

EXPRESSION VON KNOCHENMORPHOGENESEFAKTOREN BEI NON-HODGKIN-LYMPHOMEN

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Katrin Rapp, geb. Weiß

geboren am 11. Mai 1975 in Neuendettelsau

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Klaus Höffken
Klinik für Innere Medizin II
Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. PD Dr. med. habil. Bernd Gruhn
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. med. Ulrich Kaiser
Medizinische Klinik II
St. Bernward Krankenhaus Hildesheim

Tag der öffentlichen Verteidigung: 3. Februar 2009

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Definition
a.U.	engl.: arbitrary units (beliebige Einheiten)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
µl	Mikroliter (10^{-6} l)
µM	Mikromolar (10^{-6} M)
5'	5'-Ende der DNA, das Ende, welches die Phosphatgruppe trägt
antisense	Gegenstrang
BMP	engl.: bone morphogenetic protein (Knochenmorphogenesefaktoren)
BMPR	BMP-Rezeptor
bp	Basenpaar
cDNA	engl.: complementary DNA (komplementäre DNA)
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
Co-Smad	engl.: common mediator Smad
dest	destilliert
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	engl.: desoxy nucleotide triphosphat (Desoxynukleotidtriphosphat)
DTCS	engl.: dye-labeled dideoxy terminator cycle sequencing
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	engl.: ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	engl.: fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszellsortierung)
g	Konstante für die Schwerebeschleunigung
HIV	engl.: human immunodeficiency virus
Id	engl.: inhibitor of differentiation
I-Smad	engl.: inhibitory Smad

Abkürzung	Definition
kb(p)	Kilobasen (paare)
LB	engl.: lysogeny broth (Nährmedium für <i>E. coli</i>)
LED	engl.: light emitting diode (Leuchtdiode)
M	Molare Masse
mA	Milliampere (10^{-3} Ampere)
MACS	engl.: magnetic Activated Cell Sorting
MAP	engl.: mitogenactivated protein kinase
mM	Millimolar (10^{-3} M)
M-MLV	engl.: Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	engl.: messenger RNA
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
nM	Nanomolar (10^{-9} M)
nt	Nukleotid
OD	engl.: optical density (optische Dichte)
PBS	engl.: phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	engl.: polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
REAL	engl.: revised European-American Lymphoma
RNA	engl.: ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
R-Smad	engl.: regulatory Smad
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
sense	zu deutsch: Protein-kodierender Strang
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq-Polymerase	Die hitzebeständige DNA Polymerase aus <i>Thermophylus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA Puffer
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
U	Unit (Einheit)

Abkürzung	Definition
U/min	Umdrehungen pro Minute
IPTG	engl.: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
X-Gal	engl.: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside
RPMI	engl.: Roswell Park Memorial Institute Medium; Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten
TGF- β	engl.: Transforming Growth Factor- β
Z. n.	Zustand nach

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
1 Einleitung	5
1.1 Knochenmorphogenesefaktoren (Bone Morphogenetic Proteins).....	5
1.1.1 BMPs und ihre Rezeptoren	5
1.1.2 BMP-Signaltransduktion.....	7
1.1.3 Biologische Bedeutung von BMPs	8
1.2 Non-Hodgkin-Lymphome.....	10
1.2.1 Epidemiologie	10
1.2.2 Ätiologie.....	10
1.2.3 Klassifikation	11
1.2.4 Stadieneinteilung.....	11
1.2.5 Remissionsstatus	12
1.3 Ziele der Arbeit	13
2 Methodik	14
2.1 Patientenkollektiv.....	14
2.2 Probengewinnung.....	14
2.3 Leukozytenisolation mittels Erythrozytenlyse.....	14
2.4 Lymphozytenisolation mittels Ficollpräparation	15
2.5 RNA-Isolierung.....	15
2.6 RNA-Quantifizierung.....	16
2.7 cDNA-Synthese.....	16
2.8 Gewinnung des Kompetitorfragmentes.....	16
2.9 Polymerase-Kettenreaktion	18
2.9.1 Allgemeines.....	18
2.9.2 PCR mit dem Thermocycler.....	19
2.9.3 Kompetitive PCR	22
2.9.4 PCR-Auswertung mittels Gelelektrophorese	24
2.9.5 Realtime-PCR.....	25
2.10 Normalisierung.....	31
2.11 Sequenzierung	32
2.12 Statistische Auswertung	33
2.13 Verwendete Materialien und Geräte	34
3 Ergebnisse	36
3.1 Patientenkollektiv.....	36
3.2 Etablierung der PCR-Analytik	38
3.3 Korrelation zwischen RNA-Gehalt und Aktinexpression.....	39
3.4 Expression von BMPs und BMP-Rezeptoren	40
3.4.1 Semi-quantitative RT-PCR	40
3.4.2 Realtime-PCR.....	41
3.5 Expressionsvergleiche gebildeter Subkollektive.....	44
3.5.1 Vergleich der Normalpersonen mit den Patienten	44
3.5.2 Korrelation zwischen Expressionsmuster und Lymphomentität.....	47
3.5.3 Korrelation zwischen Expressionsmuster und Geschlecht.....	49
3.5.4 Korrelation zwischen Expressionsmuster und Ann Arbor-Stadium	51
3.5.5 Korrelation zwischen Expressionsmuster und Knochenmarksbefall	53
3.6 Vergleich zwischen Erythrozytenlyse und Ficoll-Aufreinigung.....	55
3.7 Verlaufsproben	57

3.8	Sequenzierung	62
4	Diskussion	66
4.1	BMP-/BMP-Rezeptor-Expression bei Non-Hodgkin-Lymphomen	67
4.1.1	Differentielle BMP-/BMP-Rezeptor-Expression bei Patienten mit einem unbehandelten Non-Hodgkin-Lymphom und gesunden Vergleichspersonen	67
4.1.2	Einfluss der Leukozytenisolierung auf die gewonnene Zellpopulation und gemessene BMP-/BMP-Rezeptor-Expression	71
4.1.3	Betrachtung des BMP-Expressionsprofils im Krankheitsverlauf	72
4.2	Vergleich quantitativer PCR-Methoden am Beispiel der BMP-Expression im Rahmen von Non-Hodgkin-Lymphom-Erkrankungen	73
5	Schlussfolgerungen	74
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	75
7	Anhang	82
7.1	Lymphomklassifikationen	82
7.2	Patientenkollektiv	84
7.3	Weitere Messwerte und Rohdaten	86
7.3.1	RNA Quantifizierung	86
7.3.2	Ergebnisse der Sequenzierung der Real-Time-PCR Produkte	87
7.4	Lebenslauf	90
7.5	Danksagung	91
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung	92

Zusammenfassung

Bone Morphogenetic Proteins, abgekürzt BMPs und zu deutsch Knorpelentstehungsfaktoren, sind Wachstumsfaktoren der TGF β -Superfamilie und als solche nicht nur in die Knochen- und Knorpelentstehung, insbesondere im Rahmen der Frakturheilung, sondern auch in eine Vielzahl embryonaler Differenzierungsprozesse involviert. Für viele maligne Erkrankungen ist mittlerweile bekannt, dass BMPs die Proliferation und Differenzierung von Tumorzellen beeinflussen können, welches sich unter anderem in einem veränderten BMP-/BMP-Rezeptor-Expressionsniveau widerspiegelt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen dem Bestehen einer Non-Hodgkin-Lymphom-Erkrankung und der Veränderung des BMP-Expressionsprofils untersucht. Hierzu wurden aus dem Blut von 46 Patienten mit einem unbehandelten Non-Hodgkin-Lymphom sowie von zehn gesunden Normalpersonen Leukozyten isoliert. Mit der Realtime-PCR stand eine valide Methode zur quantitativen PCR zur Verfügung, mit deren Hilfe das Expressionsniveau für BMP-2, -4, -6, -7, BMP-Rezeptor-IA und -II bestimmt werden konnte. Die gewonnenen Expressionswerte wurden mittels des Expressionsniveaus von β -Aktin normalisiert. Im Vergleich zu den Normalpersonen zeigte sich hierbei bei den Patienten eine höhere BMP-2 und BMP-7-Expression sowie eine geringere BMP-4 und BMP-6-Expression. Insbesondere für BMP-2 ist eine gesteigerte Expression im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Tumorentitäten in der Literatur beschrieben. In der Expression der beiden untersuchten BMP-Rezeptoren fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Weiterhin erfolgte die Differenzierung der erhobenen Expressionsprofile nach Lymphomentität, Geschlecht, Stadium und Vorliegen einer Knochenmarkinfiltration. Diesbezüglich kristallisierte sich die erhöhte BMP-2-Expression der Patienten als eine Erscheinung der späten Stadien und die vermehrte BMP-7-Expression als besonders deutlich bei den diffus-großzelligen Lymphomen heraus. Ein Geschlechtsunterschied fand sich lediglich in der Gruppe der Patienten, wobei männliche Patienten gegenüber den weiblichen eine erhöhte Expression von BMP-4 zeigten. Bei zwölf Patienten konnten im weiteren Krankheitsverlauf Blutentnahmen vorgenommen werden und ebenfalls auf ihr BMP-Expressionsprofil untersucht werden. Aus den erhobenen Ergebnissen lässt sich ein Zusammenhang zwischen der BMP-2-Expression und dem Therapieansprechen vermuten. Weitere individuelle Veränderungen der BMP-Expression im Krankheitsverlauf sind zu beobachten, aber nicht zu verallgemeinern. Des Weiteren wurde bei fünf Patienten mit einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) der Einfluss unterschiedlicher Leukozytenisolierungsverfahren (Ficoll oder Erythrozytenlyse)

auf das gemessene Expressionsniveau untersucht, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verfahren ergab.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Expression von Knochenmorphogenesefaktoren in Leukozyten durch das Auftreten und den Krankheitsverlauf einer Non-Hodgkin-Lymphom-Erkrankung verändert werden.

1 Einleitung

Die besondere Stellung der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) in der aktuellen Tumorforschung und –therapie ist durch ihre deutliche Inzidenzzunahme begründet: Die Inzidenz der Non-Hodgkin-Lymphome hat sich in den letzten 20 bis 25 Jahren bei Männern nahezu verdoppelt während es bei den Frauen zu einer relativen Steigerung um 70% kam. Die Non-Hodgkin-Lymphome sind somit die hämatologische maligne Erkrankung mit dem höchsten Inzidenzzuwachs (Schmidt et al. 2004). Da es sich bei Non-Hodgkin-Lymphomen vor allem um eine Erkrankung der zweiten Lebenshälfte handelt, ist anzunehmen, dass ihre Bedeutung mit allgemein steigender Lebenserwartung noch zunehmen wird.

Die erstmalige Abgrenzung eines Non-Hodgkin-Lymphoms von den von Hodgkin 1832 als maligne Lymphome bezeichneten Tumoren erfolgte 1925. Seitdem wurde diese heterogene Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome immer wieder neuen Klassifikationen unterzogen und es konnten stetig neue Entitäten voneinander abgegrenzt werden (Hiddemann und Stein 1999).

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Proliferation maligner Erkrankungen spielen Wachstumsfaktoren. Knochenmorphogenesefaktoren, kurz BMPs (engl. bone morphogenetic proteins) sind Wachstumsfaktoren, welche zunächst vor allem für ihre physiologische Rolle in der Knochenmorphogenese und ihren therapeutischen Einsatz in der Frakturheilung bekannt waren (De Biase und Capanna 2005, Urist 1965). Es mehren sich jedoch die Hinweise, dass sie in vielfältiger Weise in die Genese vieler Tumore involviert sind, beispielsweise beim Bronchialkarzinom (Langenfeld et al. 2005) bei Knochentumoren (Yoshikawa et al. 2004) sowie beim Mammakarzinom (Clement et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit soll der Zusammenhang zwischen Knochenmorphogenesefaktoren und Non-Hodgkin-Lymphomen untersucht werden.

1.1 Knochenmorphogenesefaktoren (*Bone Morphogenetic Proteins*)

1.1.1 BMPs und ihre Rezeptoren

Bone Morphogenetic Proteins sind Wachstumsfaktoren und gehören zur TGF- β (Transforming Growth Factor β) – Superfamilie. Ihre wesentliche Bedeutung im Rahmen der Knochenbildung wurde bereits in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts entdeckt (Urist 1965), ihre Aminosäuresequenz und die zugrunde liegende mRNA (messenger RNA)-Sequenz

konnte jedoch erst in den späten 80er Jahren aufgeklärt werden (Wozney et al. 1988). Mittlerweile sind mehr als 20 Mitglieder der BMP-Familie bekannt, welche nach Struktur und Funktion in folgende Untergruppen eingeteilt werden können: BMP-2, -4 und das *Drosophila decapentaplegic*-Genprodukt bilden die BMP-2/-4-Gruppe. BMP-5, -6, -7, -8 und das *Drosophila-gbb-60A*-Genprodukt werden als die OP-1-Gruppe bezeichnet (nach dem Synonym für BMP-7, osteogenic protein-1). Die dritte Gruppe ist die GDF (Growth-differentiation factor, Wachstums-Differenzierungsfaktor) -5-Gruppe, welche sich aus BMP-13, -12 und GDF-5 zusammensetzt (Kawabata et al. 1998, Miyazono et al. 2005). Die Eigenschaften der untersuchten BMPs und BMP-Rezeptoren sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Tabelle 1.1: Übersicht über die untersuchten BMP- bzw. BMP-Rezeptor-Gene, ihre Transkripte und den daraus gebildeten Proteinen. Alle Angaben wurden den Gencards (www.gencards.org) entnommen.

Protein	Genlokus	Genlänge (bp)	mRNA-Länge (bp)	Proteingröße (aa)	Proteingewicht (Da)
BMP-2	20p12.3	10562	1188	396	44702
BMP-4	14q22.2	7155	1224	408	46555
BMP-6	6p24.3	154728	1539	513	57225
BMP-7	20q13.31	95746	1293	431	49313
BMP-RIA	10q23.2	168537	1596	532	60201
BMP-RII	2q33.1	182965	3114	1038	115201

BMPs werden als Vorläufer-Moleküle synthetisiert und bestehen nach Dimerisation und partieller Proteolyse aus zwei identischen oder unterschiedlichen Polypeptidketten, welche über eine Disulfid-Brücke zum Homo- bzw. Heterodimer werden. Das funktionelle BMP liegt in einer glykolisierten Form vor (Urist et al. 1976) und zeigt eine bis zu 50%ige Aminosäuresequenzhomologie mit dem TGF- β -Protein. Ebenso besteht zwischen den einzelnen BMPs eine enge strukturelle Verwandtschaft. So zeigen BMP-2 und BMP-5 zu BMP-7 eine strukturelle Homologie von 60 und 85 %. Alle besitzen ein gemeinsames Motiv, bei welchem das Monomer einen von drei Disulfidbrücken stabilisierten Kern besitzt. Dieser besitzt zwei herausragende Finger, die jeweils von zwei Betafaltblättern gebildet werden. Um das funktionelle Dimer zu bilden sind jeweils zwei Monomere über eine Disulfidbrücke verbunden (Granjeiro et al. 2005, Griffith et al. 1996).

BMPs binden an Typ I und II Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren. Zu den BMP-bindenden Typ I-Rezeptoren gehören der Typ IA- und IB-BMP-Rezeptor sowie der Typ IA-Activin-Rezeptor. Der Typ II-BMP-Rezeptor, der Typ II- sowie der Typ IIB-Activin-Rezeptor bilden

die Gruppe der BMP-bindenden Typ II-Rezeptoren (Liu et al. 1995, Miyazono et al. 2005, Rosenzweig et al. 1995).

Für den BMP-Rezeptor IA konnte die kristallographische Struktur bereits analysiert werden. Sein extrazellulärer Anteil faltet sich zu einer einzigen Domäne, bestehend aus zwei β -Faltblättern und einer α -Helix. Diese Struktur wird auch verglichen mit der Form einer geöffneten linken Hand (Kirsch et al. 2000).

Nach erfolgter Ligandbindung bilden die Rezeptoren ein Heterotetramer aus zwei Typ I und zwei Typ II Rezeptoruntereinheiten (Cao und Chen 2005). BMP-2 und -4 binden vorzugsweise an BMP-Rezeptor-IA und -IB, wohingegen BMP-5, -6, -7 und -8 vor allem an den Aktivin IA-Rezeptor und BMP-Rezeptor-IB binden. BMP-13 und -12 binden lediglich an BMP-Rezeptor-IB (Miyazono et al. 2005).

1.1.2 BMP-Signaltransduktion

Die BMP-Signaltransduktion dient dazu, ein extrazelluläres auto- oder parakrines Signal ins Innere der Zelle zu überführen und dort eine Kaskade von Phosphorylierungen auszulösen, die zur transkriptionellen Aktivierung spezifischer Gene führt.

Wie in Abbildung 1.1 zu erkennen, führt die bei der Ligandbindung erfolgte Bildung eines Typ I-Typ II-Rezeptor-Komplexes zur Phosphorylierung der intrazellulären Glycin-Serin-Domäne des Typ I-Rezeptors durch die Serin-Threonin-Kinase des Typ II-Rezeptors, was wiederum zur Aktivierung der Typ I-Rezeptor-Kinase führt (Heldin et al. 1997, Shi und Massague 2003, ten Dijke et al. 1996). Die nachfolgende Signaltransduktion erfolgt im Wesentlichen über Mitglieder der sogenannten Smad-Protein-Familie. Diese können in drei Untergruppen unterteilt werden: Receptor-regulated-Smads (Rezeptor-regulierte Smads) oder R-Smads, welche nach Ligandbindung durch Typ I-Rezeptoren phosphoryliert werden, Common-partner-Smads (gemeinschaftliche Smads) oder Co-Smads, welche mit R-Smads einen Komplex bilden, der zum Zweck der Transkriptionsregulierung in den Nukleus transloziert und schließlich Inhibitory-Smads (inhibierende Smads) oder I-Smads, welche die Signaltransduktion negativ regulieren. Nach Aktivierung eines Typ I-Rezeptors durch BMP-Bindung fungieren Smad 1, 5 und 8 als R-Smad, Smad 4 als Co-Smad und Smad 6 und 7 als I-Smad. Im Nukleus endet die Signaltransduktion entweder über direkte DNA-Bindung, Interaktion mit anderen DNA-bindenden Proteinen wie beispielsweise Runx, Menin und YY1 oder Rekrutierung von Co-Aktivatoren bzw. -Repressoren wie p300 oder cSKI (Miyazono et al. 2005, Zhang et al. 1997). Unter der Vielzahl von Zielgenen der BMPs sind die sogenannten Id (inhibitor of differentiation)-Proteine wohl die bedeutendsten. Sie können zu

einer Hemmung der Zelldifferenzierung und Steigerung der Zellproliferation führen (Miyazono et al. 2005), haben in letzter Zeit jedoch vor allem wegen ihres anti-apoptotischen Effektes bei Tumorzellen auf sich aufmerksam gemacht (Wong et al. 2004).

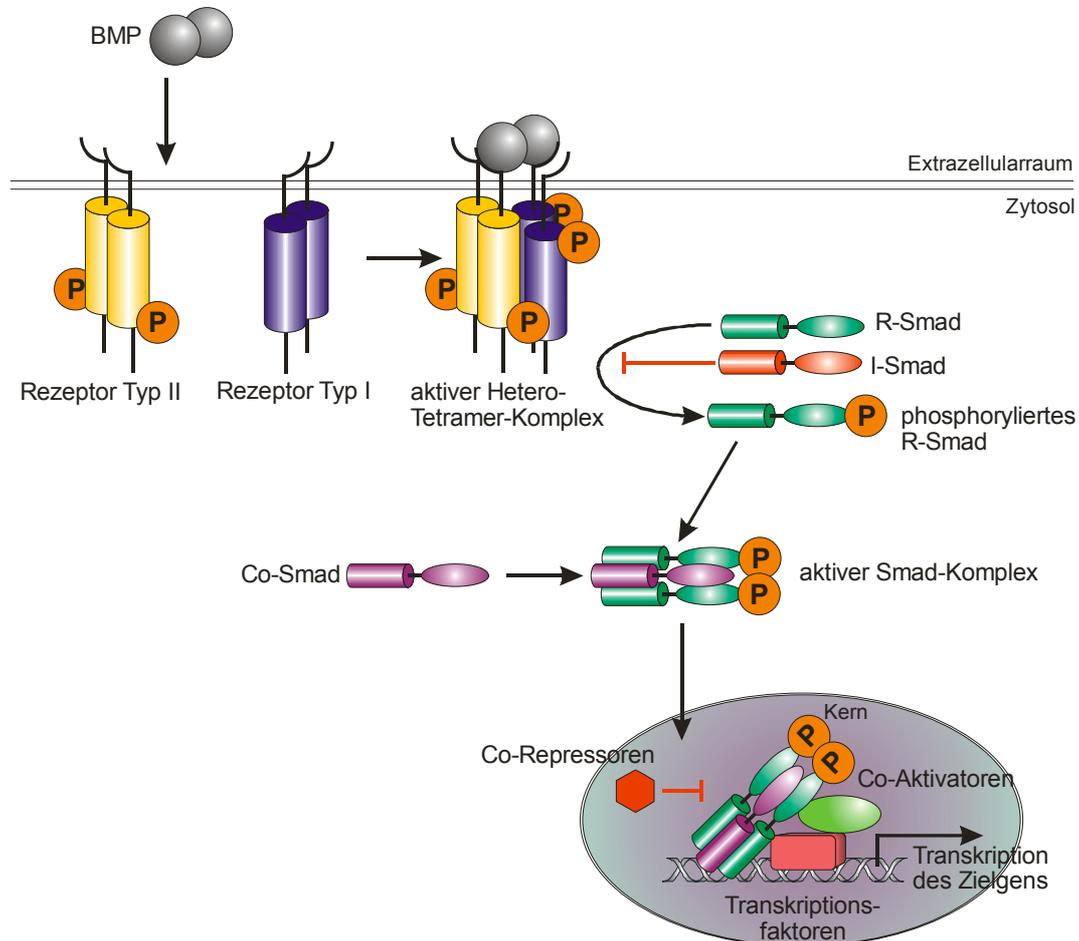


Abbildung 1.1: Der Signaltransduktionsweg von BMP modifiziert nach Miyazono et al. (Miyazono et al. 2005). Nach Bindung eines dimeren BMP-Moleküls an ein BMP-Typ II-Rezeptor-Paar kommt es zur Phosphorylierung eines BMP-Typ I-Rezeptor-Paares und Ausbildung eines Heterotetramers. Dies führt über Phosphorylierung zur Aktivierung eines R-Smads, welches gemeinsam mit Co-Smads einen aktiven Smad-Komplex bildet. Dieser transloziert in den Zellkern, um dort über Interaktion mit Co-Aktivatoren, Transkriptionsfaktoren oder Co-Repressoren bzw. direkte DNA-Bindung die Transkription des Zielgens zu beeinflussen.

Des Weiteren gibt es auch Smad-unabhängige BMP-Signaltransduktionswege wie z.B. den der MAP-Kinase (mitogenactivated protein kinase, mitogenaktivierte Proteinkinase) (Cao und Chen 2005).

1.1.3 Biologische Bedeutung von BMPs

Knochenmorphogenesefaktoren wurden zunächst im Zusammenhang mit der Neubildung von Knochengewebe erwähnt. Die zentrale Rolle, die sie bei der Knochen- und Knorpelbildung auch im Rahmen der Frakturheilung spielen, ist mittlerweile gut erforscht und diesbezüglich

der klinische Einsatz von BMP-2 und -7 bereits mehrfach erfolgreich getestet (Granjeiro et al. 2005).

Doch die Funktionen der Knochenmorphogenesefaktoren sind nach heutigem Kenntnisstand weitaus vielfältiger. So sind sie maßgeblich an Steuerungsvorgängen der Embryogenese, welche zur Modulation von Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Morphogenese führen, beteiligt. Auch die Organogenese z.B. der Niere, des Nervensystems und der Lunge ist von der Regulation durch BMPs abhängig (Hogan 1996).

Von besonderem Interesse ist bei der Betrachtung von BMPs im Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen natürlich deren bedeutende Rolle bei der Hämatopoese. So konnte insbesondere für BMP-4 eine Schlüsselstellung in der Hämatopoese mit *in vitro* nachweisbarem Einfluss auf Differenzierung und Wachstum hämatopoetischer Stammzellen sowie eine Verlängerung des Stammzellüberlebens nachgewiesen werden (Bhatia et al. 1999). Des Weiteren wird vermutet, dass ein BMP-IA-vermitteltes BMP-Signal durch Mitbestimmung der Größe der Nische für hämatopoetische Stammzellen zur Regulierung derer Populationsgröße beiträgt (Zhang und Li 2005).

BMPs haben jedoch auch Einfluss auf bereits differenzierte Blutzellen. So konnte gezeigt werden, dass BMP-6 einen antiproliferativen Effekt auf stimulierte B-Zellen ausüben kann bzw. zur Aktivierung der Smad-Signaltransduktion in reifen B-Zellen führt (Kersten et al. 2005).

Auch der Zusammenhang zwischen hereditären Erkrankungen und Mutationen von BMP-Sequenzen konnte inzwischen vereinzelt hergestellt werden. So fanden sich Mutationen in der BMP-11-Sequenz bei Chondrodysplasieerkrankten (Thomas et al. 1996, Thomas et al. 1997), die ektope Expression von BMP-4 bei Patienten der *Fibrodysplasia ossificans progressiva* (Gannon et al. 1997, Xu et al. 2000) und BMPRII-Mutationen bei Menschen, die unter *Primärer pulmonaler Hypertension* leiden (Deng et al. 2000, Lane et al. 2000).

Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Beziehung zwischen veränderter BMP-Expression und dem Auftreten maligner Erkrankungen. In der Reihe der diesbezüglich untersuchten soliden Tumore konnte ein solcher Zusammenhang unter anderem hergestellt werden für das Mammakarzinom (Alarmo et al. 2007, Alarmo et al. 2008, Arnold et al. 1999, Clement et al. 1999), das Magenkarzinom (Katoh und Terada 1996), das Ösophaguskarzinom (Raida et al. 1999) sowie das Prostatakarzinom (Harris et al. 1994). In der Gruppe der hämatologischen Malignome konnte mittlerweile beim Plasmozytom eine antiproliferative Wirkung der BMPs -2, -4, -5, -6 und -7 nachgewiesen werden (Baade et al. 2004, Hjertner et al. 2001, Kawamura et al. 2000).

1.2 Non-Hodgkin-Lymphome

Die Arbeit beschränkt sich auf die Betrachtung von Non-Hodgkin-Lymphomen, einer in sich sehr heterogenen Gruppe, sowohl was Genese als auch Morphologie und Klinik betrifft.

1.2.1 Epidemiologie

Wie bereits einleitend erwähnt, hat sich die Inzidenz des Non-Hodgkin-Lymphoms in den letzten ca. 20 Jahren bei Männern verdoppelt und bei Frauen sogar eine relative Steigerung um 70% erfahren, wohingegen die meisten anderen Tumorentitäten sich in ihrer Inzidenzrate stabilisiert oder gar verringert haben. So ist derzeit in Deutschland mit jährlich 4749 Neuerkrankungen bei Männern und 4562 Neuerkrankungen bei Frauen zu rechnen, was einer rohen Inzidenz von 11,81/100000 bzw. 10,83/100000 entspricht. Der Anteil der Non-Hodgkin-Lymphome an Krebsneuerkrankungen beträgt 2,4 bzw. 2,5%, das mittlere Erkrankungsalter 59 Jahre (Muller et al. 2005, Schmidt et al. 2004). Angesichts des hohen mittleren Erkrankungsalters ist die Zunahme der Inzidenz möglicherweise auch durch die zunehmende Überalterung der Gesellschaft begründet.

1.2.2 Ätiologie

In den letzten Jahren konnte der Zusammenhang zwischen einigen Einflussfaktoren und dem Auftreten eines Non-Hodgkin-Lymphoms hergestellt werden und so zumindest teilweise die steigende Inzidenz erklärt werden (Fisher und Fisher 2004, Grulich und Vajdic 2005, Muller et al. 2005):

- Immunsuppression: Ein erhöhtes Risiko an einem NHL zu erkranken konnte im Rahmen einer HIV-Infektion, bei angeborenen Immundefekten sowie nach Organtransplantationen mit folgender immunsuppressiver Therapie nachgewiesen werden.
- Autoimmunerkrankungen: Bei Patienten, welche an Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder dem Sjörgen-Syndrom leiden, ist die Wahrscheinlichkeit an einem NHL zu erkranken ebenfalls erhöht.
- Infektionen: Das Epstein-Barr-Virus, das Humane-T-Zell-Leukämie-Virus, das Hepatitis C-Virus sowie das Helicobacter-pylori-Bakterium tragen vermutlich ursächlich zur Entstehung von Non-Hodgkin-Lymphomen bei.
- Umwelttoxene: Neben einer Reihe von noch nicht gesicherten Umwelttoxenen als kausale Faktoren gilt der Zusammenhang zwischen der Verwendung einiger Pestizide und der Entstehung eines NHL als wahrscheinlich.

1.2.3 Klassifikation

Bis in die 1990er Jahre existierte keine einheitliche Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome. Während die USA und andere englischsprachige Länder die Working Formulation aus dem Jahr 1982 und zum Teil die Rappaport-Klassifikation aus dem Jahr 1966 verwendeten, wurde in Europa seit 1974 die Kiel-Klassifikation angewandt. Erstmals 1994 wurde mit der „REAL“ (Revised European American Lymphoma) –Klassifikation eine gemeinsame Einteilung geschaffen, welche 2001 durch die WHO-Klassifikation abgelöst wurde (Stein 2005). In Tabelle 7.1 (siehe Anhang Kapitel 7.1) sind die Kiel-, REAL- und die WHO-Klassifikation dargestellt.

1.2.4 Stadieneinteilung

Sowohl Non-Hodgkin- als auch Hodgkin-Lymphome werden nach der 1971 entworfenen Ann-Arbor-Klassifikation in Stadien eingeteilt, welche zwar seitdem mehrfach modifiziert wurde, aber in ihren Grundprinzipien weiterhin Gültigkeit besitzt und in Tabelle 1.2 aufgeführt ist (Hiddemann et al. 2005).

Tabelle 1.2: Ann-Arbor-Klassifikation (1971) (Hiddemann et al. 2005)

Stadium	Befall
I	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Befall einer einzigen Lymphknotenregion (I) oder ▶ lokalisierter Befall eines einzigen extralymphatischen Organs (I_E)
II	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Befall von 2 oder mehr Lymphknotenregionen (II) oder ▶ lokalisierter Befall extralymphatischer Organe oder Gewebe und Befall von einer oder mehreren Lymphknotenregionen (II_E) auf der gleichen Seite des Zwerchfells
III	Befall von Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells (III), welcher ebenfalls von lokalisiertem extralymphatischem Organ- oder Gewebefall (III _E) oder Milzbefall (III _S) oder beidem (III _{SE}) begleitet sein kann
IV	Diffuser oder disseminierter Befall von einem oder mehreren extralymphatischen Organen oder Geweben, mit oder ohne vergrößerte Lymphknoten
Unterteilung in A- und B-Kategorien: <ul style="list-style-type: none"> ▶ A: ohne Allgemeinsymptom ▶ B: mit Allgemeinsymptom Definition der Allgemeinsymptome: <ul style="list-style-type: none"> ▶ Fieber > 38°C und/oder ▶ Nachtschweiß und/oder ▶ Gewichtsverlust von >10% des Körpergewichts in den vergangenen 6 Monaten 	

Für einige Lymphomentitäten gibt es eigene Stadieneinteilungen wie für die Chronisch Lymphatische Leukämie und das Plasmozytom. Da Plasmozytompatienten in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, soll im Folgenden nur auf die

Stadieneinteilungen der CLL eingegangen werden. Die Festlegung des Krankheitsstadiums der CLL-Patienten erfolgte nach der in Tabelle 1.3 aufgeführten Stadieneinteilung nach Binet.

Tabelle 1.3: Stadieneinteilung der CLL nach Binet et al. (1981), modifiziert nach Schmoll (Schmoll et al. 2006)

Stadium	Definition	Durchschnittliche Lebenserwartung ab Diagnosestellung
A	Eindeutige Diagnose der CLL (Hallek et al. 2002): anhaltende Blutlymphozytose >5000/ μ l (mit typischem Immunphänotyp), Hb \geq 10 g/dl, Thrombozyten \geq 100000 / μ l, höchstens zwei Lymphknotenregionen* befallen	Über 10 Jahre
B	Mindestens 3 Lymphknotenregionen* befallen	Ca. 5 Jahre
C	Hb <10 g/dl oder Thrombozyten <100000/ μ l	2-3 Jahre
* Als Lymphknotenregionen gelten in der Binet-Stadieneinteilung die axillären, inguinalen und zervikalen Lymphknotengruppen und die Milz und Leber (maximal fünf Regionen). Grundlage der Einteilung ist der manuelle Tastbefund.		

1.2.5 Remissionsstatus

Da in der vorliegenden Arbeit bei einigen untersuchten Patienten die BMP-Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf untersucht wird, ist hierbei auch der Remissionsstatus der Erkrankung nach Einleitung der Therapie von Bedeutung. Die Einschätzung der Remission erfolgt einheitlich nach den in Tabelle 1.4 gezeigten Kriterien:

Tabelle 1.4: Kriterien zur Beurteilung des Therapieerfolgs für Non-Hodgkin-Lymphome nach Cheson et al. 1999 (Cheson et al. 1999, Hiddemann und Lang 2005).

Therapieerfolg	Körperliche Untersuchung	Lymphknoten	Knochenmark
Komplette Remission	Unauffällig	normal	normal
Unbestätigte komplette Remission	Unauffällig	normal	nicht untersucht
	Unauffällig	normal oder Reduktion der Lymphommasse um >75%	normal oder nicht untersucht
Partielle Remission	Unauffällig	normal	positiv
		mindestens 50%ige Abnahme	irrelevant
	Größenabnahme von Leber und Milz	mindestens 50%ige Abnahme	irrelevant
Rezidiv, Progress	neue Manifestation, Größenzunahme von Leber/Milz und/oder neue Manifestation	neue Manifestation, Zunahme und/oder neue Manifestation	erneute Infiltration

1.3 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion festzustellen, ob zwischen dem Auftreten einer Non-Hodgkin-Lymphom-Erkrankung und einer gegenüber Normalpersonen veränderten BMP-/BMP-Rezeptor-Expression in Leukozyten ein Zusammenhang besteht. Um unverfälschte Daten zu erhalten, wurden ausschließlich Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten ohne vorangegangene antitumoröse Therapie in die Untersuchungen einbezogen. Um die Vielfalt der Knochenmorphogenesefaktoren zu berücksichtigen, wurden Expressionsanalysen von BMP-2, -4, -6 und -7 sowie BMP-Rezeptor-IA und -II durchgeführt. Hierbei sollte der Heterogenität der Non-Hodgkin-Lymphome bzgl. klinischem Erscheinungsbild, Krankheitsverlauf und Therapie Rechnung getragen werden. Dies konnte durch differentielle Betrachtung der erhobenen Expressionsdaten entsprechend Subentität, Stadium usw. erfolgen. Außerdem ist von besonderem Interesse, ob sich durch den weiteren Krankheitsverlauf eine Veränderung des Expressionsprofiles ergibt. Da unklar ist, wie hoch der Anteil an Lymphomzellen im peripheren Blut ist, ist ein weiteres Ziel, mittels unterschiedlicher Leukozytenisoliationsverfahren, die im Blut enthaltenen Tumorzellen zu konzentrieren und differenziert zu betrachten.

2 Methodik

2.1 Patientenkollektiv

Bei den ausgewählten Probanden handelt es sich um Patienten, welche histologisch bzw. im Falle einer CLL immunzytologisch gesichert an einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt sind und bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme noch keine spezifische Lymphomtherapie im Sinne einer zytostatischen Chemo- oder Radiotherapie bzw. einer Antikörpertherapie erhalten hatten. Des Weiteren konnte zum Zeitpunkt der Blutentnahme kein Zweitmalignom nachgewiesen werden. Bei den ausgewählten Patienten wurde nach Diagnosestellung eines Non-Hodgkin-Lymphoms und vor Einleitung einer zytostatischen Therapie die Einverständniserklärung zur Blutentnahme und anonymisierten Probenverarbeitung eingeholt. Insgesamt konnten so 46 Patientenproben asserviert werden, darunter Proben von 21 Frauen und 25 Männern in einem medianen Alter von 54 Jahren (Altersspanne 27-77 Jahre) bei einem gemittelten Alter von 54,6 Jahren. Zu den genaueren Daten des Patientenkollektives soll auch auf Unterpunkt 3.1 verwiesen werden.

Bei zwölf Patienten konnten im weiteren Krankheitsverlauf bzw. im Rahmen der Nachsorge Proben entnommen werden, darunter bei zwei Patienten Proben der zur Retransfusion gewonnenen peripheren Blutstammzellen bei autologer peripherer Blutstammzelltransplantation nach vorangegangener Hochdosistherapie.

Außerdem erfolgte die Probengewinnung bei zehn gesunden Vergleichspersonen in einem medianen Alter von 30,5 Jahren (Altersspanne 24-55 Jahre) und einem mittleren Alter von 32,5 Jahren, darunter acht Frauen und zwei Männer. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme fanden sich bei diesen weder Hinweise für ein akutes noch ein chronisches Krankheitsgeschehen.

2.2 Probengewinnung

Zunächst wurde den Probanden in einer herkömmlichen Entnahmemonovette 10 ml venöses, peripheres Blut entnommen. Die zur Entnahme verwendete Monovette enthielt als Antikoagulans Ammoniumheparin.

2.3 Leukozytenisolation mittels Erythrozytenlyse

Am Tag der Blutentnahme wurde die Probe zur weiteren Konservierung aufgearbeitet.

Hierzu wurden zu einer Blutprobe von 10 ml Volumen insgesamt 40 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer gegeben. Auf Eis inkubierte diese Mischung für 10 Minuten. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 250g und 4°C für 10 Minuten. Der entstandene Überstand wurde abgekippt und das zurückgebliebene Pellet nochmals mit 15 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer aufgefüllt, 5

Minuten auf Eis inkubiert sowie die Zentrifugation wiederholt. Fand sich nun nach optischer Kontrolle ein weißes, weitgehend von Erythrozytenresten befreites Pellet, wurde dieses mit einer Pipette je nach Größe in ca. 10 -15 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und auf 4-7 Kryoröhrchen verteilt. Nach nochmaliger Abzentrifugation wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet bei -80°C konserviert.

2.4 Lymphozytenisolation mittels Ficollpräparation

Alternativ zur Leukozytenisolation mittels Erythrozytenlyse wurde die sogenannte Ficoll-Präparation angewendet. Diese bietet sich dann an, wenn nicht Leukozyten, sondern lediglich der lymphozytäre Zellanteil anschließend Gegenstand der Untersuchung ist, da allein dieser durch die Ficollpräparation isoliert wird.

Hierzu wurde am Tag der Probenentnahme das Blut mit RPMI-Medium im Verhältnis 1:2 verdünnt. Anschließend wurden 10 ml verdünntes Blut vorsichtig auf 4 ml Ficolllösung aufgetragen. Die Zentrifugation bei 390g und 23°C über 15 Minuten muss ohne Abbremsung beendet werden, nur dann zeigt sich an der Grenzzone zwischen Blutplasma und Ficolllösung ein weißer Ring, die Schicht mononukleärer Zellen. Nachdem vorsichtig das Plasma abgehoben worden war, wurde der Zellring in ein neues Gefäß überführt und zweimalig mit PE-Puffer (PBS-Puffer unter Hinzugabe von 2 mM EDTA) gewaschen sowie bei 210g 10 Minuten abzentrifugiert. Das verbleibende Pellet wurde bei -80°C konserviert.

2.5 RNA-Isolierung

Aus dem mittels Erythrozytenlyse gewonnenen Leukozytenpellet bzw. mittels Ficoll-Präparation gewonnenen Lymphozytenpellet konnte nun RNA (ribonucleic acid, zu deutsch Ribonukleinsäure) isoliert werden. Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits.

Zunächst wurde der Lysepuffer vorbereitet, indem je Pellet 600µl RLT-Puffer mit 6µl β-Mercaptoethanol vermischt wurden. Dieser wurde dann zu dem Pellet gegeben und so lange vermengt, bis sich das Pellet aufgelöst hatte. Die erhaltene, zähflüssige Zellsuspension wurde mittels Zentrifugation bei 15000g über 2 Minuten durch einen „Homogenisator“ gepresst. Anschließend wurde das Lysat mit 500µl 70%igem Ethanol vermischt, auf eine Säule aufgetragen und bei 8000g über 15 Sekunden zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Vorganges wurde auf die Säulenmembran 500µl RW1-Waschpuffer aufgetragen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Zentrifugation mit 8000g über 15 Sekunden erfolgt war, wurde die Membran zweimalig mit 400µl RPE-Puffer gewaschen und zuerst für 15 Sekunden bei 8000g und beim zweiten Waschvorgang für 2 Minuten bei 8000g

zentrifugiert. Zuletzt wurde die RNA mit insgesamt 50 µl RNase-freiem Wasser in zwei aufeinander folgenden Zentrifugationen über 60 Sekunden bei 8000g eluiert und bei -80°C konserviert.

2.6 RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte spektrophotometrisch (NanoDrop). Hierbei wurde die optische Dichte bei 260nm sowie zur Reinheitskontrolle bei 280 und 230nm gemessen.

2.7 cDNA-Synthese

Die gewonnene RNA konnte nun in cDNA (englisch complementary DNA, zu deutsch komplementäre DNA) übersetzt werden. Hierzu wurde zunächst auf Eis ein Reaktionsmix folgender Zusammensetzung hergestellt:

Komponente	Endkonzentration	Menge
5x Reaktionspuffer (250mM Tris-HCl, pH 8,3; 375mM KCl; 15mM MgCl ₂)	1x	4µl
DTT (0,1M)	10mM	2µl
Random primer (3,0µg/µl)	0,15µg/µl	1µl
Oligo-dT ₁₅ (320µM)	16µM	1µl
dNTP-Mix (2,5mM jeweils)	250µM jeweils	2µl
RNasin (40U/µl)	1U/µl	0,5µl
M-MLV reverse Transkriptase (200U/µl)	10U/µl	1µl

Zu je 8,5µl Gesamt-RNA, welche zuvor fünf Minuten bei 65°C im Wasserbad denaturiert worden war, wurden 11,5µl des oben angeführten Reaktionsmixes hinzugefügt, gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde dieser Ansatz zehn Minuten bei Raumtemperatur und danach 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer abschließenden Erhitzung auf 95°C für acht Minuten zur Deaktivierung der reversen Transkriptase konnte die synthetisierte cDNA kurz abzentrifugiert und bei -20°C gelagert werden.

2.8 Gewinnung des Kompetitorfragmentes

Zur Durchführung der unten beschriebenen kompetitiven PCR als auch zur Real-Time-PCR wurde ein von M. Schwalbe hergestelltes Kompetitorfragment (Schwalbe 2000) verwendet.

Dieses lag bereits in Plasmidform (pCR II-TOPO-Vektor mit Ampicillinresistenzgen) in Bakterienzellen (*E. coli*) transformiert und als Glycerolstock konserviert vor. Zur Aufreinigung wurde der Maxi-Prep-Kit (Qiagen) verwendet.

In einer Starterkultur wurden 5 µl aufgetaute Bakterienkultur mit 5 ml LB-Medium vermengt und für 20 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Das verwendete LB-Medium setzt sich wie folgt zusammen:

Trypton 10g

Hefe-Extrakt 5g

NaCl 10g

gelöst in 1 Liter destilliertem Wasser, pH 7,0

Anschließend erfolgte die Schüttelinkubation von 20 µl dieser Bakteriensuspension vermischt mit 200ml Medium erneut bei 37°C für 20 Stunden. Diese neu erhaltene Bakteriensuspension wurde nun 10 Minuten bei 4°C und 8000g abzentrifugiert, das Pellet in zwei Portionen aufgeteilt und in jeweils 10ml P1-Puffer resuspendiert. Daraufhin wurden 10ml P2-Puffer hinzugefügt, fünfmal invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10ml P3-Puffer hinzugefügt, erneut fünfmal vorsichtig invertiert und 30 Minuten bei 4°C und 20000g zentrifugiert. Der dabei erhaltene Überstand enthält die Plasmid-DNA und wurde nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde der Überstand über eine mit 8ml QBT-Puffer äquilibrierte Säule gegeben und diese zweimal mit 30ml QC-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert, mit 10,5 ml Isopropanol gefällt, hierzu 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 30 Minuten bei 4°C und 20000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben, das Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und bei 4°C für zehn Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet und das Pellet zehn Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zum Schluss wurde jedes Pellet in 300 µl TE-Puffer gelöst und der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt. Die 100-fach verdünnten Proben ergaben einen $OD_{260} = 0,406$ bzw. $OD_{280} = 0,216$. Daraus ergab sich ein Verhältnis OD_{260} / OD_{280} von 1,85, welches einer guten Reinheit entspricht. Daraus errechnet sich nach

$$\text{DNA-Gehalt} = OD_{260} \times 50 \text{ in } \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

eine DNA-Konzentration von 2029 µg/ml.

Im anschließenden Restriktionsverdau wurde das Kompetitorfragment mit Hilfe der Restriktionsendonuklease EcoRI aus dem Plasmid ausgeschnitten und mittels eines präparativen Agarosegels aufgereinigt.

Für die Restriktionsspaltung wurde folgender Ansatz auf Eis bereitet:

Komponente	Endkonzentration	Menge
Plasmid DNA	~ 30 µg	15 µl
EcoRI Puffer (10x)	1x	10 µl
EcoRI (10 U/µl)	100 U	10 µl
H ₂ O	-	65 µl

Die Reaktion wurde zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 25µl Ladebuffer (Zusammensetzung siehe Abschnitt PCR-Auswertung) auf ein 1%-iges, ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen. Nach erfolgtem Gellauf konnte die spezifische Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und das Kompetitorfragment im Weiteren mit Hilfe des Qiaex II-Kits (Qiagen) aufgereinigt werden. Das Gelstück wurde in der dreifachen Menge QX1 (v/w) aufgenommen und bei 50°C für zehn Minuten geschmolzen. Zusätzlich wurden 30 µl QX2 zugegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die an die Beads gebundene DNA wurde durch Zentrifugation (8000g, eine Minute) abgetrennt. Das Pellet wurde mit 500µl QX1-Puffer gewaschen und erneut bei 8000g für eine Minute zentrifugiert. Nachfolgend wurde zweimal mit jeweils 500µl PE-Puffer gewaschen. Nachdem das Pellet 30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet worden war, erfolgte durch Hinzugabe von 20 µl RNase-freiem Wasser die Elution. Für den Verdau von 30 µl Plasmid wurden insgesamt sieben Parallelansätze durchgeführt, so dass insgesamt 140 µl Kompetitorfragmentlösung isoliert wurden. Nach erneuter Messung der DNA-Konzentration mittels UV-Spektroskopie wurde die Endkonzentration mit RNase-freiem Wasser auf 5µg/ml eingestellt und die Kompetitorfragmentlösung bei -20°C aufbewahrt.

2.9 Polymerase-Kettenreaktion

2.9.1 Allgemeines

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction: PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren und wurde erstmals 1987 von Mullis (Mullis und Faloona 1987) beschrieben.

Die Methode beruht auf der mehrfachen Wiederholung eines Reaktionszyklus bestehend aus Denaturierung eines Nukleinsäuredoppelstranges, Annealing eines Primers sowie Elongation

des Einzelstranges mithilfe einer Polymerase. Da aus jedem so neu entstandenen Doppelstrang bei erneuter Denaturierung zwei Matrizen entstehen, kann die Kopienanzahl je Zyklus exponentiell ansteigen.

Die ursprüngliche Form der PCR, welche für jeden Zyklusbestandteil ein optimiertes Wasserbad sowie die wiederholte Hinzugabe der Polymerase einmal je Zyklus notwendig machte, wurde bald revolutioniert durch die Einführung einer hitzestabilen Polymerase aus *Thermophilus aquarius* (Taq Polymerase) 1988 (Saiki et al. 1988) sowie die Entwicklung automatisierter Thermocycler bis hin zur heute gängigen Real-Time-PCR (Higuchi et al. 1993).

Wie oben bereits beschrieben, besteht ein PCR-Zyklus aus drei Phasen: Zunächst führt eine initiale Denaturierung bei 95°C zur Aufspaltung der Doppelstrang-DNA. Daran schließt sich die Annealingphase an, deren Temperatur in Abhängigkeit des sich nun anlagernden Primers zwischen ca. 55-65°C variiert. In der darauf folgenden Elongation wird ausgehend vom Primer DNA bei 72°C mit Hilfe der Polymerase amplifiziert.

In der vorliegenden Arbeit diente die PCR der Quantifizierung von aus RNA gewonnener cDNA (Reverse Transkriptase-PCR, RT-PCR). Neben dem RNase Protection Assay sowie dem Northern Blot mit *in situ*-Hybridisierung ist die RT-PCR eine zuverlässige Methode zur Transkriptquantifizierung (Bustin 2000).

Grundsätzlich unterscheidet man im Rahmen der PCR zwischen der absoluten und relativen Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung wird die Zielsequenz parallel zu den interessierenden Proben in einer Standardverdünnungsreihe amplifiziert. Die gemessene Konzentration des Transkriptes jeder einzelnen Probe wird dann auf die Standardkurve bezogen und als Absolutwert angegeben.

Im Gegensatz dazu wird bei der relativen Quantifizierung die Konzentration des Transkriptes (ebenfalls bezogen auf eine Standardkurve) in Relation zur Konzentration eines „Housekeeping“-Gens angegeben (Eleaume und Jabbouri 2004).

Bei sogenannten „Housekeeping“-Genen handelt es sich um Gene, die zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels unabdingbar und deshalb in jeder Zelle vorzufinden sind. Unter der Annahme, dass sie in jeder Zelle gleich exprimiert werden, können sie der Standardisierung dienen.

2.9.2 PCR mit dem Thermocycler

Bei der PCR mit Hilfe eines Thermocyclers erfolgt diese voll automatisiert in einem programmierbaren Thermoblock. Das entstandene Produkt wird im Anschluss auf ein

Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel aufgetragen und die Banden können mit Hilfe einer densitometrischen Gelauswertung analysiert werden.

Der Reaktionsansatz für eine PCR dieser Art setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	Endkonzentration	Menge
Aqua dest. Steril		18,3µl
10x Reaktionspuffer mit 15mM MgCl	1x	2,5µl
Primer (10µM jeweils)	400nM jeweils	1µl
dNTP-Mix (2,5mM jeweils)	200µM jeweils	2µl
Taq-Polymerase (5units/µl)	1U	0,2µl

Es wurde grundsätzlich hierbei auf Eis pipettiert, um unspezifische Amplifikationen zu vermeiden.

Dieser Ansatz von 24µl wurde dann zu 1µl in einem 0,5ml-Reaktionsgefäß vorgelegter DNA hinzugefügt, das Gemisch kurz zentrifugiert und mit einer dünnen Schicht Mineralöl bedeckt, um Kondensierungseffekte während der PCR zu verhindern.

Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einen für die PCR vorgesehenen, programmierbaren Thermocycler gegeben und das gewünschte Programm ausgewählt.

Zu jedem PCR-Ansatz wurde eine zusätzliche Negativkontrolle, welche anstatt cDNA 1µl steriles Wasser enthält, mitgeführt.

In Tabelle 2.1 sind die verwendeten Thermocyclerprogramme dargestellt. Das gewonnene Amplifikat wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

Die Auswahl der Primer ist in der Dissertationsarbeit von M. Schwalbe (Schwalbe 2000) beschrieben.

Tabelle 2.1: PCR-Bedingungen der einzelnen Gene

Gen	Bedingung			
	Initiale Denaturierung 95°C, 3 Minuten			
	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
β-Aktin	95°C, 30 sec	60,5°C, 30 sec	72°C, 20 sec	28
BMP-2	95°C, 30 sec	60°C, 30 sec	72°C, 30 sec	34
BMP-4	95°C, 30 sec	61°C, 30 sec	72°C, 30 sec	34
BMP-6	95°C, 30 sec	65,5°C, 30 sec	72°C, 30 sec	34
BMP-7	95°C, 30 sec	65°C, 30 sec	72°C, 30 sec	34
BMPR-IA	95°C, 30 sec	58°C, 30 sec	72 °C, 25 sec	34
BMPR-II	95°C, 30 sec	60°C, 30 sec	72°C, 45 sec	34
	Terminale Elongation 72°C, 5 Minuten			

In Tabelle 2.2 sind die Primersequenzen, in Tabelle 2.3 deren Bindungsstellen sowie die Eigenschaften der mRNA-Amplifikate als auch des verwendeten Kompetitorfragmentes aufgeführt:

Tabelle 2.2: Verwendete Primer und deren Sequenzen

Transkript	Orientierung	Sequenz
β-Aktin	sense	5' - CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT
	antisense	5' - GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC
BMP-2	sense	5' -TCA TAA AAC CTG CAA CAG CCA CAT CG
	antisense	5' -GCT GTA CTA GCG ACA CCC AC
BMP-4	sense	5' -ACT GGT CCA CCA CAA TGT GAC ACG
	antisense	5' -GCT GAA GTC CAC ATA GAG CGA GTG
BMP-6	sense	5' -GTC GTA ATC GCT CTA CCC AGT CC
	antisense	5' -CTG GGT AAT AAG GCA CTG GCA TG
BMP-7	sense	5' -CCT ACC CCT ACA AGG CCG TCT TC
	antisense	5' -TGC TCC CCG TGG ACC GGA TGC TG
BMPR-IA	sense	5' -CGA AAA AGT GGC GGT GAA AG
	antisense	5' -CAC CCT GGT ATT CAA GGG CA
BMPR-II	sense	5' -GGG AGA AAT CAA AAG GGG ACA TA
	antisense	5' -ACA GAA TGA GCA AGA CGG CAA GAG C

Der BMP-2-forward-Primer zeigt an Position 1333-1334 der Gendatenbanksequenz ein Mismatch, welches sich erst retrospektiv durch eine Korrektur der veröffentlichten Sequenzen demaskierte. Letztendlich können jedoch durch diesen Mismatch die bei der Amplifikation von BMP-2 aufgetretenen Probleme, auf welche später noch eingegangen wird, möglicherweise erklärt werden.

Tabelle 2.3: Eigenschaften der Amplifikate, aus mRNA bzw. aus dem Kompetitorfragment amplifiziert.

Primer	mRNA			Kompetitorfragment	
	Genbank Acc. No.	Position (nt)	Länge (nt)	Position (bp)	Länge (bp)
β -Aktin sense	NM_001101	689	712	24	542
β -Aktin antisense	NM_001101	1400C		565C	
BMP-2 sense	NM_001200.1	1312	671	44	502
BMP-2 antisense	NM_001200.1	1982C		545C	
BMP-4 sense	NM_001202	1086	346	181	237
BMP-4 antisense	NM_001202	1431C		417C	
BMP-6 sense	NM_001718	1330	529	115	346
BMP-6 antisense	NM_001718	1858C		460C	
BMP-7 sense	NM_001719	433	579	70	436
BMP-7 antisense	NM_001719	1011C		505C	
BMPR-IA sense	NM_004329	1313	442	138	300
BMPR-IA antisense	NM_004329	1754C		437C	
BMPR-II sense	U25110.1	371	715	1	590
BMPR-II antisense	U25110.1	1085C		590C	

2.9.3 Kompetitive PCR

Mit Hilfe eines von M. Schwalbe 1998 synthetisierten Kompetitorfragmentes (Schwalbe 2000), welches Primerbindungsstellen für alle untersuchten BMPs als auch für das Housekeeping-Gen β -Aktin enthält, war die Durchführung einer kompetitiven, semi-quantitativen PCR möglich. Hierbei wird im gleichen PCR-Ansatz der zu untersuchenden Probe das Kompetitorfragment bekannter Größe und Konzentration beigelegt. Dieses konkurriert mit der cDNA um den zur Verfügung stehenden Primer und Nukleotide.

Der Reaktionsansatz für eine kompetitive PCR sieht wie folgt aus:

Komponente	Endkonzentration	Menge
Aqua dest. steril		17,3 μ l
10x Reaktionspuffer	1x	2,5 μ l
Primer (10 μ M jeweils)	400nM jeweils	1 μ l
dNTP-Gemisch(2,5mM jeweils)	200 μ M jeweils	2 μ l
Taq-Polymerase (5units/ μ l)	1U	0,2 μ l

23µl dieses Ansatzes wurden zu den in einem 0,5ml-Reaktionsgefäß vorgelegten 1µl cDNA und 1µl Kompetitorfragment hinzugefügt, gemischt, abzentrifugiert und mit einer Mineralölschicht bedeckt. Die kompetitive PCR für β-Aktin erfolgte unter den in Tabelle 2.4 aufgeführten Bedingungen:

Tabelle 2.4: PCR-Bedingungen für β-Aktin bei der kompetitiven PCR

Gen	Bedingung			
	Initiale Denaturierung 95°C, 3 Minuten			
	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
β-Aktin	95°C, 30 sec	60,5°C, 30 sec	72°C, 20 sec	29
	Terminale Elongation 72°C, 5 Minuten			

Verwendet wurde der unter 2.9.2 bereits erwähnte β-Aktin-Primer.

Das Kompetitorfragment lag unverdünnt in einer Konzentration von 5µg/ml vor und wurde in einer ersten PCR jeweils in Verdünnungsstufen von 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} zu vier Reaktionsansätzen mit cDNA hinzugegeben.

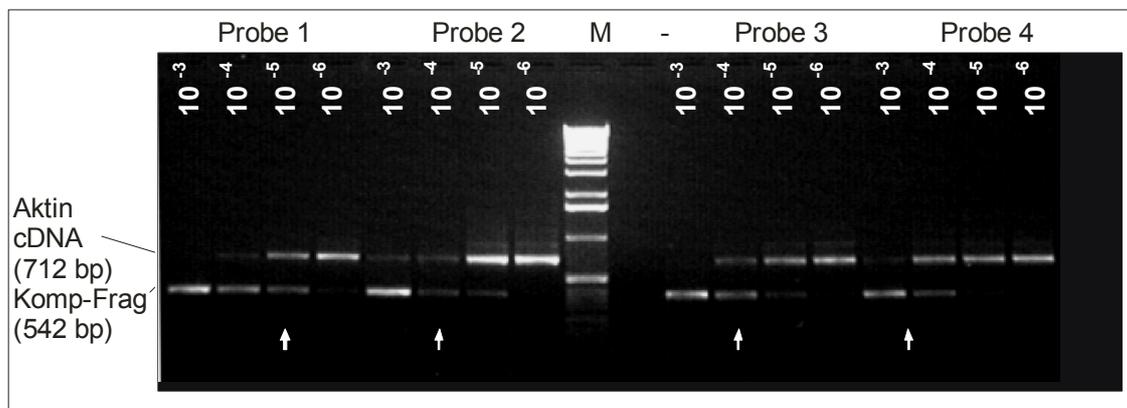


Abbildung 2.1: Gelelektrophorese nach kompetitiver Thermocycler-PCR für vier Proben mit jeweils vier Verdünnungen des Kompetitorfragmentes. Die jeweils mit einer definierten Ausgangsmenge Kompetitorfragment in einem Reaktionsgefäß gemeinsam amplifizierte cDNA findet man oberhalb des Kompetitorfragmentes bei einer Länge von 712bp. Das Kompetitorfragment darunter (542bp) nimmt bei entsprechender höherer Verdünnung an Intensität ab, bei gleichzeitiger Intensitätszunahme des cDNA-Amplifikates. An der Stelle, an welcher das Kompetitorfragment und die cDNA die gleiche Bandenintensität aufweisen, ist die Konzentration des cDNA-PCR-Produktes gleich der des Kompetitorfragment-PCR-Produktes (Markierung mit Pfeil). Ist dieser Zustand zwischen zwei Banden wie bei Probe 4 in der Abbildung zu vermuten, so wurden diese als obere und untere Konzentrationsgrenze für drei Zwischenverdünnungen in einem erneuten Gellauf festgelegt. M: 1kb-Marker, -: Negativkontrolle.

Lagen in der anschließend durchgeführten Gelanalyse die PCR-Produkte der cDNA und des Kompetitorfragmentes in der gleichen Konzentration vor, zeigten sich zwei übereinander liegende Banden gleicher Intensität. Die benachbarten Banden bildeten die obere und untere Konzentrationsgrenze des Kompetitorfragmentes zur genaueren Konzentrationsermittlung in einer anschließend durchgeführten erneuten PCR. Abbildung 2.1 zeigt das typische Bild einer kompetitiven PCR.

2.9.4 PCR-Auswertung mittels Gelelektrophorese

Zur Auswertung der herkömmlichen Thermocycler-PCR sowie der kompetitiven PCR wurde die Gelelektrophorese verwendet. Zur Herstellung eines 1%-igen Agarose-Gels wurden 1g Agarose zu je 100ml TAE-Puffer hinzugefügt und in der Mikrowelle kurz aufgeköcht sowie geschüttelt bis sich eine schlierenfreie Lösung ergab. Der verwendete TAE-Puffer setzt sich in 50-facher Konzentration wie folgt zusammen:

Tris	242g
Essigsäure	57,1ml
0,5M EDTA, pH 8,0	100ml
auf 1l aqua dest	

Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden je 100ml Agaroselösung 2µl Ethidiumbromid (10µg/µl) hinzugefügt, vermischt und in eine Gelapparatur gegossen. Nach Einfügen eines Taschenkammes konnte das Gel bis zu seiner Auspolymerisation bei Zimmertemperatur abkühlen. Anschließend wurde das Gel in seiner Wanne in die mit TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophorese-Kammer eingebracht und der Kamm entfernt. In die so entstanden Taschen konnten jeweils 15µl PCR-Produkt, welches zuvor mit 10µl Ladepuffer vermengt wurde, aufgetragen werden. Der verwendete Ladepuffer setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	Endkonzentration	Menge
1M Tris-HCl, pH 8,0	10mM	1ml
0,5M Na ₂ -EDTA	1mM	200µl
20% SDS	0,1%	500µl
Glycerin	30%	30ml
4% Bromphenolblau	0,0025%	62,5µl
Aqua dest. ad 100ml		

Zusätzlich zu den Proben und der jeweils mitgeführten Negativkontrolle wurden 10µl eines Längenstandards (1kb-ladder) aufgetragen. Anschließend erfolgte der Gellauf bei 200mA. Nach ca. 50 Minuten konnte der Gellauf beendet werden und das Gel auf einem

Ultraviolettgellicht betrachtet und fotodokumentiert werden. Abbildung 2.2 zeigt das typische Bild einer solchen Gelelektrophorese nach β -Aktin- bzw. BMP-2-Amplifikation.

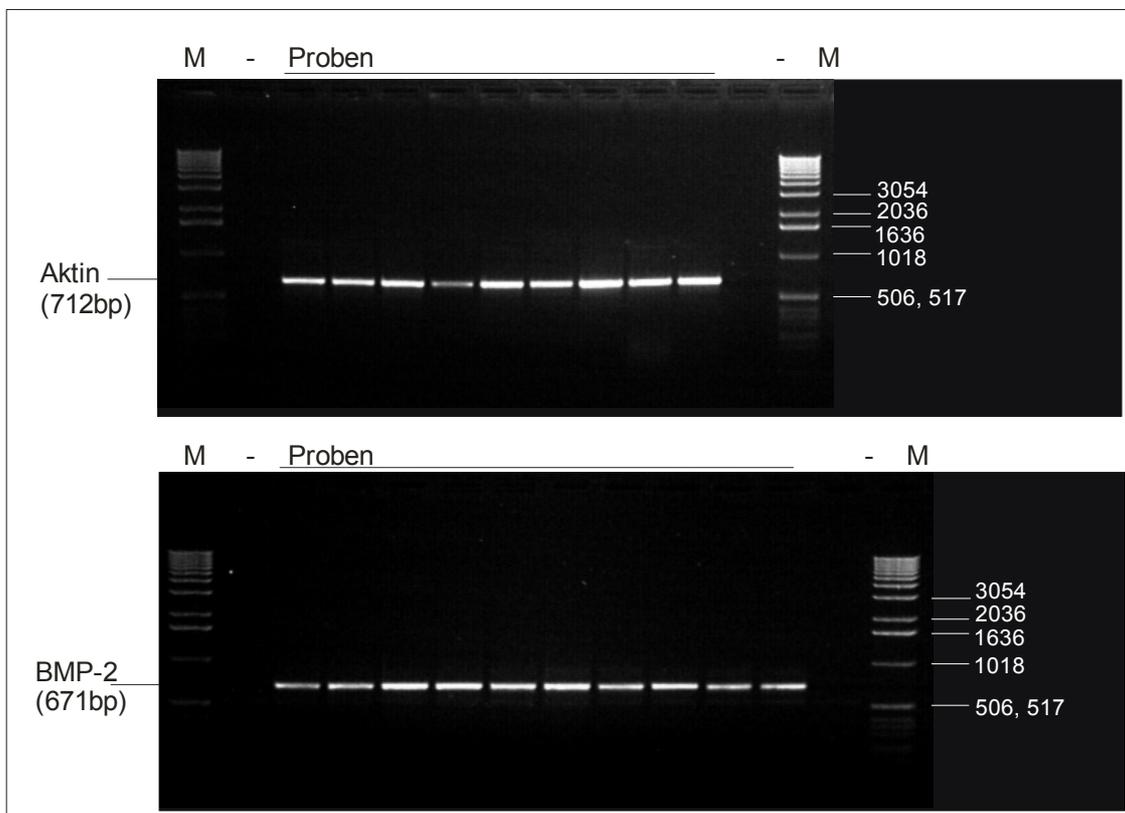


Abbildung 2.2: Gelelektrophorese mit Ethidiumbromidfärbung nach semi-quantitativer RT-PCR. Zu sehen ist im oberen Bildabschnitt eine Elektrophorese nach Aktin-, im unteren Bildabschnitt nach BMP-2-Amplifikation. Neben den PCR-Produkten wurden jeweils auch zwei Negativkontrollen (-) und als Längen- und Mengenstandard der 1kb-Marker (M) aufgetragen.

Bei der herkömmlichen, nicht-kompetitiven Thermocycler-PCR erfolgte daran anschließend die densitometrische Auswertung der Banden mittels der AIDA-Software. Der so ermittelte integrale Intensitätswert jeder Bande wurde, um die Proben verschiedener Gelläufe vergleichbar zu machen, auf den Wert der ebenfalls gemessenen 506/517 bp Bande des Längenstandards, welcher immer in derselben Verdünnung mitgeführt wurde, bezogen. Zuletzt wurde der Quotient aus standardisiertem BMP-/BMP-Rezeptorexpressionswert und standardisiertem Aktinexpressionswert gebildet.

2.9.5 Realtime-PCR

Das Prinzip der Realtime-PCR beruht auf der Detektion eines Fluoreszenzfarbstoffes, z.B. SYBR-Green, welcher während der Amplifikation ausschließlich an die entstehende doppelsträngige DNA bindet und somit fluoreszent wird. Das heißt, je mehr doppelsträngige

DNA entsteht, umso mehr Fluoreszenzfarbstoff wird gebunden und kann dann nach Anregung bei 480nm umso mehr Fluoreszenzlicht emittieren.

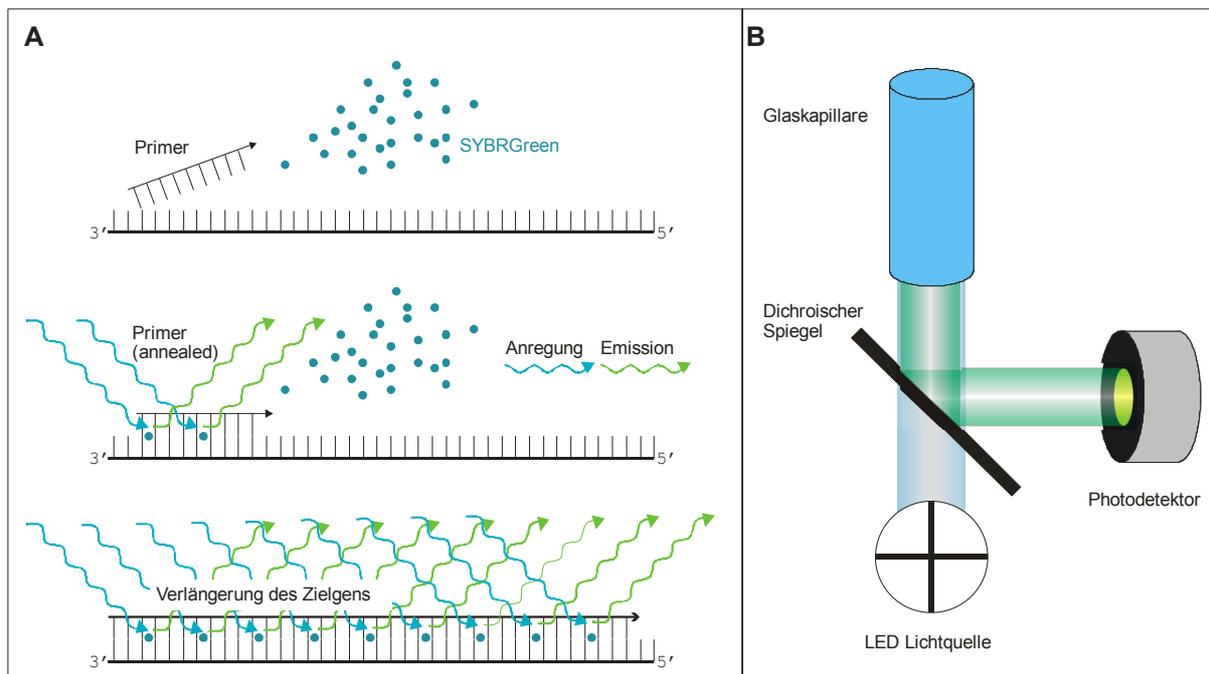


Abbildung 2.3: **A)** Prinzip der Detektion des SYBR-Green-Farbstoffes. Nach Anlagerung des Primers im Rahmen der PCR kommt es während der Elongation zur Bildung eines Doppelstranges, an welchen SYBR-Green bindet. Im DNA-gebundenen Zustand emittiert SYBR-Green Fluoreszenz bei 520nm nach Anregung mit 488nm. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Menge der entstandenen doppelsträngigen DNA. **B)** Aufbau der Detektoreinheit im Lightcycler der Firma Roche. Die PCR-Reaktion erfolgt in einer Küvette, welche von einer LED mit 488nm bestrahlt wird. Das Emissionslicht (520nm) wird von einem dichroischen Spiegel auf den Detektor reflektiert (modifiziert nach (Rasmussen et al. 1998, Roche 2000)

Im Gegensatz zur Thermocycler-PCR erfolgt bei der Real-Time-PCR eine Detektion des entstandenen PCR-Produktes in Echtzeit, eine anschließende quantitative Auswertung mit Hilfe eines Ethidiumbromidgeles ist überflüssig. Die Amplifizierung und Auswertung im Rahmen der Realtime-PCR erfolgte mit dem Lightcycler-System der Firma Roche. Abbildung 2.3 zeigt das Prinzip der Entstehung eines Fluoreszenzsignals bei der Realtime-PCR sowie den Aufbau eines Fluoreszenzdetektors im Lightcycler-Gerät der Firma Roche.

Außer für BMP-2 wurde die Methode der sogenannten „HotStart“-PCR verwendet, bei welcher die Taq-Polymerase zunächst in einem inaktiven Zustand vorliegt und erst nach zehnmütiger Präinkubation bei 95°C ihre volle Aktivität entfaltet. So kann die Bildung unspezifischer Produkte während der Latenzzeit zwischen der Pipettierung der ersten Probe und dem Beginn der PCR verhindert werden.

Folgende Tabelle zeigt den Ansatz für eine „HotStart“-PCR auf dem Lightcycler mit dem LightCycler FastStart DNA Master Plus Sybr Green I-Kit:

Komponente	Endkonzentration	Menge
Aqua dest. steril		12µl
Primer (10µM jeweils)	1µM jeweils	2µl
Master Mix (enthält FastStart Taq DNA Polymerase, Pufferlösung, MgCl ₂ , Sybr Green I, dNTPMix)	1x	4µl

Mit der „HotStart“-PCR war kein spezifisches PCR-Produkt bei der BMP-2-Amplifikation nachzuweisen, so dass hierfür die Methode der herkömmlichen Realtime-PCR mit dem LightCycler – DNA Master Sybr Green I-Kit angewandt wurde. Ein Ansatz dieser Art setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	Endkonzentration	Menge
Aqua dest. steril		12,6µl
Primer (10µM jeweils)	0,5µM jeweils	1,0µl
MgCl ₂ -Lösung, 25mM	3mM	2,4µl
LightCycler – DNA Master Sybr Green (enthält Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP-Mix, Sybr Green, 10mM MgCl ₂)	1x	2,0µl

Der Ansatz von jeweils 18µl wurde gemischt, kurz abzentrifugiert und zu 2µl in einem 0,5ml Reaktionsgefäß vorgelegter cDNA hinzugefügt, mit der Pipette erneut gut vermischt und abzentrifugiert. Die erhaltenen 20µl Reaktionsansatz wurden in eine gekühlte Glaskapillare pipettiert, mit einem Deckel versehen, zentrifugiert und in das Lightcycler-Karussell eingesetzt. Die PCR konnte daraufhin mit Hilfe der Lightcycler-Software gestartet werden.

Die verwendeten Primer entsprechen denen bereits unter 2.9.2 angegebenen. Die folgende Tabelle 2.5 gibt die verwendeten Lightcycler-Programme für die „HotStart“-PCR an:

Tabelle 2.5: Amplifikationsbedingungen für die Hot-Start-Realtime-PCR

Gen	Bedingungen							
	Initiale Denaturierung 95°C, 10 min						Schmelzkurve	
	Amplifikation					Schmelzkurve		
	Denat.	Annealing	Extension	Messung	Zyklen	Denat.	Annealing	Melting
β-Aktin	95°C, 10“	60°C, 10“	72°C, 30“	87°C, 1“	40	95°C, 10“	70 °C, 30“	0,1°C/“, -95°C
BMP-4	95°C, 10“	61°C, 10“	72°C, 25“	85°C, 1“	40	95°C, 0“	65 °C,15“	0,1°C/“, -95°C
BMP-6	95°C, 10“	63°C, 10“	72°C, 25“	86°C, 1“	40	95°C, 0“	65 °C,15“	0,1°C/“, -95°C
BMP-7	95°C, 10“	63°C, 10“	72°C, 25“	86°C, 1“	40	95°C, 0“	65 °C,15“	0,1°C/“, -95°C
BMPRIA	95°C, 10“	60°C, 10“	72°C, 25“	86°C, 1“	40	95°C, 0“	65 °C,15“	0,1°C/“, -95°C
BMPRII	95°C, 10“	62°C, 10“	72°C, 35“	86°C, 1“	40	95°C, 0“	65 °C,15“	0,1°C/“, -95°C

Für die Realtime-PCR von BMP 2 ohne „HotStart“-Bedingungen wurde folgendes Programm verwendet (Tabelle 2.6):

Tabelle 2.6: Amplifikationsbedingungen für die Realtime-PCR von BMP-2

Gen	Bedingungen							
	Initiale Denaturierung 95°C, 30 sec							
	Amplifikation					Schmelzkurve		
	Denat.	Annealing	Extension	Messung	Zyklen	Denat.	Annealing	Melting
BMP-2	95°C, 5“	61°C, 10“	72°C, 35“	84°C, 0“	40	95°C, 10“	60 °C, 20“	0,2°C/“, -95°C

Durch die Echtzeitmessung wird der Produktzuwachs je Zyklus kontinuierlich aufgezeichnet. Es entsteht eine Fluoreszenzintensitätskurve, welche zunächst in eine exponentielle und dann in eine Plateau-Phase mündet. Wie in Abbildung 2.4 dargestellt, wird durch Extrapolation der linearen Phase der sogenannte „crossing-point“ bestimmt, welcher den Zeitpunkt beschreibt, zu welchem das emittierte Signal der entstandenen Produktmenge die Nachweisgrenze übersteigt.

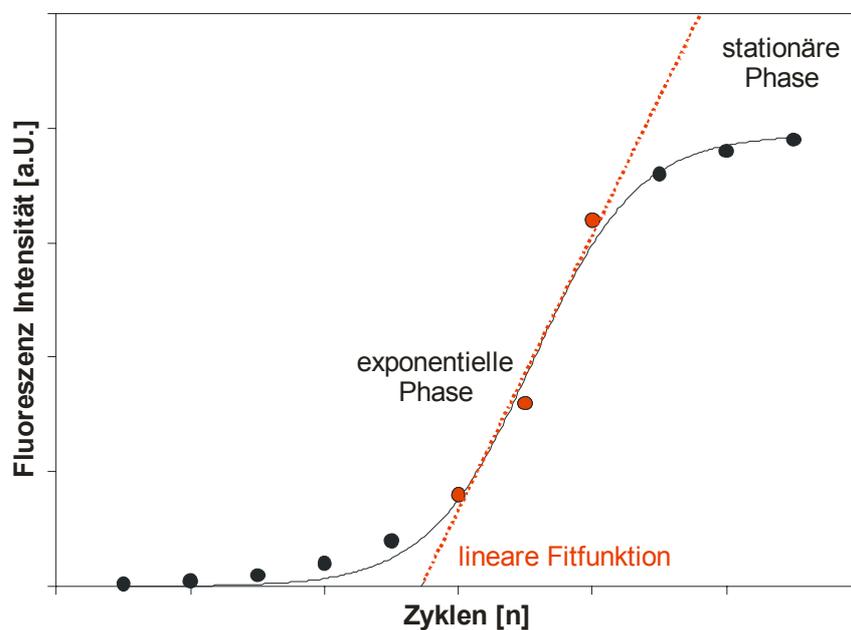


Abbildung 2.4: Theoretischer Ablauf einer Realtime-PCR mit Anstieg der Fluoreszenz in der exponentiellen Phase und Abflachung in der stationären Phase. Mit Hilfe einer linearen Fitfunktion kann der sogenannte „crossing-point“ extrapoliert werden.

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des unter 2.8 beschriebenen Kompetitorfragmentes, welche in jeder Realtime-PCR mitamplifiziert wird, kann eine Standardkurve generiert werden. Diese ordnet jedem „crossing-point“ eine definierte Ausgangskonzentration der Proben zu. Die

Konzentration der Stammlösung des Kompetitorfragmentes beträgt 5µg/ml, die Länge des Kompetitorfragmentes beträgt 609 Basenpaare.

Das Molekulargewicht eines doppelsträngigen Kompetitorfragmentes errechnet sich wie folgt:

$$\text{Anzahl der Basenpaare} \times 660 \text{ daltons/Basenpaar} \quad \text{Formel 1}$$

$$\text{MW (engl. molecular weight)} = 609 \times 660 \text{ daltons} = 401940 \text{ g/mol} \quad \text{Formel 2}$$

$$1 \text{ mol} = 6 \times 10^{23} \text{ Moleküle}$$

$$\frac{6.023 \times 10^{23} [\text{Kopien / mol}] \times \text{Konzentration} [\text{g} / \mu\text{l}]}{\text{MW} [\text{g} / \text{mol}]} = \text{Anzahl} [\text{Kopien} / \mu\text{l}] \quad \text{Formel 3}$$

daraus ergibt sich für Formel 2

$$\frac{6,023 \times 10^{23} [\text{Kopien} / \text{mol}] \times 5 \times 10^{-9} [\text{g} / \mu\text{l}]}{401940 [\text{g} / \text{mol}]} = 7,5 \times 10^9 [\text{Kopien} / \mu\text{l}] \quad \text{Formel 4}$$

Entsprechend dieser Berechnungen ergeben sich die in Tabelle 2.7 aufgeführten Konzentrationen des Kompetitorfragments auf verschiedenen Verdünnungsstufen.

Tabelle 2.7: Anzahl der Moleküle des Kompetitorfragmentes in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe.

Verdünnung	Moleküle/µl
10 ⁰	7,5 x 10 ⁹
10 ⁻¹	7,5 x 10 ⁸
10 ⁻²	7,5 x 10 ⁷
10 ⁻³	7,5 x 10 ⁶
10 ⁻⁴	7,5 x 10 ⁵
10 ⁻⁵	7,5 x 10 ⁴
10 ⁻⁶	7,5 x 10 ³
10 ⁻⁷	7,5 x 10 ²
10 ⁻⁸	7,5 x 10 ¹

Die Standardkurve ist idealerweise eine Ausgleichsgerade durch die fünf (mitamplifiziert wurde das Kompetitorfragment in den Verdünnungsstufen 10⁻⁴ – 10⁻⁸) ermittelten „crossing-points“. Ausreißer wurden bei zu hohen Fehlerschwankungen herausgenommen, so dass die Gerade mindestens durch drei Punkte bestimmt wurde. Ein weiterer Faktor, welcher die Qualität der Standardkurve bestimmt, ist die von der verwendeten Software errechnete Effizienz der PCR. Die Effizienz E einer PCR berechnet sich aus der angegebenen Steigung der Standardkurve nach der Formel

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}} \quad \text{Formel 5}$$

und kann theoretisch maximal den Wert zwei erreichen. Dies entspräche der Verdopplung der PCR-Produkte in jedem Zyklus. In Realität werden seltenen Effizienzen dieser Höhe erreicht, jedoch sollten, damit mehrere PCR-Läufe vergleichbar sind, diese in etwa eine gleiche Effizienz aufweisen (Roche 2000). PCR-Läufe, deren Effizienz deutlich von der Mehrzahl der anderen Läufe abwich, wurden nicht in die weitere Datenverarbeitung miteinbezogen.

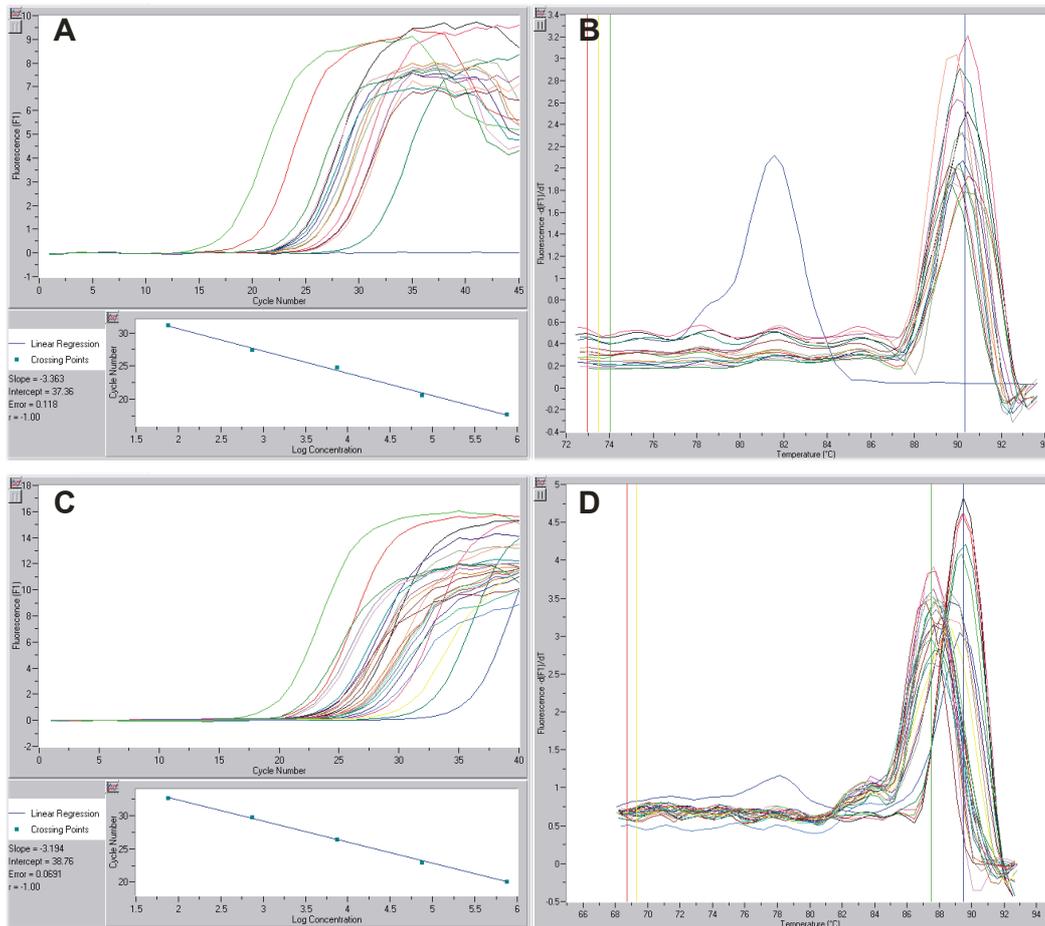


Abbildung 2.5: Typische Ergebnisse einer Realtime-PCR auf dem Lightcycler. **A)** Quantitative PCR für β -Aktin. Im oberen Bildteil ist der Anstieg der Fluoreszenzemission in Abhängigkeit von der Zyklenzahl zu sehen. Die Quantifizierung wird möglich durch das parallele Amplifizieren von fünf Verdünnungsstufen des Kompetitorfragmentes. Aus ihnen lässt sich die im unteren Bildbereich befindliche Standardkurve erstellen. **B)** Schmelzkurvenanalyse des unter A dargestellten PCR-Laufes. Der spezifische Peak des Kompetitorfragmentes als auch der cDNA befindet sich knapp oberhalb 90°C . Die mitgeführte Negativkontrolle (blaue Linie) zeigt keinen Peak im Temperaturbereich $>85^{\circ}\text{C}$, jedoch einen durch unspezifische Produktbildung entstandenen Schmelzkurvengipfel bei ca. 81°C . **C)** Analog zu Abb. A zeigt Abb. C den Anstieg der Fluoreszenz im Rahmen der Amplifikation von BMPR-IA. Auch hier erfolgte die Bildung der Standardkurve mittels der mitgeführten Kompetitorfragmentverdünnungen. **D)** Schmelzkurvenanalyse des unter C dargestellten Laufes. Hierbei zeigen sich – anders als bei der Amplifizierung von β -Aktin – unterschiedliche Schmelzkurvenpeaks für das Kompetitorfragment (ca. $89,5^{\circ}\text{C}$) und die amplifizierte cDNA (ca. $87,5^{\circ}\text{C}$).

Nach Abschluss der Amplifikation erfolgt die sogenannte Schmelzkurvenanalyse. Sie dient der qualitativen Differenzierung entstandener unterschiedlicher PCR-Produkte. Hierzu wird

im Anschluss an den letzten PCR-Zyklus mittels einer Erhitzung auf 95°C die doppelsträngige DNA geschmolzen. Das Lightcycler-Gerät zeigt mittels der ersten Ableitung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur den Schmelzkurvengipfel für jedes entstandene Produkt an. Dessen Höhe und Steilheit beschreibt das Schmelzverhalten eines Produktes und ist nicht Ausdruck der entstandenen Amplifikatmenge. Der Schmelzpunkt wird im Wesentlichen bestimmt durch die Länge des PCR-Produktes, den GC-Gehalt sowie die Kationenkonzentration. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse können so unspezifische Produkte wie beispielsweise Primerdimere durch ihre meist niedrigere Schmelztemperatur und ihren flacheren Verlauf von den spezifischen Produkten unterschieden werden. Abbildung 2.5 zeigt typische Ergebnisse einer Realtime-Quantifizierung sowie deren zugehörige Schmelzkurvenanalyse.

2.10 Normalisierung

Da nicht jeder Patient die gleiche Anzahl von Leukozyten im Blut hat und somit nicht in jedem isolierten Zellpellet gleich viel Material enthalten ist, muss, um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Proben untereinander zu erhalten, eine Normalisierung erfolgen.

Es gibt mehrere Methoden der Normalisierung. Man kann das Expressionsniveau der zu untersuchenden Gensequenz auf den RNA-Gehalt der Probe beziehen oder bei Blutproben auch auf die parallel erhobene Leukozytenzahl. Diesbezüglich soll an dieser Stelle auf die im Anhang zu findenden RNA-Messwerte aller Proben verwiesen werden (Tabelle 7.4). Die Messung des RNA-Gehaltes erfolgte auch, um die Qualität der RNA-Isolierung zu verifizieren. Es fand sich eine Spanne der Messwerte von 2,08 -456 ng/µl. Die Bezugnahme auf die Gesamtleukozytenzahl im Vollblut war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da die aus dem Vollblut, welches in seinem Leukozytengehalt von Patient zu Patient deutlich variierte, gewonnenen Zellpellets vor der RNA-Isolierung aliquotiert wurden und so Proben mit unbekannter Zellzahl entstanden.

Eine andere Möglichkeit – und die letztendlich hier verwendete – ist die relative Quantifizierung mit Hilfe eines Housekeeping-Gens. Auch die Expression von Housekeeping-Genen ist abhängig vom jeweilig untersuchten Gewebe sowie vom Vorliegen einer Erkrankung, insbesondere einer Tumorerkrankung (de Kok et al. 2005). Bezüglich der Untersuchung von Zellen des peripheren Blutes wurde in der Literatur bereits erwähnt, dass β -Aktin zumindest für einen Großteil dieser, nämlich die neutrophilen Granulozyten ein stabiles Housekeeping Gen ist (Zhang et al. 2005). An anderer Stelle wurde β -Aktin mit β -2-Mikroglobulin und Porphobilinogen Deaminase bezüglich der Konsistenz der Expression in Leukozyten gesunder und hämatologisch-onkologisch erkrankter Personen untersucht

(Lupberger et al. 2002). Hierbei zeigte sich zwar eine Überlegenheit für Beta-2-Mikroglobulin, aber dessen Einsatz als Housekeeping-Gen bei der Untersuchung von Non-Hodgkin-Lymphomen verbietet sich, da seine Expression mit dem Krankheitsausmaß korreliert (Johnson et al. 1993, Morra 1999), weswegen es auch als Tumormarker genützt wird. Eine Beeinflussung der Aktinexpression durch die Lymphomerkrankung oder andere Faktoren kann - wie auch für alle anderen zur Wahl stehenden Housekeeping-Gene - nicht definitiv ausgeschlossen werden (Lossos et al. 2003).

Von jeder Probe wurde zur Normalisierung parallel zum Expressionsspiegel des zu untersuchenden Genes die Menge an β -Aktin-Transkript bestimmt und anschließend der Quotient daraus gebildet.

2.11 Sequenzierung

Bei nicht eindeutigen PCR-Ergebnissen konnte die Sequenzierung zur genaueren Identifizierung der PCR-Produkte herangezogen werden, im speziellen war dies bei der Amplifikation von BMP-7 und BMPR-II notwendig.

Hierzu wurde im Anschluss an einen Realtime-PCR-Lauf das PCR-Produkt auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. An den Gellauf anschließend wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaex-Kits (siehe unter 2.8) weiter aufgearbeitet, so dass schließlich 20 μ l aufgereinigte DNA gewonnen werden konnten.

Für die weiteren Reaktionsschritte wurde der CEQ 2000 Quick Start Kit verwendet. Zunächst wurde die verwendete DNA fünf Minuten bei 96°C denaturiert. Der Ansatz für die anschließende Sequenzierreaktion setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	Endkonzentration	Menge
DNA	~ 30ng	3 μ l
Primer (10 μ M)	1 μ M	2 μ l
DTCS	1x	8 μ l
Aqua dest. steril		7 μ l

Die Sequenzierreaktion wurde im Thermocycler mit dem in Tabelle 2.8 aufgeführten Programm durchgeführt:

Tabelle 2.8: Bedingungen für die Sequenzierreaktion.

Bedingungen			
Initiale Denaturierung 95°C, 5 Minuten			
Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
95°C, 45 sec	57°C, 45 sec	60°C, 4 min	34

Daran anschließend erfolgte die ethanolische Fällung. Hierzu wurde zunächst die Stopp-Lösung nach folgendem Ansatz hergestellt:

Komponente	Endkonzentration	Menge
Natrium-Acetat (3M, pH 5,2)	1,2M	2 μ l
EDTA (100mM, pH 8,0)	40mM	2 μ l
Glycogen		1 μ l

Von dieser Stopp-Lösung wurden jeweils 5 μ l zum Sequenzier-Reaktionsansatz hinzugefügt und kurz zentrifugiert. Danach wurden 60 μ l 20°C-gekühlter Ethanol zu jeder Probe hinzugegeben, gevortext und zentrifugiert (30 Minuten, 15000g, 4°C). Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das entstandene Pellet einmalig mit 200 μ l 70%igem, eisgekühltem Ethanol gewaschen und erneut 20 Minuten bei 4°C und 15000g zentrifugiert. Nachdem der entstandene Überstand abgenommen worden war, erfolgte die gekühlte Trocknung des Pellets unter Vakuumbedingungen für 15 Minuten. Anschließend wurden je Probe 30 μ l Sample Loading Solution hinzugefügt, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert und schließlich auf die Platte des Sequenziergerätes aufgetragen. Die Datendarstellung und –bearbeitung erfolgte mit der Clone Manger-Software.

2.12 Statistische Auswertung

Die gesamte statistische Auswertung wurde mit dem Softwarepaket SigmaPlot und SigmaStat durchgeführt. Verwendet wurde hauptsächlich der Mann-Whitney-Rank-Sum-Tests, teilweise mit der Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen. Für den paarweisen Vergleich kam der Wilcoxon-Signed-Rank-Test zur Anwendung. Die Anwendung der einzelnen Tests, sowie die Signifikanzniveaus sind an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil angegeben.

2.13 Verwendete Materialien und Geräte

Alle verwendeten Materialien und Geräte sind in den folgenden beiden Tabellen 2.9 und 2.10 aufgeführt.

Tabelle 2.9: Verwendete Materialien

Substanz	Hersteller	Ort
Blutentnahmemonovette mit Ammoniumheparin	Sarstedt	Nürnberg
Erythrozytenlysepuffer	Quiagen	Hilden
RPMI-Medium	Gibco BRL	Eggenstein
Biocoll Separating Solution, 1,077 g/ml	Biochrom AG	Berlin
PBS-Puffer	Gibco BRL	Eggenstein
EDTA	Sigma	Deisenhofen
RNeasy Mini Kits	Quiagen	Hilden
β -Mercaptoethanol	Sigma	Deisenhofen
Ethanol	Baker	Deventer/Holland
cDNA-Synthesepuffer	Invitrogen	Heidelberg
DTT	Invitrogen	Heidelberg
Random Primer	Invitrogen	Heidelberg
Oligo-dT-Primer	Roche	Mannheim
dNTP-Mix	New England Bio Labs	Frankfurt am Main
RNAasin	Invitrogen	Heidelberg
M-MLV reverse Transkriptase	Invitrogen	Heidelberg
Maxi-Prep-Kit	Quiagen	Hilden
Isopropanol	Roth	Karlsruhe
Aqua dest. steril „Ampuwa“	Fresenius	Bad Homburg
10x Reaktionspuffer für PCR	Quiagen	Hilden
Taq-Polymerase	Quiagen	Hilden
Mineralöl	Sigma	Deisenhofen
Primer	Gibco BRL	Eggenstein
Agarose	Invitrogen	Heidelberg
Tris	Sigma	Deisenhofen
Essigsäure	Riedel-de Haën	Seelze
Ethidiumbromid	Gibco BRL	Eggenstein
SEQ 2000 Sequenzing Kit	Beckman-Coulter	Krefeld
SDS	Sigma	Deisenhofen
Glycerin	Sigma	Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma	Deisenhofen
Restriktionsendonuklease Eco R1	New England Bio Labs	Frankfurt am Main
Quiaex II-Kit	Quiagen	Hilden
Trypton	Sigma	Deisenhofen
Hefe-Extrakt	Sigma	Deisenhofen
1kb-ladder	Gibco BRL	Eggenstein
Primer	Gibco BRL	Eggenstein
Topo-TA-Kloning-Kit	Invitrogen	Heidelberg
One Shot TOP10 F'	Invitrogen	Heidelberg
Agar	Sigma	Deisenhofen

Substanz	Hersteller	Ort
IPTG	Sigma	Deisenhofen
X-Gal	Sigma	Deisenhofen
Quiagen Spin Mini Kit	Quiagen	Hilden
CEQ 2000 Quick Start Kit	Beckman Coulter	Krefeld
Natrium-Acetat	Sigma	Deisenhofen

Tabelle 2.10: Verwendete Geräte und Software.

Gerät	Hersteller	Ort
Thermocycler „Biometra Trio“	Biometra	Göttingen
Reaktionsgefäß 0,5ml	Eppendorf	Hamburg
Gelapparatur „Biometra Agagel Mini bzw. Maxi“	Biometra	Göttingen
Hoefler Mighty Slim, 5x250 Power Supply	Hoefler	San Francisco
Ultraviolettgeltisch Herolab easy	Herolab	Heidelberg
LKB Biochrom, 2103 Power Supply	Biochrom	Berlin
Aida-Gelwertungungs-Software	Raytest	Straubenhardt
Lightcycler	Roche	Mannheim
Lightcycler-Software, Version 3.5	Roche	Mannheim
Spektrophotometer “NanoDrop”	Peqlab Biotechnologie	Erlangen
ND-1000 Software V3.1	Peqlab Biotechnologie	Erlangen
Speed Vac	Eppendorf	Hamburg
CEQ 2000 Sequencer	Beckman-Coulter	Krefeld
Sigmaplot 9.0	Systat	Erkrath
SigmaStat 3.0	Systat	Erkrath
Clone Manager Software	Sci Ed	Cary NC, USA
Heraeus Megafuge 2.0R	Heraeus	Hanau
Kleine Zentrifuge	Eppendorf 5415C	Hamburg

3 Ergebnisse

Mit Hilfe der im Kapitel Material und Methoden beschriebenen Leukozytenisolierung mittels Ficoll-Methode oder Erythrozytenlyse, der RNA-Isolierung und schließlich cDNA-Synthese wurden sowohl Blutproben von 46 Patienten als auch von zehn gesunden Vergleichspersonen aufbereitet und anschließend einer quantitativen PCR zur Darstellung des BMP-Expressionsmusters zugeführt.

Untersucht wurden die Expressionsspiegel von BMP-2, -4, -6, -7 sowie BMP-Rezeptor-IA und -II. Diese Auswahl enthält somit jeweils zwei BMPs der zwei größeren BMP-Untergruppen sowie jeweils einen Vertreter der beiden BMP-Rezeptorgruppen.

Alle Werte wurden dann auf die getrennt erhobene Expression des Housekeeping-Gens Aktin bezogen, so dass im Folgenden immer relative Expressionswerte dargestellt sind.

Im Verlauf der Etablierung der PCR-Analytik wurden zunächst die semi-quantitative RT-PCR und ihre Sonderform, die kompetitive PCR, sowie später die Realtime-PCR verwandt, wobei mit Hilfe letzterer der Hauptanteil der vorgestellten Ergebnisse erhoben wurde.

Die BMP-/BMP-Rezeptor-Expressionsprofile der Patienten wurden denen der gesunden Vergleichspersonen gegenübergestellt und das Patientenkollektiv anschließend noch bezüglich der Merkmale Lymphomentität, Geschlecht, Krankheitsstadium und Knochenmarkbefall weiter differenziert.

Bei zwölf Patienten wurden im weiteren Krankheitsverlauf gewonnene Proben bezüglich ihrer BMP-/BMP-Rezeptor-Expression untersucht und im Kontext mit dem Krankheits-/Therapieverlauf dargestellt.

Bei fünf Patienten wurden mit Hilfe unterschiedlicher Methoden der Leukozytenisolierung (Erythrozytenlyse/Ficoll-Methode) verschiedene Leukozytenfraktionen auf ihr BMP-/BMP-Rezeptorexpressionsmuster überprüft und einander gegenübergestellt.

3.1 Patientenkollektiv

Bei den untersuchten Probanden handelt es sich um 46 Patienten der Abteilung für Hämatologie/Onkologie der Klinik für Innere Medizin der FSU Jena sowie um zehn gesunde Vergleichspersonen (siehe hierzu auch Unterkapitel 2.1).

Den Unterlagen der Patienten konnte aus histopathologischen Berichten die genaue Lymphomdifferenzierung, aus der durchgeführten Ausbreitungsdiagnostik das Stadium der Erkrankung sowie aus den bei jedem Lymphompatienten vorliegenden Ergebnissen der

Knochenmarkpunktion eine Aussage bezüglich des Knochenmarkbefalls entnommen werden. Das mediane Lebensalter zum Zeitpunkt der Probenentnahme lag bei den Patienten bei 54 Jahren, der Mittelwert des Alters bei 54,6 Jahren. Unter den untersuchten erkrankten Personen sind 21 weiblichen Geschlechts, 25 männlichen Geschlechts.

Während des Zeitraumes der Probenasservierung erfolgte eine Umstellung der bis dahin geltenden Kiel-Klassifikation zunächst auf die „REAL“- und schließlich auf die aktuelle WHO-Klassifikation maligner Lymphome. Soweit möglich, wurden die vorliegenden histologischen Untersuchungsergebnisse in ihrer Diagnose der aktuellen WHO-Klassifikation angepasst. Entsprechend dieser finden sich im Patientenkollektiv 20 Patienten mit diffus-großzelligem Lymphom, acht Patienten mit Follikelzentrumslymphom, sieben Patienten mit einer CLL, drei Patienten mit Mantelzelllymphom, zwei Patienten mit großzelligem mediastinalem B-Zell-Lymphom sowie jeweils ein Patient mit T-lymphoblastischem Lymphom, Marginalzonenlymphom der Milz, lymphoplasmozytischem Lymphom und primär cerebralem, diffus-großzelligem Lymphom. Bei zwei Patienten lag keine genauere Subspezifizierung vor; sie konnten lediglich als hochmalignes bzw. niedrigmalignes Lymphom registriert werden.

Die Vergleichsgruppe der gesunden Normalpersonen bestand aus insgesamt zehn, freiwillig teilnehmenden Personen, darunter zwei Männer und acht Frauen. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme fand sich bei Ihnen kein Hinweis auf ein malignes oder anderes akutes oder chronisches Krankheitsgeschehen. Das mediane Alter betrug 30,5 Jahre, das gemittelte Alter 32,5 Jahre.

Im Patientenkollektiv sind Proben von fünf CLL-Patienten enthalten, deren Blut sowohl nach der Ficoll-Methode als auch durch Erythrozytenlyse aufgearbeitet wurde. Auf den Vergleich dieser beiden Methoden wird im Unterpunkt 3.6 weiter eingegangen.

Die genauen Daten der Patienten und Normalpersonen sind Tabelle 7.2 und Tabelle 7.3 im Anhang zu entnehmen.

Da manche Patienten durch Wegzug, Tod oder Wechsel des Behandlers einer weiteren Probenentnahme nach Diagnosestellung nicht mehr zugänglich waren, konnten lediglich bei zwölf Patienten Verlaufspuben im weiteren Krankheitsverlauf gewonnen werden.

Mit Hilfe der Patientendokumente konnte der zeitliche Ablauf der Krankheitsgeschichte mit dem Datum der jeweiligen Probenentnahme korreliert werden. Die genauen Angaben diesbezüglich finden sich in Tabelle 3.7 im Unterkapitel 3.7.

3.2 Etablierung der PCR-Analytik

Zur Quantifizierung von mRNA bedarf es eines stabilen PCR-Protokolls, um eine hohe Zuverlässigkeit bei der Durchführung von Messwiederholungen und eine optimale Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Probenmessungen zu erhalten.

Zunächst erfolgte die Quantifizierung mit der unter 2.9.3 beschriebenen Methode der kompetitiven PCR. Zu diesem Zeitpunkt waren 23 Patientenproben entnommen worden, deren cDNA mit Hilfe der kompetitiven PCR bezüglich der Aktinexpression untersucht wurde.

Die Methode wies zwar bezüglich der Quantifizierung eindeutige Ergebnisse auf, stellte sich jedoch aufgrund des hohen Probenumsatzes (für jede Probe sind bei Einfachmessung für ein Zielgen minimal vier, maximal neun PCR-Probenansätze notwendig) als unpraktikabel dar.

Alternativ zur kompetitiven PCR ist es möglich mit Hilfe der densitometrischen Auswertung der auf dem Ethidiumbromidgel im Anschluss an eine RT-PCR erscheinenden Banden eine semiquantitative Messmethode aufzubauen (siehe hierzu 2.9.4). 23 Patientenproben wurden mit Hilfe dieser Methode hinsichtlich ihrer BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA und -II-Expression und zehn Normalpersonen bezüglich ihrer BMP-2-Expression untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Unterkapitel 3.4.1 erläutert.

Während es sich bei der RT-PCR um eine Endpunkt-Analyse handelt, steht mit der Realtime-PCR eine Methode zur Verfügung, bei welcher durch kontinuierliche Quantifizierung der entstehenden PCR-Produkte in „Echtzeit“ eine Messung in der exponentiellen Phase der PCR und nicht wie bei der herkömmlichen PCR in der Plateauphase möglich ist. Wie in Abbildung 3.1 ersichtlich, kann eine Endpunktmessung zur falschen Ergebnisinterpretation führen, da sich in der Plateauphase einer PCR die PCR-Produktmengen trotz unterschiedlicher Ausgangskopienzahl angleichen können. Das Erreichen der Plateauphase ist u.a. bedingt durch die fallende Konzentration der PCR-Reagenzien, zunehmende Enzyminstabilität und Produktinhibition.

Des Weiteren bietet die Realtime-PCR den Vorteil, dass der bei der RT-PCR notwendige Schritt der Gelauswertung – und somit auch eine potenzielle zusätzliche Fehlerquelle - durch kontinuierliche Fluoreszenz-Messung entfällt.

Aufgrund der geschilderten Vorteile wurde nach den Vorversuchen mit kompetitiver und RT-PCR ein Realtime-PCR-Protokoll etabliert und mit dessen Hilfe das BMP-Expressionsprofil für insgesamt 87 Proben ermittelt.

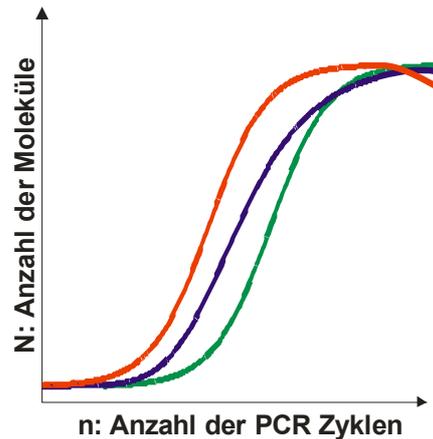


Abbildung 3.1: Darstellung typischer Kurven einer PCR-Amplifikation. Jede Kurve besteht aus einer Anfangsphase, einer exponentiellen Phase und einer Plateauphase. Die rote Kurve zeigt den Verlauf einer PCR mit hoher Ausgangskonzentration und hoher Effizienz. Die blaue Kurve zeigt eine PCR mit hoher Ausgangskopienzahl und niedriger Amplifikationseffizienz. Die grüne Kurve stellt eine PCR mit niedriger Ausgangskonzentration und hoher Effizienz dar (modifiziert nach (Roche 2000)).

3.3 Korrelation zwischen RNA-Gehalt und Aktinexpression

Wie bereits in Kapitel 2.10 erwähnt, wurde zur Normalisierung jeweils auf die Aktinexpression der untersuchten Probe Bezug genommen.

Unter der Annahme, dass der RNA-Gehalt einer Probe direkt proportional zu deren Zellzahl ist, wurde in Abbildung 3.2 der RNA-Gehalt und die Aktinexpression einer Probe gegeneinander aufgetragen.

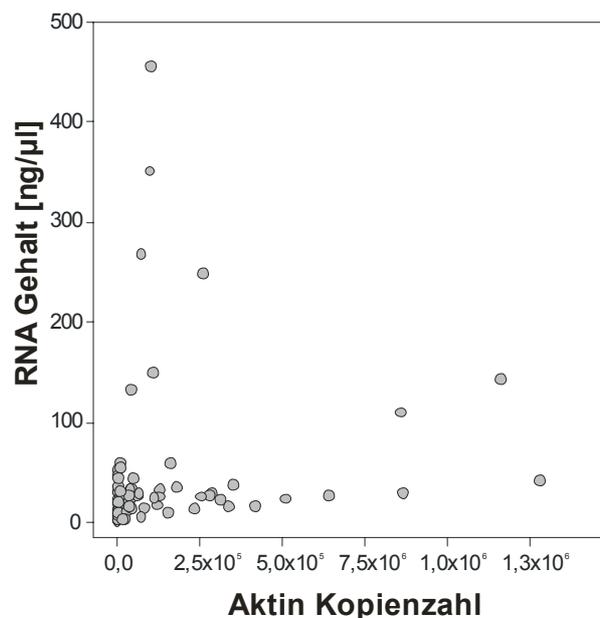


Abbildung 3.2: Mittels Realtime-PCR gemessene Aktin-Kopienzahl aufgetragen gegen den zuvor gemessenen RNA-Gehalt einer Probe.

Es zeigt sich eine signifikant positive, jedoch schwache Korrelation zwischen dem RNA-Gehalt und der gemessenen Aktinexpression einer Probe (Pearsons Korrelationskoeffizient 0,335, $p < 0,05$). Dies lässt vermuten, dass die Aktinexpression direkt proportional zum Zellgehalt einer Probe ist und als Housekeeping-Gen geeignet ist.

3.4 Expression von BMPs und BMP-Rezeptoren

3.4.1 Semi-quantitative RT-PCR

Wie bereits unter 3.2 erwähnt, wurden 23 Patientenproben zunächst mittels RT-PCR auf ihre relative BMP- bzw. BMP-Rezeptor-Expression untersucht. Zusätzlich wurde von zehn Normalpersonen die relative BMP-2- jedoch nicht die Expression der anderen BMPs bzw. Rezeptoren erfasst, da zu diesem Zeitpunkt bereits die Umstellung auf die Realtime-PCR erfolgte.

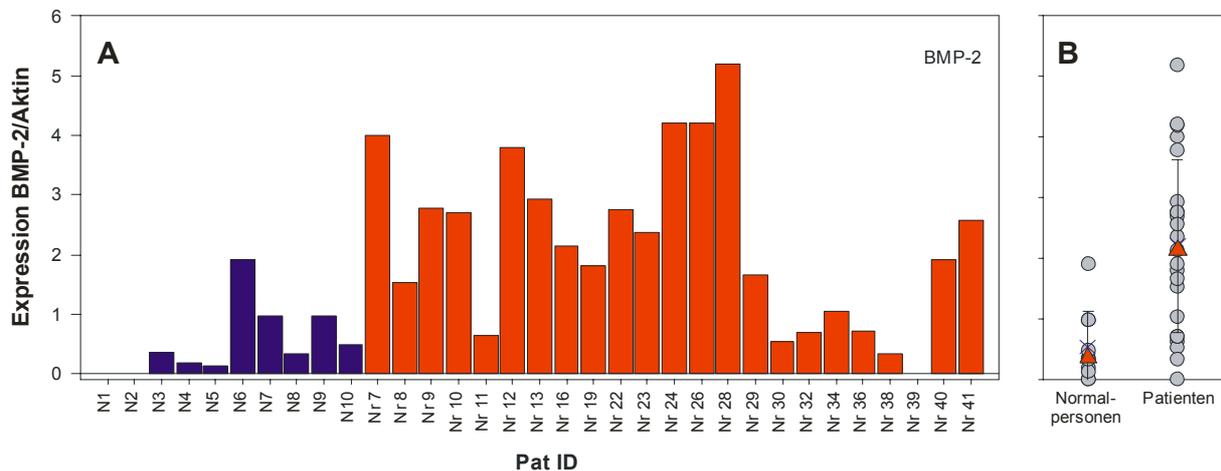


Abbildung 3.3: Darstellung des relativen, mittels konventioneller PCR erhobenen BMP-2-Expressionsniveaus bei 10 Normalpersonen (blau) und 23 Patienten (rot). **A)** Darstellung in Form eines Balkendiagrammes. **B)** Darstellung in Form eines Dotplots. ▲ gibt den Medianwert und × den Mittelwert an. Die eingetragenen Balken entsprechen der Standardabweichung.

Wie in Abbildung 3.3 ersichtlich, liegt das relative Expressionsniveau für BMP-2 bei den Normalpersonen niedriger (range 0-1,9) als bei den Patienten (range 0-5,2).

Mit Hilfe des Mann-Whitney-Rank-Sum-Tests für nicht-normalverteilte Merkmale lässt sich auf einem Signifikanzniveau von 0,001 eine signifikant höhere relative BMP-2-Expression bei den Patienten gegenüber Normalpersonen feststellen. Für die Normalpersonen betrug der Median der relativen BMP-Expression 0,345, der Mittelwert 0,535, für die Patienten zeigte sich ein Median von 2,132 sowie ein Mittelwert von 2,196.

Für die Expressionsanalyse von BMP-4, -6, -7, BMPR-IA und -II mittels semi-quantitativer RT-PCR liegen wie bereits erwähnt keine Vergleichsdaten für Normalpersonen vor. Trotzdem

sollen die erhobenen Ergebnisse in Form des relativen Expressionspiegels ohne statistische Auswertung hier dargestellt werden.

In Abbildung 3.4 zeigt sich, dass mit Hilfe der Thermocycler-PCR bei allen untersuchten Proben eine deutliche Expression von BMP-4 und BMP-RIA nachweisbar ist.

Nicht dargestellt ist die minimale bzw. fehlende Expression von BMP-6, -7 und BMP-RII: Nur zwei Proben exprimierten BMP-6 in einem nachweisbaren Bereich. Überhaupt keine Expression war zu finden für BMP-7 und BMP-RII. Bezüglich des Expressionsprofils ist zu bemerken, dass Proben mit niedriger BMP-4-Expression auch eine niedrigere BMP-RIA-Expression aufweisen und ebenso eine höhere BMP-4-Expression meist mit einer höheren BMP-RIA-Expression einhergeht.

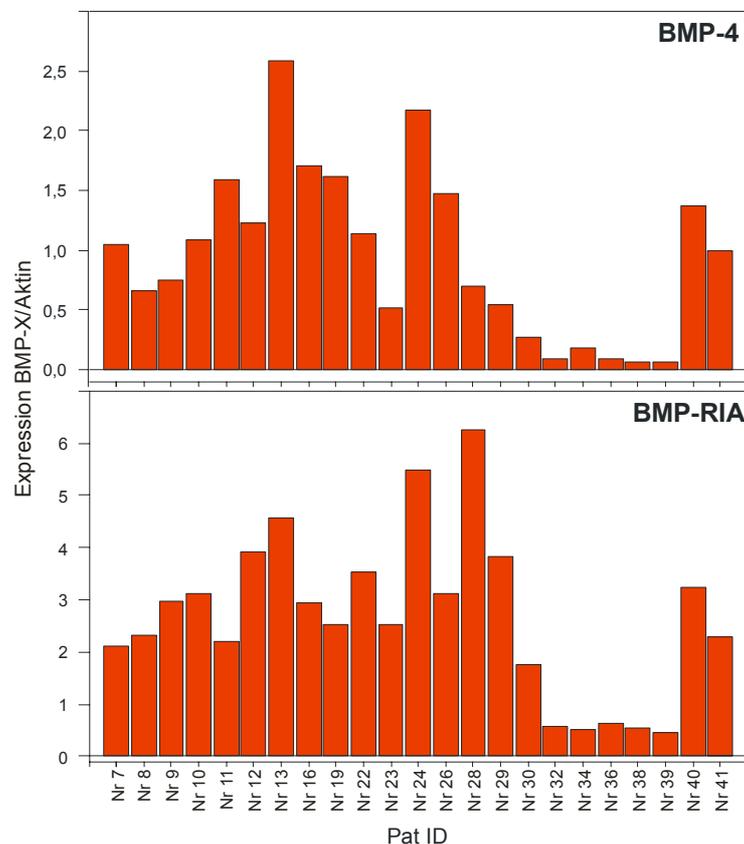


Abbildung 3.4: Darstellung des relativen, mittels RT-PCR erhobenen BMP-4 und BMP-RIA - Expressionsniveaus bei 23 an einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankten Personen.

3.4.2 Realtime-PCR

Bis zum Zeitpunkt der Umstellung von RT-PCR auf Realtime-PCR konnten weitere Patientenproben und auch Verlaufspalten entnommen werden, so dass 87 Proben (46 Patienten, zehn Normalpersonen, fünf Vergleichsproben nach Ficoll-Präparation, 26

Verlaufspuren) mit Hilfe dieser Methode auf die Expression des Housekeeping-Gens β -Aktin sowie die Expression von BMP-2, -4, -6, -7, BMP-Rezeptor IA und -II untersucht werden konnten. Jede Messung wurde mindestens dreimal durchgeführt, so dass es sich bei den in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnissen um Mittelwerte aus unabhängigen Wiederholungen handelt.

Wie unter 2.9.5 im Material- und Methodenteil beschrieben, liefert das Light-Cycler-System am Ende einer Messung einen aus dem jeweiligen Crossingpoint mit Hilfe einer mitgeführten Standardkurve ermittelten Kopienzahlwert, welcher so zur weiteren Berechnung übernommen wurde. Die hier im Folgenden abgebildeten Werte sind relative Expressionswerte, d.h. sie sind der Quotient aus Kopienzahl eines BMPs/BMP-Rezeptors und der Kopienzahl des β -Aktin einer Probe.

Nachstehende Abbildung 3.5 zeigt die relative BMP-/BMP-Rezeptor-Expression der zehn Normalpersonen und 46 Patienten.

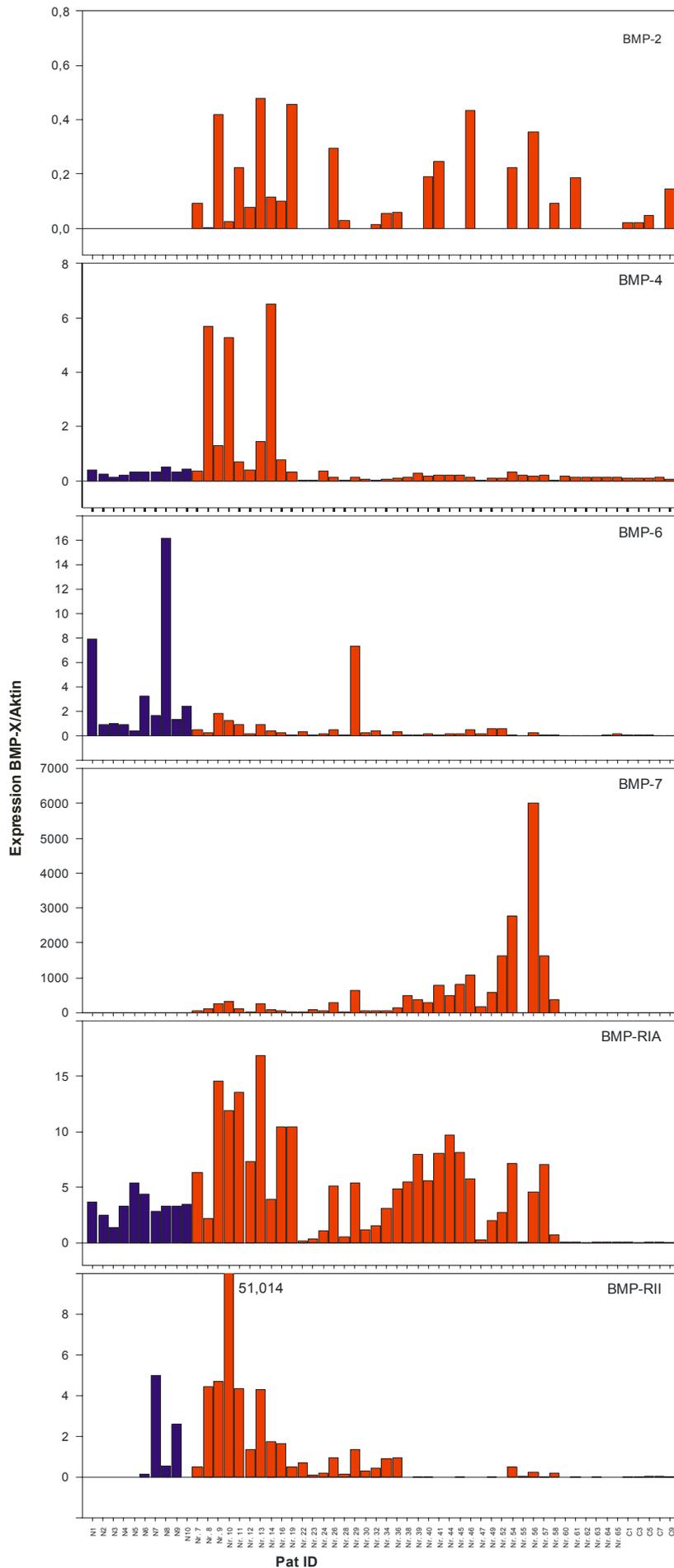


Abbildung 3.5: Darstellung der mittels Realtime-PCR ermittelten relativen BMP-/BMP-Rezeptor-Expression für zehn Normalpersonen (blau) und 46 an einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankten Patienten (rot).

Wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist, unterscheiden sich die Expressionsprofile der verschiedenen BMPs/BMP-Rezeptoren deutlich. Während bei BMP-2,-4,-7 und BMP-Rezeptor IA innerhalb der Gruppe der Normalpersonen eine relativ homogene Expression zu finden ist, zeigt das Patientenkollektiv bei allen untersuchten Genen sowie die Normalpersonen bei BMP-6 und BMPR-II eine deutlich heterogene Expression.

Die Untersuchung der verschiedenen BMPs/BMP-Rezeptoren zeigt sehr unterschiedliche Expressionsniveaus für die einzelnen Gene. Die höchsten relativen Expressionswerte findet man für BMP-7 (Quotienten haben einen Wert bis zu 6004), die niedrigsten für BMP-2 (Maximalwert 0,59).

Im Vergleich zur herkömmlichen RT-PCR ist anzumerken, dass die Sensitivität der Lightcycler-PCR größer als diejenige der konventionellen PCR zu sein scheint, da hierbei bei allen sechs untersuchten Genen eine Expression detektiert wird, wohingegen bei der Thermocycler-Quantifizierung bei zwei Genen (BMP7 und BMPR-II) keine und bezüglich BMP-6 lediglich eine geringfügige Expression festgestellt werden kann.

3.5 Expressionsvergleiche gebildeter Subkollektive

3.5.1 Vergleich der Normalpersonen mit den Patienten

Im Folgenden sind die relativen Expressionsspiegel der zehn Normalpersonen denen der insgesamt 46 Lymphompatienten gegenübergestellt.

Abbildung 3.6 zeigt diese Gegenüberstellung jeweils für BMP-2, -4, -6, -7, BMP-RIA und -II mit Angaben zum Median, dem Mittelwert und dessen Standardabweichung.

Ebenfalls wie in Abbildung 3.5 musste in Abbildung 3.6 die Skalierung dem jeweiligen relativen Expressionsniveau des entsprechenden BMPs/BMP-Rezeptors angepasst werden.

Abgesehen von BMP-6 findet sich durchwegs in der deutlich größeren Patientengruppe eine erwartungsgemäß größere Streuung der einzelnen Messwerte um den Mittelwert als bei den Normalpersonen.

Betrachtet man Abbildung 3.6, so ist auf den ersten Blick lediglich für BMP-6 ein signifikanter Unterschied zwischen den Normalpersonen und den Patienten anzunehmen. Dieser Eindruck entsteht vor allem dadurch, dass alle Ausreißer mit abgebildet sind und so

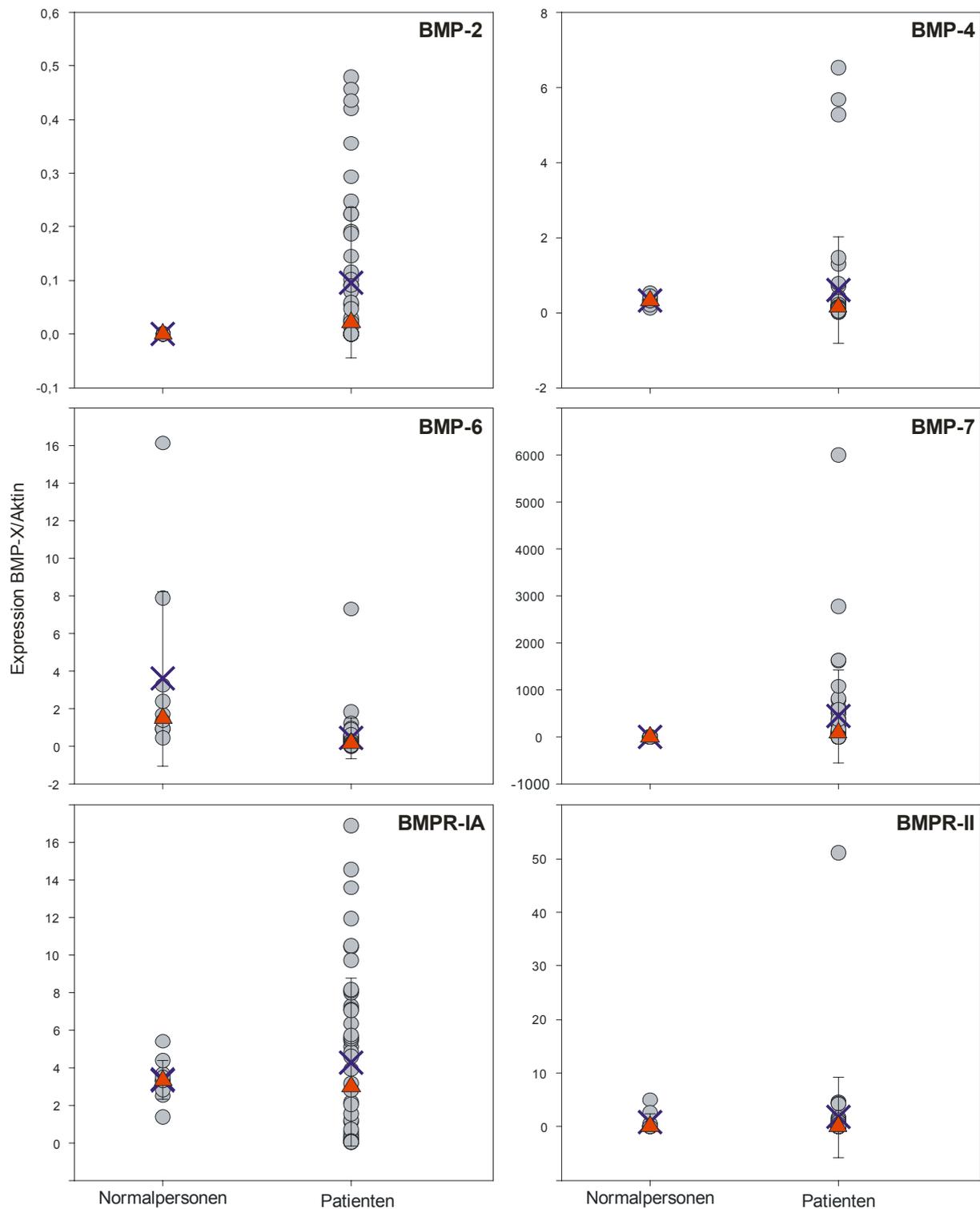


Abbildung 3.6: Gegenüberstellung des relativen Expressionsniveaus der zehn Normalpersonen und der 46 an einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankten Patienten für BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA und -II. ● kennzeichnet jeweils den Messwert einer Person, ▲ den Medianwert und × den Mittelwert einer Gruppe. Bei den eingetragenen Balken handelt es sich um die Standardabweichung des Mittelwertes.

teilweise eine ungünstige Skalierung gewählt werden musste (siehe BMP-4 und BMP-7), welche die Unterschiede zwischen den Medianwerten marginal erscheinen lassen. Die Medianwerte sind deshalb in Tabelle 3.1 nochmals aufgeführt.

Tabelle 3.1: Medianwerte der relativen BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA- und BMPR-II-Expression bei Normalpersonen im Vergleich zur Gesamtheit der Patienten.

	BMP2	BMP4	BMP6	BMP7	BMPR-IA	BMPRII
Normalpersonen (n=10)	0	0,313	1,530	0	3,321	0
Patienten (n=46)	0,021	0,142	0,162	91,86	2,975	0,050

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Mann-Whitney-Rank-Sum-Testes für nicht-normal-verteilte Probenkollektive. Dieser Test arbeitet mit den Medianwerten, welche weniger anfällig für Ausreißer sind als die entsprechenden Mittelwerte.

Bezüglich BMP-2 zeigt sich mit Hilfe des Mann-Whitney-Rank-Sum-Test auf einem Signifikanzniveau von $p=0,006$ eine signifikant höhere Expression bei den Patienten im Vergleich zu den Normalpersonen. BMP-2 wurde von den Normalpersonen nicht exprimiert, der Mittelwert und der Median der Normalpersonen liegen dementsprechend bei 0, der Mittelwert der Patienten bei 0,096, der Median bei 0,021.

Betrachtet man Abbildung 3.5, so scheint zumindest für einige Patientenproben eine deutlich höhere BMP-4-Expression zu bestehen als bei den Normalpersonen. In Abbildung 3.6 ist zu sehen, dass durch die Unempfindlichkeit gegenüber Ausreißern der Medianwert der Patienten für die BMP-4-Expression dem der Normalpersonen sehr nahe ist und sogar anders als entsprechend Abbildung 3.5 zu erwarten wäre unter dem der Normalpersonen liegt. So zeigt sich denn auch statistisch für BMP-4 eine signifikant höhere Expression bei den Normalpersonen als bei den Patienten (Signifikanzniveau von 0,024). Der Median der Normalpersonen liegt hierbei bei 0,313, der der Patienten bei 0,142, wohingegen die Mittelwerte gegenläufig bei 0,316 und 0,596 liegen.

Für BMP-6 liegt das Expressionsniveau signifikant bei den Normalpersonen höher als bei den Patienten ($p<0,001$). Für die Normalpersonen ergibt sich hierbei ein Mittelwert von 3,604 und ein Median von 1,530, für die Patienten beträgt der Mittelwert 0,437, der Median 0,162.

Bei den Untersuchungen zu BMP-7 konnte keine Expression desselben bei den Normalpersonen nachgewiesen werden. Demzufolge lag die BMP-7-Expression bei den Patienten höher, und zwar signifikant auf einem Niveau von $p<0,001$. Der Mittelwert lag hierbei bei 441,38 und der Median bei 91,9.

Ein statistisch nicht signifikanter Unterschied ergibt sich in der Expression des BMP-Rezeptors IA. Der Mittelwert der Normalpersonen liegt bei 3,36, der Median bei 3,321. Der Mittelwert der Patienten liegt bei 4,29, der Median bei 2,975.

Ebenfalls nicht signifikant ist der Expressionsunterschied bei BMP-Rezeptor II. Einem Mittelwert von 0,825 und einem Median von 0 bei den Normalpersonen steht ein Mittelwert von 1,767 und ein Median von 0,05 bei den Patienten gegenüber.

Zusammenfassend ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Normalpersonen für die Expression von BMP-2, BMP-4, BMP-6 und BMP-7, wobei für BMP-2 und BMP-7 eine erhöhte Expression und für BMP-4 und -6 eine verminderte Expression bei den Patienten nachweisbar ist.

3.5.2 Korrelation zwischen Expressionsmuster und Lymphomentität

Die Verteilung der einzelnen Lymphomentitäten gleicht im vorliegenden Patientenkollektiv in etwa größeren Patientenkollektiven wie beispielsweise dem des Tumorregisters München. Die am häufigsten dort auftretenden Non-Hodgkin-Lymphom-Entitäten sind die Chronisch Lymphatische Leukämie (18,8%), das folliculäre Lymphom (16,8%), das diffus-großzellige Lymphom (14,5%), das Immunozytom (6,2%) sowie das Mantelzelllymphom (3,6%) (Schmidt et al. 2004). Abgesehen vom Immunozytom entspricht dies den ebenfalls in dieser Arbeit am häufigsten vorzufindenden Entitäten (20 Patienten mit einem diffus-großzelligem Lymphom, acht Patienten mit einem Follikelzentrumslymphom, sieben Patienten mit einer CLL sowie drei Patienten mit einem Mantelzelllymphom). Sie werden im Folgenden untereinander sowie mit der Gruppe der Normalpersonen verglichen.

Die Daten von Patienten, deren Entität nur sehr wenig im Gesamtpatientenkollektiv vertreten ist (z.B. primär zerebrales Lymphom), werden bei dieser Betrachtung nicht berücksichtigt.

Abbildung 3.7 zeigt die relativen Expressionsspiegel von BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA sowie BMPR-II (A-F) aufgeschlüsselt nach den einzelnen Lymphomentitäten. Zum Vergleich sind jeweils die relativen Expressionsspiegel der Normalpersonen mit aufgetragen.

Wie in den vorangegangenen Abbildungen wurden auch in Abbildung 3.7 durch unterschiedliche Skalierung die Unterschiede im Expressionsniveau der einzelnen Gene berücksichtigt.

Zur übersichtlicheren Darstellung sind in Tabelle 3.2 die Medianwerte der einzelnen Lymphomentitäten für die jeweiligen Gene wiedergegeben.

Mit Hilfe des Mann-Whitney-Rank-Sum-Testes wurden alle Lymphomuntergruppen untereinander sowie gegen die Kontrollgruppe auf signifikante Unterschiede getestet. Anschließend wurde mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen, welche auch für kleine Fallzahlen geeignet ist, das Signifikanzniveau festgelegt. Es resultierten vier signifikante Aussagen:

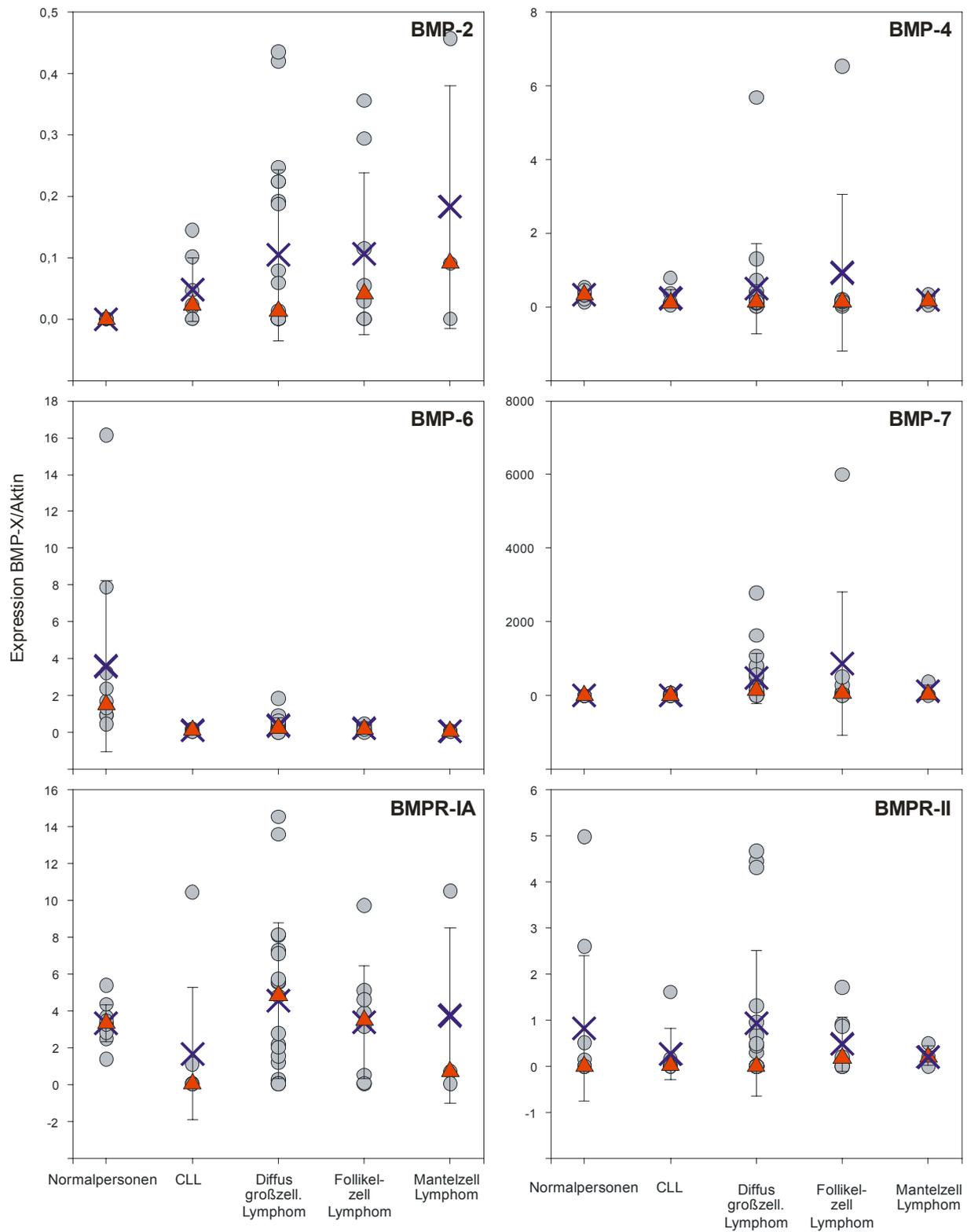


Abbildung 3.7: Vergleichende Darstellung des relativen Expressionsniveaus von BMP-2,-4, -6, -7, BMPR-IA und BMPR-II bei gesunden Personen und an unterschiedlichen Non-Hodgkin-Lymphom-Entitäten erkrankten Personen. ● kennzeichnet jeweils den Messwert einer Person, ▲ den Medianwert und × den Mittelwert einer Gruppe. Bei den eingetragenen Balken handelt es sich um die Standardabweichung des Mittelwertes.

Die Gruppe der CLL-Patienten, der Patienten mit diffus-großzelligem Lymphom sowie der Patienten mit folliculärem Lymphom zeigen eine signifikant niedrigere BMP-6-Expression als die Kontrollgruppe. Bezüglich BMP-7 findet sich eine signifikant höhere Expression bei den Patienten mit einem diffus-großzelligem Lymphom als bei den Normalpersonen. Das heißt, dass die bereits zuvor gezeigte verminderte Expression von BMP-6 bei Patienten relativ unabhängig von der Lymphomentität zu sein scheint, wohingegen die erhöhte Expression von BMP-7 bei Patienten im besonderen Maße durch die vermehrte BMP-7-Expression bei Patienten mit einem diffus-großzelligem Lymphom bedingt ist. Der signifikante Expressionsunterschied zwischen Normalpersonen und Patienten bzgl. BMP-2 und -4 hingegen ist nach Auftrennung des Patientengutes entsprechend der häufigsten Entitäten nicht zu bestätigen.

Tabelle 3.2: Medianwerte der relativen BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA- und BMPR-II-Expression bei verschiedenen Lymphomentitäten und Normalpersonen.

	BMP2	BMP4	BMP6	BMP7	BMPR-IA	BMPRII
Normalpersonen (n=10)	0	0.31	1.53	0	3.32	0
CLL (n=7)	0.02	0.11	0.11	0	0.07	0.03
Diffus Großzell (n=20)	0.01	0.13	0.26	161.75	4.82	0.01
Follikel (n=8)	0.04	0.14	0.18	75.94	3.53	0.18
Mantel (n=3)	0.09	0.16	0.08	29.14	0.71	0.2

Hinzuzufügen ist, dass bei einer Patientenzahl von n=3 wie in der Gruppe der Mantelzelllymphompatienten das Erreichen eines hohen Signifikanzniveaus, welches hier bei 0,005 liegt, deutlich erschwert ist.

3.5.3 Korrelation zwischen Expressionsmuster und Geschlecht

Um einen geschlechtsspezifische Abhängigkeit der Expression auszuschließen, wurden die erhobenen BMP-Expressionsprofile jeweils für Männer und Frauen, getrennt nach gesund und krank betrachtet.

Abbildung 3.8 zeigt die relativen Expressionsspiegel der sechs untersuchten Gene aufgliedert nach Geschlecht, sowie unterteilt in Normalpersonen und Patienten.

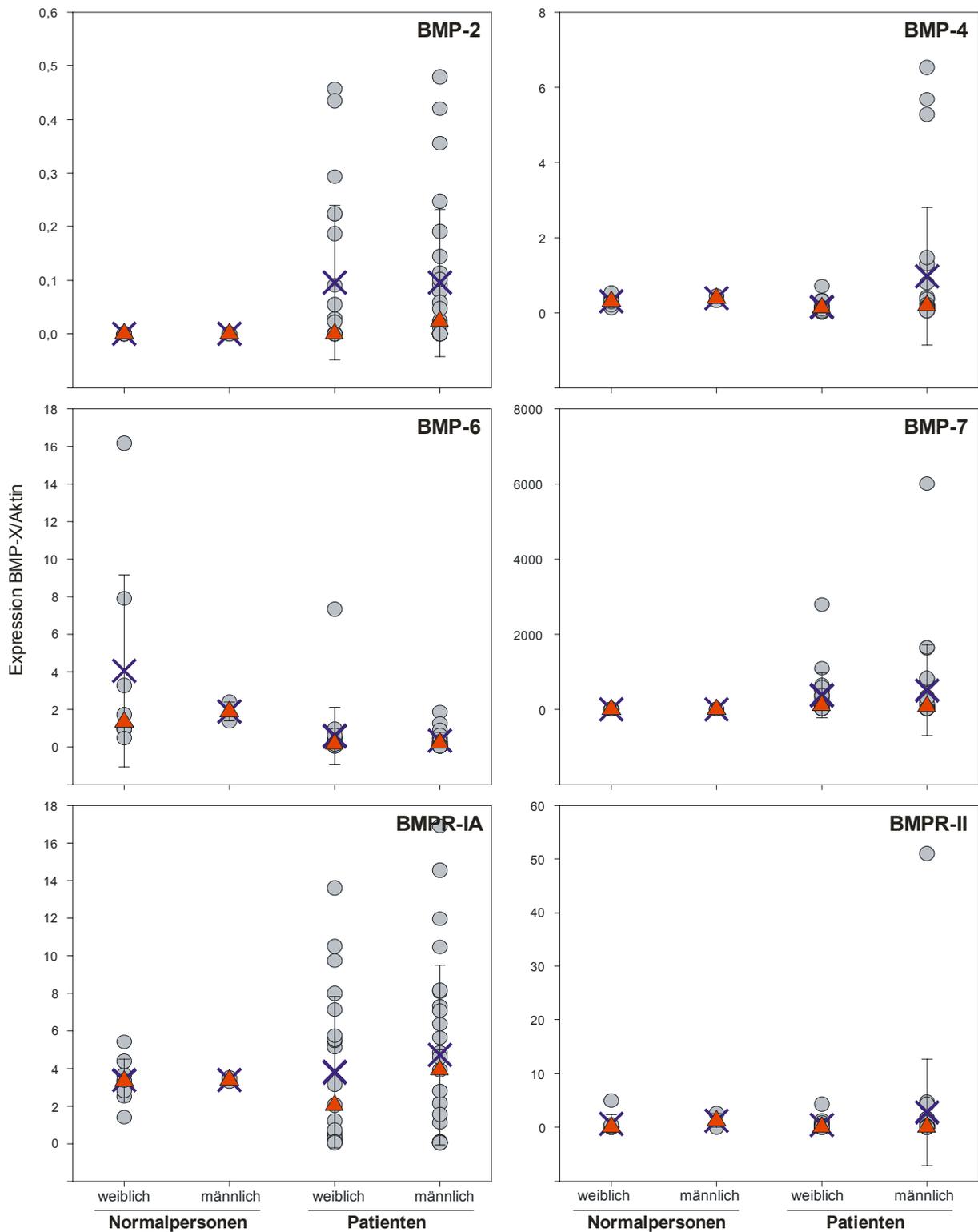


Abbildung 3.8: Gegenüberstellung der relativen Expression von BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA und BMPR-II bei Frauen und Männern, aufgeteilt nach Normalpersonen und Patienten. ● kennzeichnet jeweils den einzelnen Messwert einer Person, ▲ den Medianwert und × den Mittelwert einer Gruppe. Bei den eingetragenen Balken handelt es sich um die Standardabweichung des Mittelwertes.

In Tabelle 3.3 sind die Medianwerte der Expression nochmals aufgeführt.

Tabelle 3.3: Medianwerte der relativen BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA und -II-Expression in Abhängigkeit von Geschlecht und Zugehörigkeit zur Gruppe der Normalpersonen oder Patienten.

		BMP2	BMP4	BMP6	BMP7	BMPR-IA	BMPRII
Normalpersonen	Weiblich	0,0	0,31	1,339	0,0	3,321	0,0
	Männlich	0,0	0,372	1,872	0,0	3,387	1,301
Patienten	Weiblich	0,0	0,122	0,131	103,5	2,032	0,073
	Männlich	0,025	0,191	0,196	64,3	3,90	0,028

Mit Hilfe des Mann-Whitney-Rank-Sum-Tests wurden jeweils die Untergruppe der Normalpersonen und der Patienten auf einen signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied im Expressionsmuster untersucht. Hierbei ergab sich für BMP-4 in der Patientengruppe ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern mit einem höheren Expressionsspiegel bei den männlichen Patienten ($p=0,009$). Der Medianwert der BMP-4-Expression lag bei den männlichen Patienten bei 0,191, bei den weiblichen bei 0,122. Alle anderen betrachteten Gene zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern in der Gruppe der Patienten.

In der Gruppe der Normalpersonen ergab sich für keines der untersuchten Gene ein signifikanter Unterschied, wobei hinzuzufügen ist, dass nur zwei gesunde männliche Probanden zur Verfügung standen.

3.5.4 Korrelation zwischen Expressionsmuster und Ann Arbor-Stadium

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem Stadium der Erkrankung und der Expression eines BMPs bzw. seines Rezeptors darzustellen, wurden die untersuchten Patientenproben entsprechend ihrem zum Zeitpunkt der Blutentnahme diagnostiziertem Stadium einer Gruppe zugeteilt. Zur Vereinfachung bei unterschiedlichen Klassifikationen wurden die Proben von CLL-Patienten nicht miteinbezogen. Der Gruppe „frühe Stadien“ wurden Patienten im Stadium I oder II nach Ann-Arbor zugewiesen ($n=11$), die Gruppe „späte Stadien“ besteht aus Patienten, deren Erkrankung im Stadium III oder IV nach Ann-Arbor diagnostiziert wurde ($n=27$). Diese beiden Gruppen wurden mit der Gruppe der Normalpersonen ($n=10$) verglichen. Abbildung 3.9 zeigt die Ergebnisse.

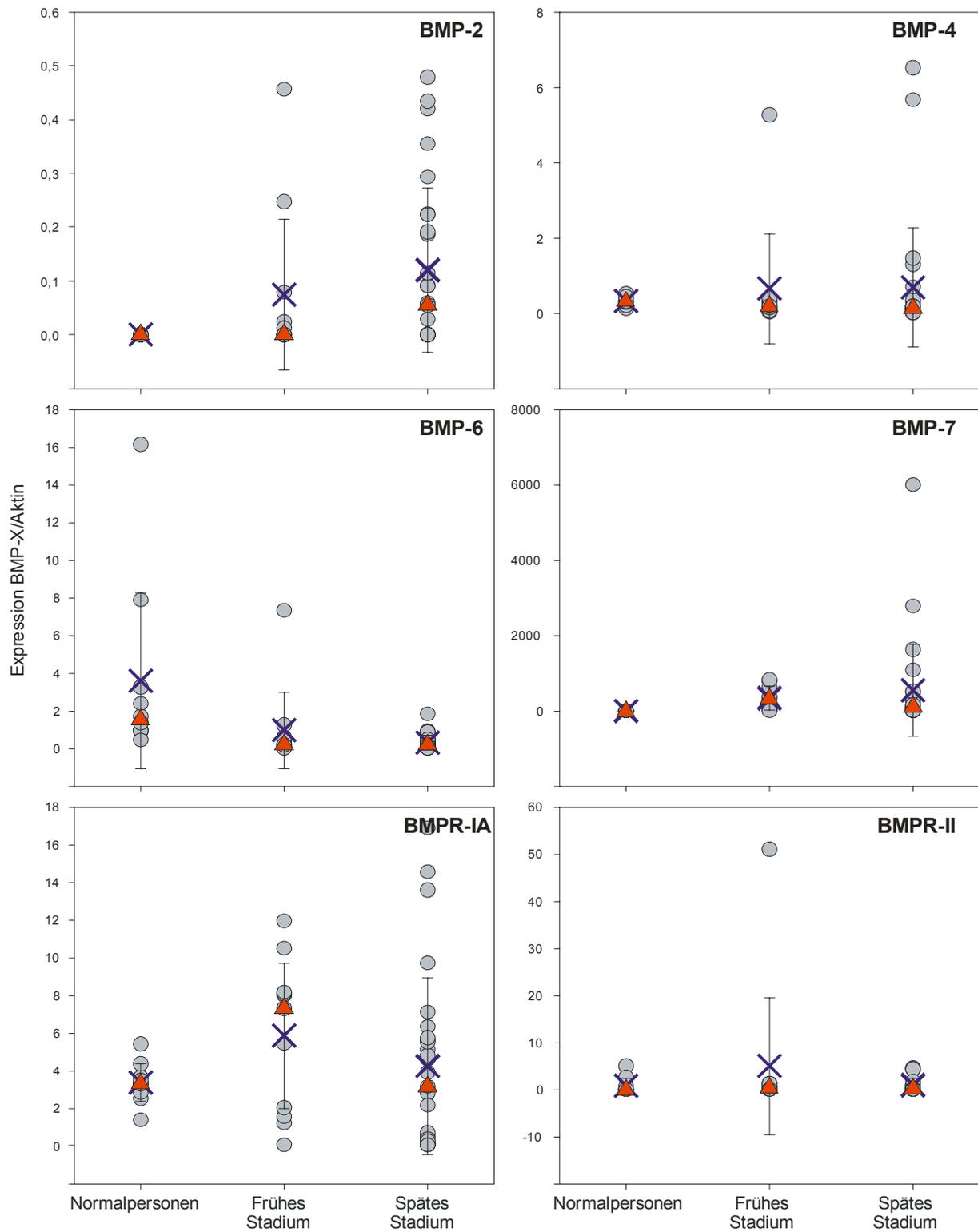


Abbildung 3.9: Darstellung der BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA- und BMPR-II-Expression in Abhängigkeit vom Stadium der Lymphomerkkrankung sowie bei gesunden Vergleichspersonen. ● kennzeichnet jeweils den einzelnen Messwert einer Person, ▲ den Medianwert und × den Mittelwert einer Gruppe. Bei den eingetragenen Balken handelt es sich um die Standardabweichung des Mittelwertes.

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse sind diese nochmals in Tabelle 3.4 einzeln aufgeführt.

Tabelle 3.4: Medianwerte der BMP-2,-4, -6, -7, BMPR-IA- und BMPR-II-Expression bei Patienten eines frühen oder späten Stadiums sowie bei Normalpersonen

	BMP2	BMP4	BMP6	BMP7	BMPRIA	BMPRII
Normalpersonen (n=10)	0	0,31	1,53	0	3,32	0
frühes Stadium (n=11)	0	0,2	0,2	321,3	7,3	0,3
spätes Stadium (n=27)	0,05	0,13	0,18	103,4	3,16	0,14

Auch hier wurden zunächst die einzelnen Stadiengruppen untereinander sowie gegen die Kontrollgruppe mit Hilfe des Mann-Whitney-Rank-Sum-Test getestet und für Mehrfachtestungen das Signifikanzniveau mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur auf $p=0,016$ festgelegt. Als signifikant erwies sich die vermehrte Expression von BMP-2 bei den späten Stadien gegenüber den Normalpersonen, die erniedrigte BMP-6-Expression sowohl der Gruppe der frühen als auch der späten Stadien gegenüber den Normalpersonen sowie die Mehrexpression von BMP-7 bei beiden Patientengruppen gegenüber den Normalpersonen. Alle Expressionsunterschiede zwischen den Patienten mit frühen und späten Stadien sind nicht signifikant. Es bestätigt sich also, dass die BMP-7-Expression mit dem Eintreten der Krankheit zunimmt und die BMP-6-Expression hingegen abnimmt. Die vorbeschriebene vermehrte BMP-2-Expression bei Patienten (siehe 3.5.1) zeigt sich jedoch erst in einem späten Erkrankungsstadium.

3.5.5 Korrelation zwischen Expressionsmuster und Knochenmarksbefall

Ein Knochenmarksbefall im Rahmen einer Non-Hodgkin-Lymphomerkrankung unterstellt einen leukämischen Verlauf der Erkrankung, welcher mit einer erhöhten Anzahl von Lymphomzellen im peripheren Blut assoziiert ist. Da dies Auswirkungen auf das untersuchte BMP-Expressionsprofil haben kann, sollen die Patientenproben im Folgenden entsprechend ihres Knochenmarkbefundes gegenübergestellt werden.

Im Rahmen der Ausbreitungsdiagnostik bei Erstdiagnose eines malignen Lymphoms wurde bei allen Patienten des untersuchten Kollektivs routinemäßig eine Beckenkammbiopsie durchgeführt.

In Abbildung 3.10 werden die Patienten entsprechend ihres Befundes - nachweisbarer Knochenmarkbefall (n=14) oder kein Knochenmarksbefall (n=32) - einander gegenübergestellt und mit den Normalpersonen (n=10) verglichen.

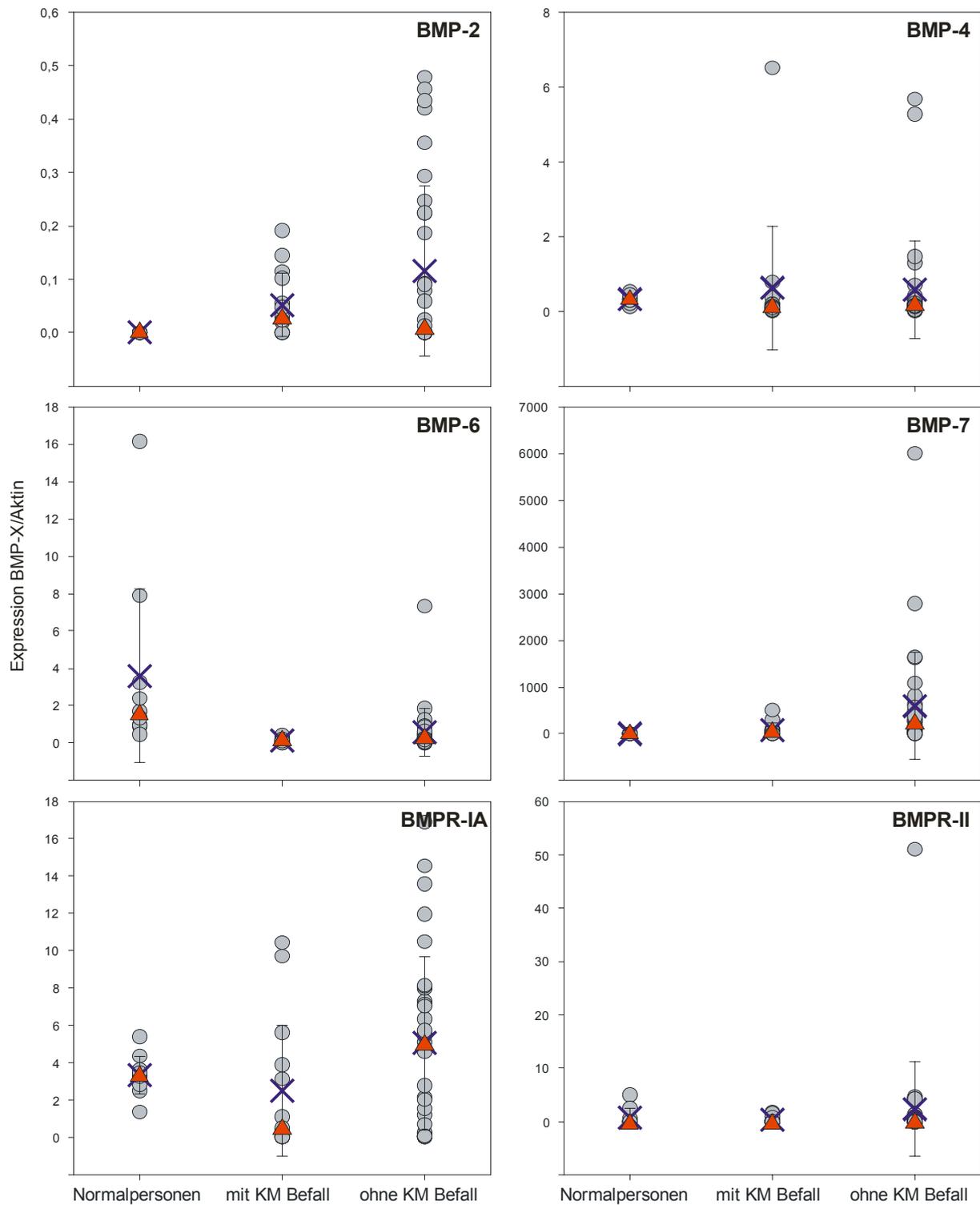


Abbildung 3.10: Relatives Expressionsniveau von BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA und BMPR-II in Abhängigkeit vom Vorliegen eines Knochenmarkbefalls. ● kennzeichnet jeweils den einzelnen Messwert einer Person, ▲ den Medianwert und × den Mittelwert einer Gruppe. Bei den eingetragenen Balken handelt es sich um die Standardabweichung des Mittelwertes.

Zur besseren Veranschaulichung sind die Medianwerte in Tabelle 3.5 nochmals aufgeführt.

Tabelle 3.5: Medianwerte der BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA- und BMPR-II-Expression in Abhängigkeit vom Knochenmarkbefund.

	BMP2	BMP4	BMP6	BMP7	BMPRIA	BMPRII
Normalpersonen (n=10)	0	0,31	1,53	0	3,32	0
mit KM-Befall (n=14)	0,03	0,11	0,11	36,74	0,47	0,03
ohne KM-Befall (n=32)	0,01	0,15	0,23	212,69	4,97	0,2

Nach Testung der beiden Patientengruppen untereinander sowie gegen die Gruppe der Normalpersonen mit Hilfe des Mann-Whitney-Rank-Sum-Testes wurde erneut durch Anwendung der Bonferroni-Korrektur das Signifikanzniveau festgelegt ($p < 0,017$).

Ähnlich wie bei der Darstellung der Expressionsprofile in Abhängigkeit vom Stadium, zeigt sich hier eine signifikant erhöhte Expression von BMP-2 und verminderte Expression von BMP-6 bei Patienten, unabhängig vom Knochenmarkbefall. Ebenfalls signifikant ist die vermehrte Expression von BMP-7 bei Patienten ohne Knochenmarkbefall, jedoch nicht bei Patienten mit Knochenmarkbefall.

3.6 Vergleich zwischen Erythrozytenlyse und Ficoll-Aufreinigung

Da unklar ist, ob eine im Vollblut nachweisbare veränderte BMP-Expression Folge einer Anreicherung von Lymphomzellen in der Blutbahn ist oder es sich um ein durch das Lymphom bei Leukozyten ausgelöstes Phänomen handelt, wurde folgende Untersuchung durchgeführt:

Es gibt zwei gängige Methoden der Isolierung weißer Blutkörperchen aus dem Vollblut. Bei der Erythrozytenlyse werden die Erythrozyten durch selektive Lyse entfernt. Dabei verbleiben alle anderen Zellbestandteile des Vollblutes für die weitere Aufarbeitung erhalten, d.h. alle Leukozyten, also Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten. Bei der etwas aufwändigeren Ficoll-Methode werden mit Hilfe eines sogenannten „Ficoll-Kissen“, welches eine Dichte von $1,077\text{g/cm}^3$ besitzt, mononukleäre Zellen, d.h. Lymphozyten und Monozyten, von Erythrozyten und Granulozyten separiert.

Hilfreich für die Klärung oben angeführter Frage wäre ein Zustand, bei welchem nachgewiesenermaßen ein erheblicher Anteil von Tumorzellen im Blut zirkuliert, welche dann auch noch weitestgehend isoliert von den anderen Leukozyten untersucht werden können. Eine Erkrankungssituation, die diesem Zustand in etwa entspricht ist die Chronisch

Lymphatische Leukämie mit Leuko- und Lymphozytose. Bei den hierbei im Blut zirkulierenden Lymphozyten handelt es sich überwiegend um klonal proliferierte, neoplastische Zellen und da die CLL definitionsgemäß ein Lymphom ist, somit um Lymphomzellen. Bereitet man nun Blut eines CLL-Patienten mit Leuko- und Lymphozytose mit Hilfe der Ficoll-Methode auf, so erhält man ein Leukozytenpräparat, welches nahezu ausschließlich aus Tumorzellen besteht. Im Gegensatz dazu enthält das Zellpellet nach Erythrozytenlyse alle Leukozytenarten.

Für fünf CLL-Patienten wurde sowohl die Leukozytenisolation mittels Erythrozytenlyse als auch mittels Ficoll-Aufreinigung durchgeführt und anschließend die daraus resultierenden zehn Proben mittels Realtime-PCR auf ihre BMP-/BMP-Rezeptor-Expression untersucht. In Abbildung 3.11 werden sie einander gegenüber gestellt.

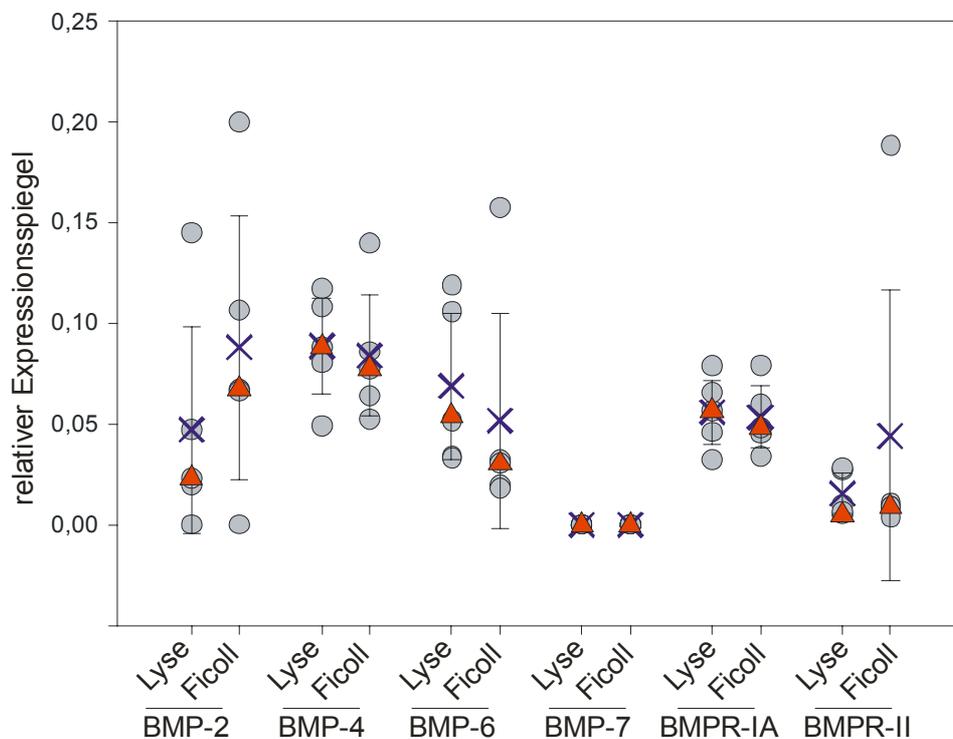


Abbildung 3.11: Darstellung der relativen Expression von BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA und BMPR-II bei fünf CLL-Patienten, deren Blut jeweils einmal einer Erythrozytenlyse und einmal einer Ficoll-Präparation zugeführt wurde. ● kennzeichnet jeweils den einzelnen Messwert einer Person, ▲ den Medianwert und × den Mittelwert einer Gruppe. Bei den eingetragenen Balken handelt es sich um die Standardabweichung des Mittelwertes.

Unterschiede in der Expressionsanalyse zwischen Ficoll- und Erythrozytenlyse zeigen sich insbesondere bei BMP-2, weniger bei BMP-6 und BMPR-II, kaum oder gar nicht bei BMP-4, BMP-7 und BMPR-IA.

Mit Hilfe des Wilcoxon-Signed-Rank-Test wurde ein paarweiser Vergleich zwischen den jeweils für eine mittels Erythrozytenlyse und der zugehörigen mittels Ficoll-Methode gewonnenen Probe erhobenen relativen Expressionswerte für BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA und BMPR-II durchgeführt. Für keines dieser Wertepaare ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied.

Zur Veranschaulichung sollen auch hier die Medianwerte der einzelnen amplifizierten Gene in Tabelle 3.6 aufgeführt werden.

Tabelle 3.6: Medianwerte der relativen Expression von BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA und BMPR-II nach Erythrozytenlyse bzw. Ficollpräparation.

BMP	Isolation	Median
BMP-2	Lyse	0,023
	Ficoll	0,067
BMP-4	Lyse	0,088
	Ficoll	0,077
BMP-6	Lyse	0,054
	Ficoll	0,030
BMP-7	Lyse	0,000
	Ficoll	0,000
BMP-RIA	Lyse	0,057
	Ficoll	0,048
BMP-RII	Lyse	$5,0 \times 10^{-3}$
	Ficoll	$8,5 \times 10^{-3}$

3.7 Verlaufspuben

Bei zwölf Patienten konnten nach der ersten Blutentnahme im weiteren Krankheitsverlauf zwischen einer und vier Proben genommen werden, jedoch nicht im gleichen zeitlichen Abstand zur Erstdiagnose. Zu welchem Zeitpunkt des Erkrankungsverlaufes welche Probe entnommen wurde, ist genau Tabelle 3.7 zu entnehmen.

Tabelle 3.7: Übersicht über die untersuchten Verlaufsproben mit Angaben zum Krankheitsverlauf zum Zeitpunkt der Blutentnahme

Probe	Diagnose
Nr.7	hochmalignes B-Zell-NHL, nicht näher klassifiziert
7/1	8 Monate nach Abschluß der Chemo-/Radiotherapie mit Erreichen einer kompletten Remission
7/2	23 Monate nach Abschluß der Chemo-/Radiotherapie mit Erreichen einer kompletten Remission
Nr.10	T-lymphoblastisches Lymphom
10/1	15 Monate nach Therapiebeginn unter weiterhin laufender Chemotherapie
10/2	31 Monate nach Therapiebeginn mit Erreichen einer kompletten Remission, 1 Monat nach Einleitung einer chemotherapeutischen Erhaltungstherapie
Nr.13	großzelliges B-Zell-Lymphom des Mediastinums
13/2	21 Monate nach Abschluß der Chemo- sowie Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation und Erreichen einer kompletten Remission
Nr.14	Follikelzentrumslymphom
14/4	29 Monate nach Diagnosestellung ohne bis dahin notwendige Therapie
14/5	36 Monate nach Diagnosestellung ohne bis dahin notwendige Therapie
Nr.23	niedrigmalignes NHL, nicht näher klassifiziert
23/1	26 Monate nach Beginn einer Chemotherapie mit Erreichen einer partiellen Remission, 12 Monate nach Abschluss einer Strahlentherapie, 4 Monate nach Einleitung einer Interferontherapie
Nr.24	CLL
24/1	13 Monate nach Diagnosestellung ohne bis dahin notwendige Therapie
24/2	25 Monate nach Diagnosestellung ohne bis dahin notwendige Therapie
24/3	37 Monate nach Diagnosestellung ohne bis dahin notwendige Therapie
Nr.26	Follikelzentrumslymphom
26/1	7 Monate nach Abschluß der Chemotherapie mit Erreichen einer partiellen Remission und 6 Monate nach Einleitung einer Interferontherapie
26/2	19 Monate nach Abschluß der Chemotherapie mit Erreichen einer partiellen Remission und 18 Monate nach Einleitung einer Interferontherapie, 4 Monate vor erneutem Progress
Nr.29	großzelliges B-Zell-Lymphom des Mediastinums
29/2	7 Monate nach Abschluß der Chemo-/Radiotherapie mit Erreichen einer kompletten Remission
29/3	17 Monate nach Abschluß der Chemo-/Radiotherapie mit Erreichen einer kompletten Remission
29/4	21 Monate nach Abschluß der Chemo-/Radiotherapie mit Erreichen einer kompletten Remission
Nr.32	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom
32/1	6 Monate nach Abschluß der Chemo-/Radiotherapie mit Erreichen einer kompletten Remission
Nr.47	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom

47/1	2 Monate nach Abschluß der Chemo-/Radiotherapie mit Erreichen einer kompletten Remission
Nr.54	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom
54/1	Z.n. 4 Kursen Chemotherapie mit bereits Erreichen einer kompletten Remission
54/2	1. Rezidiv, Z.n. erneut zwei Kursen Chemotherapie
54/3	Stammzellapheresat
54/4	17 Tage nach Hochdosischemotherapie und 12 Tage nach autologer Stammzelltransplantation (später nachgewiesene komplette Remission)
Nr.55	Lymphoplasmozytisches Lymphom
55/1	Z. n. 2 Kursen Chemotherapie
55/2	1 Monat nach Abschluss von 6 Zyklen konventioneller und 1 Kurs intensivierter Chemotherapie mit Erreichen einer partiellen Remission
55/3	Stammzellapheresat
55/4	1 Monat nach Hochdosischemotherapie und Ganzkörperbestrahlung mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation und Erreichen eines stable disease

Alle Verlaufsproben wurden auf ihr relatives Expressionsniveau von BMP-2, -4, -6, -7 sowie BMP-Rezeptor IA und II hin untersucht. In Abbildung 3.12 sind die relativen, mittels Realtime-PCR erhobenen Expressionswerte der untersuchten Patienten im Verlauf dargestellt. Es handelt sich hierbei ebenfalls um den Mittelwert einer Dreifachmessung je aufgetragenen Messpunkt. Jede Farbe symbolisiert einen Patienten. Bei zwei Patienten (Patientennummer 54 und 55) wurde zusätzlich eine Probe eines entnommenen Stammzellapheresates auf seine BMP-Expression untersucht und in zeitlicher Korrelation jedoch außerhalb der Verbindungsgeraden aufgetragen.

Die Skalierung in Abbildung 3.12 musste den verschiedenen Expressionsniveaus der untersuchten Gene angepasst werden.

Unter der Annahme, dass die BMP-2-Expression bei Lymphompatienten stärker ist als bei gesunden Vergleichspersonen, müsste diese unter Therapie des Tumorleidens zurückgehen. Dies ist auch weitestgehend der Fall, wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist. Lediglich die Proben mit der Nummer 7 und 10 zeigen einen vorübergehenden Anstieg der BMP 2-Expression, wobei sich der Patient mit der Probe Nummer 10 zu diesem Zeitpunkt noch in zytostatischer Behandlung befand. Patienten, bei denen sich bis zum Zeitpunkt der ersten Verlaufskontrolle keine Therapienotwendigkeit ergab, zeigten keine oder nur geringfügige Veränderung der BMP-2-Expression (Proben Nr. 14 und 24).

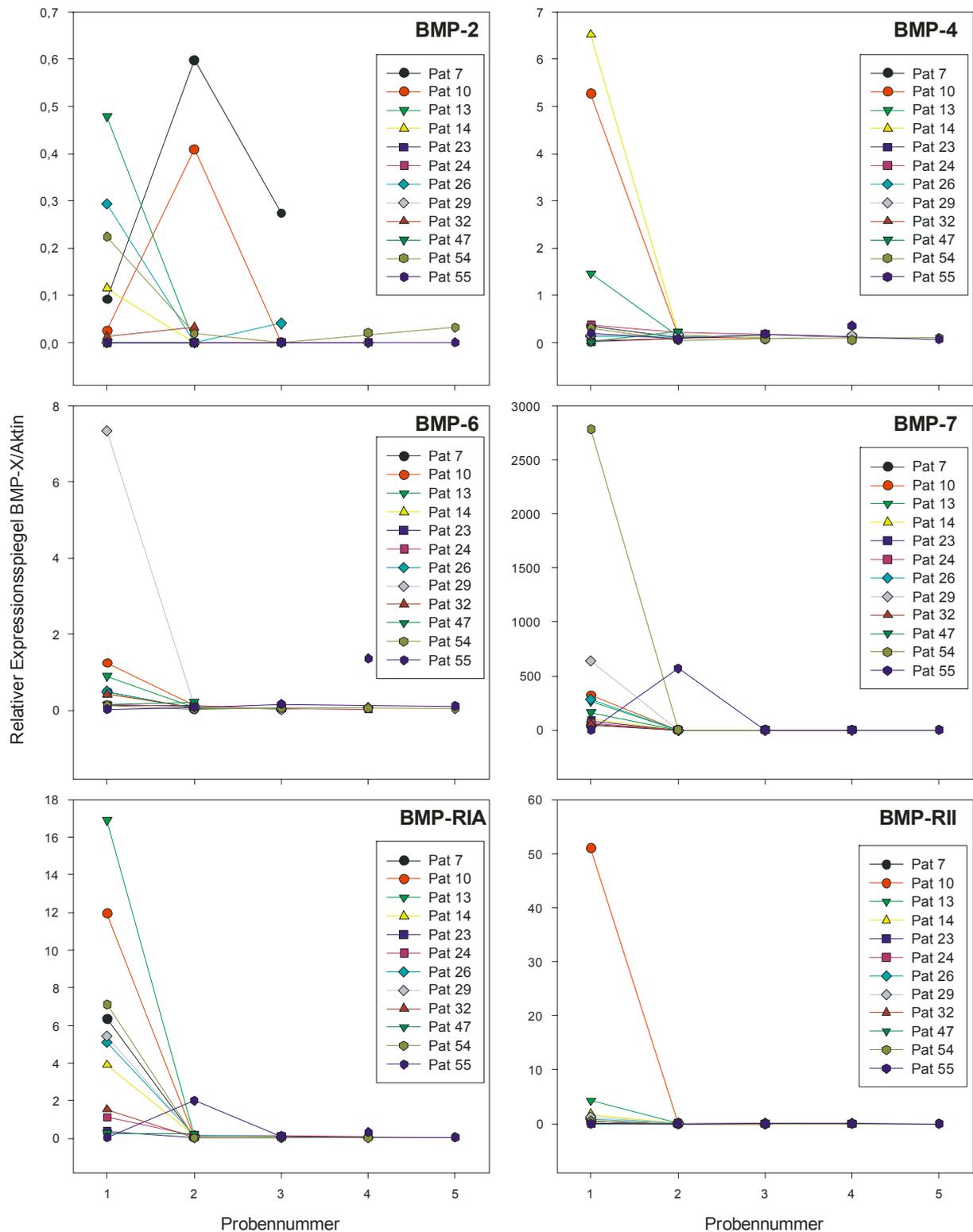


Abbildung 3.12:Verlaufsdarstellung der relativen Expression von BMP-2, -4, -6, -7, BMPR-IA und BMPR-II bei ausgewählten Patienten (siehe hierzu auch Tabelle 3.7). Auf der x-Achse sind die Ausgangsprobe sowie die Verlaufspuren in chronologischer Reihenfolge aufgetragen, wobei die Verlaufspuren der einzelnen Patienten nicht im gleichen zeitlichen Abstand entnommen wurden.

Einen Wiederanstieg im weiteren Verlauf findet man bei den Proben mit der Nummer 26 und 54. Für Probe Nr.54 ist ein Rezidiv zum Zeitpunkt der zweiten Verlaufskontrolle bekannt, bei

der Patientin mit der Probennummer 26 zeigte sich ein Progress des Lymphoms vier Monate nach dem nachgewiesenen Wiederanstieg der BMP-2-Expression.

Die Daten der relativen BMP-4-Expression im Verlauf gestalten sich homogener: lediglich die Proben mit der Nummer 10, 13 und 14 zeigen einen deutlichen Abfall des BMP-4-Expressionsniveaus bei der ersten Verlaufskontrolle. Bei den anderen Proben finden sich nur minimale Schwankungen in der Verlaufsbetrachtung. Da bei den genannten drei Proben keine Parallelität im Krankheitsverlauf besteht (ein Patient befand sich zum Zeitpunkt des Abfalls ohne Therapie, ein zweiter noch in der Chemotherapie und der dritte bereits in kompletter Remission) müssen auch andere Gründe als der Verlauf der Lymphomerkrankung für den Expressionsabfall in Betracht gezogen werden.

Bezüglich der BMP-6-Expression findet sich für Probe 29 (zum Zeitpunkt der ersten Verlaufskontrolle bereits komplette Remission) ein deutlicher Abfall des Expressionsniveaus. Dies kann auch an einer vorangegangenen, relative erhöhten Expression im Vergleich zu den anderen Proben liegen. Ein Zusammenhang zum Verlauf der Lymphomerkrankung ist jedoch nicht sicher darstellbar. Zu erwähnen ist weiterhin die sich deutlich abhebende, erhöhte Expression von BMP-6 im Stammzellapheresat des Patienten mit der Nummer 55.

Die BMP-7-Expression im Verlauf ist geprägt durch einen raschen Abfall der Expression zum Zeitpunkt der ersten Verlaufskontrolle ohne folgenden Wiederanstieg. Insbesondere bei Probe 54, einer Patientin mit einem diffus-großzelligem Lymphom, welches sich später durch einen klinisch sehr aggressiven Verlauf auszeichnete, ist dieser Expressionsabfall zu bemerken. Jedoch kommt es nicht wie zu erwarten wäre bei dem späteren Rezidiv zu einem erneuten Wiederanstieg der BMP-7-Expression. Bei Probe 55 findet sich zum Zeitpunkt der ersten Verlaufskontrolle ein passagerer Anstieg der BMP-7-Expression. Entsprechend den klinischen Angaben befand sich der Patient zu diesem Zeitpunkt noch unter laufender Therapie und der vorübergehende Anstieg steht eventuell im Zusammenhang mit einem primär ungenügenden Therapieansprechen.

Einen nahezu kongruenten Verlauf findet man bei BMP-Rezeptor IA: steiler Abfall am Anfang, außer bei Probe Nummer 55, welche vorübergehend in ihrem Expressionsniveau ansteigt.

Lediglich Probe Nummer 10 zeigt im Verlauf eine Veränderung der BMP-Rezeptor II-Expression: zum Zeitpunkt der ersten Verlaufskontrolle ist die BMPR-II-Expression bei vorbestehender, deutlich erhöhter Expression rückläufig. Es handelt sich hierbei um das einzige betrachtete T-Zell-Lymphom und so besteht gegebenenfalls ein Zusammenhang zwischen der BMPR-II-Expression und T-Zelllymphomen.

Bei zwei Patienten (Nummer 14 und 24) war zu keinem Zeitpunkt der Verlaufsbeobachtung die Indikation zur Therapie eingetreten. Ihre untersuchten Proben zeigen bei allen untersuchten Genen – außer Probe 14 bei BMP-4 – initial eher ein niedriges Expressionsniveau und im Verlauf kaum eine Änderung in der Expression.

Für die Patienten mit der Probennummer 7 und 10 ist aus den klinischen Angaben bekannt, dass sie zehn Monate bzw. elf Monate nach der Entnahme der letzten Verlaufskontrolle an einem Zweitmalignom, nämlich einem follikulärem Lymphom bzw. einem Urothelkarzinom erkrankt sind. Es findet sich jedoch in keinem der Expressionsprofile eine deutlich veränderte BMP-Expression, welche bereits Monate vor der klinischen Diagnose auf das Auftreten einer erneuten malignen Erkrankung hindeuten könnte.

Bzgl. der zwei untersuchten Stammzellapheresate (Probe Nummer 54/3 und 55/3) konnte lediglich eine geringfügig vermehrte BMP-6-Expression für die Probe Nummer 55/3 verzeichnet werden.

Bei den dargestellten Veränderungen im Verlauf handelt es sich um Einzelbeobachtungen, welche lediglich hinweisend für Zusammenhänge zwischen dem Krankheitsverlauf, der Therapie und der BMP-Expression sein können, aber nicht repräsentativ sind.

3.8 Sequenzierung

Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse des Lightcyclersystems ist es möglich, im Anschluss an jedes Experiment die einzelnen Amplifikate auf ihren Schmelzpunkt zu untersuchen. Dies dient der Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten wie beispielsweise Primerdimeren.

Manchmal ist das Ergebnis der Schmelzkurvenanalyse nicht eindeutig, sei es weil ein Amplifikat mehrere Schmelzkurvengipfel aufweist oder weil zwei Proben, bei welchen dasselbe Amplifikat erwartet wird, unterschiedliche Schmelzkurvenverläufe aufzeigen. In solchen Fällen wurde die Sequenzierung zur Differenzierung der PCR-Produkte eingesetzt.

Bei der Schmelzkurvenanalyse einer BMP-Rezeptor-II-PCR, welche in Abbildung 3.13 dargestellt ist, fiel auf, dass eine Probe einen ausgeprägten Schmelzkurvengipfel bei 84°C und einen kleinen bei 88°C aufwies (Probe Nummer 28), während eine andere Probe einen deutlichen Schmelzkurvengipfel bei 90°C (Probe Nummer zehn) zeigte. Letzterer fiel mit dem Schmelzkurvengipfel des Kompetitorfragmentes zusammen.

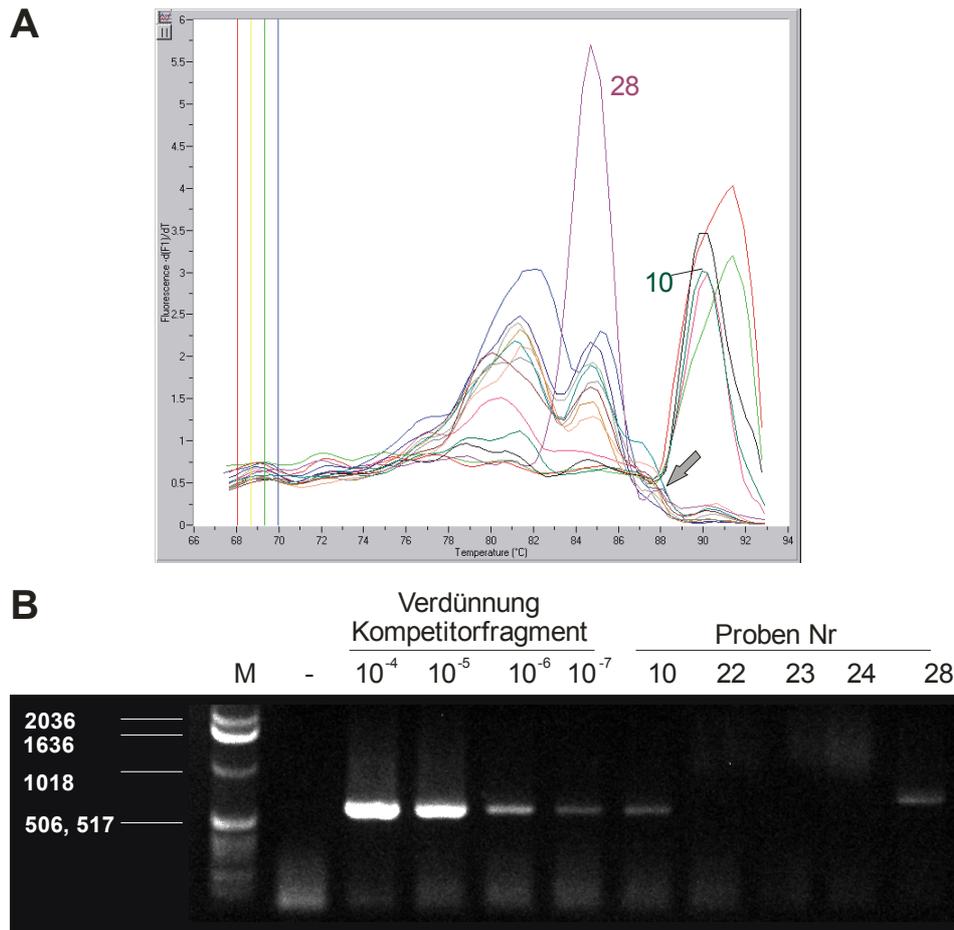


Abbildung 3.13: A) Schmelzkurvenanalyse einer BMPR-II-PCR. Bei ca. 91°C sind die Schmelzkurvengipfel der Verdünnungen des Kompetitorfragmentes sowie von Probe Nummer zehn zu sehen, während bei ca. 84°C und 88°C (Pfeil) die Schmelzkurvengipfel der Probe Nummer 28 zu erkennen sind. (M = 1kB-Marker, - = Negativkontrolle). **B)** In der Anschluss an die Schmelzkurvenanalyse durchgeführten Gelelektrophorese zeigt sich für Probe Nummer zehn eine Bande auf selber Höhe wie das Kompetitorfragment, während die Bande für Probe 28 diskret darüber, auf der erwarteten Höhe eines BMPR-II-Amplifikates liegt.

Um zu klären, welches nun der spezifische BMPR-II-Schmelzkurvengipfel ist, wurden die Proben Nummer zehn und 28 im Anschluss an die Realtime-PCR mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgereinigt und anschließend einer Sequenzierung zugeführt, wobei lediglich die Ergebnisse für Probe Nummer 28 verwertbar waren. Zwischen der sequenzierten Probe und der bekannten BMPR-II-Sequenz fand sich eine Sequenzhomologie von 600 Basenpaaren mit einer Gesamtfehlerrate von 3,43% (siehe 7.3.2). Daraus und aus dem Bild der Gelelektrophorese ist zu schließen, dass Probe zehn mit geringen Mengen Kompetitorfragment kontaminiert war und entweder der Gipfel bei 84°C bzw. der bei 88°C, welche Probe 28 aufweist der spezifische BMPR-II-Gipfel ist. Aus weiteren PCR-Läufen konnte letztendlich die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der definitive Schmelzkurvengipfel für BMPR-II bei 84°C liegt. Dies wurde bei der abschließenden Auswertung berücksichtigt.

Eine weitere Sequenzierung erfolgte bezüglich der genaueren Differenzierung von BMP-7-Amplifikaten. Bei der BMP-7-PCR war aufgefallen, dass manche Produkte ihren Schmelzkurvengipfel bei 93°C und andere bei 90°C besitzen. Bei 90°C findet sich auch der Schmelzkurvengipfel des Kompetitorfragmentes bei der BMP-7-Amplifikation, wie aus Abbildung 3.14 ersichtlich.

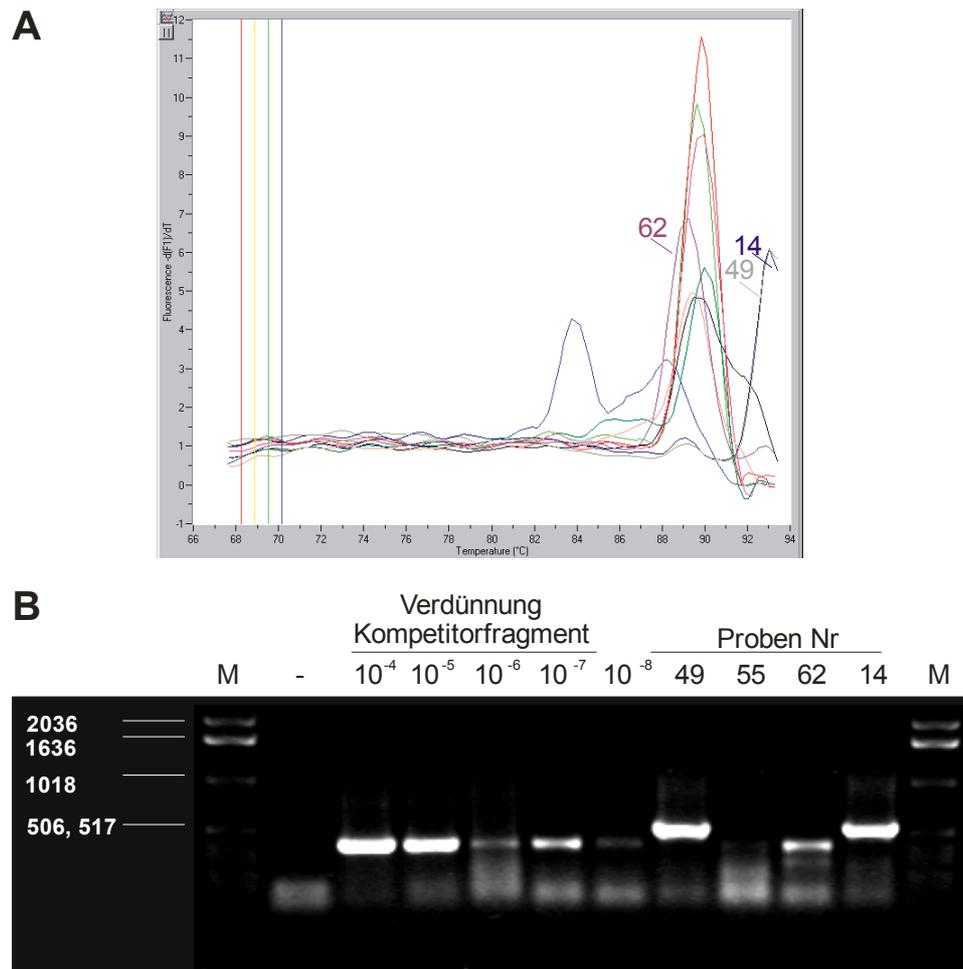


Abbildung 3.14: A) Schmelzkurvenanalyse einer BMP-7-PCR. Bei ca. 90°C sind die Schmelzkurvengipfel von Probe 62 sowie von den Verdünnungen des Kompetitorfragmentes zu sehen, während bei ca. 93°C die Schmelzkurvengipfel der Proben Nummer 14 und 49 zu sehen sind (M = 1kb-Marker, - = Negativkontrolle). **B)** In der anschließend durchgeführten Gelelektrophorese finden sich die Banden der Proben 49 und 14 auf Höhe der zu erwartenden Bande eines BMP-7-Amplifikates, während etwas unterhalb auf Höhe der Kompetitorfragmentverdünnungen die Bande von Probe 62 zu finden ist.

Ein Zusammenfallen der Schmelzgipfel des Kompetitorfragmentes und der zu untersuchenden cDNA ist nicht ungewöhnlich und findet sich zum Beispiel regelhaft bei der β -Aktin-Amplifikation. In diesem Fall jedoch musste eine Aussage getroffen werden, welches der spezifische Schmelzkurvengipfel für BMP-7 ist. Deshalb erfolgte diesbezüglich exemplarisch

die Sequenzierung der Proben Nummer 14, 49, 62, 26 und C7 nach BMP-7-Amplifikation. Während die Proben mit dem höheren Schmelzpunkt (Nummer 14, 49 und 26) eine Sequenzhomologie mit BMP-7 von mindestens 520 bp bei einer Gesamtfehlerrate von 0,65% aufwiesen, zeigte sich für die Proben, deren Schmelzpunkt mit dem des Kompetitorfragmentes zusammenfiel in der Sequenzierung eine Sequenzhomologie mit dem Kompetitorfragment von mindestens 365 bp bei einer Gesamtfehlerrate von 2,65% (siehe 7.3.2). Das bedeutet, der Schmelzkurvengipfel von BMP-7-Amplifikaten liegt bei ca. 93°C, ein Schmelzkurvengipfel der untersuchten Proben bei ca. 90°C ist kontaminationsbedingt. Auch diese Ergebnisse wurden bei der weiteren Datenauswertung berücksichtigt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion untersucht, ob zwischen dem Auftreten einer Non-Hodgkin-Lymphom-Erkrankung und einer Veränderung des BMP-Expressionsprofils ein Zusammenhang besteht.

Bezüglich der hierbei betrachteten Mitglieder der BMP-Familie und deren Rezeptoren konnten folgende wesentliche Ergebnisse festgestellt werden:

- BMP-2 wird bei an einem NHL erkrankten Personen stärker exprimiert als bei gesunden Vergleichspersonen, insbesondere in einem späten Stadium der Krankheit.
- BMP-4 und BMP-6 wird bei gesunden Personen stärker exprimiert als bei NHL-Patienten.
- BMP-7 wird bei an einem NHL, insbesondere einem diffus-großzelligem Lymphom erkrankten Personen stärker exprimiert als bei gesunden Vergleichspersonen.
- Für die Expression der BMP-Rezeptoren IA und II konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden und kranken Probanden sowie bezüglich der zusätzlich betrachteten Merkmale festgestellt werden.
- Lediglich bei Betrachtung der BMP-4-Expression in der Gruppe der Erkrankten ließ sich ein Geschlechtsunterschied feststellen (erkrankte Männer zeigen eine höhere BMP-4-Expression als erkrankte Frauen).
- Zwischen den Ergebnissen nach Aufarbeitung von Proben von CLL-Patienten mit der Methode der Erythrozytenlyse und Ficoll-Präparation gibt es keinen signifikanten Unterschied.
- Vereinzelt korrelieren Ereignisse im Krankheitsverlauf (z.B. Remission, Rezidiv) mit Veränderungen im BMP-Expressionsprofil

Bezüglich der verwendeten unterschiedlichen Methoden der quantitativen RT-PCR lassen sich folgende Hauptaussagen aus den durchgeführten Experimenten folgern:

- Die mit Hilfe der Realtime-PCR erhobenen Aktinexpressionswerte korrelieren positiv mit dem RNA-Gehalt der untersuchten Proben.
- Die Methode der Realtime-PCR ist im Vergleich zur Thermocycler-RT-PCR die sensitivere Methode.

In den folgenden Unterkapiteln soll im Einzelnen auf diese Ergebnisse eingegangen werden.

4.1 BMP-/BMP-Rezeptor-Expression bei Non-Hodgkin-Lymphomen

Nachstehend wird ausschließlich auf die mit Hilfe der Realtime-PCR erhobenen Expressionsprofile eingegangen, nicht auf die Ergebnisse der Thermocycler-PCR, da letztere im Probenumfang geringer waren, zum Großteil keine mittels RT-PCR ermittelten Vergleichsdaten von Normalpersonen vorliegen und die Realtime-PCR die sensitivere Methode ist.

4.1.1 Differentielle BMP-/BMP-Rezeptor-Expression bei Patienten mit einem unbehandelten Non-Hodgkin-Lymphom und gesunden Vergleichspersonen

4.1.1.1 BMP-2-Expression

Bezüglich der BMP-2-Expression bei unbehandelten Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom ließ sich im Vergleich zu den gesunden Normalpersonen eine signifikant erhöhte Expression feststellen. Diese erhöhte Expression manifestiert sich insbesondere in den Stadien III und IV der Erkrankung, unabhängig von der Lymphomentität.

Bereits in einer Reihe anderer maligner Prozesse konnte die Rolle von BMP-2 verdeutlicht werden. Während es beim Prostatakarzinom gegenüber gesundem Prostatagewebe zu einer verminderten Expression von BMP-2 kommt (Horvath et al. 2004), findet sich sowohl bei oralen epithelialen Tumoren (Jin et al. 2001) als auch beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Langenfeld et al. 2003) eine erhöhte Expression von BMP-2. Des Weiteren ist bekannt, dass BMP-2 beim Mammakarzinom sowohl die Empfindlichkeit des Tumors gegenüber Wachstumsfaktoren (Clement et al. 2000) als auch die Invasivität und Wachstumstendenz des Tumors selbst fördert (Clement et al. 2005). So kann die erhöhte Expression von BMP-2 bei Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom eventuell auf dieselbe wachstumsfördernde Funktion bei malignen Erkrankungen zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu den oben angeführten Publikationen wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht Tumormaterial hinsichtlich der BMP-Expression untersucht, sondern isolierte Leukozyten aus dem Vollblut. Wie groß der Anteil von Lymphomzellen an den isolierten Leukozyten ist, ist bei jedem einzelnen der untersuchten Patienten nicht bekannt, zumal eine immunzytologische Untersuchung des peripheren Blutes zum Zeitpunkt der Probenentnahme routinemäßig nicht erfolgt ist. Es ist jedoch anzunehmen, dass in einem späteren Stadium der Erkrankung, insbesondere wenn eine Knochenmarkbeteiligung vorliegt, es zu einer vermehrten Disseminierung der Lymphomzellen in die Blutbahn kommt. Auch aus diesem

Grund erfolgte die Differenzierung der BMP-Expression nach dem Status der Knochenmarkbeteiligung (siehe 3.5.5). Das Vorliegen einer Knochenmarkbeteiligung führte jedoch nicht zu signifikanten Expressionsunterschieden. So könnte es sich bei der nachgewiesenen erhöhten BMP-2-Expression bei der Gesamtheit der Patienten auch um einen Nebeneffekt der Lymphomkrankung handeln, indem beispielsweise durch parakrine Stimulation gesunde Leukozyten vermehrt BMP-2 exprimieren. Dieselben Überlegungen treffen in entsprechender Weise auch auf die Expression der anderen BMPs und derer Rezeptoren zu.

Die vermehrte BMP-2-Expression könnte jedoch auch im Rahmen eines physiologischen, antiproliferativen Effektes auftreten, zumal in der Literatur im Zusammenhang mit einer Sonderform des Non-Hodgkin-Lymphoms – dem Multiplen Myelom – beschrieben wird, dass BMP-2 zu einem Zellzyklusarrest der Myelomzellen führt und so Apoptose induziert (Kawamura et al. 2000).

Hinzuzufügen ist, dass sich die Realtime-PCR von BMP-2 sehr schwierig gestaltete, d.h. am Ende der Amplifikation konnte trotz vielfältiger Modifizierungen des Protokolls (Veränderung der Annealingzeiten und -temperaturen, der Primer- sowie der Magnesiumkonzentration) zunächst keine Schmelzkurve mit eindeutigen Produkten dargestellt werden. Dies ist sicherlich v.a. durch den unter 2.9.2 beschriebenen Primermismatch bedingt. Dieser Mismatch kommt dadurch zustande, dass Sequenzeinträge in Gendatenbanken einer ständigen Aktualisierung unterliegen und das Primerdesign noch auf einem alten Sequenzeintrag basierte. Die Amplifikation von BMP-2 konnte letztendlich mittels einer Nicht-HotStart-PCR durchgeführt werden, da diese toleranter gegenüber den Annealingbedingungen und so auch gegenüber einem Mismatch ist.

4.1.1.2 BMP-4-Expression

Im Gegensatz zu BMP-2 fand sich BMP-4 signifikant stärker bei den gesunden Vergleichspersonen als bei den Patienten exprimiert. Dies ist in sofern überraschend, als dass BMP-2 und -4 nicht nur bezüglich ihrer Struktur eine 92%-ige Homologie aufweisen, sondern sich auch in ihrer biologische Funktion sehr ähnlich sind (Langenfeld et al. 2003). So konnte BMP-4 ebenso wie BMP-2 beim Prostata-Karzinom (Harris et al. 1994) und in hormonabhängigen Mammakarzinomzelllinien (Clement et al. 2000) bereits nachgewiesen werden. Des Weiteren findet sich wie für BMP-2 auch für BMP-4 eine Apoptose-induzierende Wirkung auf Myelomzellen (Hjertner et al. 2001).

Für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom hingegen wurde in der Literatur bereits beschrieben, dass BMP-2 nicht jedoch BMP-4 im Karzinomgewebe vermehrt exprimiert wird (Langenfeld et al. 2003).

Im Gegensatz dazu findet sich bei Adenokarzinomen des Kolons eine erhöhte Expression von BMP-4 (Deng et al. 2007).

Weiterhin ist BMP-4 als wichtiger Differenzierungs- und Proliferationsfaktor hämatopoetischer Stammzellen bekannt (Bhatia et al. 1999). Eine Abnahme der BMP-4-Expression bei Lymphompatienten könnte demzufolge auch im Zusammenhang mit der Entdifferenzierung hämatopoetischer Zellen im Rahmen der Lymphomkrankung stehen.

Hinzuzufügen ist, dass ausschließlich bei der BMP-4-Expression in der Patientengruppe ein geschlechtsspezifischer Unterschied, in diesem Falle eine stärkere Expression bei männlichen Patienten, zu finden war. Hinweise zu geschlechtsspezifischen BMP-Expressionsunterschieden finden sich in der Literatur bis jetzt lediglich im Zusammenhang mit der BMP7-Expression beim Nierenzellkarzinom (Kwak et al. 2007); in diesem Zusammenhang konnte eine Mehrexpression bei weiblichen Patienten gezeigt werden.

4.1.1.3 BMP-6-Expression

Ebenso wie BMP-4 wird BMP-6 bei Lymphompatienten signifikant weniger exprimiert als bei Normalpersonen.

Die Expression von BMP-6 im Rahmen maligner Erkrankungen konnte bereits an Brustkrebsgewebe (Clement et al. 1999) und bei Ösophaguskarzinomen (Raida et al. 1999) nachgewiesen werden. Beim Prostatakarzinom, in dessen Gewebe sich gegenüber gesundem Prostatagewebe eine erhöhte Expression von BMP-6 finden lässt (Barnes et al. 1995), wird ein Zusammenhang zwischen der BMP-6-Expression und der Entstehung von Knochenmetastasen vermutet (Dai et al. 2005).

Bei Myelomzellen konnte hingegen ebenso wie für BMP-2 und -4 auch für BMP-6 ein antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden (Baade et al. 2004), welcher sich ebenfalls BMP-6-vermittelt auch bei gesunden stimulierten B-Zellen findet (Kersten et al. 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Reduktion der BMP-6-Expression führt so eventuell zu einem verminderten antiproliferativen Effekt, der eine maligne Zelltransformation und –proliferation lymphatischen Gewebes nach sich ziehen kann.

4.1.1.4 BMP-7-Expression

Bezüglich BMP-7 ist eine signifikant höhere Expression bei den Lymphompatienten, insbesondere denen an einem diffus-großzelligem Lymphom erkrankten, gegenüber den gesunden Vergleichspersonen festzustellen.

Die Expression von BMP-7 in Mammakarzinomgewebe ist bereits belegt (Schwalbe et al. 2003). Des Weiteren konnte Alarmo et al. zeigen, dass die gesteigerte Expression von BMP-7 in Mammakarzinomgewebe mit einem erhöhten Risiko Knochenmetastasen auszubilden assoziiert ist (Alarmo et al. 2008). Ähnliches wurde bereits im Vorfeld für das Prostatakarzinom beschrieben, bei welchem eine erhöhte BMP7-Expression im Bereich der Knochenmetastasen im Vergleich zu normalem Knochengewebe nachgewiesen werden konnte (Masuda et al. 2003). Ansonsten ist BMP-7 in der Literatur eher als antitumoröser Faktor beschrieben: Beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom konnte seine wachstumshemmende Wirkung gezeigt werden (Franzen und Heldin 2001) und wie andere BMPs wirkt es proliferationshemmend auf Myelomzellen (Baade et al. 2004). Das heißt, eine hier gegenüber Normalpersonen nachgewiesene erhöhte BMP-7-Expression kann entweder durch eine Tumorpheriferation bedingt sein oder aber es handelt sich um einen gegenregulatorischen, antitumorösen Effekt nicht entarteter Leukozyten.

4.1.1.5 BMPIA-/II-Expression

Für die BMP-Rezeptoren IA und II konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen gesunden und erkrankten Personen festgestellt werden.

Für die Signaltransduktion von BMPs ist sowohl die Anwesenheit eines Typ I- als auch eines Typ II-Rezeptors nötig. Wie in der Literatur beschrieben, wird BMP-Rezeptor-IA in hämatopoetischen Stammzellen (Bhatia et al. 1999) und BMP-Rezeptor-II ubiquitär (Miyazono et al. 2001) exprimiert. Während sich BMP-Rezeptor IA wenn auch teilweise nur minimal in allen untersuchten Proben nachweisen ließ, konnte in manchen Proben keine BMP-Rezeptor-II-Expression gefunden werden. Dies schließt jedoch eine BMP-Signaltransduktion in den entsprechenden Proben nicht aus, da diese auch über Aktivin-Rezeptoren erfolgen kann (Miyazono et al. 2005). Deren Expression jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Bei genauerer Differenzierung der Patienten nach Geschlecht, Lymphomentität usw. fanden sich keine signifikanten Expressionsunterschiede für beide untersuchten Rezeptoren in den untersuchten Kollektiven.

Im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen ist ein Rückgang der BMPR-II-Expression beim Nierenzellkarzinom (Kim et al. 2003), eine verminderte Expression der BMP-Typ I und II Rezeptoren mit steigendem Grad der Entdifferenzierung beim Prostatakarzinom (Kim et al. 2000) sowie die erhöhte Expression von BMP-Rezeptor IA bei Tumoren des Mundraumes (Jin et al. 2001) bekannt. Die künstlich herbeigeführte Reduktion der BMP-Signaltransduktion durch *in vitro*-Manipulation im Bereich der Gensequenz des BMPR-II-Rezeptors führte bei Mammakarzinomzelllinien zu einer Proliferationshemmung (Pouliot et al. 2003). Des Weiteren wird ein Mangel an BMP-Rezeptor IA mitverantwortlich für die Entstehung der juvenilen Polyposis gemacht (Howe et al. 2001), während beim manifesten kolorektalen Karzinom gehäuft ein Verlust der BMPR-II-Expression beobachtet wurde (Kodach et al. 2007).

Eine signifikante Expressionsveränderung in Zellen des peripheren Blutes im Rahmen einer Non-Hodgkin-Lymphomkrankung konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch fällt bei genauerer Betrachtung auf, dass die Patientenprobe Nummer zehn eine isolierte erhöhte Expression zeigt (siehe Abbildung 3.5). Dies ist insofern bemerkenswert, als dass es sich hierbei um das einzige T-Zell-Lymphom des untersuchten Patientenkollektives handelt. Weitere, vergleichende Untersuchungen zwischen B- und T-Zell-Lymphomen erscheinen hier sinnvoll.

4.1.2 Einfluss der Leukozytenisolierung auf die gewonnene Zellpopulation und gemessene BMP-/BMP-Rezeptor-Expression

Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, diente die parallele Aufarbeitung von fünf Proben von CLL-Patienten nach der Ficoll-Methode und mit Hilfe der Erythrozytenlyse der Unterscheidung, ob es sich bei einer veränderten BMP-Expression im Vollblut um ein Phänomen der dort befindlichen Lymphomzellen oder ein Begleitphänomen der Lymphomkrankung bei allen, also auch den gesunden Leukozyten handelt.

Im durchgeführten Vergleich fand sich kein signifikanter Unterschied in der BMP-Expression zwischen den beiden Methoden der Leukozytenisolierung. Dies könnte dadurch begründet sein, dass es sich beim veränderten BMP-Expressionsprofil im Vollblut um eine indirekte Auswirkung der Lymphomkrankung handelt, d.h. das Lymphom beeinflusst über parakrine Regulation die Expression von Wachstumsfaktoren in gesunden Leukozyten. Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass die Konzentration an Lymphozyten im Blut der untersuchten CLL-Patienten so hoch ist, dass die nach Erythrozytenlyse im Pellet noch enthaltene Granulozytenzahl das BMP-Expressionsprofil nicht wesentlich beeinflusst. Um also genauer

zu differenzieren, ob Lymphomzellen im Vollblut Ursache einer veränderten BMP-Expression sind oder das Lymphom Einfluss auf die BMP-Expression bei gesunden Leukozyten hat, wären weitere Untersuchungen nötig. Hierbei wäre beispielsweise die der RNA-Isolierung vorangestellte Anreicherung von Lymphomzellen aus dem peripheren Blut bei an einem anderen Lymphom als an einer CLL erkrankten Patienten mit Hilfe der FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)- oder MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)-Methode denkbar. Alternativ könnte auch vergleichend zu den vorliegenden Ergebnissen aus dem Vollblut die BMP-Expression in Lymphomtumorgewebe oder bei Lymphomzelllinien untersucht werden.

4.1.3 Betrachtung des BMP-Expressionsprofils im Krankheitsverlauf

Der Verlauf der BMP-Expression ist nicht bei allen betrachteten Patientenproben identisch mit dem Krankheitsverlauf. Es scheint jedoch bei der BMP-2-Expression eine Korrelation zwischen Therapieansprechen und Rückgang der BMP-2-Expression sowie erneutem BMP-2-Anstieg im Rahmen eines Progresses bzw. Rezidives zu geben. Dies deckt sich mit den unter 4.1.1.1 diskutierten Ergebnissen.

Für die BMP-4- und BMP-6-Expression konnte kein Zusammenhang zum Krankheitsverlauf hergestellt werden, jedoch fand sich eine geringfügig vermehrte BMP-6-Expression im Stammzellapheresat des Patienten mit der Nummer 55. Möglicherweise steht diese im Zusammenhang mit der Stammzellmobilisierung, zumal in der Literatur bereits ein möglicher Stammzell-mobilisierender Effekt von BMP-6 beschrieben wurde (Ahmed et al. 2001).

Die Abnahme der BMP-7-Expression im Krankheitsverlauf ist eventuell Folge eines Rückgangs der Lymphomerkrankung. Jedoch konnte kein Wiederanstieg der BMP-7-Expression im Falle eines Rezidivs beobachtet werden, welches diese These nicht unterstützt. Das gleiche Expressionsmuster zeigt sich bei Betrachtung des BMP-Rezeptors IA im Verlauf. BMP-Rezeptor II zeigt lediglich bei dem einzig untersuchten, bereits erwähnten T-Zell-Lymphompatienten einen deutlichen Expressionsabfall unter Therapie. Um einen gegebenenfalls bestehenden Zusammenhang zwischen der Expression von BMPR-II und dem Vorliegen einer T-Zell-Erkrankung zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen erfolgen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die angestellten Verlaufsbeobachtungen den bereits zuvor festgestellten Verdacht auf einen Zusammenhang zwischen BMP-2-Expression und Lymphomerkrankung erhärten und die besondere Bedeutung von BMP-Rezeptor II bei T-Zelllymphomen unterstützen. Vergleichbare Ergebnisse aus der Literatur sind nicht bekannt.

4.2 Vergleich quantitativer PCR-Methoden am Beispiel der BMP-Expression im Rahmen von Non-Hodgkin-Lymphom-Erkrankungen

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden mehrere Methoden der quantitativen PCR getestet und letztendlich die Methode der Realtime-PCR angewandt. Im Folgenden soll nochmals kurz ein Vergleich der beiden Methoden erfolgen.

Angesichts der erhobenen Ergebnisse handelt es sich bei der Realtime-PCR um die sensitivere Methode, denn mittels Realtime-PCR konnte bei Verwendung gleicher Primer bei identischen Proben ein Nachweis der Expression von BMP-6, BMP-7 und BMP-Rezeptor II erfolgen, wohingegen diese mittels konventioneller RT-PCR kaum oder gar nicht nachweisbar war (siehe Kapitel 3.4.1 und 3.4.2). Dies ist vereinbar mit der in der Literatur beschriebenen hohen Sensitivität der Realtime-PCR mit einem Detektionslimit von nur einer einzigen Kopie (Wong und Medrano 2005).

Die Methode der Realtime-PCR scheint aufgrund ihrer höheren Sensitivität die bessere Methode zur Durchführung einer quantitativen PCR zu sein, zumal es sich wie in Kapitel 3.2 beschrieben nicht wie bei der konventionellen RT-PCR um eine Endpunktanalyse handelt. Bezüglich der kompetitiven PCR ist hinzuzufügen, dass sie nicht nur die Nachteile einer konventionellen PCR mit sich bringt, sondern auch eine sehr große Probenmenge voraussetzt, was insbesondere bei der Verwendung von Patientenmaterial problematisch ist. Die Nachteile der Realtime-PCR sollten jedoch hierbei nicht aus den Augen verloren gehen. So ist im Gegensatz zur konventionellen RT-PCR mit anschließender Gelanalyse bei der Schmelzkurvenanalyse der Realtime-PCR nicht unmittelbar ersichtlich, ob es sich bei Produkten mit gleichem Schmelzpunkt tatsächlich um Produkte gleicher Basenpaaranzahl handelt, welches oftmals eine anschließende Gelanalyse, wenn nicht sogar Sequenzierung unumgänglich macht (siehe hierzu Kapitel 3.8). Des Weiteren macht die relative Realtime-Quantifizierung das Mitführen einer Standardkurve nötig. Sollten die Standardkurven zu vergleichender PCR-Läufe sich in ihrer Effizienz deutlich unterscheiden, ist somit auch die Beurteilbarkeit eingeschränkt (Ginzinger 2002).

Nach Abwägung aller Vor- und Nachteile ist jedoch zur Quantifizierung von mRNA der Realtime-PCR der Vorzug zu geben.

5 Schlussfolgerungen

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass das Vorliegen einer Non-Hodgkin-Lymphom-Erkrankung zu signifikanten Veränderungen des BMP-Expressionsprofils führt. Dies trifft im einzelnen für BMP-2, -4, -6 und -7 zu. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Subentität des Lymphoms, das Stadium der Erkrankung sowie das Geschlecht auf die BMP-Expression Einfluss nehmen können.

Verlaufsbetrachtungen bei Lymphompatienten zeigten ebenfalls Veränderungen der BMP-Expression; ein kausaler Zusammenhang zwischen der BMP-Expression und dem Krankheitsverlauf scheint zumindest für BMP-2 zu bestehen.

Der durchgeführte Expressionsvergleich nach unterschiedlichen Leukozytenisolierungsverfahren erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen Erythrozytenlyse und Ficoll-Methode. Er diene der Betrachtung unterschiedlicher Leukozytenfraktionen zur besseren Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen. Hier muss im Rahmen zukünftiger Experimente eine Tumorzellanreicherung mittels MACS- oder FACS-Methode in Erwägung gezogen werden.

Die Quantifizierung von mRNA mittels Realtime-PCR hat sich als valide Methode und gegenüber der PCR mit dem Thermocycler und anschließender Ethidiumbromidgelanalyse als sensitiver dargestellt.

Weitere Untersuchungen wie die BMP-Expressionsanalyse an Lymphom-Tumormaterial sowie die quantitative Messung der Expression von dem BMP-Signal nachgeschalteten Faktoren der Signaltransduktionskaskade sind anzustreben.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Ahmed N, Sammons J, Carson RJ, Khokher MA und Hassan HT. 2001. Effect of bone morphogenetic protein-6 on haemopoietic stem cells and cytokine production in normal human bone marrow stroma. *Cell Biol Int*, 25(5):429-435.
- Alarmo EL, Korhonen T, Kuukasjarvi T, Huhtala H, Holli K und Kallioniemi A. 2008. Bone morphogenetic protein 7 expression associates with bone metastasis in breast carcinomas. *Ann Oncol*, 19(2):308-314.
- Alarmo EL, Kuukasjarvi T, Karhu R und Kallioniemi A. 2007. A comprehensive expression survey of bone morphogenetic proteins in breast cancer highlights the importance of BMP4 and BMP7. *Breast Cancer Res Treat*, 103(2):239-246.
- Arnold SF, Tims E und Mcgrath BE. 1999. Identification of bone morphogenetic proteins and their receptors in human breast cancer cell lines: importance of BMP2. *Cytokine*, 11(12):1031-1037.
- Baade RT, Utne HR, Brenne AT, Hjorth-Hansen H, Waage A, Hjertner O, Sundan A und Borset M. 2004. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene*, 23(17):3024-3032.
- Barnes J, Anthony CT, Wall N und Steiner MS. 1995. Bone morphogenetic protein-6 expression in normal and malignant prostate. *World J Urol*, 13(6):337-343.
- Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L und Dick JE. 1999. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 189(7):1139-1148.
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2):169-193.
- Cao X und Chen D. 2005. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene*, 357(1):1-8.
- Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R und Canellos GP. 1999. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol*, 17(4):1244-1253.
- Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, Höffken K und Wolf S. 2000. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol*, 126(5):271-279.
- Clement JH, Raida M, Sanger J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Hortschansky P, Schmidt A, Höffken K, Wolf S und Harris AL. 2005. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. *Int J Oncol*, 27(2):401-407.

- Clement JH, Sanger J und Höffken K. 1999. Expression of bone morphogenetic protein 6 in normal mammary tissue and breast cancer cell lines and its regulation by epidermal growth factor. *Int J Cancer*, 80(2):250-256.
- Dai J, Keller J, Zhang J, Lu Y, Yao Z und Keller ET. 2005. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res*, 65(18):8274-8285.
- De Biase P und Capanna R. 2005. Clinical applications of BMPs. *Injury*, 36 Suppl 3:S43-S46.
- de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW und Span PN. 2005. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest*, 85(1):154-159.
- Deng H, Makizumi R, Ravikumar TS, Dong H, Yang W und Yang WL. 2007. Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells. *Exp Cell Res*, 313(5):1033-1044.
- Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer SG, Barst RJ, Hodge SE und Knowles JA. 2000. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet*, 67(3):737-744.
- Eleaume H und Jabbouri S. 2004. Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. *J Microbiol Methods*, 59(3):363-370.
- Fisher SG und Fisher RI. 2004. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*, 23(38):6524-6534.
- Franzen A und Heldin NE. 2001. BMP-7-induced cell cycle arrest of anaplastic thyroid carcinoma cells via p21(CIP1) and p27(KIP1). *Biochem Biophys Res Commun*, 285(3):773-781.
- Gannon FH, Kaplan FS, Olmsted E, Finkel GC, Zasloff MA und Shore E. 1997. Bone morphogenetic protein 2/4 in early fibromatous lesions of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Hum Pathol*, 28(3):339-343.
- Ginzinger DG. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*, 30(6):503-512.
- Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC und Taga R. 2005. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res*, 38(10):1463-1473.
- Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC und Carlson WD. 1996. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(2):878-883.
- Grulich AE und Vajdic CM. 2005. The epidemiology of non-Hodgkin lymphoma. *Pathology*, 37(6):409-419.

- Harris SE, Harris MA, Mahy P, Wozney J, Feng JQ und Mundy GR. 1994. Expression of bone morphogenetic protein messenger RNAs by normal rat and human prostate and prostate cancer cells. *Prostate*, 24(4):204-211.
- Heldin CH, Miyazono K und ten Dijke P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390(6659):465-471.
- Hiddemann W and Lang N. 2005. Kriterien zur Beurteilung des Therapieerfolges für Non-Hodgkin-Lymphome. In: Hiddemann W, Dreyling M, Stein H, Hrsg. *Lymphome*. Stuttgart: Thieme, 47-49.
- Hiddemann W, Lang N, Dreyling M. 2005. Stadieneinteilung. In: Hiddemann W, Dreyling M, Stein H, Hrsg. *Lymphome*. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme, 37-39.
- Hiddemann W und Stein H. 1999. Die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome: Endlich eine weltweit akzeptierte Einteilung. *Deutsches Ärzteblatt*, 96(49):A-3168-A-3176.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G und Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11(9):1026-1030.
- Hjertner O, Hjorth-Hansen H, Borset M, Seidel C, Waage A und Sundan A. 2001. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood*, 97(2):516-522.
- Hogan BL. 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*, 10(13):1580-1594.
- Horvath LG, Henshall SM, Kench JG, Turner JJ, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill GF, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ und Sutherland RL. 2004. Loss of BMP2, Smad8, and Smad4 expression in prostate cancer progression. *Prostate*, 59(3):234-242.
- Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, Velculescu VE, Traverso G und Vogelstein B. 2001. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet*, 28(2):184-187.
- Jin Y, Tipoe GL, Liong EC, Lau TY, Fung PC und Leung KM. 2001. Overexpression of BMP-2/4, -5 and BMPR-IA associated with malignancy of oral epithelium. *Oral Oncol*, 37(3):225-233.
- Johnson PW, Whelan J, Longhurst S, Stepniewska K, Matthews J, Amess J, Norton A, Rohatiner AZ und Lister TA. 1993. Beta-2 microglobulin: a prognostic factor in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer*, 67(4):792-797.
- Katoh M und Terada M. 1996. Overexpression of bone morphogenetic protein (BMP)-4 mRNA in gastric cancer cell lines of poorly differentiated type. *J Gastroenterol*, 31(1):137-139.
- Kawabata M, Imamura T und Miyazono K. 1998. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*, 9(1):49-61.

- Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, Uchida H, Fukuchi Y, Hattori Y, Koseki T, Nishihara T und Ikeda Y. 2000. Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood*, 96(6):2005-2011.
- Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB und Myklebust JH. 2005. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol*, 6(1):9-22.
- Kim IY, Lee DH, Ahn HJ, Tokunaga H, Song W, Devereaux LM, Jin D, Sampath TK und Morton RA. 2000. Expression of bone morphogenetic protein receptors type-IA, -IB and -II correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Cancer Res*, 60(11):2840-2844.
- Kim IY, Lee DH, Lee DK, Kim BC, Kim HT, Leach FS, Linehan WM, Morton RA und Kim SJ. 2003. Decreased expression of bone morphogenetic protein (BMP) receptor type II correlates with insensitivity to BMP-6 in human renal cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 9(16 Pt 1):6046-6051.
- Kirsch T, Sebald W und Dreyer MK. 2000. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol*, 7(6):492-496.
- Kodach LL, Bleuming SA, Musler AR, Peppelenbosch MP, Hommes DW, van den Brink GR, van Noesel CJ, Offerhaus GJ und Hardwick JC. 2007. The bone morphogenetic protein pathway is active in human colon adenomas and inactivated in colorectal cancer. *Cancer*, 112(2):300-306.
- Kwak C, Park YH, Kim IY, Moon KC und Ku JH. 2007. Expression of bone morphogenetic proteins, the subfamily of the transforming growth factor-beta superfamily, in renal cell carcinoma. *J Urol*, 178(3 Pt 1):1062-1067.
- Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA, III, Loyd JE, Nichols WC und Trembath RC. 2000. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet*, 26(1):81-84.
- Langenfeld EM, Bojnowski J, Perone J und Langenfeld J. 2005. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. *Ann Thorac Surg*, 80(3):1028-1032.
- Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P und Langenfeld J. 2003. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis*, 24(9):1445-1454.
- Liu F, Ventura F, Doody J und Massague J. 1995. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol*, 15(7):3479-3486.
- Lossos IS, Czerwinski DK, Wechsler MA und Levy R. 2003. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia*, 17(4):789-795.

- Lupberger J, Kreuzer KA, Baskaynak G, Peters UR, le Coutre P und Schmidt CA. 2002. Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Mol Cell Probes*, 16(1):25-30.
- Masuda H, Fukabori Y, Nakano K, Takezawa Y, CSuzuki T und Yamanaka H. 2003. Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer. *Prostate*, 54(4):268-274.
- Miyazono K, Kusanagi K und Inoue H. 2001. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*, 187(3):265-276.
- Miyazono K, Maeda S und Imamura T. 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16(3):251-263.
- Morra E. 1999. The biological markers of non-Hodgkin's lymphomas: their role in diagnosis, prognostic assessment and therapeutic strategy. *Int J Biol Markers*, 14(3):149-153.
- Muller AM, Ihorst G, Mertelsmann R und Engelhardt M. 2005. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol*, 84(1):1-12.
- Mullis KB und Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155:335-350.
- Pouliot F, Blais A und Labrie C. 2003. Overexpression of a dominant negative type II bone morphogenetic protein receptor inhibits the growth of human breast cancer cells. *Cancer Res*, 63(2):277-281.
- Raida M, Sarbia M, Clement JH, Adam S, Gabbert HE und Höffken K. 1999. Expression, regulation and clinical significance of bone morphogenetic protein 6 in esophageal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*, 83(1):38-44.
- Rasmussen R, Morrison T, Herrmann M und Wittwer C. 1998. Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. *Biochemica*, 2:8-11.
- Roche L. 2000. Overview of LightCycler Quantification Methods. Roche Molecular Biochemicals Technical Note, LC 10/2000:1-12.
- Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten DP, Heldin CH und Miyazono K. 1995. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(17):7632-7636.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487-491.
- Schmidt S, Dreyling M, Hölzel D. 2004. Epidemiologie maligner Lymphome. In: 7. Aufl. München: Tumorzentrum München und Zuckschwerdt Verlag München, 1-8.

- Schmoll HJ, Höffken K und Possinger K 2006. Kompendium Internistische Onkologie. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Schwalbe M. 2000. Untersuchungen zur Expression von Knochenmorphogenesefaktoren im Mammakarzinom [Dissertation]. Jena: Friedrich Schiller Universität.
- Schwalbe M, Sanger J, Eggers R, Naumann A, Schmidt A, Höffken K und Clement JH. 2003. Differential expression and regulation of bone morphogenetic protein 7 in breast cancer. *Int J Oncol*, 23(1):89-95.
- Shi Y und Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6):685-700.
- Stein H. 2005. Klassifikation. In: Hiddemann W, Dreyling M, Stein H, Hrsg. *Lymphome*. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme, 30-36.
- ten Dijke P, Miyazono K und Heldin CH. 1996. Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 8(2):139-145.
- Thomas JT, Kilpatrick MW, Lin K, Erlacher L, Lembessis P, Costa T, Tsipouras P und Luyten FP. 1997. Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in CDMP1. *Nat Genet*, 17(1):58-64.
- Thomas JT, Lin K, Nandedkar M, Camargo M, Cervenka J und Luyten FP. 1996. A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF-beta superfamily member. *Nat Genet*, 12(3):315-317.
- Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150(698):893-899.
- Urist MR, Nogami H und Mikulski A. 1976. A bone morphogenetic polypeptide. *Calcif Tissue Res*, 21 Suppl:81-87.
- Wong ML und Medrano JF. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1):75-85.
- Wong YC, Wang X und Ling MT. 2004. Id-1 expression and cell survival. *Apoptosis*, 9(3):279-289.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM und Wang EA. 1988. Novel Regulators of Bone-Formation - Molecular Clones and Activities. *Science*, 242(4885):1528-1534.
- Xu MQ, Feldman G, Le Merrer M, Shugart YY, Glaser DL, Urtizberea JA, Fardeau M, Connor JM, Triffitt J, Smith R, Shore EM und Kaplan FS. 2000. Linkage exclusion and mutational analysis of the noggin gene in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Clin Genet*, 58(4):291-298.
- Yoshikawa H, Nakase T, Myoui A und Ueda T. 2004. Bone morphogenetic proteins in bone tumors. *J Orthop Sci*, 9(3):334-340.
- Zhang J und Li L. 2005. BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol*, 284(1):1-11.

- Zhang X, Ding L und Sandford AJ. 2005. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 6(1):4-10.
- Zhang Y, Musci T und Derynck R. 1997. The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function. *Curr Biol*, 7(4):270-276.

7 Anhang

7.1 Lymphomklassifikationen

Tabelle 7.1: Klassifikationen der Non-Hodgkin-Lymphome im Überblick in Anlehnung an H. Stein (Stein 2005)

Updated Kiel Classification 1988	Revised European Lymphoma Classification 1994	American New WHO Lymphoma Classification (2001)
	<i>Precursor B-Cell diseases</i>	<i>Precursor B-Cell diseases</i>
B-lymphoblastic	Precursor B-lymphoblastic lymphoma/leukaemia	Precursor B-lymphoblastic leukemia / lymphoma
	<i>Peripheral B-Cell diseases</i>	<i>Mature B-Cell neoplasms</i>
B-Lymphocytic, B-CLL, B-prolymphocytic leukemia	B-cell chronic lymphocytic leukemia/prolymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma	Chronic lymphocytic leukemia / small lymphocytic lymphoma
Lymphoplasmacytoid (immunocytoma)	B-CLL-variant: with plasmacytoid differentiation	B-CLL-Variant: with monoclonal gammopathy / plasmacytoid differentiation B-cell prolymphocytic leukemia
Lymphoplasmacytic lymphoma (immunocytoma)	Lymphoplasmacytic lymphoma	Lymphoplasmacytic lymphoma
	Splenic marginal zone B-cell lymphoma [provisional]	Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia	Hairy cell leukaemia	Hairy cell leukemia
Plasmacytic	Plasmacytoma / myeloma	Plasma cell myeloma Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) Solitary plasmacytoma of bone Extrasosseous plasmacytoma
	Extranodal marginal zone B-cell lymphoma (low grade B-cell lymphoma of MALT type)	Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT type (MALT-lymphoma)
Monocytoid, including marginal zone	Nodal marginal zone B-cell lymphoma [provisional]	Nodal marginal zone B-cell lymphoma
Centroblastic-centrocytic, follicular +/- Centroblastic-centrocytic, diffuse	Follicle center lymphoma, follicular, grade I, grade II, grade III; follicular center lymphoma, diffuse, small cell [provisional]	Follicular lymphoma Variants: Grade 1, 2, 3a and 3b; Cutaneous follicle center lymphoma
Centrocytic (mantle cell)	Mantle cell lymphoma	Mantle cell lymphoma
Centroblastic, immunoblastic, large cell anaplastic (Ki-1+)	Diffuse large-B-cell lymphoma	Diffuse large B-cell lymphoma
	Primary mediastinal large B-cell lymphoma	Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
		Intravascular large B-cell lymphoma
		Primary effusion lymphoma

Burkitt	Burkitt's lymphoma	Burkitt lymphoma / leukaemia
		B-cell proliferations of uncertain malignant potential
		Lymphomatoid granulomatosis
		Post-transplant lymphoproliferative disorder, polymorphic
	<i>Precursor T-Cell diseases</i>	<i>Precursor T-Cell neoplasms</i>
T-lymphoblastic	Precursor T-lymphoblastic lymphoma / leukemia	Precursor T-cell lymphoblastic leukemia/ lymphoma
		Blastic NK-cell lymphoma
	<i>Peripheral T-Cell diseases</i>	<i>Mature T-Cell and NK-cell neoplasms</i>
T-lymphocytic, CLL type, T-prolymphocytic leukemia	T-cell chronic lymphocytic leukemia/ prolymphocytic leukaemia	T-cell prolymphocytic leukemia
	Large granular lymphocytic leukaemia – T-cell type	T-cell large granular lymphocytic leukemia
	Large granular lymphocytic leukaemia – NK cell type	Aggressive NK cell leukemia
Pleomorphic, small T-cell (HTLV-1+/-) medium-sized (HTLV-1+/-) T-immunoblastic (HTLV-1+/-)	Adult T-cell lymphomas / leukemia, HTLV-1 ⁺	Adult T-cell leukemia / lymphoma HTLV-1 ⁺
	Angiocentric lymphoma	Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type
	Intestinal T-cell lymphoma	Enteropathy-type T-cell lymphoma
	Subcutaneous panniculitic T-cell lymphoma [provisional]	Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
	Hepatosplenic gamma / delta+ T-cell lymphoma [provisional]	Hepatosplenic T-cell lymphoma
Small cell cerebriform (mycosis fungoides, Sézary syndrome)	Mycosis fungoides	Mycosis fungoides
	Sézary syndrome	Sézary syndrome
		Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
T-Zone Lymphoma	Peripheral T-cell lymphoma, unspecified	Peripheral T-cell lymphoma, unspecified
Lymphoepithelioid		
Angioimmunoblastic (AILD, LgX)	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
T-large cell anaplastic (Ki-1+)	Anaplastic large cell lymphoma, T- and null-cell types – primary systemic – primary cutaneous	Anaplastic large cell lymphoma (ALCL)

7.2 Patientenkollektiv

Tabelle 7.2: Untersuchte Patienten mit Angaben zum Geschlecht, der Diagnose, dem Krankheitsstadium sowie der Knochenmarkmanifestation. Bei den mit C1-C10 gekennzeichneten Proben handelt es sich um Proben von fünf CLL-Patienten, welche parallel mit Hilfe der Erythrozytenlyse und der Ficoll-Methode aufgearbeitet wurden. Die gerade Zahl bezeichnet hierbei immer die Probenaufbereitung mittels Erythrozytenlyse, die ungerade Zahl diejenige mittels Ficollmethode. m: männlich, w: weiblich.

Proben-Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht	Diagnose	Stadium	KM-Befall
Nr. 7	42	m	hochmalignes B-Zell-NHL, nicht näher klassifiziert	IIIB	nein
Nr. 8	54	m	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IIIB	nein
Nr. 9	56	m	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IIIB	nein
Nr. 10	54	m	T-lymphoblastisches Lymphom	I	nein
Nr. 11	40	w	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IVA	nein
Nr. 12	70	m	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IIA	nein
Nr. 13	27	m	großzelliges B-Zell-Lymphom des Mediastinums	IVA	nein
Nr. 14	41	m	Follikelzentrumslymphom	IVA	ja
Nr. 16	54	m	CLL	Binet A	ja
Nr. 19	55	w	Mantelzelllymphom	IA	nein
Nr. 22	49	w	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom	IIIA	nein
Nr. 23	34	w	niedrigmalignes NHL, nicht näher klassifiziert	IVB	ja
Nr. 24	52	m	CLL	Binet B	ja
Nr. 26	41	w	Follikelzentrumslymphom	IIIB	nein
Nr. 28	46	w	Follikelzentrumslymphom	IV	ja
Nr. 29	38	w	großzelliges B-Zell-Lymphom des Mediastinums	IIB	nein
Nr. 30	68	w	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	I	nein
Nr. 32	67	m	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IIA	nein
Nr. 34	69	W	Follikelzentrumslymphom	IV	ja
Nr. 36	34	m	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IIIB	nein
Nr. 38	51	w	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IVA	nein
Nr. 39	54	w	Marginalzonenlymphom der Milz	I	nein
Nr. 40	60	m	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IV	ja
Nr. 41	41	m	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IAE	nein
Nr. 44	59	w	Follikelzentrumslymphom	IVB	ja
Nr. 45	56	m	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IIBE	nein
Nr. 46	61	w	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IVB	nein
Nr. 47	50	w	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IVB	nein
Nr. 49	65	w	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IIA	nein
Nr. 52	66	m	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IIIA	nein
Nr. 54	46	w	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IIIA	nein
Nr. 55	51	m	Lymphoplasmozytisches Lymphom	IVB	nein
Nr. 56	65	m	Follikelzentrumslymphom	IIIA	nein
Nr. 57	42	m	Zerebrales diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom		nein
Nr. 58	77	w	Mantelzelllymphom	IV	nein

Proben-Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht	Diagnose	Stadium	KM-Befall
Nr. 60	33	m	Mantelzelllymphom	IIA	nein
Nr. 61	70	w	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IIIA	nein
Nr. 62	73	m	Follikelzentrumslymphom	IV	ja
Nr. 63	65	w	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IVAS	nein
Nr. 64	55	m	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	IIIAS	nein
Nr. 65	52	w	Follikelzentrumslymphom mit sek. Transformation in hochmal. Lymphom	IVA	nein
C1/C2	72	m	CLL	Binet B	ja
C3/C4	60	w	CLL	Binet B	ja
C5/C6	53	m	CLL	Binet A	ja
C7/C8	73	m	CLL	Binet B	ja
C9/C10	72	m	CLL	Binet C	ja

Tabelle 7.3: Gesunde Vergleichspersonen mit Angaben zu Geschlecht und Alter. m: männlich, w: weiblich.

Patientennr.	Alter	Geschlecht
N1	55	w
N2	27	w
N3	25	w
N4	37	w
N5	34	w
N6	27	w
N7	24	w
N8	38	w
N9	24	m
N10	34	m

7.3 Weitere Messwerte und Rohdaten

7.3.1 RNA Quantifizierung

Tabelle 7.4: RNA Gehalt der gewonnenen Proben

Patientennr.	RNA-Gehalt in ng/µl
N1	10,09
N2	46,58
N3	12,3
N4	53,14
N5	47,64
N6	12,73
N7	19,2
N8	9,67
N9	4,53
N10	31,19
Nr. 7	6,5
Nr. 8	30,02
Nr. 9	3,03
Nr. 10	2,08
Nr. 11	9,55
Nr. 12	7,7
Nr. 13	2,72
Nr. 14	23,03
Nr. 16	36,35
Nr. 19	24,74
Nr. 22	9,59
Nr. 23	10,95
Nr. 24	24,38
Nr. 26	3,32
Nr. 28	133,13
Nr. 29	2,99
Nr. 30	9,73
Nr. 32	17,01
Nr. 34	59,77
Nr. 36	12,05
Nr. 38	20,63
Nr. 39	18,02
Nr. 40	14,91
Nr. 41	24,99
Nr. 44	11,38
Nr. 45	7,37
Nr. 46	44,6
Nr. 47	21,29
Nr. 49	9,21
Nr. 52	7,87
Nr. 54	3,55
Nr. 55	25,32
Nr. 57	9,54
Nr. 56	7,2

Patientennr.	RNA-Gehalt in ng/µl
Nr. 58	54,83
Nr. 60	11,02
Nr. 61	38,06
Nr. 62	17,6
Nr. 63	14,01
Nr. 64	4,04
Nr. 65	20,32
C1	149,32
C3	267,95
C5	58,94
C7	456,09
C9	110,06
C2	351,38
C4	28,79
C6	248,44
C8	143,43
C10	143,43
7/1	34,14
7/2	43,89
10/1	16
10/2	15,96
13/2	32,97
14/4	27,11
14/5	35,18
23/1	13,54
24/1	33,65
24/2	15,12
24/3	27,44
26/1	25,99
26/2	10,39
29/2	6,31
29/3	16,81
29/4	24,59
32/1	26,07
47/1	27,46
54/1	41,97
54/2	26,93
54/3	30,15
54/4	23,03
55/1	31,15
55/2	28,94
55/3	3,53
55/4	23,72

7.3.2 Ergebnisse der Sequenzierung der Real-Time-PCR Produkte

Dargestellt sind die Alignments der Sequenzierreaktion mit dem korrespondierenden Gen, dessen Sequenz aus der Genbank entnommen wurde. Die Sequenz des Kompetitorfragments ist der Dissertation von Dr M. Schwalbe entnommen (Schwalbe 2000). In grün sind die homologen Bereiche der Sequenzen unterlegt. Die Sequenzierung wurde in beiden Richtungen mittels der sense und anti-sense Primer der PCR durchgeführt und sind mit fw (sense) sowie rv (anti-sense) gekennzeichnet. Die antisense Sequenzen sind als invertierter Gegenstrang aufgeführt.

Alignment zwischen BMPR-II und Probe 28

HSU25110 (BMPR-II)	tatggcctttgggagaaatcaaaaggggacataaatcttgtaaaacaaggatggttgct
HSU25110 (BMPR-II) probe 28fw	cacattggagatccccaagagtgtcactatgaagaatgtgtagtaactaccactcc tccc ac-ct tccc
HSU25110 (BMPR-II) probe 28fw	t-caatt-cagaatggaac--ataccg tttctgctgtttagcacagatttatgtaatgt tacnattncagaatggaacntnnntt tttctgctgtttagcacagatttatgtaatgt
HSU25110 (BMPR-II) probe 28fw	caactttactgagaattttccacctcctgacacaacaccactcagtcacacctcattcatt caactttactgagaattttccacctcctgacacaacaccactcagtcacacctcattcatt
HSU25110 (BMPR-II) probe 28fw	taaccgagatgagacaataatcattgctttggcatcagtcctctgtatttagctgttttgat taaccgagatgagacaataatcattgctttggcatcagtcctctgtatttagctgttttgat
HSU25110 (BMPR-II) probe 28fw probe 28rv	agttgccttatgctttggatacagaatgttgacaggagaccgtaaaacaaggctttcacag agttgccttatgctttggatacagaatgttgacaggagaccgtaaaacaaggctttcacag gacaaggctttcacag
HSU25110 (BMPR-II) probe 28fw probe 28rv	tatgaacatgatggaggcagcagcatccgaaccctctcttgatctagataatctg---aa tatgaacatgatggaggcagcagcatccgaaccctctcttgatctagataatctg---aa tagnaca-gatggaggcagcagcatccgaaccctctcttgatctagataatctg---aa
HSU25110 (BMPR-II) probe 28fw probe 28rv	actgttggagctgattggccgaggtcgatatggagcagtatataaaggctccttggatga actgttggagctgattggccgaggtcgatatggagcagtatataaaggctccttggatga actgttggagctgattggccgaggtcgatatggagcagtatataaaggctccttggatga
HSU25110 (BMPR-II) probe 28fw probe 28rv	gcgccagttgctgtaaaagtgttttccctttgcaaaccgctcagaatttatcaacgaaa gcgccagttgctgtanaagtgtntc gcgccagttgctgtaaaagtgttttccctttgcaaaccgctcagaatttatcaacgaaa
HSU25110 (BMPR-II) probe 28rv	gaacatttacagagtgcctttgatggaacatgacaacattgcccgctttatagttggaga gaacatttacagagtgcctttgatggaacatgacaacattgcccgctttatagttggaga
HSU25110 (BMPR-II) probe 28rv	tgagagagtcactgcagatggacgcatggaatatttgcttgtgatggagt-actatcca tgagagagtcactgcagatggacgcatggaatatttgcttgtgatggagt-cactatc
HSU25110 (BMPR-II)	atggatctttatgcaagtatttaagtctccacacaagtgactgggtaagctcttgccgct
HSU25110 (BMPR-II)	ttgctcattctgttactagaggactggcttatcttcacacagaattaccacgaggagatc

Alignment zwischen BMP-7 und Probe 14, 26 sowie 49

NM_001719 (BMP-7)	ccatgttcatgctggacctgtacaacgccatggcggtggaggagggcgggcgggccccggcg
NM_001719 (BMP-7)	gccagggcttctcctacccc-tacaaggccgtcttccagtagaccaggggccccctctggcc
PROBE 26 RV	nntcctaccccctacaaggccgtcttccagtagaccaggggccccctctggcc
PROBE 49 RV	ccccct-caaggccgtcttccagtagaccaggggccccctctggcc
PROBE 14 RV	caaggccgtcttccagtagaccaggggccccctctggcc
NM_001719 (BMP-7)	agcctgcaagatagccatttctcaccga-cgccgacatggatcatgagcttctgtaacct
PROBE 26 RV	agcctgcaagatagccatttctcaccga-cgccgacatggatcatgagcttctgtaacct
PROBE 49 RV	agcctgcaagatagccatttctcaccga-cgccgacatggatcatgagcttctgtaacct
PROBE 14 RV	agcctgcaagatagccatttctcaccga-cgccgacatggatcatgagcttctgtaacct
PROBE 26 FW	tgc-agatagccatttctcaccgaacgcccacatggatcatgagcttctnttaacct
PROBE 49 FW	gc-agatagccatttctcaccga-cgccgacatggatcatgagcttctctnacct
PROBE 14 FW	agatagccatttctcaccga-cgccgacatggatcatgagcttctctnacct
NM_001719 (BMP-7)	cgtggaacatgacaaggaattcttccacccacgctaccaccatcgagagttccggtttga
PROBE 26 RV	cgtggaacatgacaaggaattcttccacccacgctaccaccatcgagagttccggtttga
PROBE 49 RV	cgtggaacatgacaaggaattcttccacccacgctaccaccatcgagagttccggtttga
PROBE 14 RV	cgtggaacatgacaaggaattcttccacccacgctaccaccatcgagagttccggtttga
PROBE 26 FW	cgtggaacatgacaaggaattcttccacccacgctaccaccatcgagagttccggtttga
PROBE 49 FW	cgtggaacatgacaaggaattcttccacccacgctaccaccatcgagagttccggtttga
PROBE 14 FW	cgtggaacatgacaaggaattcttccacccacgctaccaccatcgagagttccggtttga
NM_001719 (BMP-7)	tctttccaagatcccagaaggggaagctgtcacggcagccgaattccggatctacaagga
PROBE 26 RV	tctttccaagatcccagaaggggaagctgtcacggcagccgaattccggatctacaagga
PROBE 49 RV	tctttccaagatcccagaaggggaagctgtcacggcagccgaattccggatctacaagga
PROBE 14 RV	tctttccaagatcccagaaggggaagctgtcacggcagccgaattccggatctacaagga
PROBE 26 FW	tctttccaagatcccagaaggggaagctgtcacggcagccgaattccggatctacaagga
PROBE 49 FW	tctttccaagatcccagaaggggaagctgtcacggcagccgaattccggatctacaagga
PROBE 14 FW	tctttccaagatcccagaaggggaagctgtcacggcagccgaattccggatctacaagga
NM_001719 (BMP-7)	ctacatccgggaacgcttcgacaatgagacgcttccggatcagcgtttatcaggtgctcca
PROBE 26 RV	ctacatccgggaacgcttcgacaatgagacgcttccggatcagcgtttatcaggtgctcca
PROBE 49 RV	ctacatccgggaacgcttcgacaatgagacgcttccggatcagcgtttatcaggtgctcca
PROBE 14 RV	ctacatccgggaacgcttcgacaatgagacgcttccggatcagcgtttatcaggtgctcca
PROBE 26 FW	ctacatccgggaacgcttcgacaatgagacgcttccggatcagcgtttatcaggtgctcca
PROBE 49 FW	ctacatccgggaacgcttcgacaatgagacgcttccggatcagcgtttatcaggtgctcca
PROBE 14 FW	ctacatccgggaacgcttcgacaatgagacgcttccggatcagcgtttatcaggtgctcca
NM_001719 (BMP-7)	ggagcacttgggcaggggaatcggatctcttctgctcgacagccgtgccctctgggcctc
PROBE 26 RV	ggagcacttgggcaggggaatcggatctcttctgctcgacagccgtgccctctgggcctc
PROBE 49 RV	ggagcacttgggcaggggaatcggatctcttctgctcgacagccgtgccctctgggcctc
PROBE 14 RV	ggagcacttgggcaggggaatcggatctcttctgctcgacagccgtgccctctgggcctc
PROBE 26 FW	ggagcacttgggcaggggaatcggatctcttctgctcgacagccgtgccctctgggcctc
PROBE 49 FW	ggagcacttgggcaggggaatcggatctcttctgctcgacagccgtgccctctgggcctc
PROBE 14 FW	ggagcacttgggcaggggaatcggatctcttctgctcgacagccgtgccctctgggcctc
NM_001719 (BMP-7)	ggaggagggctggctgggtggttgatcatcacagccaccagcaaccactgggtggtcaatcc
PROBE 26 RV	ggaggagggctggctgggtggttgatcatcacagccaccagcaaccactgggtggtcaatcc
PROBE 49 RV	ggaggagggctggctgggtggttgatcatcacagccaccagcaaccactgggtggtcaatcc
PROBE 14 RV	ggaggagggctggctgggtggttgatcatcacagccaccagcaaccactgggtggtcaatcc
PROBE 26 FW	ggaggagggctggctgggtggttgatcatcacagccaccagcaaccactgggtggtcaatcc
PROBE 49 FW	ggaggagggctggctgggtggttgatcatcacagccaccagcaaccactgggtggtcaatcc
PROBE 14 FW	ggaggagggctggctgggtggttgatcatcacagccaccagcaaccactgggtggtcaatcc
NM_001719 (BMP-7)	gcggcacaacctgggcctgcagctctcggtgagacgctggatgggcagagcatcaacc
PROBE 26 RV	gcggcacaacctgggcctgcagctctcggtgagacgctggatgggcagagcatcaacc
PROBE 49 RV	gcggcacaacctgggcctgcagctctcggtgagacgctggatgggcagagcatcaacc
PROBE 14 RV	gcggcacaacctgggcctgcagctctcggtgagacgctggatgggcagagcatcaacc
PROBE 26 FW	gcggcacaacctgggcctgcagctctcggtgagacgctggatgggcagagcatcaacc
PROBE 49 FW	gcggcacaacctgggcctgcagctctcggtgagacgctggatgggcagagcatcaacc
PROBE 14 FW	gcggcacaacctgggcctgcagctctcggtgagacgctggatgggcagagcatcaacc
NM_001719 (BMP-7)	caagttggcggg cc-tgattgggaggcaggggccccagaacaagcagcccttcatggtgg
PROBE 26 RV	caagttggcggg can tgattgggaggcaggggccccagaacaagcagcccttcatggtgg
PROBE 49 RV	caagttggcggg -nctgattgggaggcaggggccccagaacaagcagcccttcatggtgg
PROBE 14 RV	caagttggcggg -nctgattgggaggcaggggccccagaacaagcagcccttcatggtgg

PROBE 26 FW	caagttggcggg cc- tgattggg cggc acggggccccagaacaagcagcccttc atggtgg
PROBE 49 FW	caagttggcggg cc- tgattggg cggc acggggccccagaacaagcagcccttc atggtgg
PROBE 14 FW	caagttggcggg cc- tgattggg cggc acggggccccagaacaagcagcccttc atggtgg
NM_001719 (BMP-7)	ctt ctt caaggccacggaggtccacttccgcagcatccggtc- cacgggg- agcaaa ca
PROBE 26 RV	ctt- ctt
PROBE 49 RV	ctt- ctt
PROBE 14 RV	ctt- ctt
PROBE 26 FW	cttcttcaaggccacggaggtccacttccgcagcatccggtc- cagggggg
PROBE 49 FW	cttcttcaaggccacggaggtccacttccgcagcatccggtc- agggggggagcaann
PROBE 14 FW	cttcttcaaggccacggaggtccacttccgcagcatccggtc- agggggggagcaann
NM_001719 (BMP-7)	ggcagcagaaccgctccaagacgccaagaaccaggaagccctgcggatggccaacgt
NM_001719 (BMP-7)	ggcagagaacagcagcagcgaccagaggcaggcctgtaagaagcagcagctgtatgtcag
NM_001719 (BMP-7)	cttccgagacctgggctggcaggactggatcatcgcgctgaaggctacgccgctacta

Alignment zwischen Kompetitorfragment und Probe 7 sowie 62

Kompetitorfragment	gggagaaatcaaaaggggacatacgggaaatcgtgctgacattcataaaacctgcaaca
Kompetitorfragment	gccacatcg cctaccctacaaggcgtcttccatggtggagcagaccgtgccgctgta
PROBE 7C RV	nnnt cctaccctacaaggcgtcttccatggtggagcagaccgtgccgctgta
PROBE 62 RV	nnt cctaccctacaaggcgtcttccatggtggagcagaccgtgccgctgta
PROBE 62 FW	ta
Kompetitorfragment	atcgctctaccag- tcccgaaaaagtggcggtg- aaagggagacaatcatgttcaactcc
PROBE 7C RV	atcgctctaccag- tcccgaaaaagtggcggtg- aaagggagacaatcatgttcaactcc
PROBE 62 RV	atcgctctaccag- tcccgaaaaagtggcggtg- aaagggagacaatcatgttcaactcc
PROBE 62 FW	ntcgctctaccagntcccgaaaaagtggcggtg- aaagggagacaatc- cntttaagnc
PROBE 7C FW	tcgctct- cccag- tcccgaaaaagtggcggtg- aaagggagacaatc- cttttaantcc
Kompetitorfragment	agactggtccaccacaatgtgacacgcgccaggagatacctcaaggtagacaggtttact
PROBE 7C RV	agactggtccaccacaatgtgacacgcgccaggagatacctcaaggtagacaggtttact
PROBE 62 RV	agactggtccaccacaatgtgacacgcgccaggagatacctcaaggtagacaggtttact
PROBE 62 FW	agactggtccaccacaatgtgacacgcgccaggagatacctcaaggtagacaggtttact
PROBE 7C FW	agactggtccaccacaatgtgacacgcgccaggagatacctcaaggtagacaggtttact
Kompetitorfragment	cacgtcatccagca- gg- cgtcgccagccgagccacattgagattgagcgccacgacagc
PROBE 7C RV	cacgtcatccagcagg- cgtcgccagccgagccacattgagattgagcgccacgacagc
PROBE 62 RV	cacgtcatccagcagg- cgtcgccagccgagccacattgagattgagcgccacgacagc
PROBE 62 FW	cacgtcatccagca- gggcgtcgccagccgagccacattgagattgagcgccacgacagc
PROBE 7C FW	cacgtcatccagca- gggcgtcgccagccgagccacattgagattgagcgccacgacagc
Kompetitorfragment	ctcgtcgcatacagttatctcgggagacatgtaagcagcatcatggagggcagctacaag
PROBE 7C RV	ctcgtcgcatacagttatctcgggagacatgtaagcagcatcatggagggcagctacaag
PROBE 62 RV	ctcgtcgcatacagttatctcgggagacatgtaagcagcatcatggagggcagctacaag
PROBE 62 FW	ctcgtcgcatacagttatctcgggagacatgtaagcagcatcatggagggcagctacaag
PROBE 7C FW	ctcgtcgcatacagttatctcgggagacatgtaagcagcatcatggagggcagctacaag
Kompetitorfragment	tgcagctgtgagataaacctggcaaagaactcatttgacactcgtctatg- tggacttca
PROBE 7C RV	tgcagctgtgagataaacctggcaaagaactcatttgacactcgtctata- tggacttca
PROBE 62 RV	tgcagctgtgagataaacctggcaaagaactcatttgacactcgtctataaanggggcttca
PROBE 62 FW	tgcagctgtgagataaacctggcaaagaactcatttgacactcgtctatg- tggacttca
PROBE 7C FW	tgcagctgtgagataaacctggcaaagaactcatttgacactcgtctatg- tggacttca
Kompetitorfragment	gctgcccttgaataaccaggtgcatgccagtgccttattaccagttgatgacgtccacg
PROBE 7C RV	gctgcccttgaataaccaggtgcatgccagtgccttattaccagttgatgacgtccacg
PROBE 62 RV	gctgcccttgaataaccaggtgcatgccagtgccttattaccagttgatgacgtccacg
PROBE 62 FW	gctgcccttgaataaccaggtgcatgccagtgccttattaccagttgatgacgtccacg
PROBE 7C FW	gctgcccttgaataaccaggtgcatgccagtgccttattaccagttgatgacgtccacg
Kompetitorfragment	gctcccacagcatccgggtccacg cggagcagccccctctgctgatgcgcggtgggtgctg
PROBE 62 FW	gctcccacagcatccgggtccacg
PROBE 7C FW	gctcccacagcatccgggtccacg
Kompetitorfragment	ctagtacagcgcgagcatccccaaagttcgctcttgccgtcttgctcattctgt

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Rapp
Geburtsname:	Weiß
Vorname:	Katrin
Geburtsdatum:	11.05.1975
Geburtsort:	Neuendettelsau
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung:

1981 - 1985	Grundschule Neuendettelsau
1985 - 1994	Laurentius-Gymnasium Neuendettelsau
Abschluss:	Abitur

Hochschulbildung:

10/1994 – 06/2001	Friedrich-Schiller-Universität Jena Studiengang: Humanmedizin
09/1996	Physikum
09/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/1997-02/1998	Auslandssemester an der Universität Louis Pasteur/Strasbourg
02/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit:

07/2001-12/2002	Ärztin im Praktikum an der Klinik für Innere Medizin der FSU Jena, Abteilung für Hämatologie/Onkologie
seit 01/2003	Assistenzärztin an der Klinik für Innere Medizin der FSU Jena, Abteilung für Hämatologie/Onkologie

Jena, den 22. Juni 2008

7.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Klaus Höffken für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Unterstützung.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Clement, welcher mich während der gesamten Promotionszeit in jeder Hinsicht ausgezeichnet betreute.

Des Weiteren danke ich meinem klinischen Betreuer Herrn Dr. med. Schmalenberg, der mir bei klinischen Fragestellungen stets hilfreich zur Seite stand.

Ein herzlicher Dank gilt insbesondere den Mitarbeiterinnen des Onkologischen

Forschungslabors der Klinik für Innere Medizin II der Friedrich-Schiller-

Universität Conny Jörke, Anja Waldau, Dana Eppen, Peggy Pinther sowie Frau Dr. Manuela Schwalbe, die mich stets durch wertvolle Ratschläge und praktische Hilfe unterstützt haben.

Frau Hemmelmann vom Institut für medizinische Statistik danke ich für die hilfreiche Beratung bezüglich der statistischen Bearbeitung der erhobenen Daten.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, welche durch ihre geduldige Unterstützung die Fertigstellung der Arbeit möglich machte.

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. Klaus Höffken,

Dr. Joachim Clement,

Dr. med. Harald Schmalenberg,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 22. Juni 2008

Katrin Rapp