

Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie  
(Prof. Dr. med. L. Trümper)  
im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Expression des ABC-Transporters ABCA3  
in Zellen der physiologischen Hämatopoese  
und in maligne transformierten lymphatischen Zellen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Sabrina F. E. Corsham  
aus  
Göttingen

Göttingen 2007

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I.      Berichterstatter: JProf. Dr. med. G. G. Wulf
- II.     Berichterstatter/in:
- III.    Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	ABC-Transporter	1
1.2	ABCA3	2
1.3	Hämatopoese	3
1.4	ABCA3 in Leukämien	3
1.4.1	ABCA3 in Zellen der akuten myeloischen Leukämie	4
1.4.2	ABCA3 in Zellen der akuten lymphatischen Leukämie	4
1.5	Lymphome	4
1.5.1	Hodgkin-Lymphome	4
1.5.1.1	Zytostatische Therapie der Hodgkin-Lymphome und Zytostatikaresistenz	5
1.5.2	Non-Hodgkin-Lymphome	6
1.5.2.1	Zytostatische Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome und Zytostatikaresistenz	6
1.6	Aufgabenstellung	7
<b>2</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1	Patienten	8
2.2	Material	8
2.2.1	Geräte	8
2.2.2	EDV	9
2.2.3	Verbrauchsmaterialien	10
2.2.4	Chemikalien	11
2.2.5	Enzyme und Reagenzien für die PCR	12
2.2.6	PCR-Primer	12
2.2.7	Kits zur Bearbeitung von DNS und Proteinen	13
2.2.8	Vektoren und DNS-Standards	13
2.2.9	Antikörper	13
2.2.9.1	Primärantikörper	13
2.2.9.2	Sekundärantikörper	14
2.2.10	Zelllinien	14
2.2.11	Gebräuchliche Puffer	16

## Inhaltsverzeichnis

---

2.3	Methoden	17
2.3.1	Molekularbiologische Methoden	17
2.3.1.1	RNS-Extraktion mit dem Qiagen-Kit	17
2.3.1.2	Bestimmung der RNS-Konzentration	17
2.3.1.3	Reverse Transkription zur cDNS-Synthese	18
2.3.1.4	RT-PCR (RT-Polymerasekettenreaktion)	19
2.3.1.5	Gelelektrophorese	20
2.3.1.6	Quantitative Real-Time-PCR (RTQ-PCR)	20
2.3.2	Immunzytologische Methoden	22
2.3.2.1	Erstellung von Zytospins	22
2.3.2.2	ABCA3-Immunfärbung an Zytospins	22
2.3.2.3	Färbung eines Tissue Micro Arrays	23
2.3.3	Zellbiologische Methoden	24
2.3.3.1	Kultivierung von Zellen	24
2.3.3.2	Passagieren von Zellen	24
2.3.3.3	Kryokonservierung von Zellen	24
2.3.3.4	Revitalisierung von Zellen	25
2.3.3.5	Transfektion von HEK-293A-Zellen mittels Superfect	25
2.3.3.6	Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation mononukleärer Zellen	26
2.3.3.7	Plastikadhärenz zur Isolation von Monozyten aus peripherem Blut	27
2.3.3.8	Zellsortierung mit MACS	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	ABCA3-Expression in der Hämatopoese	29
3.1.1	Immunzytologischer Nachweis von ABCA3 in Zellen der physiologischen Hämatopoese	29
3.1.2	Nachweis von mRNS für ABCA3 in hämatopoetischen Zellen mittels RT-PCR	33
3.2	ABCA3-Expression in Zelllinien	36
3.2.1	Immunzytologischer Nachweis der Expression von ABCA3 in malignen lymphatischen Zelllinien	36

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.2	Nachweis von mRNS für ABCA3 in malignen lymphatischen Zelllinien mittels RT-PCR	40
3.3	Untersuchung der Expression von ABCA3 bei Patienten mit NHL	42
3.4	Prognostische Bedeutung der Höhe des ABCA3-Expressionslevels bei Patienten mit NHL	45
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
4.1	ABCA3-Expression in Zelllinien und Malignitäten der lymphatischen Reihe	54
4.2	Prognostische Bedeutung des ABCA3-Expressionslevels bei Patienten mit NHL	55
4.3	Mögliche Mechanismen der durch ABCA3 vermittelten Chemotherapeutikaresistenz	57
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
°C	Grad Celsius
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CML	Chronische myeloische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DLCL	diffuse large cell lymphoma
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	Downstream
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)

## Abkürzungsverzeichnis

---

g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde
HL	Hodgkin-Lymphom
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
k	kilo
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
MACS	magnetic cell separation
MCL	mantle cell lymphoma
mdr	Multidrug resistance
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min.	Minute
ml	Milliliter
Mol	Mol
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion

## Abkürzungsverzeichnis

---

Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RTQ-PCR	Quantitative RT-PCR
sec.	Sekunde
SP	Side Population
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat
upm	Umdrehungen pro Minute
us	Upstream
UV	Ultraviolett
V	Volt
Well	Vertiefung einer Mikrotiterplatte
(w/v)	Gewicht in Volumen



# 1 Einleitung

## 1.1 ABC-Transporter

Die von einer großen Genfamilie kodierte Gruppe der ABC-Transporter wurde zuerst in Bakterien entdeckt, wo sie als ATPasen durch ATP-Hydrolyse zur Energiegewinnung für die Einschleusung von Aminosäuren, Zuckern und Peptiden beitragen (Higgins 1992, Dean und Allikmets 1995). Sie ermöglichen weiterhin den intrazellulären Transport über die Membranen des endoplasmatischen Retikulums, der Peroxisomen und der Mitochondrien (Dean et al. 2001). ABC-Transporter bestehen aus einem Paar von ATP-bindenden Domänen sowie aus zwei transmembranären Domänen mit sechs Alpha-Helices. Die ATP-bindenden Domänen bestehen aus einer Walker-A- und einer Walker-B-Domäne, die in allen ATP-Transportern zu finden sind, und einem C-„Motiv“, das für die jeweiligen ABC-Transporter spezifisch ist und diese von anderen ATP-Transportern unterscheidet (Hyde et al. 1990). Bei den ABC-Transportern sind acht Unterklassen zu unterteilen: mdr/TAP, ALD, MRP/CFTR, ABC1, White, OABP, ANSA und GCN20. Die mdr-1 und mdr-2 (Multidrug-Resistance-Proteine) sind für den aktiven Transport von Chemotherapeutika verantwortlich. Bei dem CFTR-Protein (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) handelt es sich um einen Chloridkanal. Die ABCA/ABC1-Unterklasse unterscheidet sich von den anderen Subgruppen durch eine große zusätzliche Domäne zwischen der ersten ATP-bindenden Domäne und der zweiten Transmembrandomäne, dazwischen befindet sich ein zusätzliches hydrophobes Segment (Zhao et al. 2000). Weitere Funktionen von ABC-Transportern sind unter anderem der Schutz der Zelle vor Apoptose und hypoxisch bedingtem Zellschaden (Krishnamurthy und Schuetz 2005).

## 1.2 ABCA3

ABCA3, im Genom kodiert auf Chromosom 16p13.3, besteht aus 1704 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 190 kDa und gehört in die ABCA(ABC1)-Untergruppe der ABC-Transporter (Higgins 1992). Das Transportprotein wurde zuerst in einer humanen Schilddrüsenkrebszelllinie entdeckt (Klugbauer und Hofmann 1996). Es handelt sich um einen Lipid-Transporter. Das ABCA3-Protein setzt sich aus insgesamt 12 Transmembrandomänen und 2 ATP-bindenden Domänen zusammen, wobei je eine ATP-bindende Domäne von 6 sich wiederholenden Transmembrandomänen getragen wird. 3 Regionen des Transporters liegen intraluminär, 2 transmembranär. Extraluminär liegen lediglich wenige kurze Bereiche, die die Transmembrandomänen verbinden (Klugbauer und Hofmann 1996).

Eine hohe ABCA3-Expression wurde zunächst in der Lunge gefunden. Das Transportprotein ist hier am stärksten an den limitierenden Membranen der Lamellarkörper von Alveolarepithelzellen des Typs II vertreten (Yamano et al. 2001). Es trägt durch den intrazellulären Transport von Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Cholesterol zur Surfactantbildung bei. ABCA3 scheint essentiell für die Bildung der oben erwähnten Lamellarkörperchen, in denen Surfactant gespeichert wird (Cheong et al. 2006, Shulenin et al. 2004). Mutationen im ABCA3-Gen führen bei Neugeborenen zu einem tödlichen Surfactantmangel (Shulenin et al. 2004). Bei Kindern, die unter einem unerklärlichen RDS (respiratory distress syndrome) litten, wurde eine deutlich geringere ABCA3-Expression als Ursache gefunden, bedingt durch funktionell relevante Mutationen des ABCA3-Gens (Brasch et al. 2006). Die Gabe von Glukokortikoiden führte im Tierversuch zu einer deutlichen Hochregulation der ABCA3-Genexpression (Yoshida et al. 2004). Eine ebenfalls hohe ABCA3-Expression konnte für die Niere gezeigt werden, wo das Protein in den peritubulären Kapillaren lokalisiert ist, außerdem in der Apikalmembran in mehreren Abschnitten des proximalen Tubulus und in der Bowmanschen Kapsel (Huls et al. 2006). Die Expression wird nach hypoxischem Nierenschaden herunterreguliert. Als Funktion wird die Beteiligung an der Herstellung der Lipid-Homöostase, wichtig für die Regeneration von Membranlipiden, ver-

mutet (Huls et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass ABCA3 gemeinsam mit weiteren Transportproteinen (mdr-1, SUR2 und MRP1) in besonders chemotherapeutikaresistenten Zelllinien überexprimiert wird (Yasui et al. 2004). Ebenfalls überexprimiert findet es sich in kindlicher und adulter AML, wo es Chemotherapieresistenz vermittelt und je nach Höhe der Expression mit einer schlechteren Prognose der Patienten korreliert (Wulf et al. 2004).

### **1.3 Hämatopoese**

Die Bildung der Blutzellen nimmt ihren Ausgang bei einer pluripotenten Stammzelle, die für die Bildung aller Zellen des Blutes verantwortlich ist. Immunologisch ist sie durch die Expression der Oberflächenmarker CD34 und CD117 sowie das weitgehende Fehlen der Expression weiterer Expressionsmarker charakterisiert. Über die Differenzierung von Vorläuferzellen erfolgt in mehreren Schritten die Bildung der reifen Blutzellen (Hoffbrand et al. 2003).

### **1.4 ABCA3 in Leukämien**

Leukämien entstehen durch maligne Transformation hämatopoetischer Zellen, die durch ungebremste Proliferation und/oder den Verlust einer geregelten Apoptose im Knochenmark, Blut sowie in lymphatischen Geweben akkumulieren. Durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese kommt es unbehandelt rasch zu einem Knochenmarkversagen. Je nachdem, ob es sich bei den Leukämiezellen um Myeloblasten oder Lymphoblasten handelt, spricht man von myeloischer oder lymphatischer Leukämie, weitere Unterscheidungen erfolgen anhand des Differenzierungsgrades und des natürlichen Verlaufes (akut oder chronisch) (Hoffbrand et al. 2003, Classen et al. 1998). Akute Leukämien sind durch eine Proliferation unreifer Blasten gekennzeichnet, definitionsgemäß müssen mehr als 20 % Blasten im Knochenmark vorliegen.

### **1.4.1 ABCA3 in Zellen der akuten myeloischen Leukämie**

Es konnte gezeigt werden, dass das Transportprotein ABCA3 ebenso wie ABCA2, ABCB2 und ABCC10 in leukämischen Blasten von Kindern mit AML überexprimiert sind. Vermutlich ist ABCA3 ein für Chemotherapieresistenz mitverantwortlicher Transporter, da seine Überexpression mit einem schlechten Ansprechen auf die Therapie korrelierte (Steinbach et al. 2006). Eine höhere Expression von ABCA3 war mit dem selteneren Eintreten einer kompletten Remission verbunden. Bei weiteren Untersuchungen wurde herausgefunden, dass nach Behandlung mit Zytostatika die Expression von ABCA3 hochreguliert wurde.

### **1.4.2 ABCA3 in Zellen der akuten lymphatischen Leukämie**

Bei Patienten mit ALL, insbesondere T-ALL, findet sich häufig eine Zytostatikaresistenz, die zu Rückfällen führt und eine dauerhafte Heilung verhindert. Es wurde gezeigt, dass ABCA3 (und ABCA2) in vielen Fällen von ALL überexprimiert war und zur Zytostatikaresistenz beitrug. Eine Herunterregulation der Transportproteine führte zu einer Sensibilisierung der ALL-Zellen für Zytostatika (Efferth et al. 2006).

## **1.5 Lymphome**

Bei Lymphomen handelt es sich um Erkrankungen, bei denen sich maligne transformierte Lymphozyten in Lymphknoten ansammeln bzw. ins Blut übertreten oder extralymphatische Organe infiltrieren. Es wird zwischen Hodgkin-Lymphomen und Non-Hodgkin-Lymphomen unterschieden.

### **1.5.1 Hodgkin-Lymphome**

Die Hodgkin-Lymphome stellen eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems dar, charakterisiert durch das Vorliegen von Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen in den befallenen Lymphknoten. Die Hodgkin-

Reed-Sternberg-Zellen werden von reaktiven Lymphozyten, Histiozyten, Granulozyten und Fibroblasten umgeben (Harris 1999).

### **1.5.1.1 Zytostatische Therapie der Hodgkin-Lymphome und Zytostatikaresistenz**

Bei den Hodgkin-Lymphomen handelt es sich um äußerst chemotherapieempfindliche Tumore. In der Regel wird eine Polychemotherapie durchgeführt, d. h. eine Kombination verschiedener Zytostatika. Eingesetzt werden heute zumeist entweder das BEACOPP-Schema (Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbacin und Prednison) oder das ABVD-Schema (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin und Dacarbacin) (Diehl und Behringer 2006, Byrne und Gockerman 2007). Je nach Krankheitsstadium und Risikoprofil erfolgen eine unterschiedliche Anzahl von Chemotherapie-Zyklen sowie gegebenenfalls eine anschließende Strahlentherapie mit 30 Gy bis zum Erreichen einer kompletten Remission. Auch die Durchführung einer autologen Stammzelltherapie ist möglich, sie wird vor allem bei Patienten mit Rezidiv eingesetzt (Schmitz et al. 2002). Durch die Primärtherapie können bis zu 90 % der Patienten geheilt werden. Leider kommt es in 30-40 % der Fälle zu Krankheitsrezidiven. Hier sind die Heilungschancen deutlich geringer (Diehl et al. 2003). Ursächlich für das Rezidiv bzw. das Nichtansprechen auf die Chemotherapie ist meist eine Zytostatikaresistenz der Tumorzellen. Folgende Resistenzmechanismen sind bisher bekannt: Überexpression des *mdr-1*-Genes mit der Folge einer vermehrten Expression des Membranproteins p-gp (P-Glykoprotein) (Wilson et al. 1995). Dieses bedingt durch aktive Ausschleusung der chemotherapeutischen Substanzen die Resistenz der Tumoren gegen diverse in der Lymphomtherapie eingesetzte Chemotherapeutika. Ein weiterer Mechanismus für die Chemotherapieresistenz in Hodgkin-Lymphomen wird durch das Protein XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) vermittelt: Es handelt sich um einen Caspase-Inhibitor. Durch die Ausschaltung der Caspaseaktivität wird ein Schritt in der Apoptose unterbunden (Bratton et al. 2001). Untersuchungen haben gezeigt, dass XIAP wesentlich an der Chemotherapieresistenz in Hodgkin-Lymphomen beteiligt ist (Kashkar et al. 2003, Kashkar et al. 2007). Einen weiteren Resis-

tenzmechanismus in Hodgkin-Lymphomen stellt die Veränderung von apoptoseregulierenden Proteinen dar. Die erhöhte Expression des Proteins bcl-2 bewirkt, dass die durch die Chemotherapeutika induzierte Apoptose der Tumorzellen verhindert wird (Reed 1997, Brink et al. 1998, Smolewski et al. 1998).

### **1.5.2 Non-Hodgkin-Lymphome**

Bei den Non-Hodgkin-Lymphomen handelt es sich um bösartige Erkrankungen, die ihren Ausgang von monoklonalen Populationen von B-Lymphozyten nehmen (B-NHL). In 10-15 % der Fälle können auch T-Lymphozyten oder NK-Zellen die Ursprungszelle darstellen (T-NHL). Im Zuge der Erkrankung kommt es zu einer klonalen Expansion der entarteten Zellen. Häufig sind chromosomale Mutationen die Ursache für die Lymphomentstehung. Durch Translokation oder andere Mutationen kann es zu einer Aktivierung von Onkogenen oder den Verlust von Tumorsuppressorgenen kommen. Die Folge ist ein Wachstumsvorteil für die betroffene Zelle. Als Beispiele sind die Translokationen t(14;18) (betroffenes Gen: BCL2), t(8;14) (betroffenes Gen: C-MYC) und t(9;14) (betroffenes Gen: PAX5) zu nennen. Diverse weitere Translokationen und Inversionen sind bekannt. Generell werden indolente und aggressive Lymphome unterschieden.

#### **1.5.2.1 Zytostatische Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome und Zytostatikaresistenz**

Bei den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) handelt es sich um äußerst chemotherapieempfindliche Malignitäten (Bouabdallah und Milpied 2007). Die Standard-Primärtherapie bei aggressiven NHL ist R-CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, zusätzlich Rituximab [Anti-CD20-Antikörper]) bzw. bei Hochrisikopatienten das Mega-CHOEP-Regime (hohe CHOP-Konzentrationen, zusätzlich Etoposid) (Schmitz et al. 2005, Glass et al. 2006). Weiterhin besteht die Möglichkeit einer allogenen oder autologen Stammzelltransplantation mit vorausgegangener Hochdosis-Chemotherapie. Dieses Konzept wird insbesondere bei Patienten mit Rezidiv oder bei Nichtansprechen auf die Primärtherapie eingesetzt (Kim et al.

2006, Schmitz et al. 2005, Josting et al. 2005). Leider verhalten sich die NHL in 30-40 % der Fälle refraktär gegenüber der Chemotherapie. Folgende Resistenzmechanismen sind bisher bekannt: Einen wesentlichen Resistenzmechanismus stellt eine vermehrte Expression des bereits bei den Hodgkin-Lymphomen beschriebenen *mdr-1*-Genes bzw. seines Produktes, des Membrantransporters *p-gp*, dar (Dalton et al. 1989). Weitere Resistenzmechanismen werden auch in den NHL durch die veränderte Expression apoptoseregulierender Substanzen vermittelt, beispielsweise die Überexpression der antiapoptotischen Proteine *bcl-2* (Mounier et al. 2003) oder *bcl-x<sub>L</sub>* (Amundson et al. 2000). Ein Mangel der Tumorzellen an *Apaf-1* (apoptotic protease-activating factor-1) mit der Folge einer gestörten Einleitung der Apoptose kann ebenfalls für Chemotherapieresistenz verantwortlich sein (Sun et al. 2005). Auch die Überexpression von *NF-kB* verhindert die durch die Chemotherapeutika normalerweise induzierte Apoptose der Zellen (Vega et al. 2005).

## 1.6 Aufgabenstellung

In Vorarbeiten war gezeigt worden, dass es assoziiert mit der malignen Transformation in hämatologischen Neoplasien, beispielhaft demonstriert in der AML, zu einer Expression des ABC-Transporters *A3* kommt. Es sollte nun geklärt werden, ob die Akquisition dieser Expression Ausdruck einer Dedifferenzierung der transformierten Zellen auf das Expressionsprofil früher hämatopoetischer Stammzellen sein kann und ob dieses Phänomen auch in lymphatischen Neoplasien nachweisbar ist.

Dementsprechend sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Ist in hämatopoetischen Stammzellen sowie in den Hauptdifferenzierungslinien der Blutbildung eine Expression von *ABCA3* nachweisbar ?
- 2) Ist über die Expression in myeloischen Zelllinien hinaus eine Expression des Transporters auch in Zelllinien und klinischen Proben von Malignomen der lymphatischen Reihe nachweisbar?
- 3) Gibt es Hinweise auf eine prognostische Bedeutung der Höhe der Expression von *ABCA3* in aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen?

## 2 Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Die Proben des Knochenmarkes (KM) und des peripheren Blutes (PB), aus denen die Subpopulationen physiologischer hämatopoetischer Zellen gewonnen wurden, repräsentierten ausschließlich archiviertes Material von Patienten, bei denen zum Ausschluss einer hämatologischen Grunderkrankung Material entnommen worden war und bei denen kein pathologischer Befund erhoben wurde.

Die Untersuchungen an klinischem Material erfolgten ebenfalls ohne Ausnahme an archiviertem Tumormaterial von Patienten, bei denen die Diagnose eines aggressiven NHL gestellt worden war und die im Rahmen der Studien NHL-B1, NHL-B2 und Mint der DSHNHL (Deutsche Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome) aus dem Zeitraum 1993-2000 (NHL-B1/-B2) bzw. 2000-2003 (Mint) behandelt worden waren (Pfreundschuh et al. 2004a, Pfreundschuh et al. 2004b, Pfreundschuh et al. 2006). Die Patienten hatten im Rahmen der Studienaufklärung einer wissenschaftlichen Analyse des archivierten Materials zugestimmt.

### 2.2 Material

#### 2.2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Dampfsterilisator Varioklav®	H. und P. Labortechnik (Oberschleißheim)
Eismaschine	ZIEGRA (Isernhagen)
Elektrophoresegerät (Electrophoresis Power Supply Consort EV202)	Invitrogen (Karlsruhe)
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss (Göttingen)
Mikrowelle	AEG (Nürnberg)
Multifuge 3 L-R	Heraeus (Hanau)
Multipipette Accu-jet®	Brand (Wertheim)



Neubauer-Zählkammer (0,0025mm <sup>2</sup> )	Brand Gläser (Wertheim)
Photometer 8,5 mm Lichtstrahlhöhe	Eppendorf (Hamburg)
Sterilbank HERA Safe	Heraeus (Osterode)
Taqman-Reader 7500 HAT (ABI PRISM)	Applied Biosystems (USA)
Thermocycler T3000	Biometra (Göttingen)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
UV-Transluminator	Biometra (Göttingen)
Vortexer (Vortex-Genie-2)	Schütt-Labortechnik (Göttingen)
Waage	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Schütt-Labortechnik (Göttingen)
Zytospin-Zentrifuge	Shandon (Frankfurt)

Tabelle 1: Geräte

### 2.2.2 EDV

EDV	Hersteller
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems Inc. (San Jose, USA)
Laser Writer 4050N & 2100	Hewlett Packard (Palo Alto, USA)
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Office Publisher 2003	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Office Word 2003	Microsoft (Redmond, USA)
SDS 2.1 Software	Applied Biosystems (USA)
Windows XP	Microsoft (Redmond, USA)

Tabelle 2: EDV

### 2.2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Einfrierboxen	Nalgene (Herford, UK)
Fettstift	Dako-Cytomation (Glostrup, Dänemark)
Filterkarten (Zytospins)	Shandon (Frankfurt)
Filterspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)
Gelkammer (Gelelektrophorese)	Angewandte Gentechnolo- gische Systeme (AGS) (Heidelberg)
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nalgene (Herford, UK)
Kulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt (Braunschweig)
Kulturschalen	Sarstedt (Braunschweig)
MACS-Röhrchen	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Microtest Zellkultur-Platten (6 Well, 96 Well)	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Microtest Zellkultur-Platten (386 Well)	Abgene (Hamburg)
Micro-Test-Röhrchen 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Objektträger (76 x 26 mm)	Knittel-Gläser (Braunschweig)
PCR-Röhrchen 0,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipetten 2 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson (Nümbrecht)
Pipetten 20 µl, 100 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt (Braunschweig)
Spitzröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellsieb	Becton Dickinson (Heidelberg)

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**

### 2.2.4 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, im Reinheitsgrad *pro analysi* von folgenden Firmen bezogen:

Chemikalie	Hersteller
Ampuva (dH <sub>2</sub> O)	Fresenius (Bad Homburg)
AEC-Reagenz	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
BSA	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
DMDS Medium	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
DMEM Medium	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
DMSO Medium	Merck (Darmstadt)
Ethanol 99%	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
FCS Medium (fetales Kälberserum)	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
Ficoll®400	Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd 36 %	Fluka-Chemie (Buchs, Schweiz)
L-Glutamin	Roth (Karlsruhe)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck (Darmstadt)
Hämalaun (nach Mayer)	Roth (Karlsruhe)
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaiser's Glyceringelatine	Merck (Darmstadt)
MACS Anti-PE Microbeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Magermilchpulver	Bio-Rad (München)
β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma Aldrich (Steinheim)

Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin-EDTA 0,05 %	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Xylol (Dimethylbenzol)	Roth (Karlsruhe)

Tabelle 4: Chemikalien

### 2.2.5 Enzyme und Reagenzien für die PCR

Enzyme und Reagenzien	Hersteller
100 bp DNS-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP-Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
DTT	Invitrogen (Karlsruhe)
5 x First Strand Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Ladepuffer (8 x)	PeqLab (Erlangen)
MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen (Karlsruhe)
10 x PCR Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Random Primers	Invitrogen (Karlsruhe)
Superscript Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 5: Enzyme und Reagenzien für die PCR

### 2.2.6 PCR-Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
ABCA3 (RT)	us: AGA CCA CCT ACT TCT CTA GC ds: TCG GCA TGG TAC TCC ATG AT	IBA GmbH (Göttingen)
ABL (RT)	us: GGC CAG TAG CAT CTG ACT TTG ds: ATG GTA CCA GGA GTG TTT CTC C	IBA GmbH (Göttingen)
ABCA3 (RTQ)	us: TTC TTC ACC TAC ATC CCC TAC ds: CCT TTC GCC TCA AA TTT CCC	IBA GmbH (Göttingen)
β-Aktin (RTQ)	us: CAC ACT GTG GCC CAT CT ds: TGA GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG	IBA GmbH (Göttingen)

Tabelle 6: PCR-Primer

## 2.2.7 Kits zur Bearbeitung von DNS und Proteinen

AEC-Kit	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dako Real Detection System AP Kit K 5005	Dako (Glostrup, Dänemark)
RNS Extraktionskit	Qiagen (Hilden)
SuperFect® Transfection Kit	Qiagen (Hilden)
SYBR® Green Kit	Qiagen (Hilden)

Tabelle 7: Kits zur Bearbeitung von DNS und Proteinen

## 2.2.8 Vektoren und DNS-Standards

Vektor/DNS-Standard	Herkunft
pcDNS 3.1 + ABCA3	N. Klugbauer (München)

Tabelle 8: Vektoren und DNS-Standards

## 2.2.9 Antikörper

### 2.2.9.1 Primärantikörper

Antigen	Antikörper	Verdünnung MACS	Verdünnung Zytochemie	Herkunft
ABCA3	Kaninchen anti-human ABCA3		1:100- 1:1000	Dr. N. Inagaki, University of Kyoto, Japan
β-Aktin	Maus			Sigma Aldrich
CD33	Anti-CD33- PE	1:10		Becton- Dickinson (Heidelberg)
CD56	Anti-CD56- PE	1:10		Becton- Dickinson (Heidelberg)
CD61	Anti-CD61- PE	1:10		Becton- Dickinson (Heidelberg)

CD16	Anti-CD16- PE	1:10		Becton- Dickinson (Heidelberg)
CD20	Anti-CD20- PE	1:10		Becton- Dickinson (Heidelberg)
CD19	Anti-CD19- PE	1:10		Becton- Dickinson (Heidelberg)
CD3	Anti-CD3- PE	1:10		Becton- Dickinson (Heidelberg)
CD34	Anti-CD34- PE			Becton- Dickinson (Heidelberg)

Tabelle 9: Primärantikörper

### 2.2.9.2 Sekundärantikörper

DakoCytomation EnVision Anti- Rabbit	DakoCytomation (Carpinteria, CA, USA)
---	--

Tabelle 10: Sekundärantikörper

### 2.2.10 Zelllinien

Name	Quelle	Herkunft
Balm3	Lok et al. 1979	Humanes B-Zell-NHL
Daudi	Klein E et al. 1968	Humanes Burkitt- Lymphom
Granta	Jadayel et al. 1997	Humanes B-Zell-NHL (Mantelzelllymphom)
HDLM2	DSMZ	Humanes Hodgkin- Lymphom

HL-60	DSMZ	Humane akute myeloische Leukämie
HUT-78	Gazdar et al. 1980	Humanes kutanes T-Zell-Lymphom
Jeko	Jeon et al. 1998	Humanes B-Zell-NHL (Mantelzelllymphom)
Jurkat	Schneider et al. 1977	Humane akute lymphatische T-Zell-Leukämie
K-562	Lozzio und Lozzio 1975	Humane chronische myeloische Leukämie
Karpas	Dyer et al. 1990	Humanes B-Zell-NHL
L-1236	Wolf et al. 1996	Humanes Hodgkin-Lymphom
L-428	Schaadt et al. 1980	Humanes Hodgkin-Lymphom
Mino	Lai et al. 2002	Humanes B-Zell-NHL (Mantelzelllymphom)
NB-4	Lanotte et al. 1991	Humane akute myeloische Leukämie
NK-92	Gong et al. 1994	Humanes NK-Zell-NHL
PM-1	Lusso et al. 1995	Subklon der Zelllinie HUT-78
Raji	DSMZ	Humanes Burkitt-Lymphom
Ramos	Klein G et al. 1975	Humanes Burkitt-Lymphom
SP-53	Daibata et al. 1996	Mantelzelllymphom
SUDHL-4	DSMZ	Diffus großzelliges B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (DLCL)
Sup B15	Koyama et al. 2006	Humane akute lymphoblastische Leukämie





## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.3.1.1 RNS-Extraktion mit dem Qiagen-Kit**

Die Präparation von Gesamt-RNS erfolgte mit einem kommerziellen Verfahren der Firma Qiagen (Qiagen-Handbuch April 2002).

Die zu verarbeitenden Zellen wurden gemäß Herstellerangaben in eine Mischung aus  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,1 %) und RLT-Puffer aufgenommen. Bis zu einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  erfolgte eine Aufnahme in 350  $\mu$ l, bei einer Zellzahl zwischen  $5 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  mussten 600  $\mu$ l zugegeben werden. Anschließend wurde das Gemisch gevortext. Dann musste die Zellsuspension auf eine Shredder-Säule gegeben und bei 14000 upm 2 min. lang zentrifugiert werden. Dem Eluat wurde dann im Verhältnis 1:1 70 % EtOH zugefügt, beides durch Pipettieren vermischt, dann auf eine RNS-Säule gegeben und bei 8000 upm 15 sec. lang zentrifugiert. Anschließend folgte das zweimalige Waschen jeder Säule mit 350  $\mu$ l RW1-Puffer. Nach jedem Waschen mussten die Säulen wieder 15 sec. lang bei 8000 upm zentrifugiert werden. Danach wurden je 500  $\mu$ l RPE-Puffer (gemäß Anleitung mit Ethanol [70 %] verdünnt), dazupipettiert und die Säule wiederum 15 sec. lang bei 8000 upm zentrifugiert. Nach erneutem Hinzugeben von je 500  $\mu$ l RPE wurden die Proben für 2 min. bei 14000 upm zentrifugiert. Als Letztes mussten sie zweimal mit je 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (RNase-frei) eluiert und 1 min. lang bei 8000 upm zentrifugiert werden. Die RNA konnte nun entweder sofort weiterverarbeitet oder für eine spätere Bearbeitung bei -80 °C eingefroren werden.

#### **2.3.1.2 Bestimmung der RNS-Konzentration**

Zur Bestimmung der RNS-Konzentration in wässriger Lösung wurden 2  $\mu$ l der RNS mit 98  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend konnte die Extinktion der RNS-Lösung in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen werden. Mithilfe des Lambert-Beer-Gesetzes konnte nun die Konzentration errechnet werden.

Lambert-Beer-Gesetz:  $E = \epsilon \cdot c \cdot d$

$E$  = Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$

$c$  = Teilchenkonzentration der Lösung in mol/l

$d$  = Schichtdicke der durchstrahlten Lösung in cm

Formel zur Berechnung der RNS-Konzentration:  $c = E_{260} \cdot k/d$

$c$  = RNS-Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$

$E_{260}$  = Extinktion bei 260 nm

$d$  = 1 cm (Dicke der Küvette)

$k$  = 40  $\mu\text{g/ml}$  (RNS-spezifischer Koeffizient)

Reinheitsmaß für die RNS: Quotient  $E_{260}/E_{280}$ . Dieser sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

### 2.3.1.3 Reverse Transkription zur cDNS-Synthese

10  $\mu\text{l}$  RNS wurden mit 10  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser aufgefüllt und zur Denaturierung für 10 min. bei 65 °C in einem Thermocycler inkubiert. Nach Abkühlen der Proben für 5 min. auf Eis wurden 20  $\mu\text{l}$  RT-Mix dazugegeben und alles vermischt, bevor im Thermocycler die reverse Transkription erfolgte: 1 h bei 42 °C, 10 min. bei 65 °C.

Bis zur weiteren Verarbeitung mussten die Proben bei 4 °C aufbewahrt werden.

RT-Mix für eine Probe:

5 x First Strand Puffer	8 µl
DTT 0,1 M	4 µl
dNTPs 10 µM	3,5 µl
Random Primers (1:60 mit dH <sub>2</sub> O verdünnt)	2 µl
Superscript	1,5 µl
RNAse Out	1 µl

**Tabelle 12: RT-Mix**

### 2.3.1.4 RT-PCR (RT-Polymerasekettenreaktion)

Je 2 µl der bei der reversen Transkription gewonnenen cDNS wurden 48 µl Mastermix zugesetzt, der je Probe folgende Reagenzien enthielt:

10 x PCR-Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
Primer sense	1 µl (1:10 mit PCR-H <sub>2</sub> O verdünnt)
Primer antisense	1 µl (1:10 mit PCR-H <sub>2</sub> O verdünnt)
Taq-Polymerase	0,4 µl

**Tabelle 13: Mastermix für die RT-PCR**

Nach Auffüllen der genannten Reagenzien auf einen 50 µl Ansatz mit PCR-H<sub>2</sub>O wurden die Proben kurz gevortext und zum Schluss zentrifugiert, bevor sie zu der cDNS hinzugegeben wurden.

Als Letztes mussten die Proben gegebenenfalls mit 3 µl PCR-Öl überschichtet werden. Anschließend wurden sie im Thermocycler nach folgendem Protokoll inkubiert:

10 min. bei 95 °C (initiale Denaturation)

95 sec. bei 95 °C (Denaturation)

45 sec. bei 55 °C (Hybridisierung)

1 min. bei 72 °C (Extension)

Diese Schritte wurden 35-mal wiederholt.

Es folgte eine Inkubation der Proben für 10 min. bei 72 °C und dann eine Abkühlung auf 4 °C.

### **2.3.1.5 Gelelektrophorese**

Zur Herstellung des Gels wurden zunächst 1,2 g Agarose zu 100 ml TBE (1 x) gegeben. Nach dem Vermischen wurde die Lösung für 5 min. in der Mikrowelle gekocht und zwischendurch mehrmals geschwenkt. Nach Abkühlen auf ca. 70 °C wurden 100 µl Ethidiumbromid dazugegeben und das Gel in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach etwa 10 min. war es fest und konnte nun verwendet werden.

Vor dem Laden des Gels musste das PCR-Produkt zunächst mit 8 x Lade-puffer vermischt werden, wobei für je 20 µl Probe 3 µl Puffer verwendet wurden. Neben einer Positiv- bzw. Negativkontrolle (Positivkontrolle: transient mit ABCA3-transfizierte HEK-293A-Zellen, Negativkontrolle: dH<sub>2</sub>O) enthielt jedes Gel auch einen Größenstandard, im Verhältnis 1:1 mit 8 x Ladepuffer vermischt. Nach dem Laden des Gels wurde es bei 100 V laufen gelassen, bis  $\frac{2}{3}$  der Gelstrecke abgelaufen waren. Durch Interkalation des Ethidiumbromids mit der DNS konnten die Banden im Anschluss unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### **2.3.1.6 Quantitative Real-Time-PCR (RTQ-PCR)**

Die Durchführung dieser Methode diente der quantitativen Bestimmung der Expression von ABCA3. Die Quantifizierung erfolgte über die Messung von Fluoreszenz. Hierfür wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green zu den PCR-Produkten gegeben. Er interkaliert mit bzw. bindet an doppelsträngige DNS. Es folgt ein Wiederaufschmelzen der DNS unter kontinuierlicher Temperaturerhöhung (50-95 °C). Als Nächstes wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei einer für das DNS-Fragment spezifischen Temperatur wurde der DNS-Doppelstrang wieder ein einzelsträngiges Molekül. Hierbei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme kann registriert werden. Für die Quantifizierung

wurde das sogenannte „Housekeeping“-Gen Aktin für jede Probe mitgemessen. Als Eichgerade für ABCA3 diente eine Verdünnungsreihe ( $10^{-2}$  -  $10^{-9}$ ) des ABCA3-Plasmids und für Aktin eine Verdünnungsreihe von cDNS einer Modellzelllinie. Die Eichkurven dienten als Standardkurven zur Quantifizierung der in den Proben gemessenen cDNS-Transkripte. Jede Probe wurde als Duplikat sowohl gegen ABCA3 als auch gegen das „Housekeeping“-Gen Aktin aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde für beide Gene dH<sub>2</sub>O mitlaufen gelassen. Für die jeweiligen Ansätze von ABCA3 und Aktin wurde je ein Mastermix mit spezifischen Primern (s. Tab. 6) angesetzt: Der Mastermix für einen Ansatz (0,5 µl cDNS) enthielt:

SYBR® Green	5,25 µl
Primer sense (10 µM)	0,3 µl
Primer antisense (10 µM)	0,3 µl
dH <sub>2</sub> O	4,15 µl

**Tabelle 14: Mastermix für die RTQ-PCR**

Vom jeweiligen Mastermix wurden 10 µl in eine 384-Well-Platte mit 0,5 µl der jeweiligen cDNS-Probe pipettiert und die Platte mit einer Folie überzogen. Nach kurzer Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit wurde die Platte in den Taqman-Cycler gestellt. Die Reaktion im Taqman-Cycler erfolgte in folgenden Schritten:

- 1.) 2 min. bei 50 °C (Stufe 1)
- 2.) 10 min. bei 95 °C (Stufe 2)
- 3.) 15 sec. bei 95 °C (Stufe 3)
- 4.) 45 sec. bei 58 °C
- 5.) 1 min. bei 72 °C
- 6.) 15 sec. bei 95 °C (Stufe 4)
- 7.) 15 sec. bei 60 °C
- 8.) 15 sec. bei 95 °C

Von den Schritten 3-5 erfolgten 40 Zyklen.

Die Analyse erfolgte mittels der Software SDS 2.1. Dabei lässt sich die Zykluszahl ( $C_T$ -Wert = Threshold = „Schwellenwert“) bestimmen, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Reaktionshintergrund abhebt. Führt man parallel zur eigentlichen Messung die gleiche Reaktion mit bekannten cDNS-Matrizenmengen (z. B. mit „Housekeeping“-Gen) durch, erhält man eine Standardkurve mit  $C_T$ -Werten, die einen Rückschluss auf die Produktmengen zulassen.

## **2.3.2 Immunzytologische Methoden**

### **2.3.2.1 Erstellung von Zytospins**

Nach Zählung und Konzentrationsbestimmung der Zellen und Positionierung der Objektträger in der Zytospinzentrifuge konnten die für die Zytospins vorgesehenen Zellen auf die Zentrifuge verteilt werden, wobei pro Zytospin  $2 \times 10^4$  Zellen benötigt wurden. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 min. bei 800 upm. Nach Beendigung der Zentrifugation konnten die Objektträger entnommen werden. Nach einer Trockenzeit von 20 min. standen die fertigen Zytospins für die Färbung zur Verfügung. Zur Konservierung für eine spätere Färbung mussten sie in Alufolie gewickelt und bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren werden.

#### **2.3.2.2 ABCA3-Immunfärbung an Zytospins**

Zunächst musste der Objektträgerbereich, auf dem sich die Zellen befanden, mit einem Fettstift eingegrenzt werden. Anschließend wurden zur Fixierung 200  $\mu\text{l}$  4%-Formalin (Verdünnungspuffer: PBS) aufgebracht und die Objektträger 10 min. bei RT inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit 0,1 % Tween 20 (Verdünnungspuffer: PBS). Als Nächstes wurden zur Inaktivierung von unspezifischen Bindungen 0,3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Verdünnungspuffer: PBS) aufgebracht und die Objektträger wieder 10 min. bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit mussten die Objektträger erneut zweimal mit 0,1 % Tween 20 gewaschen werden. Es folgte eine 10 min. dauernde Inkubation mit 2,5 % Magermilch + 0,1 % Tween 20 (Verdünnungspuffer: PBS). Ohne zu waschen, wurden an-

schließlich 100 µl des Primärantikörpers (Kaninchen anti-human ABCA3) in einer Verdünnung gemäß Tab.9 mit 2,5 % Magermilch + 0,1 % Tween 20 (Verdünnungspuffer: PBS) aufgetragen. Die Objektträger wurden nun für 24 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert, um eine Präzipitation zu verhindern.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger zweimal mit 0,1% Tween 20 (Verdünnungspuffer: PBS) gewaschen. Als Nächstes folgten das Aufbringen von 100 µl Sekundärantikörper in Form von Envision DAKO (Anti-Rabbit) und eine anschließende Inkubationszeit von 30 min. bei RT. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurde die AEC-Reaktion durchgeführt: Zwei Tropfen Acetatpuffer (2,5 M) und jeweils ein Tropfen AEC-Chromogen und Hydrogenperoxid (3 %  $H_2O_2$  in deionisiertem  $H_2O$ ) mussten in 4 ml  $dH_2O$  gelöst und anschließend auf die Objektträger gegeben werden. Nach 10 min. wurden die Objektträger einmal mit PBS gewaschen und dann 3 min. mit Hämatoxylin gegengefärbt. Danach mussten sie einmal mit  $dH_2O$  gewaschen und im Anschluss daran 10 min. in warmem Wasser stehen gelassen werden. Als Letztes wurden die Objektträger mit Glyceringelatine betropft und mit Deckgläsern abgedeckt.

### 2.3.2.3 Färbung eines Tissue Micro Arrays

Die formalinfixierten Gewebeschnitte mussten zunächst entparaffiniert werden. Hierzu wurden sie zweimal für 5 min. in Xylol eingeweicht, anschließend für je 2 min. in 100 %, 96 % und 75 % Alkohol (absteigende Alkoholreihe). Danach wurden sie zuerst in  $dH_2O$  und dann in Tris-Puffer gespült. Es folgte eine Inkubation der Präparate in 10 % BSA-5% FCS (Verdünnungspuffer: Tris-Puffer) für 15 min. bei RT. Im Anschluss wurde das Serum etwas ablaufen gelassen. Als Nächstes wurden der ABCA3-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in Tris-Puffer aufgetragen und die Schnitte für 30 min. bei RT inkubiert. Die nachfolgende Bearbeitung erfolgte mit dem Dako Real Detection System AP Kit K 5005. Nach Bearbeitung der Schnitte laut Handbuch (4. Ausgabe) wurden diese für 5 min. in  $dH_2O$  gespült. Es folgte eine Kernfärbung mit Hämalaun für 2 min. bei

RT. Als Letztes wurden die Schnitte für 5 min. in warmes Leitungswasser gelegt und mit wasserlöslichem Eindeckmittel eingedeckt.

### **2.3.3 Zellbiologische Methoden**

#### **2.3.3.1 Kultivierung von Zellen**

Die in Tab. 11 aufgeführten Zelllinien wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C kultiviert. Medien und Lösungen wurden mit Ausnahme der Trypsinlösung auf 37 °C vorgewärmt.

#### **2.3.3.2 Passagieren von Zellen**

Trypsin-EDTA-Lösung	0,05 % (w/v)	Trypsin
	0,02 % (w/v)	EDTA in PBS

Zum Passagieren der Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz des Zellrasens das Medium abgesaugt und die Zellen kurz mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen bis zur vollständigen Ablösung vom Untergrund mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Der Waschschritt entfernte zum großen Teil die dem Medium zugesetzten Proteinaseninhibitoren, welche zu einer Inaktivierung des Trypsins führen würden. Nach Kontrolle der vollständigen Ablösung im Mikroskop wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe serumhaltigen Mediums gestoppt und die Zellen wurden durch mehrmaliges Resuspendieren vereinzelt. Nach Zentrifugation (1000 upm, 5 min. in der Zentrifuge) standen die Zellen zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

#### **2.3.3.3 Kryokonservierung von Zellen**

Einfriermedium	10 % (v/v)	DMSO im jeweiligen gebrauchsfertigen Zellkulturmedium
----------------	------------	---

Die Zellen wurden trypsiniert und nach Aufnahme in Medium für 5 min. bei 1000 upm und 4 °C in der Zentrifuge pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 1,5 ml Einfriermedium vorsichtig resuspen-



diert und dann in beschriftete, vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden sofort für eine Nacht bei  $-80\text{ °C}$  und ab dem nächsten Tag in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### **2.3.3.4 Revitalisierung von Zellen**

Das Kryoröhrchen musste etwa 1 min. bei RT erwärmt und anschließend in 70 % Ethanol bei  $37\text{ °C}$  aufgetaut werden, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Nach vorsichtiger Entnahme der Zellsuspension wurde diese in 8,5 ml kaltes Medium ( $4\text{ °C}$ ) überführt und 5 min. bei 1000 upm in der Zentrifuge sedimentiert. Mit diesem Waschschrift sollte das DMSO entfernt werden, da es bei Inkubationstemperaturen zytotoxisch wirkt.

Das Zellpellet konnte nun in Kultivierungsmedium aufgenommen und ausplattiert werden. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um restliches DMSO und Zelldetritus zu entfernen.

#### **2.3.3.5 Transfektion von HEK-293A-Zellen mittels Superfect**

Die Transfektion, i. e. der Transfer von Plasmiden in das Zytoplasma von HEK-293A-Zellen, erfolgte mittels liposomalem Gentransfer. Als liposomale Trägersubstanz wurde eine kommerzielle Präparation (Superfect, Qiagen) verwendet.

Protokoll gemäß Qiagen-Handbuch (Stand 12/2002).

Es wurde folgendes Plasmid verwendet: pcDNS 3.1(+)-hABCA3 (Klugbauer und Hofmann 1996).

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $2-8 \times 10^6$  Zellen pro 60-mm-Platte in 5 ml Medium ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h ( $37\text{ °C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) wurden 5  $\mu\text{g}$  DNS, aufgelöst in TE Puffer (pH 7-8), bis zu einem Endvolumen von 150  $\mu\text{l}$  mit Medium verdünnt. Anschließend musste das Gemisch für einige Sekunden abzentrifugiert werden. Als Nächstes wurden 30  $\mu\text{l}$  SuperFect-Transfektionsreagent zu der DNS-Lösung gegeben und die Proben für 10 sec. gevortext, bevor sie zur Komplexbildung für 5-10 min. bei RT inkubiert wurden. Während der Komplexbildung wurde das

Medium vorsichtig abgesaugt. Es folgte ein einmaliges Waschen der Zellen mit 4 ml PBS. Nach Zugabe von 1 ml Medium zu den Proben und zweimaligem Hoch- und Runterpipettieren konnte die gesamte Menge zu den Zellen in den 60-mm-Platten gegeben werden. Anschließend mussten die Zellen mit den Transfektionskomplexen für 2-4 h unter ihren normalen Wachstumsbedingungen inkubieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen erneut einmal mit 4 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von frischem Medium standen die Zellen nun zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

#### **2.3.3.6 Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation mononukleärer Zellen**

Um Untersuchungen an mononukleären Zellen durchführen zu können, mussten das frische oder eingefrorene Blut bzw. Knochenmark zunächst aufgereinigt und anschließend die mononukleären Zellen von Erythrozyten und Thrombozyten isoliert werden. Hierzu wurden 10-15 ml Blut in ein 50-ml-Spitzröhrchen gegeben. In ein zweites 50-ml-Spitzröhrchen wurden 15 ml Ficolllösung gefüllt. Das Blut musste nun im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt, anschließend in eine Pipette aufgenommen und ganz langsam in das Röhrchen mit dem Ficoll gegeben werden. Es bildeten sich zwei Phasen. Anschließend wurde das Röhrchen für 20 min. bei 2200 upm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich die mononukleären Zellen in der Phase zwischen dem Ficoll (obere Phase) und den sich in der untersten Phase befindlichen Thrombozyten und Erythrozyten. Die mononukleären Zellen wurden mit einer 10-ml-Pipette aufgenommen und in ein neues Spitzröhrchen überführt, welches dann bis 50 ml mit PBS aufgefüllt wurde. Zum Schluss wurden die Zellen ein zweites Mal zentrifugiert, dieses Mal für 10 min. bei 1200 upm. Sie standen anschließend für die weitere Verarbeitung zur Verfügung.

### **2.3.3.7 Plastikadhärenz zur Isolation von Monozyten aus peripherem Blut**

Nach der Blutentnahme wurden die mononukleären Zellen zunächst gemäß Abschnitt 2.3.3.6 von Thrombozyten und Erythrozyten isoliert. Um anschließend die Monozyten von den übrigen mononukleären Zellen zu trennen, wurden  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in eine 10-ml-Kulturflasche gegeben. Medium: DMEM + 2 mM L-Glutamin + Pen/Strep ohne FCS. Als Nächstes mussten die Zellen für 1-3 h in einem Brutschrank inkubiert werden. Am Ende der Inkubationszeit waren die Monozyten am Boden der Kulturflasche adhären, sodass die übrigen Zellen abgenommen werden konnten. Nach Trypsinierung standen die isolierten Monozyten zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

### **2.3.3.8 Zellsortierung mit MACS**

Nach dem Aufreinigen der Zellen wurden diese in 1000  $\mu$ l MACS-Puffer gelöst und anschließend über ein 10- $\mu$ m-Zellsieb von grobem Detritus befreit. Als Nächstes erfolgte eine Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer, vorher wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 mit Blaupuffer verdünnt. Die im Folgenden genannten Mengenangaben galten für etwa  $10^7$  Zellen. Bei abweichender Zellzahl mussten die Mengen entsprechend angepasst werden. Nach Zentrifugation bei 1200 upm für 10 min. und Abpipettieren des Überstandes wurden die Zellen in 100  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert. Dann wurden 10  $\mu$ l des entsprechenden Antikörpers dazugegeben. Nach Mischung und Inkubation auf einem Schüttler für 30 min. bei 4-8 °C im Dunkeln wurden 1-2 ml MACS-Puffer dazugegeben und die Lösung 10 min. bei 1200 upm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation mussten der Überstand vollständig abpipettiert und das Zellpellet in 80  $\mu$ l MACS-Puffer gelöst werden. Im Anschluss wurden 20  $\mu$ l Anti-PE MicroBeads hinzugegeben. Alles wurde gut vermischt und – wiederum auf einem Schüttler – für 15 min. bei 4-8 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch Hinzufügen von 1-2 ml MACS-Puffer und Zentrifugieren für 10 min. bei 1200 upm gewaschen. Nach vollständigem Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet in

---

500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen waren nun bereit für die Sortierung über die MACS-Säule. Für geringere Zellzahlen wurde eine MS-Säule benutzt, für größere Zellzahlen (mehr als  $10^8$  Zellen) eine LS-Säule. Nach Positionierung der MACS-Säule in dem MACS-Sorter und Anfeuchtung der Säule durch Spülung mit 500 µl MACS-Puffer (LS-Säulen: 3 ml) wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und dann dreimal mit je 500 µl MACS-Puffer (LS-Säulen: 3 ml) gewaschen. Anschließend wurde das Eluat weggegossen und die Säule auf ein 15 ml Spitzröhrchen gestellt. Als Nächstes mussten 1000 µl MACS-Puffer (LS-Säulen: 5 ml) hinzugefügt und die Zellen mit Druck in das Röhrchen gepresst werden. Nach Zentrifugation der Zellen für 10 min. bei 1200 upm und Abpipettieren des Überstandes wurden die sortierten Zellen in 350 µl RLT-Puffer +  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  weggefroren oder sofort weiterverarbeitet.

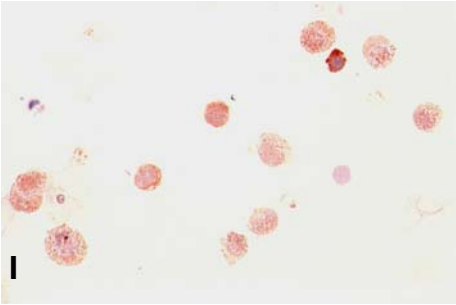
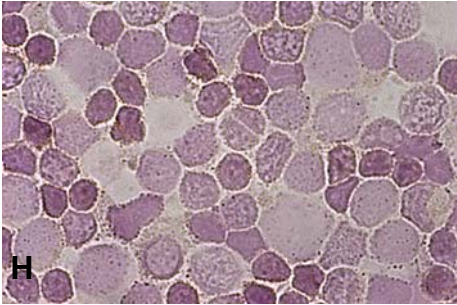
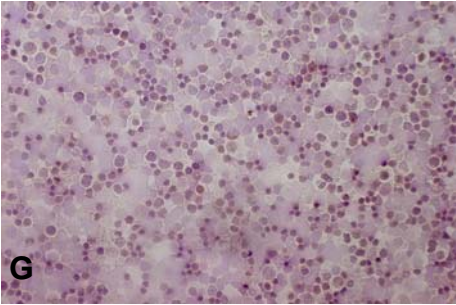
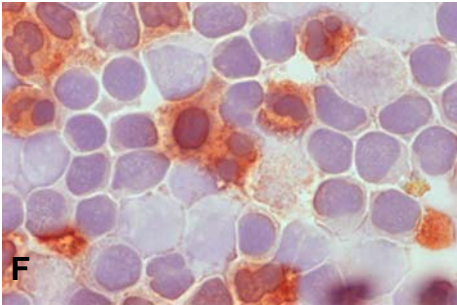
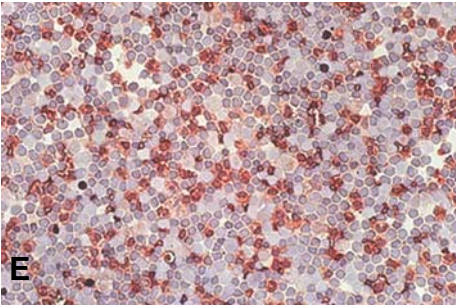
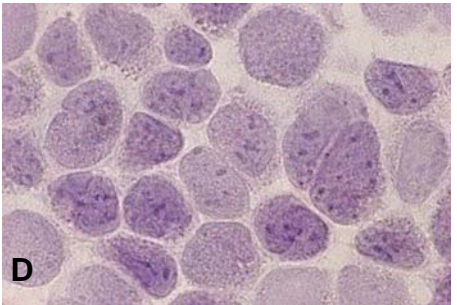
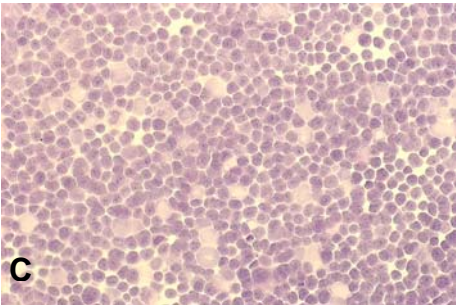
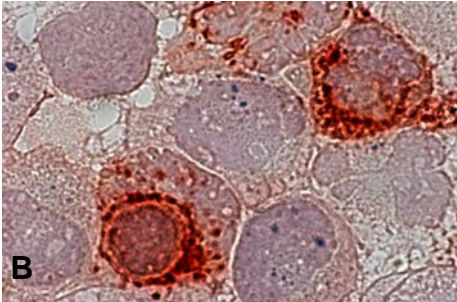
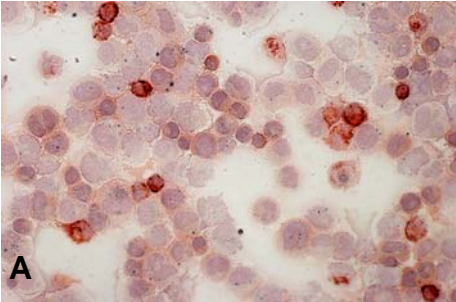
## 3 Ergebnisse

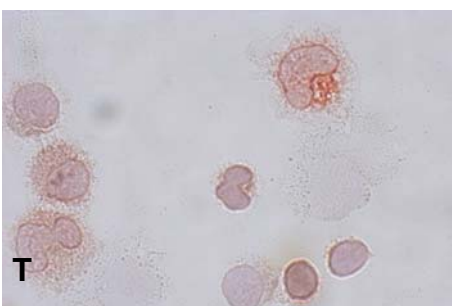
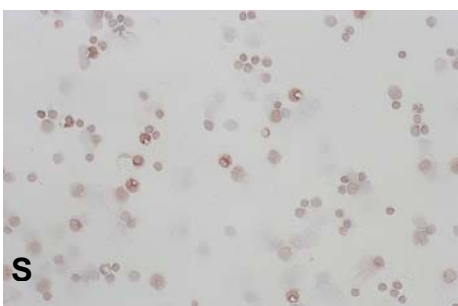
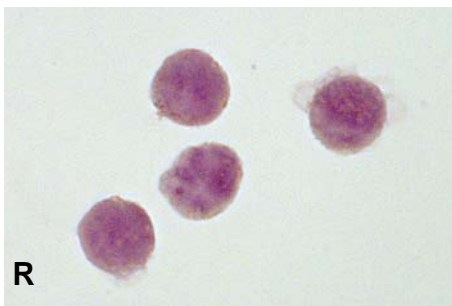
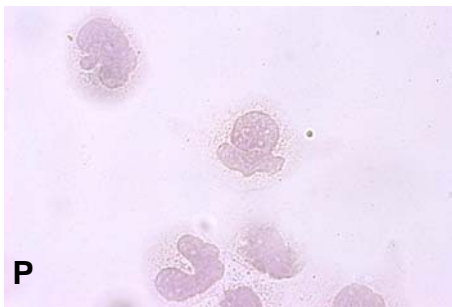
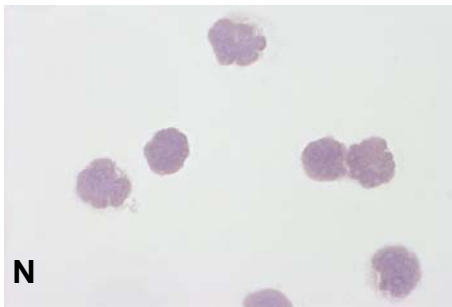
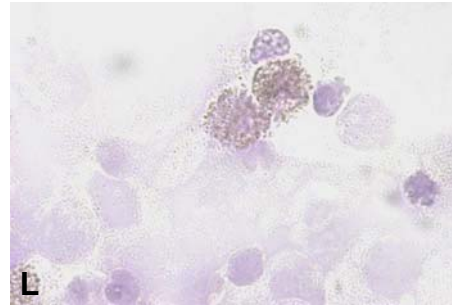
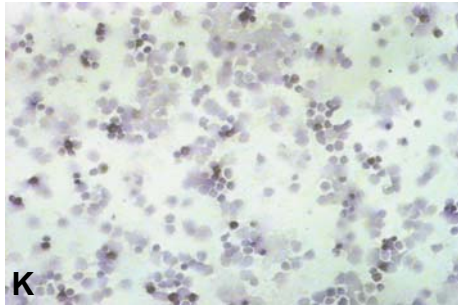
### 3.1 ABCA3-Expression in der Hämatopoese

#### 3.1.1 Immunzytologischer Nachweis von ABCA3 in Zellen der physiologischen Hämatopoese

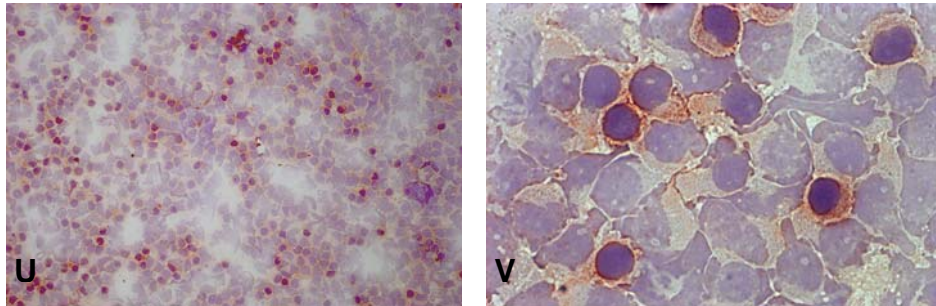
Die Expression einer Reihe von tumorassoziiert nachweisbaren Proteinen wird durch die Aktivierung früher Expressionsprofile im Rahmen der Dedifferenzierung in der malignen Transformation erklärt. Vor diesem Hintergrund sollte das Profil der Expression von ABCA3 in Zellen der hämatopoetischen Differenzierungslinien geklärt werden. Mittels der in Abschnitt 2.3.2.2 beschriebenen ABCA3-Immunfärbung konnte die Expression des ABCA3-Transportproteins in Subpopulationen der physiologischen Hämatopoese analysiert werden.

Folgende Zellreihen wurden untersucht: hämatopoetische Stammzellen, charakterisiert durch die Expression von CD34, sowie durch die effiziente Ausschleusung von Hoechst 33342 charakterisierte SP-Zellen, CD3-positive T-Zellen, CD13-positive myelomonozytäre Vorläuferzellen, CD19-positive B-Zellen, plastikadhärente Monozyten und CD56-positive NK-Zellen. Zur Kontrolle der Färbequalität wurde bei jeder Färbung sowohl eine Positivkontrolle (HEK-293A-Zellen mit transienter Expression von ABCA3) als auch eine Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) mitgefärbt. Wie in Abb. 1 ersichtlich, zeigten CD34-positive Stammzellen und SP-Zellen eine deutliche Expression des Proteins im Zytoplasma. Ebenfalls positiv waren CD56-positive NK-Zellen und ein Teil der monozytär differenzierten Zellen. Die übrigen untersuchten Zellreihen der Hämatopoese (s. o.) zeigten in der Zytochemie keine Expression von ABCA3.









**Abb.1: Immunzytologischer Nachweis der Expression von ABCA3 in Zellreihen der Hämatopoese.** Die Immunzytologie mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen ABCA3 wies eine Expression des Transporters mit granulärem Muster im Zytoplasma nach, beispielhaft in der Färbung der positiven Kontrolle (A: HEK-293A-Zellen mit transienter Expression von ABCA3, 20 x vergrößert, B: HEK-293A Zellen mit transienter Expression von ABCA3, 100 x vergrößert). Stark positiv reagierten die CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen sowie die SP-Zellen (E: CD34-positive Stammzellen, 20 x vergrößert, F: CD34-positive Stammzellen, 100 x vergrößert, I: SP-Zellen, 40 x vergrößert, J: SP-Zellen, 100 x vergrößert). Ebenfalls positiv waren die plastikadhärenten Monozyten sowie die CD56-positiven NK-Zellen (S: plastikadhärente Monozyten, 20 x vergrößert, T: plastikadhärente Monozyten, 100 x vergrößert, U: CD56-positive NK-Zellen, 20 x vergrößert, V: CD56-positive NK-Zellen, 100 x vergrößert). CD34-negative hämatopoetische Zellen, Non-SP-Zellen, CD3-positive T-Zellen, CD13-positive granulozytäre Vorläuferzellen und CD19-positive B-Zellen wiesen in der Immunzytologie keine Expression von ABCA3 auf (G: CD34-negative hämatopoetische Zellen, 20 x vergrößert, H: CD34-negative hämatopoetische Zellen, 100 x vergrößert, K: Non-SP-Zellen, 40 x vergrößert, L: Non-SP-Zellen, 100 x vergrößert, M: CD3-positive T-Zellen, 20 x vergrößert, N: CD3-positive T-Zellen, 100 x vergrößert, O: CD13-positive granulozytäre Vorläuferzellen, 20 x vergrößert, P: CD13-positive granulozytäre Vorläuferzellen, 100 x vergrößert, Q: CD19-positive B-Zellen, 20 x vergrößert, R: CD19-positive B-Zellen, 100 x vergrößert). Ebenfalls keine Anfärbbarkeit wiesen die nicht mit ABCA3 transfizierten HEK-293A-Zellen auf (C: HEK-293A-Zellen, 20 x vergrößert, D: HEK-293A-Zellen, 100 x vergrößert).



### **3.1.2 Nachweis von mRNS für ABCA3 in hämatopoetischen Zellen mittels RT-PCR**

Als zweite Methode zum Nachweis der Bildung von ABCA3 in hämatopoetischen Zellen wurde die Detektion von mRNS mittels RT/PCR gewählt. Der Nachweis der Expression von ABCA3 auf der Ebene der mRNA mittels RT-PCR zeigte Folgendes (vgl. Abb. 2, 3 und 4): CD34 positive Stammzellen und SP-Zellen wiesen ein hohes Maß an ABCA3-Expression auf. Ein geringeres Expressionslevel zeigten Monozyten, CD20-positive B-Zellen und CD33-positive Zellen. Am geringsten wurde ABCA3 in den CD19-positiven B-Zellen, CD3-positiven T-Zellen, CD56-positiven NK-Zellen und in CD13-positiven Zellfraktionen exprimiert. Negativ für die Expression von ABCA3 waren die CD61-positiven Vorläuferzellen der Thrombozyten (Megakaryozyten). Die Diskrepanz dieser Ergebnisse zu den Ergebnissen der Immunzytologie ist am ehesten auf die höhere Sensitivität der molekularbiologischen Nachweismethode zurückzuführen. Zusammenfassend wurde ABCA3 in mehreren Fraktionen der physiologischen Hämatopoese nachgewiesen, mit den höchsten Werten auf der Ebene von blutbildenden Stamm- und Progenitorzellen.

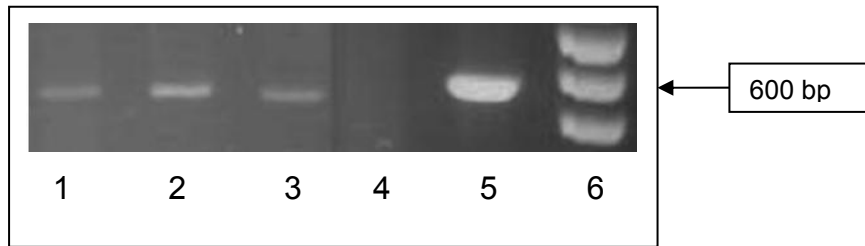


Abb. 2A

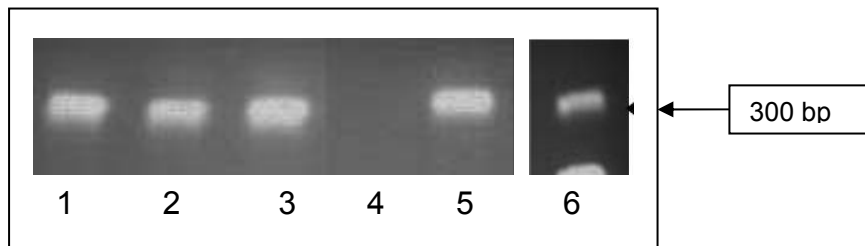
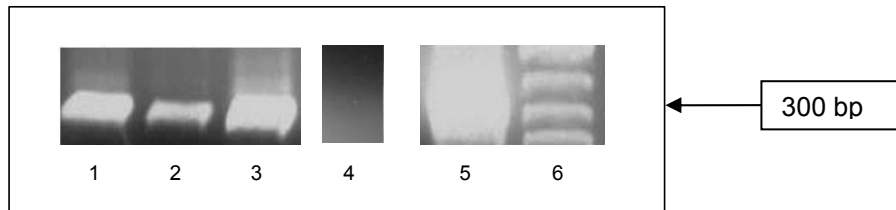
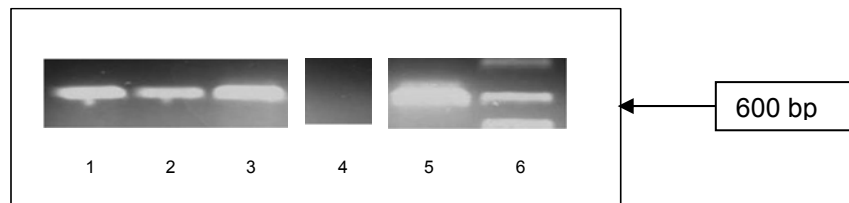
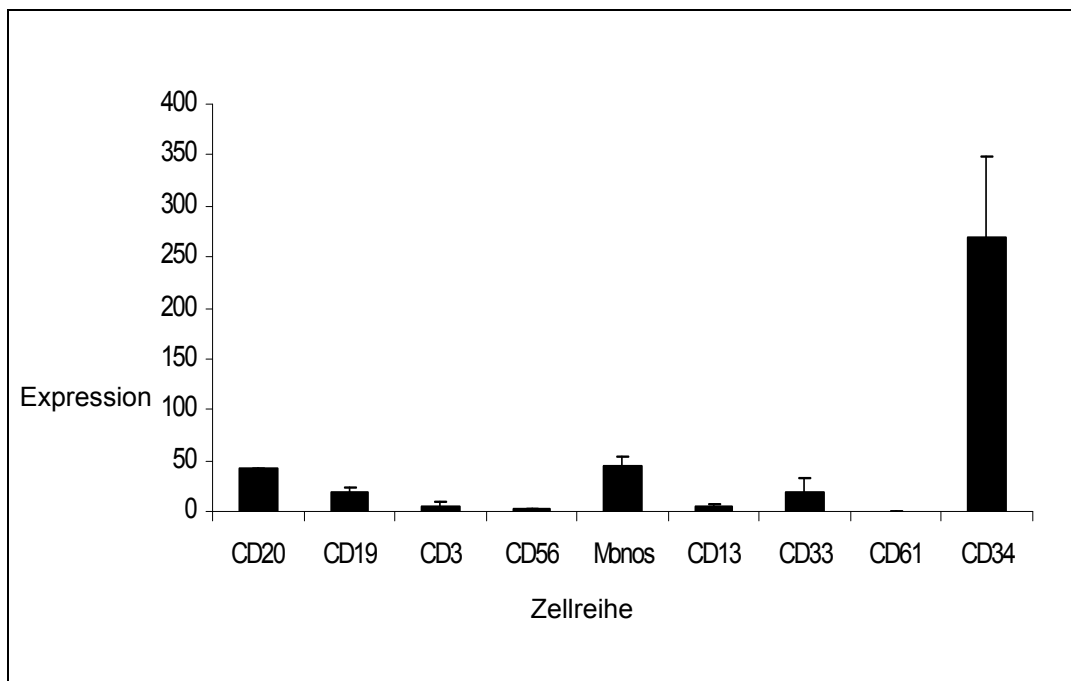


Abb. 2B

**Abbildung 2: Detektion der mRNS für ABCA3 mittels RT-PCR in CD3-positiven T-Zellen. T-Zellen des peripheren Blutes wurden immunmagnetisch mit einem Antikörper gegen CD3 aufgereinigt, und die Expression von ABCA3 mittels RT/PCR wird nachgewiesen. Die CD3-positiven T-Zellen zeigten in der RT-PCR nur eine geringe Expression von ABCA3 (2A: ABCA3-PCR, Abb. 2B: ABL-PCR. 1-3 = CD3-positive Zellen, 4 = Negativkontrolle (dH<sub>2</sub>O), 5 = Positivkontrolle (transient mit ABCA3-transfizierte HEK-293A-Zellen, 6 = Größenstandard (100 bp DNS-Leiter)).**

**Abb. 3A****Abb. 3B**

**Abbildung 3: Detektion der mRNS für ABCA3 in CD34 positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen.** CD34-positive Zellen des Knochenmarkes wurden immunmagnetisch angereichert und Transkripte von ABCA3 mittels RT/PCR wie in Abb. 2A/B nachgewiesen (3A: ABCA3-PCR, Abb. 3B: ABL-PCR. 1-3 = CD34-positive hämatopoetische Vorläuferzellen, 4 = Negativkontrolle (dH<sub>2</sub>O), 5 = Positivkontrolle (transient mit ABCA3 transfizierte HEK-293A Zellen), 6 = Größenstandard (100bp DNS-Leiter)).



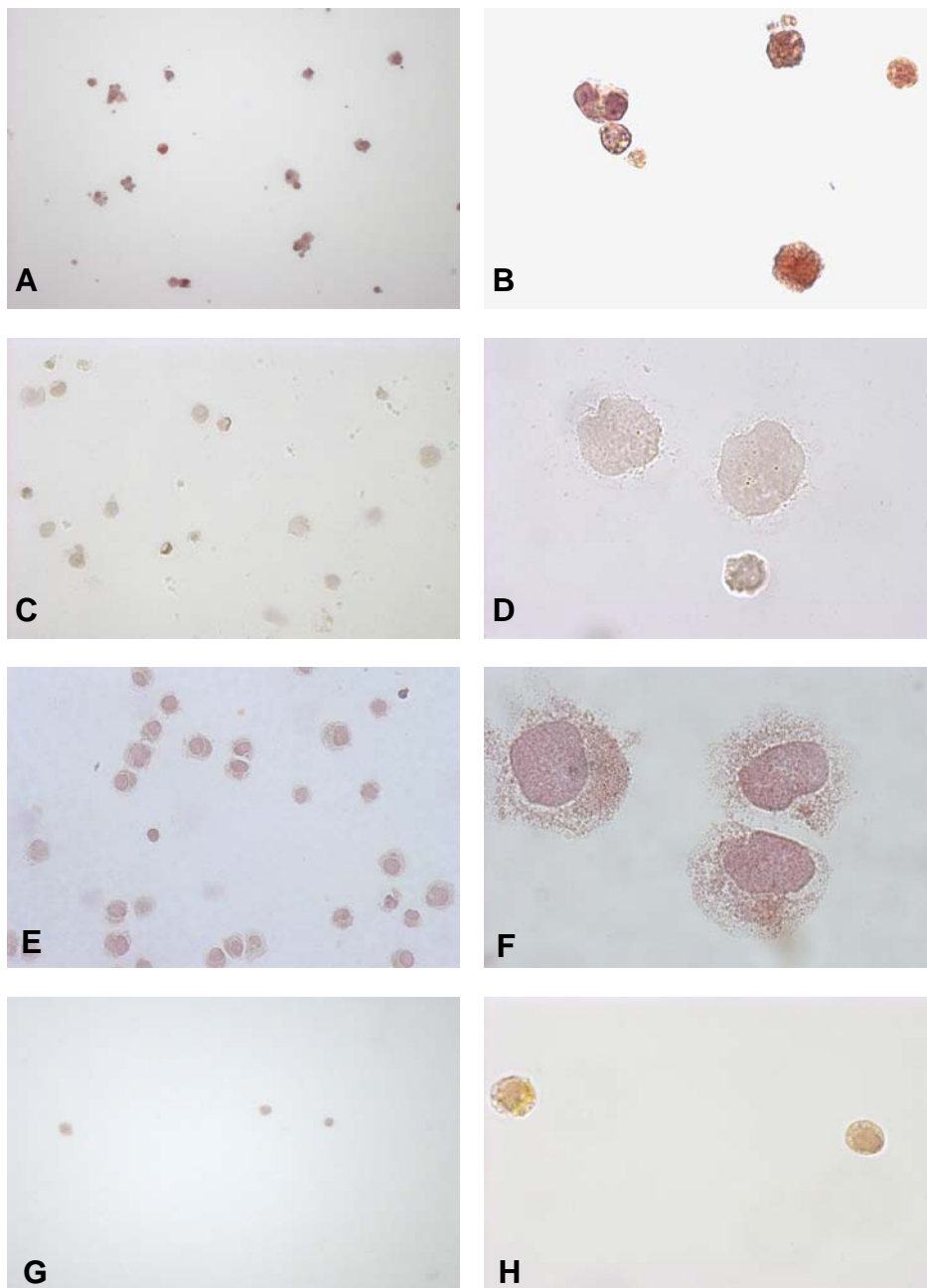
**Abbildung 4: Vergleich der Expression von ABCA3 in Zellreihen der Hämatopoese.** Mittels quantitativer RT-PCR (RTQ-PCR) wurde in CD34-positiven Zellen ein deutlich höheres Niveau der Expression von ABCA3 nachgewiesen als in CD20/CD19-positiven B-Zellen, CD3-positiven T-Zellen, CD56-positiven NK-Zellen, CD61-positiven thrombozytären bzw. CD33-positiven myeloischen Zellpopulationen sowie den Monozyten. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Analysen an immunmagnetisch aufgereinigten Zellpopulationen.

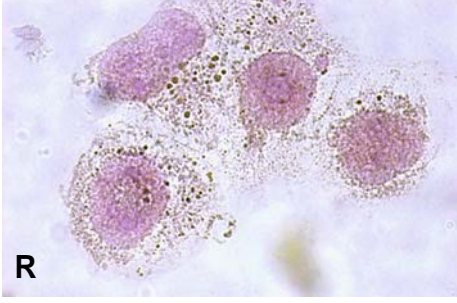
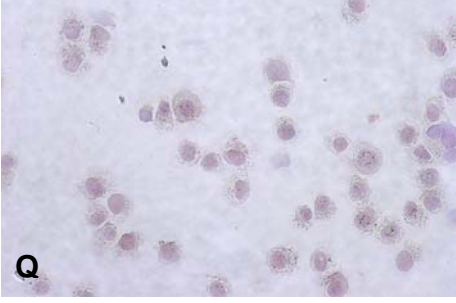
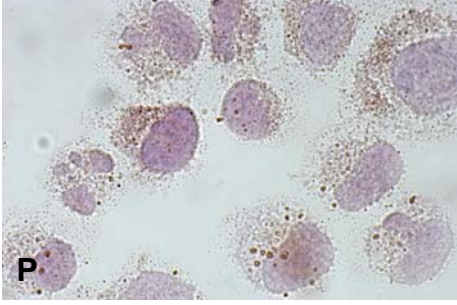
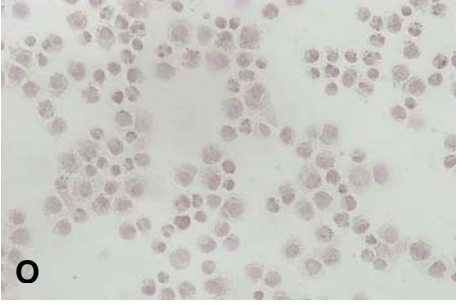
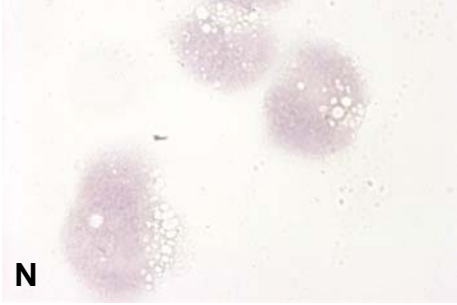
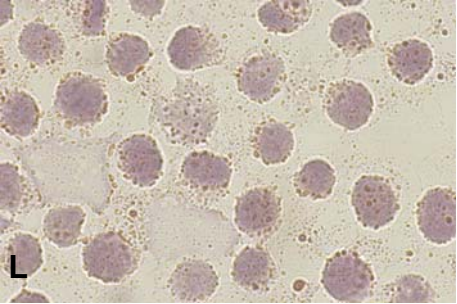
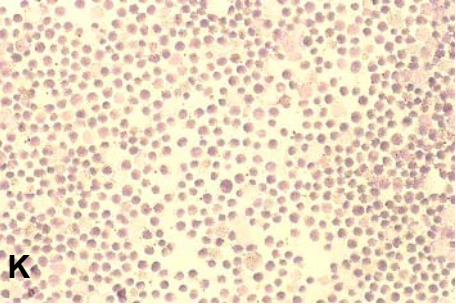
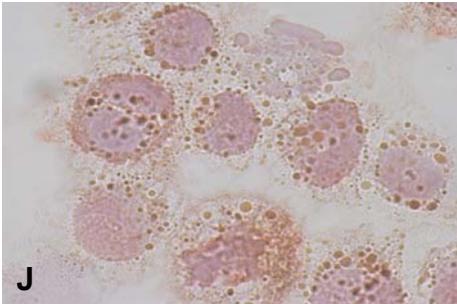
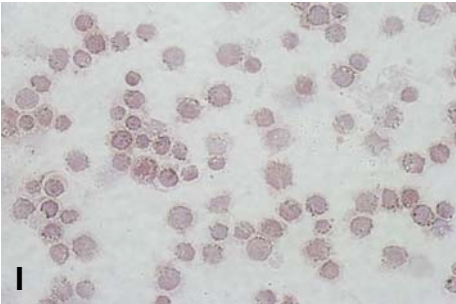
### 3.2 ABCA3-Expression in Zelllinien

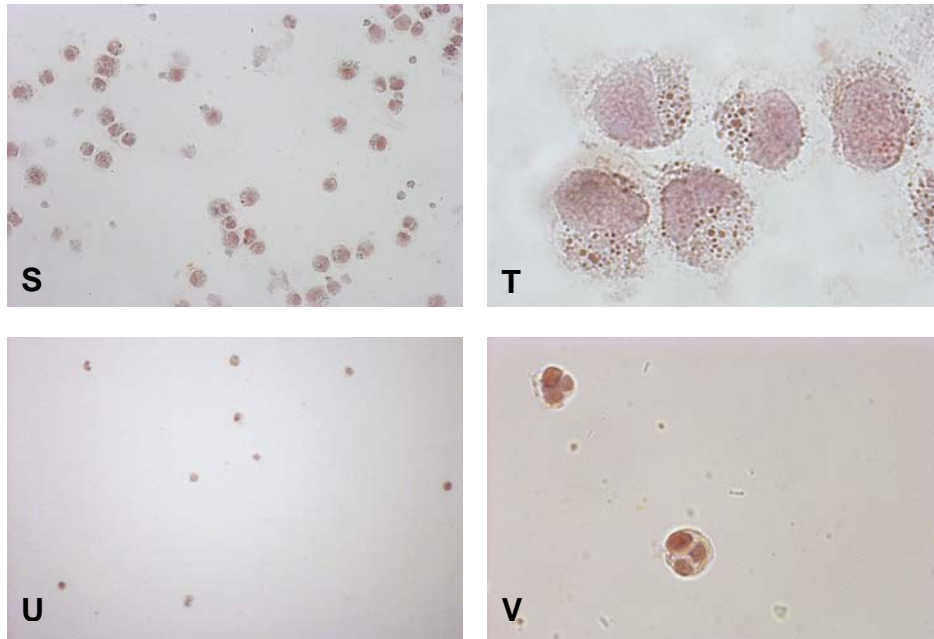
#### 3.2.1 Immunzytologischer Nachweis der Expression von ABCA3 in malignen lymphatischen Zelllinien

Um einen Überblick über die Expression von ABCA3 in Neoplasien lymphatischer Differenzierung zu gewinnen, wurde analog zur Untersuchung der ABCA3-Expression in der physiologischen Hämatopoese diese auch mit einer Sammlung von Zelllinien durchgeführt, die neben der AML als positiver Kontrolle alle Hauptformen von malignen Lymphomerkrankungen repräsentierten. Die Färbungen zeigten eine deutliche Expression bei den Zelllinien HL-60 (AML), Daudi (Burkitt-Lymphom) und Granta (MCL).

Weiterhin waren die Zelllinien HDLM-2 (HL), SudHL4 (DLCL), Raji, Ramos (Burkitt), und Jurkat (T-NHL) ABCA3-positiv. Keine ABCA3-Expression zeigten in der Zytochemie die Zelllinien NB4 (AML), K562 (CML) und Balm3 (DLCL). Zusammenfassend konnte eine Expression von ABCA3 auf Proteinebene im Zytoplasma von Zelllinien aller Hauptformen von malignen Lymphomerkrankungen nachgewiesen werden (Abb. 5).







**Abbildung 5: Immunzytologischer Nachweis der Expression von ABCA3 in Zelllinien hämatologischer Neoplasien.**

Der immunzytologische Nachweis von ABCA3 zeigte ein heterogenes Expressionsmuster des Transporters im Zytoplasma der Zelllinien hämatologischer Neoplasien. Während bei einigen Zelllinien der B- und T-Zellreihe eine deutliche granuläre Expression im Zytoplasma nachweisbar war, reagierten andere Zelllinien negativ.

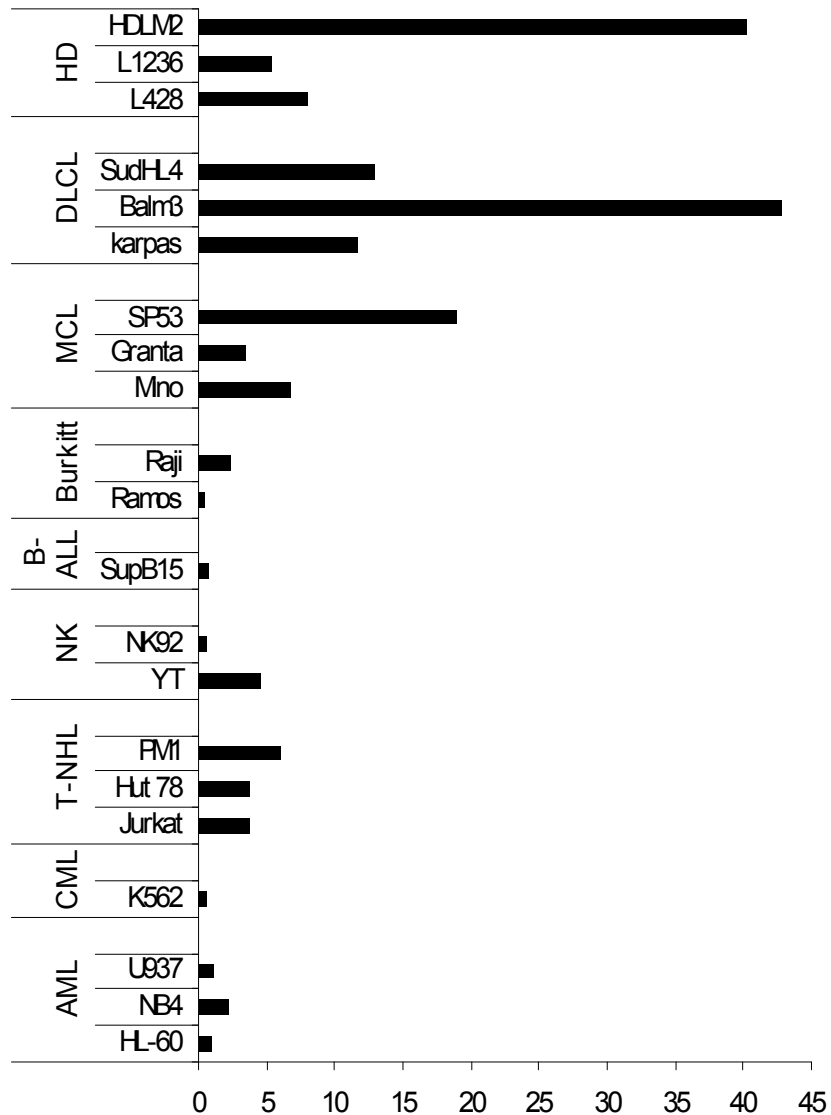
Positiv für die Expression des Transporters waren im Einzelnen die Burkitt-Lymphomzelllinie Daudi (I = Daudi-Zellen, 20 x vergrößert, J = Daudi-Zellen, 100 x vergrößert), die DLCL-Zelllinie SuDHL-4 (K = SuDHL-4-Zellen, 20 x vergrößert, L = SuDHL-4-Zellen, 100 x vergrößert), die Burkitt-Lymphomzelllinien Ramos und Raji (O = Raji-Zellen, 20 x vergrößert, P = Raji-Zellen, 100 x vergrößert, Q = Ramos-Zellen, 20 x vergrößert, R = Ramos-Zellen, 100 x vergrößert), die HL-Zelllinie HDLM-2 (G = HDLM-2-Zellen, 20 x vergrößert, H = HDLM-2-Zellen, 100 x vergrößert), die AML-Zelllinie HL-60 (A: HL-60-Zellen, 20 x vergrößert, B: HL-60-Zellen, 100 x vergrößert), Granta (MCL) (U = Granta-Zellen, 20 x vergrößert, V = Granta-Zellen, 100 x vergrößert) sowie die T-NHL-Zelllinie Jurkat (S = Jurkat-Zellen, 20 x vergrößert, T = Jurkat-Zellen, 100 x vergrößert). Die übrigen untersuchten Zelllinien reagierten in der Immunzytologie negativ (C = NB-4-Zellen, 20 x vergrößert, D = NB-4-Zellen, 100 x vergrößert).

ßert, E = K-562-Zellen, 20 x vergrößert, F = K-562-Zellen, 100 x vergrößert, M = Balm-3-Zellen, 20 x vergrößert, N = Balm-3-Zellen, 100 x vergrößert).

### **3.2.2 Nachweis von mRNS für ABCA3 in malignen lymphatischen Zelllinien mittels RT-PCR**

Es erfolgte zunächst eine RT-PCR mit orientierender, densitometrischer Auswertung der Ergebnisse. Folgende Zelllinien wurden untersucht: Mino, L428, PM1, YT, L1236, Granta, HL60, Jeko, SP53, HDLM2, NB4, U937 und Jurkat. Es war bei jeder PCR außerdem sowohl eine Positivkontrolle (mit ABCA3 transfizierte HEK-293A-Zellen) als auch eine Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) vorhanden, um einen methodischen Fehler auszuschließen. Die Negativkontrolle zeigte keine Bande. In allen untersuchten Zelllinien konnte eine Expression des ABCA3-Transporters nachgewiesen werden. Bei der quantitativen RT-PCR (siehe Abb. 6) wurde die Expression von ABCA3 in den Zelllinien HDLM-2, L-1236, L-428 (HD), SuDHL-4, Balm-3, Karpas (DLCL), SP53, Granta, Mino (MCL), Raji, Ramos (Burkitt), SupB15 (B-ALL), NK-92, YT (NK), PM-1, Hut78, Jurkat (T-NHL), K-562 (CML), NB-4 und U-937 (AML) auf molekularbiologischer Ebene untersucht. Das Expressionslevel wurde in Relation zur ABCA3-Expression bei HL-60 dargestellt. Eine im Vergleich zu HL-60 sehr hohe Expression konnte bei den Zelllinien HDLM-2 und Balm-3 beobachtet werden, eine mittelstarke Expression zeigte sich bei L1236, SuDHL4, Karpas, SP53, Granta, Mino, PM1, Hut 78, Jurkat und YT. Ein geringes Expressionslevel hatten Raji, Ramos, SupB15, NK92, K562, U937 und NB4. Somit scheint eine hohe Expression eher bei HD, DLCL, MCL und T-/B-NHL vorzuliegen, niedrige Expressionslevel haben die Burkitt-Lymphome, B-ALL-, NK-, CML- und AML-Zelllinien.





**Abbildung 6: Vergleichende Darstellung der Expression von ABCA3 in malignen Zelllinien.** Dargestellt ist die ABCA3-Expression der Zelllinien im Verhältnis zu der Expression in der Zelllinie HL 60, gemessen mittels quantitativer RT-PCR (RTQ-PCR). Die höchste Expressionsrate wurde in aggressiven Lymphomen vom Typ des diffus großzelligen B-NHL (DLCL) und in Zelllinien vom Typ des M. Hodgkin gefunden. Auch in den übrigen untersuchten Zelllinien konnte eine Expression des Transporters nachgewiesen werden.

### 3.3 Untersuchung der Expression von ABCA3 bei Patienten mit NHL

Aufgrund der zuvor nachgewiesenen hohen ABCA3-Expression in NHL-Zelllinien wurden Proben befallener Lymphknoten von Patienten mit aggressiven NHL hinsichtlich der ABCA3-Expression untersucht und ihre klinischen Daten (NHL-B1/B2 Studie, Mint-Studie) hinzugezogen. Das Ziel war, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Höhe der ABCA3-Expression und der Prognose der betroffenen Patienten zu überprüfen.

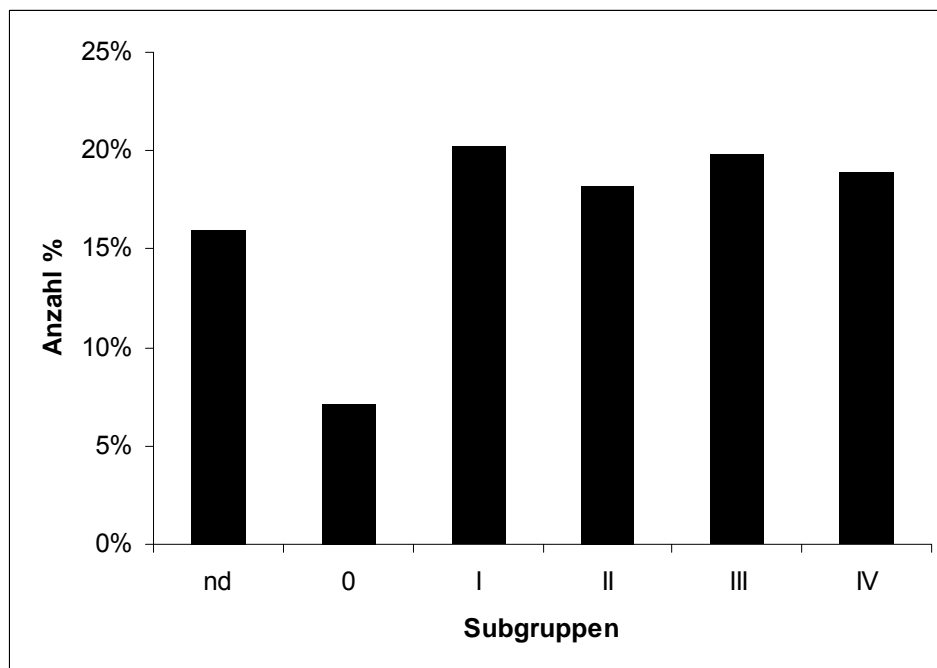
Hierzu wurde ein Tissue Micro Array angefertigt: Kleine Schnitte aus den lymphombefallenen Lymphknoten der Patienten wurden auf Objektträger aufgebracht, fixiert und gegen ABCA3 gefärbt. Es folgte eine Einteilung der Schnitte in Subgruppen entsprechend ihrer Färbeintensität (Subgruppe I-IV), anschließend wurden sie nach der Expressionshöhe in drei Kategorien eingeordnet: hohe (high), intermediäre (intermediate) und geringe (low) Expression. Die Einordnung erfolgte durch B. Chapuy, W. Klapper und S. Corsham. Eine Konsensusmeinung wurde gebildet.

Für die NHL-B1-Studie zeigte sich Folgendes: 12 % wurden in Subgruppe 0 eingeordnet, 21 % in Gruppe I, 15 % in Gruppe II, 17 % in Gruppe III und 24 % in Gruppe IV. Die Expressionshöhe „low“ zeigten 41 % der bewerteten Proben, „intermediate“ 15 %, als „high“ wurden 32 % eingestuft.

Bei der NHLB2-Studie fielen 12 % in die Subgruppe 0, 21 % in Subgruppe I, 15 % in Subgruppe II, 12 % in Subgruppe III und 24 % in Subgruppe IV. Bei 41 % wurde die Expressionshöhe „low“ vergeben, bei 15 % „intermediate“ und bei 32 % „high“.

In der Mint-Studie wurden 6 % der Subgruppe 0 zugeordnet, 20 % der Subgruppe I, 26 % der Subgruppe II, 17 % der Subgruppe III und 17 % der Subgruppe IV. Die Expressionshöhe war bei 26 % „low“, bei 26 % „intermediate“ und bei 34 % „high“.

Für alle drei Studien zusammengefasst ergaben sich folgende Zuordnungen: Auf die Subgruppe 0 entfielen 7 %, auf Subgruppe I 20 %, auf Subgruppe II 18 %, auf Subgruppe III 20 % und auf Subgruppe IV 19 % (Abb. 7). Bei der Bewertung der Expressionshöhe wurden 27 % als „low“, 18 % als „intermediate“ und 39 % als „high“ eingestuft (Abb. 8).



**Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der NHL-Proben in Subgruppen mit einer unterschiedlich hohen Färbeintensität.**

nd: aus technischen Gründen nicht gewertet

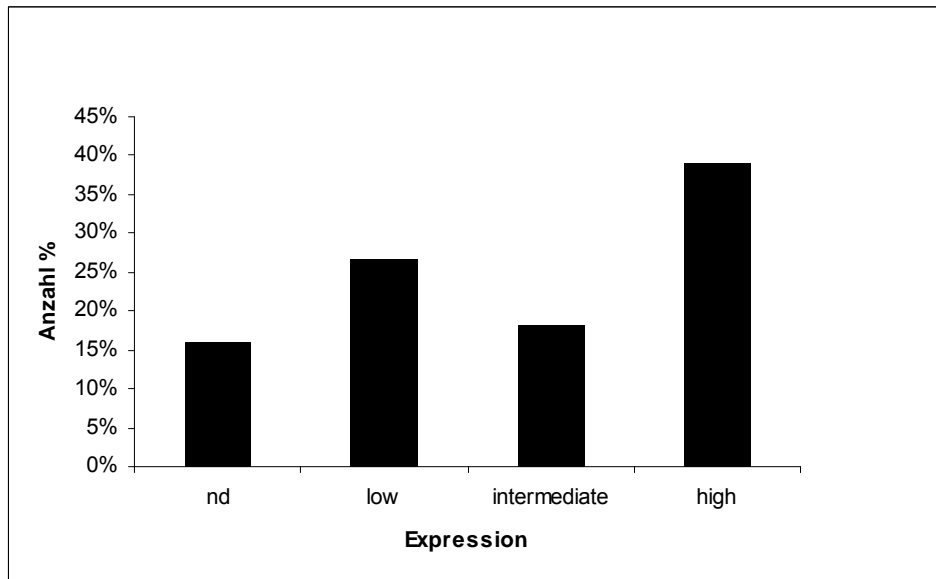
0: Prozentsatz der in Subgruppe 0 eingeordneten Proben

I: Prozentsatz der in Subgruppe I eingeordneten Proben

II: Prozentsatz der in Subgruppe II eingeordneten Proben

III: Prozentsatz der in Subgruppe III eingeordneten Proben

IV: Prozentsatz der in Subgruppe IV eingeordneten Proben.



**Abbildung 8: Relative Verteilung der NHL-Tumorproben nach Expression von ABCA3 unter Berücksichtigung des relativen Anteils positiver Zellen und der Färbeintensität. Definiert wurden die Gruppen niedrige (low), intermediäre (intermediate) und hohe (high) ABCA3-Expression.**

nd: aus technischen Gründen nicht gewertet

low: Prozentsatz der der Expressionshöhe „low“ zugeordneten Tumorproben

intermediate: Prozentsatz der der Expressionshöhe „intermediate“ zugeordneten Tumorproben

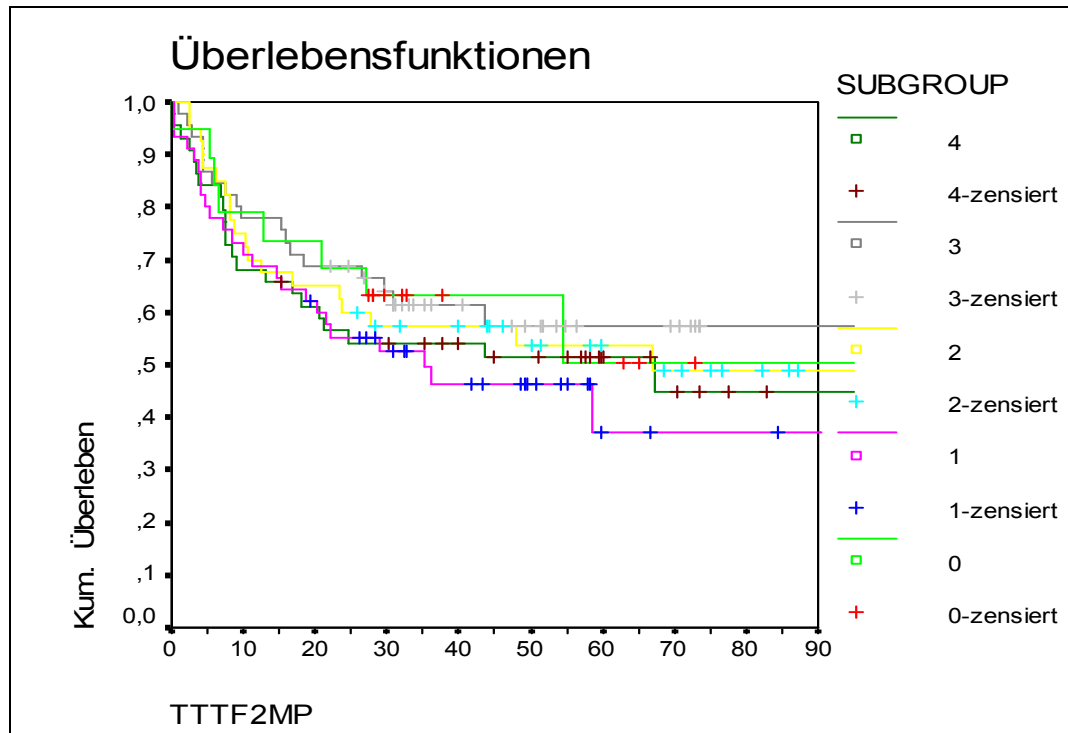
high: Prozentsatz der der Expressionshöhe „high“ zugeordneten Tumorproben

### **3.4 Prognostische Bedeutung der Höhe des ABCA3-Expressionslevels bei Patienten mit NHL**

Durch eine statistische Auswertung sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Höhe der ABCA3-Expression und der Prognose der Patienten untersucht werden. Die Auswertung erfolgte für die NHL-B1- und NHL-B2-Studie gemeinsam sowie gesondert für die Mint-Studie in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Informatik und Klinische Epidemiologie der Universität Leipzig, wo die klinischen Daten der berücksichtigten Studien vorliegen (Dipl.-Math. M. Ziepert). Der Kaplan-Meier-Plot für das ereignisfreie Überleben (Event-free Survival) der NHL-B1- und NHL-B2-Studie ergab für die verschiedenen Subgruppen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 9). Auch der Kaplan-Meier-Plot für die Expressionshöhen ergab keine signifikanten Differenzen in Bezug auf das ereignisfreie Überleben (Abb. 10). Als Ereignisse wurden Rezidiv, Krankheitsprogress oder Tod unmittelbar an der Erkrankung gewertet. Mit einer weiteren Analyse nach Kaplan-Meier sollte das Gesamtüberleben (Overall Survival) untersucht werden. Abb. 11 macht deutlich, dass hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven für die verschiedenen Subgruppen feststellbar ist. Das Gleiche gilt für den Vergleich der Kurven der verschiedenen Expressionshöhen (Abb. 12). Zur Verifizierung der Ergebnisse der Kaplan-Meier-Plots wurden jeweils Log-Rank-Tests angefertigt, welche die Signifikanz der Ergebnisse bestätigten.

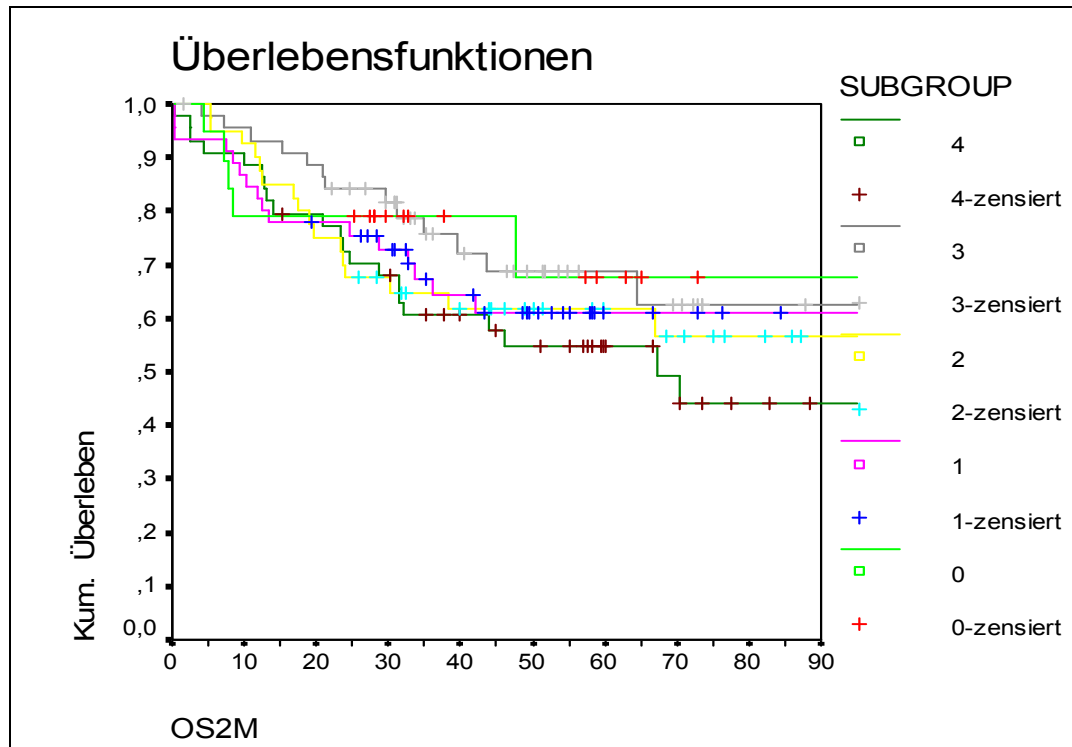
Als Nächstes wurden auf die gleiche Weise die Daten aus der Mint-Studie untersucht. Auch hier fanden sich bezüglich des ereignisfreien Überlebens weder bei den einzelnen Subgruppen (Abb. 13) noch bei den unterschiedlichen Expressionshöhen (Abb. 14) signifikante Unterschiede. Auch hier konnte die Signifikanz der Ergebnisse jeweils durch einen Log-Rank-Test bestätigt werden.

Zusammenfassend ergab diese Untersuchung, dass die Prognose der Patienten mit aggressiven NHL unabhängig von der Höhe der ABCA3-Expression zu sein scheint. Ein statistischer Zusammenhang konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 9: Geschätzte Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier zum Vergleich des ereignisfreien Überlebens (Event-free Survival) bei den Patienten der Subgruppen 0 bis 4. Die Ergebnisse der NHL-B1- und NHL-B2-Studien wurden zusammengefasst. Es zeigten sich keine Unterschiede in den Überlebensfunktionen der Subgruppen.**

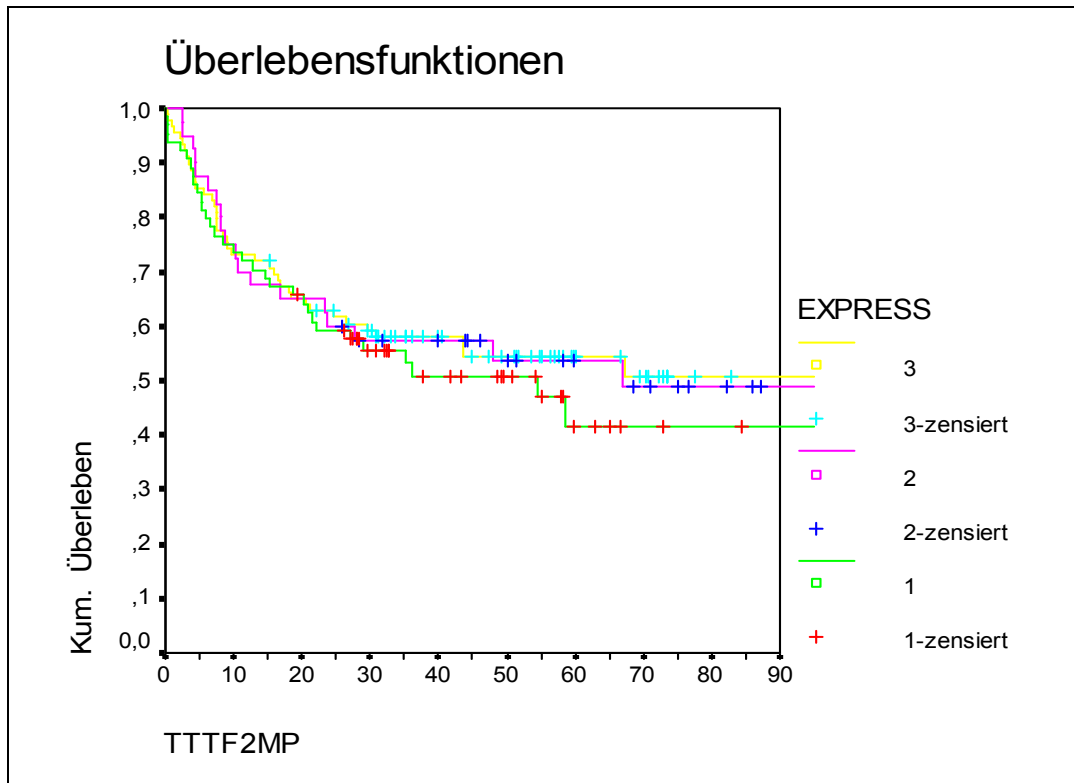
Subgroup = Subgruppe, 0 = Subgruppe 0, 1 = Subgruppe 1, 2 = Subgruppe 2, 3 = Subgruppe 3, 4 = Subgruppe 4



**Abbildung 10: Geschätzte Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier zum Vergleich des Gesamtüberlebens (Overall Survival) bei den Patienten der Subgruppen 0-4. NHL-B1- und NHL-B2-Studie wurden zusammengefasst.**

Es ergaben sich keine Unterschiede in den Überlebensfunktionen der Subgruppen.

Subgroup = Subgruppe, 0 = Subgruppe 0, 1 = Subgruppe 1, 2 = Subgruppe 2, 3 = Subgruppe 3, 4 = Subgruppe 4

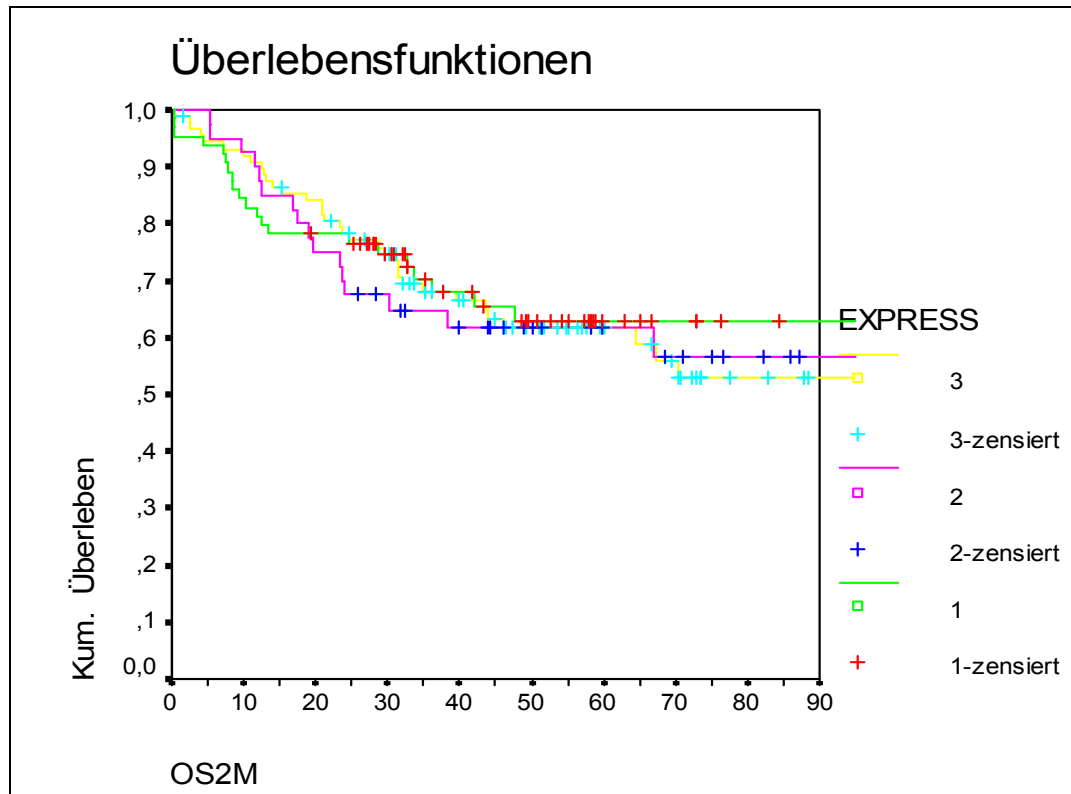


**Abbildung 11: Geschätzte Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier zum Vergleich des ereignisfreien Überlebens (Event-free Survival) bei den Patienten der Expressionshöhen 1-3. NHLB1- und NHLB2-Studie wurden zusammengefasst.**

Hinsichtlich des ereignisfreien Überlebens konnte kein Unterschied zwischen den Überlebensfunktionen der Patienten mit unterschiedlichen Expressionshöhen nachgewiesen werden.

1 = Expressionshöhe „high“, 2 = Expressionshöhe „intermediate“, 3 = Expressionshöhe „low“

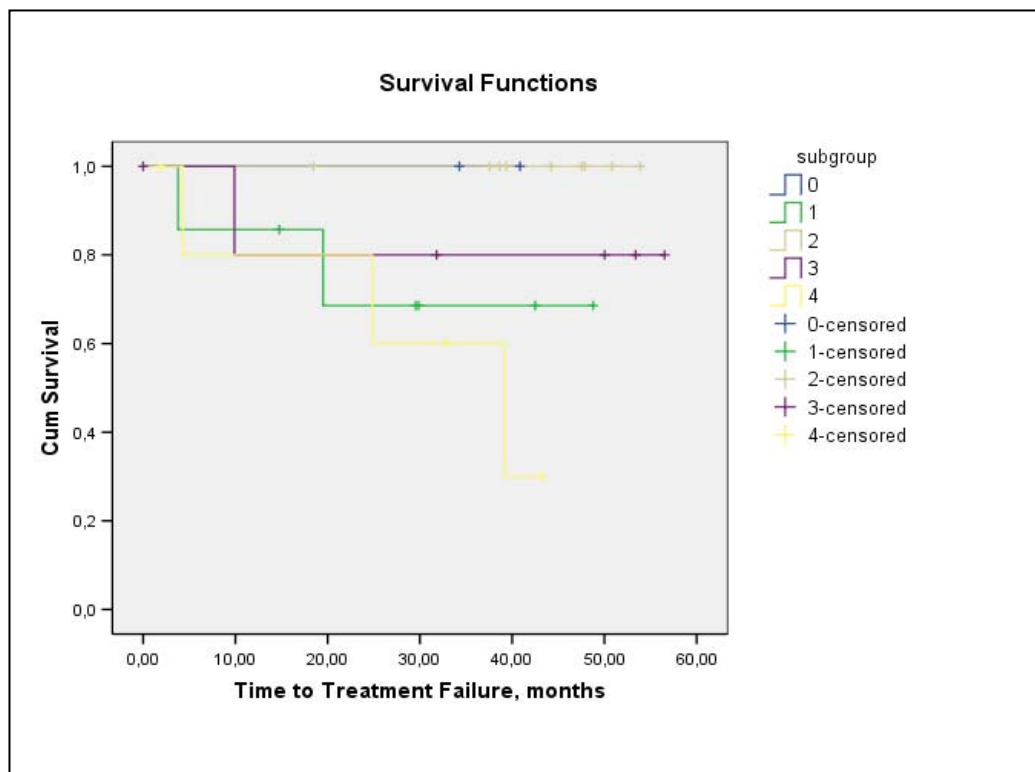




**Abbildung 12: Geschätzte Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier zum Vergleich des Gesamtüberlebens (Overall Survival) der Patienten der Expressionshöhen 1-3. NHL-B1- und NHL-B2-Studie wurden zusammengefasst.**

Es konnte kein Unterschied in den Überlebensfunktionen der Patienten mit unterschiedlichen Expressionshöhen nachgewiesen werden.

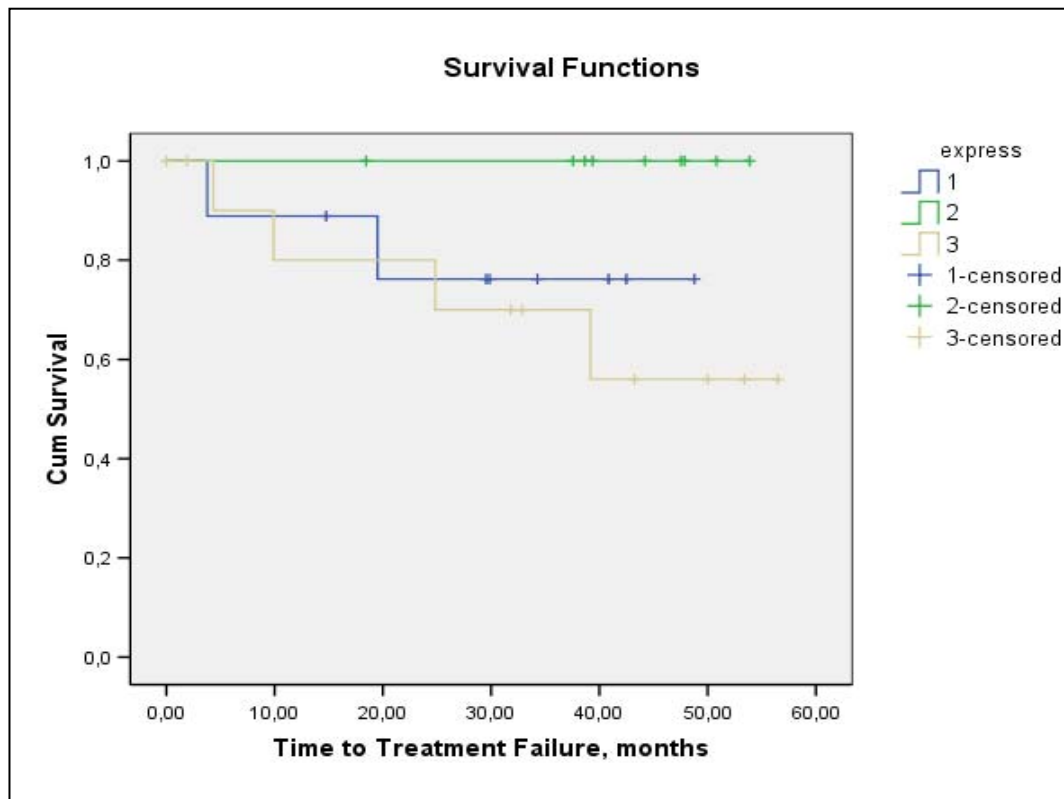
1 = Expressionshöhe „high“, 2 = Expressionshöhe „intermediate“, 3 = Expressionshöhe „low“



**Abbildung 13: Geschätzte Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier zum Vergleich des ereignisfreien Überlebens (Event-free Survival) bei den Patienten der Subgruppen 0-4 der Mint-Studie.**

Es konnte kein Unterschied in den Überlebensfunktionen der Patienten der verschiedenen Subgruppen nachgewiesen werden.

Subgroup = Subgruppe, 0 = Subgruppe 0, 1 = Subgruppe 1, 2 = Subgruppe 2, 3 = Subgruppe 3, 4 = Subgruppe 4.



**Abbildung 14: Geschätzte Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier zum Vergleich des ereignisfreien Überlebens (Event-free Survival) bei den Patienten mit den Expressionshöhen 1-3 der Mint-Studie.**

Es konnte kein Unterschied in den Überlebensfunktionen der Patienten der verschiedenen Expressionshöhen festgestellt werden.

1 = Expressionshöhe „high“, 2 = Expressionshöhe „intermediate“, 3 = Expressionshöhe „low“

## 4 Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Entdeckung, dass es assoziiert mit der malignen Transformation in hämatologischen Neoplasien, beispielhaft demonstriert in der AML, zu einer Expression des ABC-Transporters A3 kommt (Wulf et al. 2004). Es sollte nun geklärt werden, ob das Auftreten dieser Expression Ausdruck einer Dedifferenzierung der transformierten Zellen auf das Expressionsprofil früher hämatopoetischer Stammzellen sein kann. Ferner sollte untersucht werden, ob auch in lymphatischen Neoplasien eine Expression von ABCA3 nachzuweisen ist.

Bezüglich der Expression von ABCA3 in der physiologischen Hämatopoese wies ich mittels Realtime-PCR nach, dass ABCA3 in den CD34-positiven Stammzellen, den SP-Zellen sowie in CD20/CD19-positiven B-Zellen, CD3-positiven T-Zellen, CD13-positiven myelo-monozytären Vorläuferzellen, CD33-positiven Zellen und in CD56-positiven NK-Zellen exprimiert wird. Die höchste Anzahl an Transkripten fand sich in den CD34-positiven Stammzellen und den SP-Zellen. Bei der immunzytologischen Untersuchung der entsprechenden Zellreihen reagierten die CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen und die SP-Zellen – konkordant zu dem Nachweis einer hohen Anzahl von Transkripten mittels RT/PCR – stark positiv. Abweichend von den Ergebnissen der RT-PCR wiesen die CD34-negativen Vorläuferzellen, die Non-SP-Zellen, außerdem die CD3-positiven T-Zellen, die CD19-positiven B-Zellen und die CD13-positiven myelo-monozytären Vorläuferzellen immunzytologisch keine Expression des Transporters auf. Als Begründung für diese abweichenden Ergebnisse erscheint wahrscheinlich, dass ABCA3 zwar auf RNS-Ebene vorhanden ist, es aber beispielsweise in den immunzytologisch negativen Zellreihen nicht zu einer Expression auf Proteinebene kommt oder die Expressionshöhe unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Beide Methoden zeigen übereinstimmend sowohl auf RNS- als auch auf Proteinebene eine ausgesprochen hohe ABCA3-Expression bei den CD34-positiven Stammzellen sowie bei deren Vorläuferzellen, den SP-Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass ABCA3 bereits auf Stammzelebene exprimiert wird, und dies in deutlich höherem Maße als in differen-

zierteren Zellreihen, in welchen eine Expression nicht nachgewiesen werden konnte. Dies könnte dahingehend bewertet werden, dass die ABCA3-Expression in den Malignitäten eine Dedifferenzierung auf Stammzebene darstellt, da in den Malignitäten in hohen Maßen ein Protein exprimiert wird, das in der physiologischen Hämatopoese vor allem auf Stammzebene ein hohes Expressionslevel aufweist und in differenzierteren Zellreihen nur in deutlich geringeren Mengen exprimiert wird. Dieses Verhalten erinnert an weitere Proteine, für die ein ähnlicher Zusammenhang aufgezeigt wurde: Das Transportprotein P-Glycoprotein (p-gp), codiert durch das *mdr-1*-(*ABCB1*-)Gen, verleiht Tumorzellen, in denen es in hohem Maße exprimiert wird, durch aktiven Efflux eine Resistenz gegen diverse chemotherapeutische Substanzen und hat negative prognostische Relevanz (Juranka et al. 1989, Sonneveld 2000, Nooter und Sonneveld 1994). Es wurde herausgefunden, dass das *mdr-1*-Gen und sein Produkt, das p-gp, in CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen in relativ hohen Mengen exprimiert wird. In differenzierteren hämatopoetischen Zellreihen lag das Expressionslevel deutlich niedriger (Drach et al. 1992). Als weiteres Beispiel ist die Gruppe der onkofetalen Proteine anzuführen. Beispielfhaft wird das als Tumormarker relevante Alpha-Fetoprotein (AFP) physiologisch nur in der fetalen Leber exprimiert, nach Abschluss der Fetalperiode wird seine Expression supprimiert (Zhou et al. 2006). In hepatozellulären Karzinomen sowie weiteren Malignitäten, insbesondere des Gastrointestinaltraktes, wird es in hohen Konzentrationen nachgewiesen. Durch das Auftreten von AFP im Blut kann es als Tumormarker verwendet werden (Zhou et al. 2006). Ein weiteres Beispiel ist das onkofetale Protein Glypican 3 (GPC3). Es handelt sich um einen sehr sensitiven Tumormarker für das hepatozelluläre Karzinom. In physiologischer Weise wird Glypican 3 in der 18.-39. Gestationswoche in der fetalen Leber produziert, in der adulten Leber findet sich keine Expression (Yamauchi et al. 2005).

Für ABCA3 weiter unbeantwortet ist zurzeit die Frage, welche physiologische Funktion dem Transportprotein in den Stammzellen zukommt. Zu denken wäre zum einen an eine Schutzfunktion der Zelle vor äußeren Einflüssen bzw. potentiell toxischen Substanzen. Diese können unter Um-

ständen zu einem Funktionsverlust bis hin zur Apoptose der Zelle führen, in diesem Fall mit gravierenden Folgen, da es sich um eine pluripotente Vorläuferzelle handelt, die essentiell für die lebenslange Regenerationsfähigkeit und Neubildung aller hämatopoetischen Zellreihen ist.

Dem weiter oben erwähnten p-gp (mdr-1) wurden, abhängig von den Zellen, die es exprimieren, unterschiedliche Funktionen zugeordnet: Durch die Expression in hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks schützt p-gp (mdr-1) dieses vor toxischen Einflüssen wie zum Beispiel Chemotherapeutika (Wang et al. 2006, Guo und Jin 2006). Wie weiter oben beschrieben, macht es hämatologische und weitere Tumoren durch eine Überexpression resistent gegen chemotherapeutische Therapie (Goldstein et al. 1989). Durch aktiven Efflux von körperfremden Substanzen wie z. B. manchen Medikamenten ist p-gp an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Takano et al. 2006). An den Membranen des Gastrointestinaltraktes sowie der Niere und der Leber sorgt p-gp für eine erschwerte Resorption verschiedener Substanzen wie z.B. Medikamenten sowie für deren gesteigerte renale oder biliäre Exkretion (Juranka et al. 1989, Ieiri et al. 2004). Interindividuelle Unterschiede in der Anzahl der Transporter bedingt durch genetische Polymorphismen resultieren so beispielsweise in einer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten, die von p-gp transportiert werden (Ieiri et al. 2004, Jamroziak und Robak 2004).

#### **4.1 ABCA3-Expression in Zelllinien und Malignitäten der lymphatischen Reihe**

Nachdem eine hohe ABCA3-Expression in Malignomen der myeloischen Reihe, insbesondere in AML, in Vorarbeiten bereits nachgewiesen worden war und durch Untersuchungen für diese Arbeit eine starke Expression des Transportproteins auf Stammzellebene gezeigt werden konnte, standen entsprechende Untersuchungen für Zelllinien und Malignome der lymphatischen Reihe noch aus. Der Nachweis sollte, analog zu den vorangegangenen Untersuchungen, auf zytologischer und molekularbiologischer Ebene erfolgen.

Insgesamt ließ sich in fast allen ausgewählten Zelllinien eine ABCA3-Expression nachweisen, die Höhe des Expressionslevels war heterogen mit hoher Varianz.

In dem Spektrum der getesteten Zelllinien wurde eine deutliche Expression des Transporters in Zelllinien von Patienten mit M. Hodgkin und Patienten mit aggressivem B-Zelllymphom gefunden. Diese Tumoren zeichnen sich generell durch ein gutes Ansprechen auf die Primär-Chemotherapie aus (Diehl et al. 2003, Bouabdallah und Milpied 2007). Allerdings kommt es auch nach zunächst erfolgreicher Chemotherapie häufig zu Rezidiven. Bedingt werden diese meist durch eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber den Chemotherapeutika. Die Tatsache, dass es bei den oben erwähnten Tumoren trotz einer hohen Expression des ABCA3-Transporters zu einem guten Ansprechen auf die Chemotherapie kommt, spricht zunächst einmal gegen eine Rolle von ABCA3 in der Zytostatikaresistenz dieser Tumoren. Allerdings ist zu bedenken, dass die untersuchten Zelllinien aus dem Gewebe von Patienten im Rezidiv der Erkrankung stammen, Patienten also, bei denen sich Tumorzellen der Primärtherapie gegenüber zumindest zum Teil refraktär verhalten haben. Somit kann das hier untersuchte Material nicht als repräsentativ für die Tumorentitäten gewertet werden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass ABCA3 eine Rolle in der Zytostatikaresistenz des M. Hodgkin und der aggressiven Lymphome zukommt.

#### **4.2 Prognostische Bedeutung des ABCA3-Expressionslevels bei Patienten mit NHL**

Die Untersuchung der lymphatischen Zelllinien und Malignitäten hatte ein besonders hohes Expressionslevel für die Gruppe der B-NHL ergeben. Es stellte sich die Frage, ob auch hier – vergleichbar mit der AML – ein statistischer Zusammenhang zwischen der Höhe des Expressionslevels und der Prognose der Patienten besteht. Um dies zu untersuchen, wurden Proben aus einheitlich archivierten Lymphknoten von NHL-Patienten, die im Rahmen von prospektiv-randomisierten Studien der DSHNHL behandelt worden waren, hinsichtlich der Expression von ABCA3 untersucht. Die klinischen Daten der entsprechenden Patienten wurden hinzugezogen und

statistisch mit der Höhe der ABCA3-Expression in Beziehung gesetzt. Bei der Auswertung zeigte sich, dass ein Einfluss des Expressionslevels auf die Prognose der Patienten nicht nachzuweisen war. Dies galt sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das ereignisfreie Überleben.

Wie ist diese Tatsache vereinbar mit Voruntersuchungen, in denen für die AML ein Zusammenhang zwischen der Höhe der ABCA3-Expression und der Prognose der Patienten festgestellt wurde? Eine Möglichkeit ist, dass der hier durchgeführte immunzytochemische Nachweis von ABCA3 nicht ausreichend diskriminierend für die Expressionsrate von ABCA3 ist. Für dieses Argument spricht die hohe Rate an ABCA3-positiven Tumorzellproben. Zur Umgehung bzw. Ausschaltung dieses Problems sollte eine quantitative RT-PCR mit den Tumorzellen durchgeführt werden. Weiterhin könnte an einen Bias in der Studie mit Auswahl überwiegend prognostisch schlechter NHL-Patienten gedacht werden. Diese Überlegung ist jedoch aufgrund der Art der Studie auszuschließen, da es sich nicht um eine eingeschränkte Auswahl an Patienten handelte. Wahrscheinlicher erscheint, dass bei den NHL andere beziehungsweise weitere Transporter oder Mechanismen entscheidend für das Therapieansprechen und den Verlauf der Erkrankung sind, der Höhe des ABCA3-Levels allein somit eine untergeordnete Rolle zukommt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die NHL-Schnitte nur auf die Expression von ABCA3 hin untersucht, ein Nachweis von anderen Transportern erfolgte hier nicht. In NHL wird beispielsweise neben ABCA3 auch der durch das *mdr-1*-Gen kodierte Transporter p-gp (Dalton et al. 1989, Sonneveld 2000) exprimiert (vgl. 1.5.2.1). Für diesen konnte eindeutig eine Beteiligung an der Zytostatikaresistenz in NHL nachgewiesen werden (Dalton et al. 1989). Ein wichtiger Resistenzmechanismus in NHL ist außerdem die Resistenz gegenüber chemotherapieinduzierter Apoptose. In NHL sind mehrere Mechanismen nachgewiesen worden, die über eine veränderte Expression apoptoseregulierender Substanzen die Apoptose verhindern und damit zu einer Zytostatikaresistenz führen. Zu nennen ist beispielsweise die Überexpression der antiapoptotischen Proteine bcl-2 (Mounier et al. 2003) oder bcl-x<sub>L</sub> (Amundson et al. 2000). Weiterhin kann die Einleitung der Apoptose durch eine veränderte Expression von Apaf-1



(apoptotic protease-activating factor-1) gestört oder verhindert werden (Sun et al. 2005). Bedingt durch eine Überexpression von NF- $\kappa$ B kann die durch die Chemotherapeutika normalerweise induzierte Apoptose der Zellen ebenfalls unterbunden werden (Vega et al. 2005).

Auch an die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Transporter untereinander ist beim Vorliegen von Chemotherapieresistenz zu denken. Bei ALL bei Kindern konnte gezeigt werden, dass in diesen Malignitäten die Transportproteine ABCA3 und ABCA2 die gleiche Funktion, i. e. die Ausschleusung zytostatischer Substanzen, ausüben. Dies hat zur Folge, dass bei Überexpression des einen Transporters die Expression des anderen herunterreguliert wird (Efferth et al. 2006). Zur Klärung der Frage, ob ähnliches auch bei NHL gelten könnte, ist es erforderlich, die Malignitäten auf weitere Transporter hin zu untersuchen.

Möglich ist auch, dass in NHL bisher noch nicht bekannte Co-Faktoren fehlen, die ABCA3 zur Ausführung seiner Funktion in diesen Tumoren benötigt. Dieses wäre nicht untypisch: Es wurde beispielsweise gezeigt, dass ABCA3 für die Surfactantbildung in der Lunge zwar essentiell, aber ohne das Vorhandensein weiterer Faktoren, besonders des Surfactant-Proteins B (SP-B), keinesfalls allein ausreichend ist (Shulenin et al. 2004).

### **4.3 Mögliche Mechanismen der durch ABCA3 vermittelten Chemotherapeutikaresistenz**

Hintergrund der Untersuchungen zur Expression von ABCA3 in malignen Lymphomen in dieser Arbeit waren die Ergebnisse zur Bedeutung dieses Transportproteins in der AML und in Modellsystemen der Chemotherapieresistenz in vitro.

Das Transportprotein ABCA3 wurde in Vorarbeiten in vielen Geweben sowie in Malignitäten, insbesondere AML, nachgewiesen. Eine hohe ABCA3-Expression führte, wie am Beispiel der AML deutlich gemacht werden konnte (Wulf et al. 2004, Steinbach et al. 2006), zu einer höheren Ausschleusungskapazität der Zellen für chemotherapeutische Substanzen, somit zu einem schlechteren Therapieerfolg und einer schlechteren Prognose durch die erhöhte Gefahr eines Krankheitsrezidivs. Neuesten Erkenntnissen zufolge sorgt ABCA3 nicht für eine direkte Ausschleusung

der Substanzen aus der Zelle. Vielmehr ist ABCA3 an den Membranen von Lysosomen und anderen sauren Vesikeln lokalisiert, wo es die Aufnahme der Substanzen in die entsprechenden Vesikel bewirkt. Hierdurch werden Chemotherapeutika auf subzellulärer Ebene sequestriert und gelangen nur in geringer Menge in den Zellkern. Ein Eingreifen in den Zellzyklus wird so unterbunden, die Zelle zeigt sich resistent. Zellen, die eine hohe ABCA3-Expression aufweisen, verfügen über eine größere Anzahl saurer Vesikel, außerdem zeigen die Lysosomen ein gesteigertes Volumen gegenüber Zellen mit einer geringeren Expression des Proteins (Wulf et al. 2004). Diese Feststellung bestätigt Voruntersuchungen, in denen gezeigt worden war, dass ABCA3 in den Pneumozyten der Lunge wesentlich an der Bildung von Lamellarkörpern beteiligt ist, welche den Lysosomen verwandte Organellen darstellen (Yamano et al. 2001). Die immunzytologischen Daten dieser Arbeit, die ABCA3 vornehmlich an zytoplasmatischen Vesikeln nachwies, sind auch vereinbar mit einer lysosomalen Lokalisation des Transporters in lymphatischen Neoplasien. Ob auch für Lymphomzellen ähnliche Transportmechanismen, wie für die myeloischen Zellen gezeigt, gelten, war nicht Gegenstand dieser Arbeit und muss in weiterführenden Projekten untersucht werden. Ergebnisse funktioneller Transportanalysen an Lymphomzellen könnten dann gegebenenfalls zur Erklärung des Befundes beitragen, dass in den Analysen dieser Arbeit eine vermehrte Expression von ABCA3 klinisch nicht mit einem verminderten Ansprechen auf Chemotherapie assoziiert war.

## 5 Zusammenfassung

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass der intrazelluläre ABC-Transporter A3 in Subpopulationen der physiologischen humanen Hämatopoese exprimiert wird. Während das Expressionsniveau in den differenzierten Zellen der erythropoetischen, myeloischen und megakaryozytären Differenzierungslinien auf der Ebene der mRNA niedrig ist und auf Proteinebene der Transporter nicht nachgewiesen werden konnte, ist im Kompartiment der frühen hämatopoetischen Progenitoren ABCA3 in einem Teil der CD34-positiven und in den SP-Zellen mit deutlicher Expression darstellbar. In diesen Zellen entspricht die intrazelluläre Lokalisation des Transporters in der Membran von zytoplasmatischen Vesikeln der subzellulären Ausprägung, die für diesen Transporter auch in Pneumozyten vom Typ II sowie in leukämischen Zellen gezeigt wurde.

Über die Expression von ABCA3 in Zellen der frühen Hämatopoese hinaus wurde in dieser Arbeit auch erstmalig eine relevante Expression des Transporters in maligne transformierten lymphatischen Zellen entdeckt. ABCA3 wurde auf mRNA- und Proteinebene in Zelllinien aller Haupttypen humaner Lymphomkrankungen, d. h. des M. Hodgkin, der B- und T-Zell-Lymphome, nachgewiesen. Das höchste Expressionsniveau fand sich dabei in Lymphomen vom Typ des aggressiven B-Zell-NHL. An einem Kollektiv von 247 klinischen Tumorproben konnte dieser Befund bestätigt werden. Dabei wurde keine statistisch signifikante Assoziation der Expressionshöhe des Transporters mit der Prognose der aggressiven NHL in diesem Kollektiv festgestellt. In hämatologischen Neoplasien myeloischer Differenzierung (AML und CML) wurde unlängst in parallelen Arbeiten eine Bedeutung von ABCA3 für die Zytostatikaresistenz gezeigt. Über die Funktion des ABC-Transporters A3 in Stammzellen oder Lymphomen liegen derzeit noch keine Erkenntnisse vor.

Zusammenfassend wurde die Expression von ABCA3 in frühen hämatopoetischen Zellen und in Zellen aggressiver Lymphome nachgewiesen, und damit die Grundlage für weitere funktionelle und klinische Analysen in der normalen und der maligne transformierten humanen Hämatopoese gelegt.

## 6 Literaturverzeichnis

Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace Jr. AJ (2000): An Informatics Approach Identifying Markers of Chemosensitivity in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res* 60 (21), 6101-6110

Bouabdallah K, Milpied N (2007): An update on recent developments in non-Hodgkin's lymphoma. *Bull Cancer* 94 (1), 43-52

Brasch F, Schimanski S, Mühlfeld C, Barlage S, Langmann T, Aslandis C, Boettcher A, Dada A, Schrotten H, Mildenerger E (2006): Alteration of the Pulmonary Surfactant System in Full-Term Infants with Hereditary ABCA3 Deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 174 (5), 571-580

Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM (2001): Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 20 (5), 998-1009

Brink AA, Oudejans JJ, van den Brule AJ, Kluin PM, Horstman A, Ossenkuppele GJ, van Heerde P, Jiwa M, Meijer CJ (1998): Low p53 and high bcl-2 expression in Reed-Sternberg cells predicts poor clinical outcome for Hodgkin's disease: involvement of apoptosis resistance? *Mod Pathol* 11 (4), 376-383

Byrne BJ, Gockerman JP (2007): Salvage Therapy in Hodgkin's Lymphoma. *Oncologist* 12 (2), 156-167

Cheong N, Madesh M, Gonzales LW, Zhao M, Yu K, Ballard PL and Shuman H (2006): Functional and Trafficking Defects in ATP Binding Cassette A3 Mutants Associated with Respiratory Distress Syndrome. *J Biol Chem* 281 (14), 9791-9800

---

Classen M, Diehl V, Kochsiek K: Innere Medizin. 4.Auflage; Urban und Schwarzenberg, München, Köln und Würzburg 1998

Daibata M, Kubonishi I, Miyoshi I (1996): Differential Tumorigenicity between Epstein-Barr Virus Genome-Positive and Genome-Negative Cell Line with t(11;14) (q13;q32) Derived from Mantle Cell Lymphoma. *J Virol* 70 (12), 9003-9007

Dako: Dako-Handbuch zum Dako Real Detection System AP Kit K 5005; Firma Dako (Glostrup, Dänemark), 2006

Dalton WS, Grogan TM, Meltzer PS, Scheper RJ, Durie BG, Taylor CW, Miller TP, Salmon SE (1989): Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J Clin Oncol* 7 (4), 415-424

Dean M, Allikmets R (1995): Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* 5 (6), 779-785

Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42 (7), 1007-1017

Diehl V, Behringer K (2006): Could BEACOPP Be the New Standard for the Treatment of Advanced Hodgkin's Lymphoma (HL)? *Cancer Invest* 24 (7), 713-717

Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Hasenclever D, Tesch H, Herrmann R, Dörken B, Müller-Hermelink HK (2003): Standard and Increased-Dose BEACOPP Chemotherapy Compared with COPP-ABVD for Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* 348 (24), 2386-2395

Drach D, Zhao S, Drach H, Mahadevia R, Gatringer C, Huber H, Andreeff M (1992): Subpopulations of Normal Peripheral Blood and Bone Marrow Cells Express a Functional Multidrug Resistance Phenotype. *Blood* 80 (11), 2729-2734

Dyer MJS, Fischer P, Nacheva E, Labastide W, Karpas A (1990): A New Human B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma Cell Line (Karpas 422) Exhibiting both t(14;18) and t(4;11) Chromosomal Translocations. *Blood* 75, 709-714

Efferth T, Gillet JP, Sauerbrey A, Zintl F, Bertholet V, De Longueville F, Remacle J, Steinbach D (2006): Expression profiling of ATP-binding cassette transporters in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol Cancer Ther* 5 (8), 1986-1994

Gazdar AF, Carney DN, Bunn PA, Russell EK, Jaffe ES, Schechter GP, Guccion JG (1980): Mitogen Requirements for the In Vitro Propagation of Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Blood* 55 (3), 409-417

Glass B, Kloess M, Bentz M, Schlimok G, Berdel WE, Feller A, Trümper L, Loeffler M, Pfreundschuh M, Schmitz N (2006): Dose-escalated CHOP plus etoposide (MegaCHOEP) followed by repeated stem cell transplantation for primary treatment of aggressive high-risk non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107 (8), 3058-3064

Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM (1989): Expression of a Multidrug Resistance Gene in Human Cancers. *J Natl Cancer Inst* 81 (2), 116-124

Gong JH, Maki G, Klingemann HG (1994): Characterization of a Human Cell Line (NK-92) with Phenotypical and Functional Characteristics of Activated Natural Killer Cells. *Leukemia* 8 (4), 652-658

Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R (1977): Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol* 36 (1), 59-72

Guo C, Jin X (2006): Chemoprotection Effect of Multidrug Resistance 1 (MDR1) Gene Transfer to Hematopoietic Progenitor Cells and Engrafted in Mice with Cancer Allows Intensified Chemotherapy. *Cancer Invest* 24 (7), 659-668

Harris NL (1999): Hodgkin's disease: Classification and differential diagnosis. *Mod Pathol* 12 (2), 159-175

Higgins CF (1992): ABC-transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8, 67-113

Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH, Hoelzer D: *Grundkurs Hämatologie*. 2. Auflage; Blackwell Verlag GmbH, Berlin & Wien 2003

Huls M, Van den Heuvel JJMV, Dijkman HBPM, Russel FGM, Masereeuw R (2006): ABC transporter expression profiling after ischemic reperfusion injury in mouse kidney. *Kidney Int* 69 (12), 2186-2193

Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF (1990): Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346, 362-65

Ieiri I, Takane H, Otsubo K (2004): The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 43 (9), 553-576

Jadayel DM, Lukas J, Nacheva E, Bartkova J, Stranks G, De Schouwer PJJ, Lens D, Bartek J, Dyer MJS, Kruger AR (1997): Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16<sup>CDKN2</sup> and p15<sup>CDKN2B</sup> genes

in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519). *Leukemia* 11, 64-72

Jamroziak K and Robak T (2004): Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 gene: the influence on risk and clinical outcome of haematological malignancies. *Hematology* 9 (2), 91-105

Jeon HJ, Kim CW, Yoshino T, Akagi T (1998): Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *Br J Haematol* 102 (5), 1323-1326

Josting A, Sieniawski M, Glossmann JP, Staak O, Nogova L, Peters N, Mapara M, Dörken B, Ko Y, Metzner B (2005): High-dose sequential chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in relapsed and refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of a multicenter phase II study. *Ann Oncol* 16 (8), 1359-1365

Juranka PF, Zastawny RL, Ling V (1989): P-glycoprotein: multidrug resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J* 3 (14), 2583-2592

Kashkar H, Haefs C, Shin H, Hamilton-Dutoit SJ, Salvesen GS, Krönke M, Jürgensmeier JM (2003): XIAP-mediated Caspase Inhibition in Hodgkin's Lymphoma-derived B Cells. *J Exp Med* 198 (2), 341-347

Kashkar H, Deggerich A, Seeger JM, Yazdanpanah B, Wiegmann K, Haubert D, Pongratz C, Krönke M (2007): NF-kappaB-independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B cells against cytotoxic drugs. *Blood* 109 (9), 3982-3988

Kim SW, Tanimoto TE, Hirabayashi N, Goto S, Kami M, Yoshioka S, Uchida T, Kishi K, Tanaka Y, Kohno A (2006): Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a nationwide survey in Japan. *Blood* 108(1), 382-389



Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wigzell H, Clifford P (1968): Surface IgM-kappa Specificity on a Burkitt Lymphoma Cell In Vivo and in Derived Culture Lines. *Cancer Res* 28 (7), 1300-1310

Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin JS, Mumford D (1975): An EBV-Genome-Negative Cell Line Established from an American Burkitt Lymphoma; Receptor Characteristics. EBV-Infectibility and Permanent Conversion into EBV-Positive Sublines by in vitro Infection. *Intervirology* 5 (6), 319-334

Klugbauer N, Hofmann F (1996): Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett* 391 (1-2), 61-65

Koyama N, Koschmieder S, Tyagi S, Portero-Robles I, Chromic J, Myloch S, Nürnberger H, Rossmann T, Hofmann WK, Hoelzer D (2006): Inhibition of Phosphotyrosine Phosphatase 1B Causes Resistance in BCR-ABL-Positive Leukemia Cells to the ABL Kinase Inhibitor STI571. *Clin Cancer Res* 12 (7), 2025-2031

Krishnamurthy P, Schuetz JD (2005): The ABC transporter Abcg2/Bcrp: Role in hypoxia mediated survival. *Biometals* 18 (4), 349-358

Lai R, McDonnell TJ, O'Connor SL, Medeiros LJ, Oudat R, Keating M, Morgan MB, Curiel TJ, Ford RJ (2002): Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino. *Leuk Res* 26 (9), 849-855

Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R (1991): NB4, a Maturation Inducible Cell Line With t(15;17) Marker Isolated From a Human Acute Promyelocytic Leukemia (M3). *Blood* 77 (5), 1080-1086

Lok MS, Koshiba H, Han T, Abe S, Minowada J, Sandberg AA (1979): Establishment and characterization of human B-lymphocytic lymphoma cell lines (Balm-3, -4 and -5): intracloonal variation in the B-cell differentiation stage. *Int J Cancer* 24 (5), 572-578

Lozzio CB, Lozzio BB (1975): Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line With Positive Philadelphia Chromosome. *Blood* 45 (3), 321-334

Lusso P, Cocchi F, Balotta C, Markham PD, Louie A, Farci P, Pal R, Gallo RC, Reitz MS Jr (1995): Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J Virol* 69 (6), 3712-3720

Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, Lederlin P, Sebban C, Berger F, Bosly A, Morel P, Tilly H (2003): Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 101 (11), 4279-4284

Nooter K, Sonneveld P (1994): Clinical relevance of p-glycoprotein expression in haematological malignancies. *Leuk Res* 18 (4), 233-243

Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Metzner B, Hasenclever D (2004a): Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood* 104 (3), 626-633

Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rube C, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Eimermacher H (2004b): Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the

treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood* 104 (3), 634-641

Pfreundschuh M, Trümper L, Österborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani PL (2006): CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 7 (5), 379-391

Qiagen: Qiagen Handbuch zum RNS-Extraktionskit; Firma Qiagen (Hilden), April 2002

Qiagen: Qiagen Handbuch zum SuperFect®Transfection Kit; Firma Qiagen (Hilden), Dezember 2002

Reed JC (1997): Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 34, 9-19

Schaadt M, Diehl V, Stein H, Fonatsch C, Kirchner HH (1980): Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 26 (6), 723-731

Schmitz N, Pfister B, Sextro M, Sieber M, Carella AM, Haenel M, Boissevain F, Zschaber R, Müller O, Kirchner H (2002): Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: A randomized trial. *Lancet* 359 (9323), 2065-2071

Schmitz N, Kloess M, Reiser M, Berdel WE, Metzner B, Dorken B, Kneba M, Trümper L, Loeffler M, Pfreundschuh M (2005): Four versus Six Courses of a Dose-Escalated Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vin-

cristine, and Prednisone (CHOP) Regimen plus Etoposide (MegaCHOEP) and Autologous Stem Cell Transplantation. *Cancer* 106 (1), 136-145

Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G (1977): Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19 (5), 621-626

Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M (2004): ABCA3 Gene Mutations in Newborns with Fatal Surfactant Deficiency. *N Engl J Med* 350 (13), 1296-1303

Smolewski P, Niewiadomska H, Bloski JZ, Robak T, Krykowski E (1998): Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53, bcl-2 or C-erb B-2 proteins on Reed-Sternberg cells: prognostic significance in Hodgkin's disease. *Neoplasma* 45 (3), 140-147

Sonneveld P (2000): Multidrug resistance in haematological malignancies. *J Intern Med* 247 (5), 521-534

Steinbach D, Gillet JP, Sauerbrey A, Gruhn B, Dawczynski K, Bertholet V, De Longueville F, Zintl F, Remacle J, Efferth T (2006): ABCA3 as a Possible Cause of Drug Resistance in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 12 (14), 4357-4363

Sun Y, Orrenius S, Pervaiz S, Fadeel B (2005): Plasma membrane sequestration of apoptotic protease-activating factor-1 in human B-lymphoma cells: a novel mechanism of chemoresistance. *Blood* 105 (10), 4070-4077

Sundström C, Nilsson K (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17 (5), 565-577

Takano A, Kusuhara H, Suhara T, Ieiri I, Morimoto T, Lee YJ, Maeda J, Ikoma Y, Ito H, Suzuki K (2006): Evaluation of In Vivo P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier Among MDR1 Gene Polymorphisms by Using <sup>11</sup>C-Verapamil. *J Nucl Med* 47 (9), 1427-1433

Vega MI, Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Bonavida B (2005): Rituximab-Induced Inhibition of YY1 and Bcl-xL Expression in Ramos Non-Hodgkin's Lymphoma Cell Line via Inhibition of NF-kappaB Activity: Role of YY1 and Bcl-xL in Fas Resistance and Chemoresistance, Respectively. *J Immunol* 175 (4), 2174-2183

Wang Y, Jin XQ, Wang S, Wang Q, Luo Q, Luo XJ (2006): Therapeutic efficacy and bone marrow protection of the mdr1 gene and over-dose chemotherapy with doxorubicin for rabbits with VX2 hepatocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 5 (4), 545-551

Wilson WH, Bates SE, Fojo A, Bryant G, Zhan Z, Regis J, Wittes RE, Jaffe ES, Steinberg SM, Herdt J (1995): Controlled trial of dexverapamil, a modulator of multidrug resistance, in lymphomas refractory to EPOCH chemotherapy. *J Clin Oncol* 13 (8), 1995-2004

Wolf J, Kapp U, Bohlen H, Kornacker M, Schoch C, Stahl B, Mücke S, Von Kalle C, Fonatsch C, Schaefer HE (1996): Peripheral Blood Mononuclear Cells of a Patient With Advanced Hodgkin's Lymphoma Give Rise to Permanently Growing Hodgkin-Reed Sternberg Cells. *Blood* 87 (8), 3418-3428

Wulf GG, Modlich S, Inagaki N, Reinhardt D, Schroers R, Griesinger F, Trümper L (2004): ABC transporter ABCA3 is expressed in acute myeloid leukemia blast cells and participates in vesicular transport. *Haematologica* 89 (11), 1395-1397

Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, Morohoshi T, Ogawa J, Shioda S, Inagaki N (2001): ABCA3 is a lamellar

body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett* 508 (2), 221-225

Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, Ohashi K, Midorikawa Y, Morishita Y, Niki T, Shibahara J, Mori M, Makuuchi M (2005): The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 18 (12), 1591-1598

Yasui K, Mihara S, Zhao C, Okamoto H, Saito-Ohara F, Tomida A, Funato T, Yokomizo A, Naito S, Imoto I (2004): Alteration in Copy Numbers of Genes as a Mechanism for Acquired Drug Resistance. *Cancer Res* 64 (4), 1403–1410

Yodoi J, Teshigawara K, Nikaido T, Fukui K, Noma T, Honjo T, Takigawa M, Sasaki M, Minato N, Tsudo M (1985): TCGF (IL 2)-receptor inducing factor(s).I. Regulation of IL 2 receptor on a natural killer-like cell Line (YT Cells). *J Immunol* 134 (3), 1623-1630

Yoshida I, Ban N, Inagaki N (2004): Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoids in lung alveolar type II cells. *Biochem Biophys Res Commun* 323 (2), 547-555

Zhao LX, Zhou CJ, Tanaka A, Nakata M, Hirabayashi T, Amachi T, Shioda S, Ueda K, Inagaki N (2000): Cloning, characterization and tissue distribution of the rat ATP-binding cassette (ABC) transporter ABC2/ABCA2. *Biochem J* 350, 865-872

Zhou L, Liu J, Luo F (2006): Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 12 (8), 1175-1181

---

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. L. Trümper danke ich für die Ermöglichung der Arbeit in seinen Laboren und die stete Diskussionsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt Herrn JProf. PD Dr. med. G. G. Wulf für das Überlassen des Themas dieser Dissertation sowie für die intensive Betreuung. Ebenfalls wertvolle Unterstützung und Anregungen erhielt ich durch Herrn Dr. med. B. Chapuy.

Danken möchte ich auch den Labormitarbeitern Frau B. Sadowski, Frau B. Jünemann und Herrn Y. Hildebrandt für das angenehme Arbeitsklima im Labor und die wertvollen Ratschläge bei meiner experimentellen Arbeit.

Für die Möglichkeit der Analyse von ABCA3 an dem Lymphom Tissue Micro Array (TMA) danke ich auch der Deutschen Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (DSHNHL). In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. med. Wolfram Klapper am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Abteilung Pathologie und Hämatopathologie für die Herstellung und Überlassung des Lymphom-TMAs und für die Hilfe bei der Auswertung.

Frau Dr. Dipl.-Math. M. Ziepert vom Institut für Medizinische Informatik und Klinische Epidemiologie der Universität Leipzig danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der statistischen Auswertung und der Korrelation der Lymphomdaten mit den Überlebenszeiten.

---

## Lebenslauf

Als Kind von Stephen R. Corsham und Leonie E. E. Corsham wurde ich am 22. Januar 1982 in Göttingen geboren. Von 1988 bis 1992 besuchte ich zunächst als Grundschule die Albanischule in Göttingen und im Anschluss daran von 1992 bis 1994 die Orientierungsstufe an der Lutherschule in Göttingen. Ab 1994 bis zur Erlangung der allgemeinen Hochschulreife im Jahr 2001 besuchte ich das Max-Planck-Gymnasium in Göttingen.

Im Sommersemester 2002 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Hier legte ich im Wintersemester 2003/2004 den ersten Teil der ärztlichen Prüfung (Physikum) ab. Im Oktober 2004 begann ich die Doktorarbeit in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Göttingen.

Famulaturen absolvierte ich unter anderem am Universitätsklinikum Göttingen (Abteilung für Hämatologie und Onkologie), am Krankenhaus Neu-Mariahilf (Innere Medizin) in Göttingen, am Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende (Anästhesiologie) sowie in der Neurologie am Neurologischen Zentrum Rosenhügel des KH Hietzing in Wien. Studienbegleitend arbeitete ich zeitweise als studentische Aushilfe im Krankenhaus Neu-Bethlehem in Göttingen sowie am Universitätsklinikum Göttingen.

Seit Februar 2007 komplettiere ich meine medizinische Ausbildung mit dem Praktischen Jahr am Pius-Hospital in Oldenburg, zunächst in der Klinik für Innere Medizin, dann an der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie sowie an der Klinik für Thorax-, Gefäß und endovaskuläre Chirurgie. Im Oktober 2007 begann ich mein Wahltertial Neurologie an der Neurologischen Klinik des Evangelischen Krankenhauses in Oldenburg. Der 2. Teil der ärztlichen Prüfung (Staatsexamen) zur Erlangung der Approbation wird voraussichtlich im April 2008 stattfinden.

In meiner Freizeit engagiere ich mich musikalisch als Mitglied des Orchesters der studentischen Musikvereinigung „Blaue Sänger“ in Göttingen.