new family of phingosine-1-phosphate receptors. Biochim. Biophys. Acta 2000; 1484:107-116.

Sterrenburg, E., et al. A common reference for cDNA microarray hybridizations. Nucleic Acids Res. 2002; 30, e116.

Stilgenbauer, S., et al. Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. Rev Clin Exp Hematol. 2000; 4:48-72.

Storz, MN., et al. Gene Expression Profiles of Cutaneous B Cell Lymphoma. J Invest Dermatol. 2003; 20(5):865-70.

Südhof, T.C. Synaptotagmin, why so many ? J. Biol. Chem. 2002; 277, 7629-32.

Tebbe, B., et al. Helicobacter pylori infection and chronic urticaria. J Am Acad Dermatol. 1996; 34(4):685-6.

Tedoldi S., et al. Jaw1/LRMP, a germinal centre-associated marker for the immunohistological study of B-cell lymphomas. J Pathol. 2006; 209(4):454-63.

Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity.
Nature 1983: 14;302(5909):575-581.

Torne R, Su WPD, Winkelmann RK, et al. Clinicopathologic study of cutaneous plasmacytoma. Int J Dermatol. 1990; 29:562-566.

Tusher, VG., et al. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci 2001; 98(9):5116-21.

Verschueren K, Huylebroeck D. Remarkable versatility of Smad proteins in the nucleus of transforming growth factor-beta activated cells.
Cytokine Growth Factor Rev. 1999; 10(3-4):187-99.

Voncken, J.W., et al. MAPLAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein BMI-1. J Biol Chem. 2005; 280(7):5178-8.

Watanabe TK., et al. Cloning and characterization of a novel member of the human Mad gene family. Genomics 1997; 42(3):446-51.

Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid.. Nature 1953; 4356 April 25.

Watson, JD., Crick, FHC. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.
Nature 1953; 171:737-738.

Willemze, R., et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. Blood 1997; 90:354-371.

Willemze, R., et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas.
Blood 2005; 105:3768-3785.

Wotherspoon, AC., et al. Helicobacter pylori-assosciated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet 1991; 338(8776):1175-1176.

Wood, GS., et al. Absence of Borrelia burgdorferi DNA in cutaneous B-cell lymphomas from the United States. J Cutan Pathol. 2001; 28(10):502-507.

Wotherspoon, AC., et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori.
Lancet 1993; 342(8771):575-577.

Zenahlik, P., et al. Therapie der primaär kutanen Lymphome. Hautarzt 2000; 51(1):19-24.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
bp	*base pairs*
	Basenpaare
CBCL	*cutaneous B cell lymphoma*
	kutane B-Zell Lymphome
CD	*cluster of differentiation*
	Differenzierungscluster
cDNA	*complementary DNA*
	komplementäre DNA
CR	*complete remission*
	vollständige Remission
CT	Chemotherapie
CTCL	*cutaneous T cell lymphoma*
	kutanes T-Zell Lymphome
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	*desoxyribonucleic acid*
	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	*desoxynucleotide triphosphate*
	dreifach phophorylierte Nukleotide
DOC	*dead of other cause*
	Aus andererem Grund verstorben
DOD	*dead of disease*
	an der Erkrankung verstorben
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EORTC	*European Organization for Research and Treatment of Cancer*
	Europäische Organisation zur Erforschung und Behandlung von Krebs
FISH	*fluorescent in situ hybridization*
	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
HP	Helicobacter pylorii
HTLV	*human T cell lymphotropic virus*
	humanes T Zell lymphotrophes Virus

IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galactosid
kb	Kilobasen
MALT	*Mucosa associated lymphoid tissue*
	mukosaassoziertes lymphatisches Gewebe
MHC	*major histocompatibility complex*
	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	*messenger* RNA
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NSC-	*Non Small Cell (Lung Cancer)*
	Nicht-kleinzelliger Lungen Krebs
OP	Operation
PCBCL	*primary* CBCL
	primäre CBCL
PCFCL	*primary cutaneous follicle center lymphoma*
	primär kutanes Keimzentrums-Lymphom
PCL	*primary cutaneous lymphoma*
	primär kutanes Lymphom
PCR	*polymerase chain reaction*
	Polymerase Kettenreaktion
PD	*progressive disease*
	*f*ortschreitenden Erkrankung
REAL	*Revised European-American Lymphoma Classification*
	Überarbeitete eurpäisch-amerikanische Lymphomklassifikation
RNA	*ribonucleic acid*
	Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute*
	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	*room remperature*
	Raumtemperatur
RT-PCR	*real time polymerase chain reaction*
	Polymerase Kettenreaktion in Echtzeit

Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Triborate-EDTA
TMACL	Tetramethylammoniumchlorid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
WHO	*World Health Organization* Weltgesundheitsorganisation
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid

9. DANKSAGUNG

Ich danke dem Klinikdirektor Prof. Dr. med. Wolfram Sterry für die freundliche Unterstützung und die hervorragenden zur Verfügung gestellten Arbeitsbedingungen.

Frau PD Dr. med. Sylke Gellrich gilt mein Dank für die beispielhafte Unterstützung durch großes fachliches Wissen, menschliche Kompetenz und nie nachlassende Motivation.

Ein Riesendank an Mandy Doreen Lehmann, die beste MTA der Welt – ohne Deine Geduld, Dein Wissen und Dein Können wäre ich nie soweit gekommen.

Carmen Kowacz, Petra Siegel und allen anderen Laborkollegen vielen Dank für Eure Hilfsbereitschaft und alle Leckereien die den Laboralltag versüßt haben.

Jana und Dietrich – ohne Euch hätte ich vieles nicht mehr erlebt; Eure Freundschaft, Eure Teilnahme und Eure Lehre waren und sind für mich Vorbild und ständige Motivation.

10. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. ERKLÄRUNG

„Ich, Kim Christian Jasch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Genexpression in primär kutanen B-Zell-Lymphomen mittels custom-made Microarrays“ 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