

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie, Forschungslabor

Direktor: Prof. Dr. Konrad Reinshagen

THY1-Expression im Neuroblastom als Prognosemarker

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Emine Varol
aus Kiel

Hamburg 2012

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.06.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. D. Kluth

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. T. Strate

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. M. Horstmann

Abkürzungsverzeichnis

GPI Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
INCP	International Neuroblastoma Pathology Classification
MKI	Mitose-Karyorrhexis-Index
NRSS	Neuroblastoma Risk Stratification System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
LRG	Low Risk Group
MRG	Medium Risk Group
HRG	High Risk Group
MIBG-Radiotherapie	Metaiodobenzylguanidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
LOH	loss of heterozygosity
kDA	kilodalton
EFS	Event Free Survival
OS	Overall Survival
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
TMA	Tissue-Microarrays
RNA	Ribonukleinsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
NSE	neuronenspezifische Enolase
TBS-Puffer	Tris-buffered Saline
TRIS-Puffer	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ABC-kit	avidin-biotin complex
DAB	Diaminobenzidin
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase- Kettenreaktion

cDNA	complementary DNA
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
NBL	Neuroblastom
ANOVA	analysis of variance
GIST	gastrointestinale Stromatumore
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatocelluläres Carcinom

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
2. Material und Methoden	12
2.1. Patienten, klinische Daten, Evaluation	12
2.2. Tissue Microarrays	13
2.3. Immunhistochemie	16
2.4. Lichtmikroskopische Analyse	17
2.5. Molekularbiologische Daten	18
2.6. Statistische Auswertung	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Auswertung der klinischen Daten	24
3.2. THY1-Expression im Neuroblastomgewebe	28
3.3. THY1-Expression und Überleben sowie Rezidiv & Tod	31
3.4. THY1-Expression und histologisches Grading	35
3.5. THY1-Expression und klinisches Bild	36
4. Diskussion	37
4.1. Expression von THY1 im Neuroblastomgewebe	37
4.2. THY1 Expression und klinische Überlebensdaten sowie klinische Prognose	39
4.3. THY1 Expression beim Neuroblastom im Vergleich mit THY1 Expression bei Tumoren des Erwachsenenalters	42
4.4. Biologische Bedeutung der THY1 Expression im Tumor	44
4.5. Ausblick	45
5. Zusammenfassung	46
6. Abbildungsverzeichnis	48
7. Literaturverzeichnis	49
8. Danksagung	58

9. Publikationen	59
10. Eidesstattliche Erklärung	60

1. Einleitung

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter, der für etwa 7 % aller malignen Erkrankungen in der Kindheit und für ca. 15 % aller Todesfälle von malignen Erkrankungen bei Kindern verantwortlich ist (Maris et al. 2007). Die Inzidenz des Neuroblastoms beträgt 10/1000000 Neuerkrankungen pro Jahr (Spix et al. 2006), wobei das Neuroblastom ein typischer Tumor des Säuglings und des frühen Kindesalters ist (Brodeur et al. 2001). Weniger als 5 % der diagnostizierten Neuroblastomfälle betreffen nach Conte et al. 2005 Kinder jenseits des 10. Lebensjahres. Neuroblastome im fortgeschrittenen Stadium oder mit positiven Risikofaktoren haben noch immer eine schlechte Prognose. Interessanterweise zeigen einige Neuroblastome bei Kleinkindern und Säuglingen eine spontane Regression, eine Differenzierung in ein Ganglioneurom oder ein aggressives Wachstum. Diese klinische Heterogenität wurde schon von Evans et al. 1976 beschrieben.

Die Zellmorphologie der Neuroblastome besteht aus den embryonalen Vorläuferzellen, den Neuroblasten und je nach Ausmaß der Differenzierung aus teilweise oder komplett ausgereiften Ganglienzellen und Schwann-Zellen (Hero und Berthold 2002). Neuroblastome entstehen im Bereich des Grenzstranges und im Bereich von Paraganglien wie dem Nebennierenmark und dem Zuckerkandl-Organ (Fischer et al. 2005). Die Ätiologie und Pathogenese ist bis heute nicht eindeutig geklärt, aber man weiß, dass eine Fehlentwicklung auf zellulärer Ebene vorliegt (Kushner und Cheung 2005).

Umweltfaktoren und genetische Dispositionen, wie z.B. die Deletion des 1p36 Gens mögen eine Rolle bei der Ätiologie des Neuroblastoms spielen (Brodeur 2003).

Bei zwei Drittel der vorstellig werdenden Patienten aller Altersstufen liegt der Primärtumor intraabdominell (Carachi 2002). 40 % der Primärtumoren finden sich adrenal, gefolgt von den abdominal gelegenen mit 25 %, den thorakalen mit 15 % und cervicalen mit 5 % (Schwab et al., 2000). In etwa 7 % der Fälle ist keine Primärtumorlokalisation definierbar (Roald 2001). Fernmetastasen

werden bei 50 % der Patienten zum Diagnosezeitpunkt beobachtet und betreffen häufig das Knochenmark, den Knochen, die Leber, tumorferne Lymphknoten, das zentrale Nervensystem, die Pleura und die Haut (Fischer et al. 2005).

Die histopathologische Klassifikation von Neuroblastomen erfolgt nach der „International Neuroblastoma Pathology Classification“ (INPC) (Shimada et al. 1999). Aufgrund seiner signifikanten Korrelation mit dem klinischen Verlauf der Patienten sowie seiner stärkeren prognostischen Aussagekraft hat es sich durchgesetzt. Die INPC Klassifikation nach Shimada et al. 1999 beinhaltet den Differenzierungsgrad der Neuroblastome, das Kriterium Gehalt an Schwann-Zellen und den Mitose-Karyorrhexis-Index (MKI) unter Berücksichtigung des Patientenalters.

Nach Hughes et al. 1974 erfolgt das histologische Grading in drei Malignitätsstufen bezüglich des Differenzierungsgrades der Neuroblasten. Das von der Children's Oncology Group entwickelte „Neuroblastoma Risk Stratification System“ (NRSS), dessen Ursprung das „International Risk Grouping System“ ist (Weinstein et al. 2003, Castleberry et al. 1997) wird zur Therapiestratifizierung herangezogen. Die Stadieneinteilung erfolgt nach dem weltweit anerkannten „International Neuroblastoma Staging System“ (INSS) (Brodeur et al. 1993).

Basierend auf der Analyse von Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, INSS-Stadium, Histopathologie sowie molekularbiologischen Parametern werden die Patienten bezüglich des NRSS in die Low Risk Group (LRG), Medium Risk Group (MRG) oder High Risk Group (HRG) stratifiziert (Weinstein et al. 2003).

Trotz mittlerweile guter Prognose durch Erfolge im Bereich der Therapie von Patienten aus der LRG und MRG, bleibt diese für die Patienten aus der HRG immer noch schlecht (Matthay et al. 1999). In der MRG folgt der chirurgischen Exzision eine minimale postoperative Therapie, bestehend aus Chemotherapie (Weinstein et al. 2003, NB 2004 Trial Protocol). Für HRG-Patienten beinhaltet die postoperative Therapie zusätzlich zur aggressiveren Chemotherapie MIBG-

Radiotherapie, Ganzkörperbestrahlung sowie autologe Stammzelltransplantation (McCluskey et al. 2005, Matthay et al. 1999, Weinstein et al. 2003). Die Tumorexstirpation spielt zum einen eine Rolle für die molekularbiologische Diagnostik (Hase et al. 2002), zum anderen führt sie im INSS Stadium 1 sowie 2A und 2B zu exzellenten Überlebensraten (Perez et al. 2000). Für die INSS-Stadien 3 und 4 betragen die Heilungsraten lediglich 13 bis 38 % (Chan et al. 1997; Escobar et al. 2006).

Für das Behandlungskonzept und die Prognose sind Prognosemarker essentielle Mittel, um Patienten mit unterschiedlichen Risiken zu identifizieren und in die unterschiedlichen Therapiearme zu stratifizieren (Grosfeld 2000). Zu diesen Prognosemarkern gehören DNA- und Chromosomenabnormalitäten, Katecholaminabbauprodukte im Urin sowie biologische Marker (Riley et al. 2004). Neben dem Krankheitsstadium, welches nach dem INSS-System stratifiziert (Castleberry et al. 1997) wird, gilt beim Neuroblastom das Patientenalter bei Diagnosestellung als wichtiger unabhängiger Prognosefaktor (Sano et al. 2006). Als wichtigster unabhängiger Indikator für eine schlechte Prognose gilt die Amplifikation des MYCN-Onkogens mit einer Inzidenz von ~ 35 % aller Neuroblastome (Schwab et al. 1983, Vasudevan und Nuchtern 2005, Ambros et al. 2003, Ambros et al. 2009, Bagatell et al. 2009). Dieser per FISH nachweisbare (Ambros et al. 2003) auf Chromosom 2p23-24 lokalisierte molekulare Marker (Schwab et al. 1984) geht gewöhnlich mit erhöhter MYCN-Expression einher und kodiert ein Nuklearprotein, das als Transkriptionsfaktor fungiert. Dieser Marker korreliert mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium, raschem Tumorwachstum sowie ungünstiger Prognose (Cohn et al. 2004, Schwab 2004).

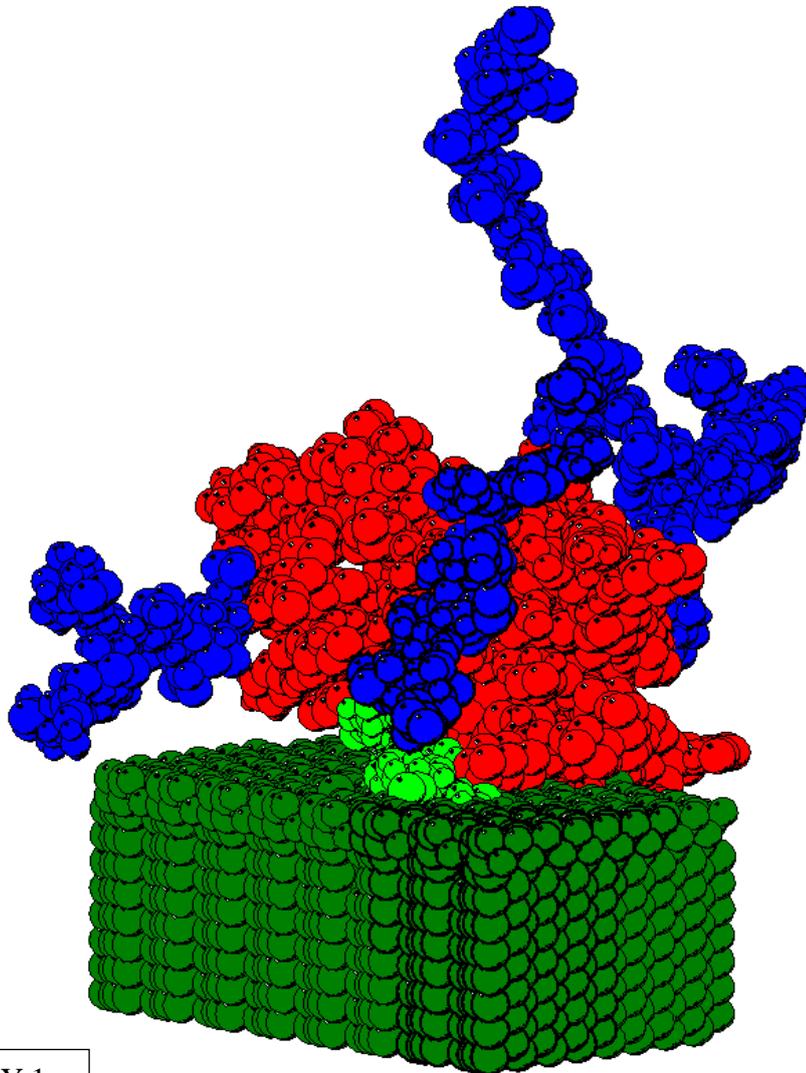
Auch der chromosomale Verlust der Heterozygotie der chromosomalen Bande 1p36 (LOH 1p) korreliert stark mit einem ungünstigen klinischen Verlauf. Die Abwesenheit eines hier lokalisierten Tumorsuppressorgens ist mit fortgeschrittenem Alter, Metastasierung und MYCN-Amplifikation assoziiert (Caron et al. 1996, Maris et al. 1995).

THY1 ist ein Glycoprotein der Zelloberfläche mit bis heute unbekannter

Funktion und einer Größe von 25 kDA (Williams und Gagnon 1982) Es dient als Marker verschiedener Typen von Stammzellen, wie z.B. hämatopoetischer Stammzellen (Craig et al. 1993), mesenchymaler Stammzellen (Pittenger et al. 1999, Jeong et al. 2005) und aktivierten T-Lymphozyten (Kroczeck et al. 1986). Unterschiedliche Studien konnten exemplarisch eine Expression von THY1 in Neuroblastomgeweben nachweisen (Seeger et al. 1982, Kemshead et al. 1986).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von THY1 im Neuroblastom zu untersuchen und die Expression von THY1 mit klinischen Kriterien und dem Erkrankungsverlauf bei Neuroblastom Patienten zu korrelieren. Hierfür wurden Gewebeproben auf Tissue Arrays per immunhistochemischer Färbemethoden untersucht und mit den molekularbiologischen Daten verglichen sowie die zugehörigen Patientendaten statistisch analysiert. Um die THY1-Expression auf den klinischen Verlauf zu beziehen, wurden Event Free Survival (EFS) sowie Overall Survival (OS) mithilfe von Kaplan Meier-Analysen bestimmt. Vor diesem Hintergrund galt es, die folgenden zwei Fragen zu klären:

1. Wird THY1 auf Neuroblastom-Gewebe exprimiert?
2. Kann eine Korrelation zwischen der THY1-Expression und dem klinischen Verlauf hergestellt werden? Und eignet sich THY1-Expression als möglicher neuer Prognosemarker für Neuroblastom-Patienten?



THY 1

Abb. 1: Die Abbildung zeigt die Struktur des THY1-Glykoproteins

Basierend auf ein Standard-Immunglobulin Modell

Der GPI-Anker (hellgrün) wird in eine einfache Modell Membran (dunkelgrün) eingefügt. (Aus Oxford Glycobiology Institute, Molecular Model Archive)

2. Material und Methoden

2.1. Patienten, klinische Daten und Evaluation

Von 1992 bis 2005 wurden 108 Kinder mit der Diagnose Neuroblastom an der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf behandelt.

Retrospektiv konnten wir in Zusammenarbeit mit der Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie des UKE unter der Leitung von Prof. Erttmann 98 Akten dieser Neuroblastom-Patienten auswählen.

Aus den Patientenakten wurden folgende klinische Daten erhoben: Alter bei Erstdiagnose, Geschlecht, Tumorstadium nach INSS „International Tumor Staging System“, Histologisches Grading nach Hughes et al., MYCN Amplifikation, Verlust der Heterozygotie des Chromosomes 1 (LOH 1p), Primärtumorlokalisation, Metastasierung, Therapie, Event free survival, Rezidiv, Rezidivzeitpunkt, Tod und Todeszeitpunkt.

Im Anschluss wurden uns freundlicherweise vom Pathologischen Institut des UKE anhand der vorliegenden Patientendaten die Gewebeproben zur Verfügung gestellt.

Aufgrund eines unzureichenden Beobachtungszeitraumes einiger Patienten und einer nicht ausreichenden guten Gewebequalität reduzierte sich die einzubeziehende Anzahl der Patienten auf 63.

Von den 63 untersuchten Gewebeproben waren 51 THY1-positiv und 12 THY1-negativ.

Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose des Neuroblastoms lag bei 30,0 Monaten.

Von diesen 63 Patienten waren 20 (32 %) unter 1 Jahr und 43 (68 %) über einem Jahr alt. Eine positive MYCN-Amplifikation lag bei 10 Patienten (16 %) vor. Ein Verlust der Heterozygotie des Chromosomes 1 (LOH 1p) lag bei 11 (21 %) Patienten vor. Aufgrund der mangelnden Datenlage bezüglich LOH 1p konnten 9 Patienten nicht klassifiziert werden.

Alle Gewebeproben und klinischen Daten wurden unter dem schriftlichen

Einverständnis der Eltern erhoben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt.

2.2. Tissue microarray

Die Gewebeproben der Neuroblastome wurden im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. G. Sauter unter Verwendung von Tissue Microarrays untersucht.

Die Tissue Microarrays wurden freundlicherweise von Dr. Quaas (Institut für Pathologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf) angefertigt und zur Verfügung gestellt. Bei den Tissue-Microarrays (TMA) wurden ausgestanzte Gewebezyylinder auf einem Paraffinblock zusammengesetzt. Je nach Größe des ausgestanzten Gewebezyinders können zwischen 50 und 400 Proben auf einer 1,5 x 3 cm großen Fläche untergebracht und untersucht werden, wobei parallele Serienschnitte des Array-Blockes die gleichzeitige Untersuchung von DNA, RNA und Proteinstrukturen ermöglichen, wie auch Genexpressionen von Proben per Immunhistochemie, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung oder RNA/RNA-in-situ-Hybridisierung. Mit dieser Methode können auf einem Objektträger eine Vielzahl von Proben (z.B. Tumorgewebe unterschiedlicher Herkunft) untersucht werden.

Es standen 120 Tumorproben, inklusive Metastasengewebe, zur Verfügung, 40 gesunde Gewebe bildeten die Kontrollgruppe, so dass insgesamt 160 Proben für diese Arbeit verwendet wurden.

Zuerst wurden morphologisch repräsentative Gebiete aus den in Paraffin eingebetteten Tumorböcken mittels Hämotoxilin-Eosin gefärbter Schnitte ausgewählt. Diese entstammten der Oberfläche des Tumorböcks. Die repräsentativen Areale wurden markiert. Anschließend wurden aus diesen Sektoren Gewebeproben entnommen.

Die verwendeten Stanzen hatten einen Durchmesser von 600 µm und konnten

aufgrund ihrer Konstruktion nur parallel gestanzt werden. Zum Stanzen wurden dann die Markierungen der korrespondierenden HE-Schnitte zur Hilfe genommen und die Tumorblöcke dementsprechend unter den Stanzen positioniert. Somit war die Entnahme des morphologisch repräsentativen Gewebes gewährleistet. Die entnommenen zylindrischen Gewebeproben wurden gleich im Anschluss in definierte Array-Koordinaten des Empfängerblockes (Paraffinblock) übertragen.

Diese Schritte wurden für jeden Donorblock wiederholt.

Da die Array-Analysen im Anschluss interpretiert werden mussten, wurden zur Erleichterung die Gewebeproben gleicher Art (Primärtumor, Metastasen, Kontrollgewebe) in Gruppen im Empfängerblock angeordnet. Der Abstand zwischen den Elementen im Empfängerblock betrug 100 μm .

Nun wurden von den vorliegenden Stanzproben mit Hilfe eines Mikrotomes mehrere parallele Schnitte angefertigt. Jeder Schnitt war 5 μm dick. Diese angefertigten Schnitte wurden zu einem späteren Zeitpunkt unterschiedlichen Färbungen unterzogen. Auf der Blockoberfläche waren Klebestreifen befestigt, die bei der Ablösung des Schnittes vom Mikrotom behilflich waren und die Schnitte somit auf die Objektträger übertragen werden konnten. In einem letzten Schritt wurden die Klebestreifen entfernt, so dass die Arrays für die histologische Beurteilung und Immunhistochemie zur Verfügung standen.

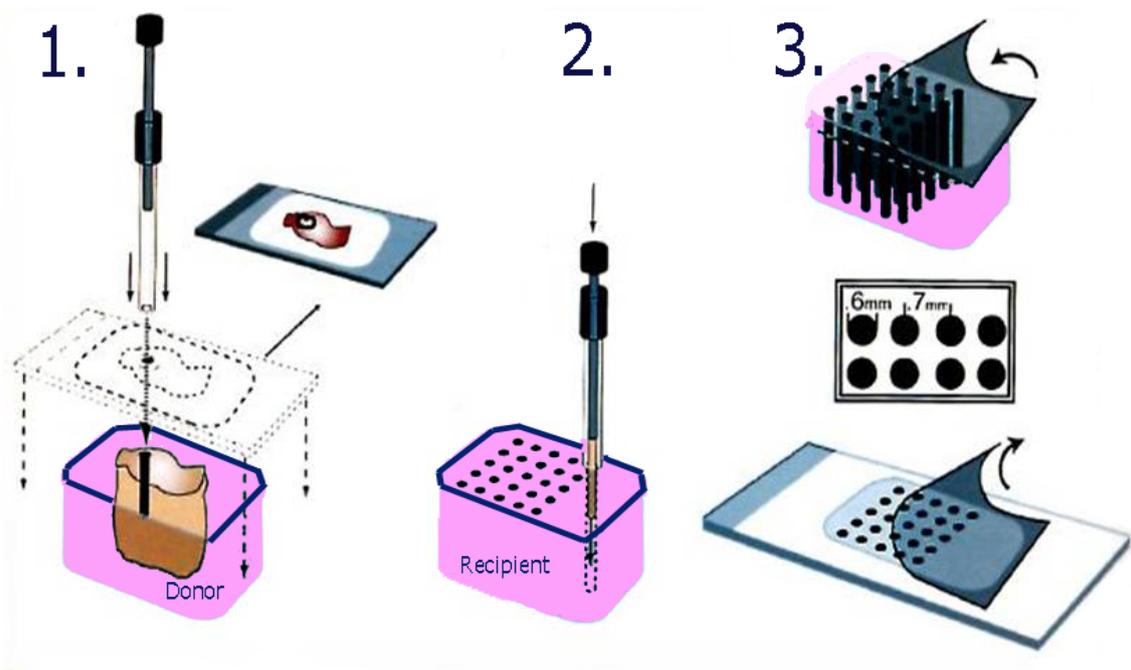


Abb. 2: Die Abbildung zeigt ein Multi-Tissue-Array MTA

Modifiziert nach Kononen et al., *Nat Med* 4, 1998

2.3. Immunhistochemie

In einem ersten Schritt wurden die für das Neuroblastom typischen Marker S 100 und NSE bei den vorhandenen Stanzten nachgewiesen.

Bei den 5 µm dicken, in Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Geweben wurden unter Verwendung von 3-Triethoxysilylpropylamin (Merck, Darmstadt, Deutschland) die für das Neuroblastom typischen Marker S 100 und NSE nachgewiesen.

Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung zum Nachweis von THY1.

Die Schnitte wurden zuerst durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und in ein wässriges Milieu überführt. Dazu wurde auf die Schnitte 4 x 5 Minuten Rotihistol (Carl Roth GmbH-Co) aufgetragen und anschließend die absteigende Alkoholreihe angewendet, zuerst wurde 3 x 3 Minuten 100%iges EtOH verwendet, dann jeweils 2 x 3 Minuten 95%iges, 80%iges und 70%iges EtOH verwendet. Abschließend wurde mit Aqua dest. für 2 Minuten abgespült und für 5 Minuten mit TBS-Puffer (0,05 mol, pH 7,6 mit 0,1%igem Tween 20) gewaschen.

Da durch die Fixierung Antigene maskiert wurden und für Antikörper unzugänglich bleiben würden, konnten die Schnitte im nächsten Schritt demaskiert werden. Zuerst wurden sie 30 Minuten in 1%igem NH₄/ TBS, danach für 5 Minuten in TBS, dann in 0,05 molarem Glycin/ TBS für 15 Minuten und wieder in TBS für 5 Minuten gewaschen.

Im Anschluss wurden die Schnitte im Citratpuffer in der Mikrowelle inkubiert (pH 6,0; Dako, ChemMate Target Retrieval Solution, Cato. No.:S2031, 10fach konzentriert, 40 ml verdünnt auf 400 ml). Zuletzt wurden die Schnitte bei Raumtemperatur abgekühlt.

Unspezifische Bindungen wurden durch ein 20 minütiges Auftragen von Pferdeserum (Vechtaerin, Victor Laboratories, Burlingame, USA) geblockt und dann in TRIS Puffer gewaschen (Trishydroxymethyl-aminomethan).

Anschließend wurde für jeweils 15 Minuten zuerst mit Avidin-Blocking-Reagent

und dann mit Biotin-Blocking-Reagent gewaschen. Der monoklonale Anti-THY 1- Antikörper Cdw90, Clone MCAP90; (Serotec, Mannheim, Germany) von der Maus als Primärantikörper wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt auf die Schnitte aufgetragen und in der feuchten Kammer gelagert. Anschließend erfolgte das dreimalige Waschen in TBS. Danach wurde ein biotinkonjugierter zweiter Antikörper (ABC-kit) für 20 Minuten aufgetragen und erneut dreimalig in TBS gewaschen. Nach Auftragen des Primär- und Sekundärantikörpers wurden die Schnitte in einem ABC-Komplex, Avdidin-Biotin-Enzymkomplex Vectastain (ABC-kit), für 20 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde mit TBS gewaschen. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wurde auf die Präparate 3,3 Diaminobenzidin (DAB) für 10 Minuten appliziert und im Anschluss kurz mit Aqua dest gespült. Dann konnte die Gegenfärbung mit Hämotoxin (Merck, Darmstadt) erfolgen. Zu allerletzt konnten die Präparate mit wässrigem Eindeckmittel (Aquatil®; Merck) überzogen werden und waren somit zur lichtmikroskopischen Analyse bereit.

2.4. Lichtmikroskopische Analyse

Anhand der aus den Patientenakten stammenden histologischen Einteilung und den folgenden lichtmikroskopischen Analysen konnten die Daten abgeglichen werden. Dies geschah im Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durch Dr. A. Quaas. Anschließend konnten die Gewebe in THY1- positiv und THY1-negativ unterteilt werden. Dabei konnte man anhand der Färbereaktion der Gewebeproben den Kontrast der zellulären Färbereaktion der Tumorzellen und den der Neurofibrillen gut erkennen. Die Unterschiede im Reaktionsmuster der THY1-positiven und THY1-negativen Proben erlaubten dann die Klassifizierung der Proben. Die Auswertung der Gewebeproben wurde durch drei unabhängige Untersucher überprüft (Dr. H. C. Fiegel, Dr. J. Kaifi, Dr. A. Quaas).

2.5. Molekularbiologische Daten

RNA Isolierung und RT-PCR

Tiefgefrorenes Tumorgewebe wurde im Thermoblock für ca. 5 min bei 37°C aufgetaut. Im ersten Schritt wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy-Kit von der Firma Qiagen (Bergisch-Gladbach, Germany) isoliert.

Das Gewebe wurde in 600 µl RLT-Puffer homogenisiert. Dann wurde das Lysat 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein 2 ml Röhrchen gestellt und erneut für 30 Sekunden zentrifugiert, der Vorgang wurde wiederholt. Der Säulendurchfluss wurde mit 600 µl 70%igem Ethanol gemischt. In den nun folgenden Waschsritten mit den verschiedenen Puffern wurden

Verunreinigungen entfernt. 650 µl dieses Gemisches wurden auf die RNeasy-Säule, die auf einem 2 ml Tube steht, gegeben und 15 Sekunden zentrifugiert.

Das Zentrifugat wurde verworfen und die RNeasy-Säule nochmals auf dasselbe 2 ml Tube mit 700 µl RW1-Puffer zum Waschen gegeben. Nach 15 sekundiger Zentrifugierung wurde das Zentrifugat verworfen und die RNeasy-Säule nochmals auf dasselbe Tube mit 500 µl RPE-Puffer gegeben.

Es wurde erneut für 15 Sekunden zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Derselbe Schritt wurde mit 500 µl RPE-Puffer wiederholt, allerdings wurde nun

2 Minuten zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, die RNeasy-Säule wurde auf ein neues 2 ml Tube gesetzt und für 1 Minute zentrifugiert. Die

RNeasy-Säule wurde auf ein 1,5 ml Tube gesetzt und 50 µl RNease freies

Wasser dazugeben, anschließend wurde 1 Minute zentrifugiert. Dieser Schritt

wurde wiederholt, um ein Eluat von 20 µl zu erhalten. Dieses Eluat wurde dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 80°C gelagert.

Reverse Transkriptase

Die Polymerasekettenreaktion benötigt als Ausgangsmaterial DNA, daher musste zuerst eine komplementäre DNA-Kopie hergestellt werden. Diese c-DNA wurde mit Hilfe der Reverse Transkriptase synthetisiert. Hierfür wurde bulk First- strand c-DNA Synthesis Kit (Amersham, Freiburg, Germany) benutzt. Zuerst wurde die RNA im Eisbucket aus - 80°C herausgenommen und bei 4°C aufgetaut. Anschließend wurde für 10 Minuten im Thermoblock bei 65°C inkubiert. Währenddessen wurde für die Reverse Transkription nach folgendem Pipettierschema das RT-Mix vorbereitet:

1 µl pDN6 primer

1 µl dTT solution

11 µl bulk Mix (zuletzt zugeben, da Polymerase enthalten ist)

Der Mix wurde zentrifugiert und je RNA Probe (20 µl) wurde 13 µl RT-Mix hinzugeben und erneut zentrifugiert

Im Anschluss wurden die beschrifteten Eppendorf-Tubes bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Die cDNA wurde nun bei - 20°C eingefroren. Für die PCR wurden jeweils 7 µl benötigt.

PCR

Die eingefrorenen Proben wurden aufgetaut, auf Eis gestellt und der Thermocycler wurde in Betrieb genommen. Der Mix wurde wie folgt vorbereitet:

33 µl Dd H₂O

5 µl 10x Puffer

1,5 µl MgCl₂ 50 mM

1 µl Primer1 50 ng/ml

1 µl Primer2 50 ng/ml

1 µl dNTPs 10 mM

0,5 µl Taq Polymerase (ganz zum Schluss)

Die 7 µl cDNA Probe wurden dann in das PCR Tube pipettiert, anschließend wurden 43 µl des PCR-Mix hinzugefügt und sofort in den Thermocycler

gegeben und gestartet.

Die PCR wurde von dem programmierten Thermocycler Biometra UNO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) mit folgenden Primern ausgeführt: 3'-CCT TCA TTG ACC TCA ACT AC-5' (FP) und 3'-GGA AGG CCA TGC CAG TGA GC-5' (RP) für GAPDH und 3'- AAC GGC CTG CCT AGT GGA C-50 (FP) und 3'-CCA GAG GTG TGC GGA GAG -5' (RP) für THY1.

PCR Programm:

Start bei 94°C und Denaturierung der cDNA für 1 min bei 94°C.

Bei 55 - 65°C lagern sich die Primer an den jeweiligen DNA-Einzelstrang an, 58°C bei THY1 und 62°C bei GAPDH. Z.B. Das Annealing wurde für 1 Minute durchgeführt. Bei 72°C erfolgt dann die Extension, dieser Zyklus wurde jeweils 30-mal (THY1) oder 35-mal (GAPDH) wiederholt. Im Anschluss erfolgte die Endextension bei 72°C für 10 Minuten. Jeder Durchlauf enthielt eine negative Probe zur Kontrolle.

Gelelektrophorese

Folgende Puffer wurden benötigt:

TAE Puffer (50 x) Stocklösung:

242 g Trishydroxymethyl-aminomethan

57 ml konzentrierte Essigsäure

186 g EDTA

ad 1000 ml Aqua destillata

1%iges Agarosegel:

2 g Agarosegel

200 ml 1x TAE-Puffer

Dieses wurde in der Mikrowelle aufgekocht, anschließend abgekühlt und danach wurden 8 µl Ethiumbromid hinzugefügt.

Der TAE-Puffer diente als Laufpuffer und wurde vor Beginn der Elektrophorese in die Gelkammer gegeben.

Elektrophorese:

In die mit dem Probenkamm vorbereiteten Taschen gab man 10-15 µl der

Proben. Man ließ eine Negativkontrolle und einen Marker, 8-10 µl mitlaufen.
Die Trennung der DNA erfolgte bei 120 Volt und die Laufzeit betrug 50 Minuten.
Zu allerletzt wurden die Gele mit UV-Licht von 100 base pair ladder (Gibco BRL) analysiert und gespeichert.

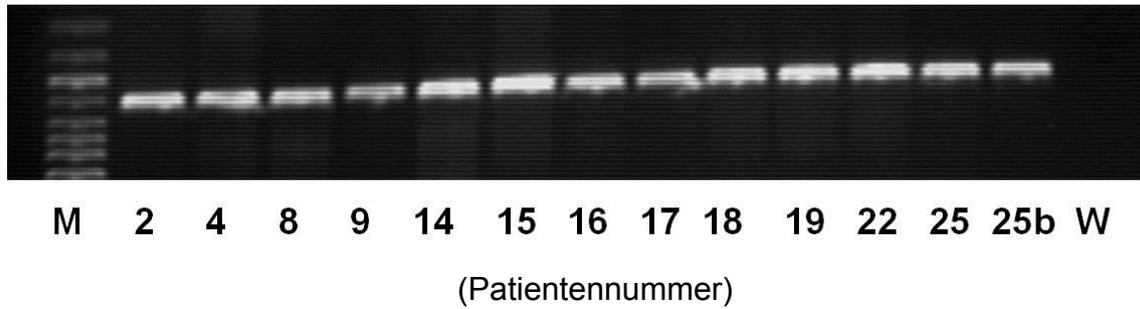


Abb. 3: RT PCR, Gelbelegung mit GAPDH

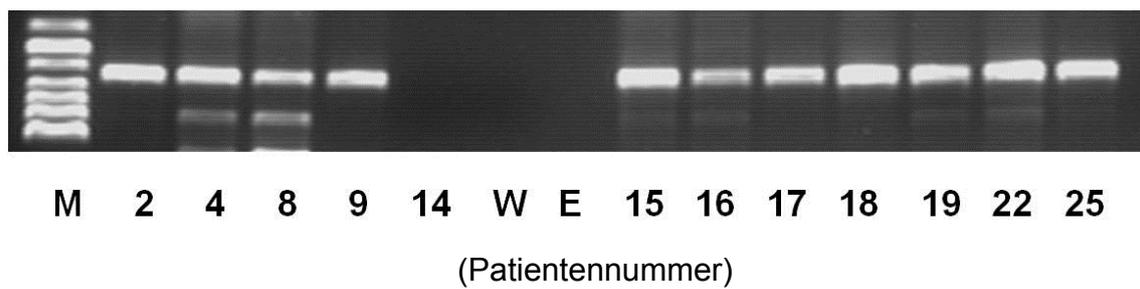


Abb. 4: RT PCR, THY1

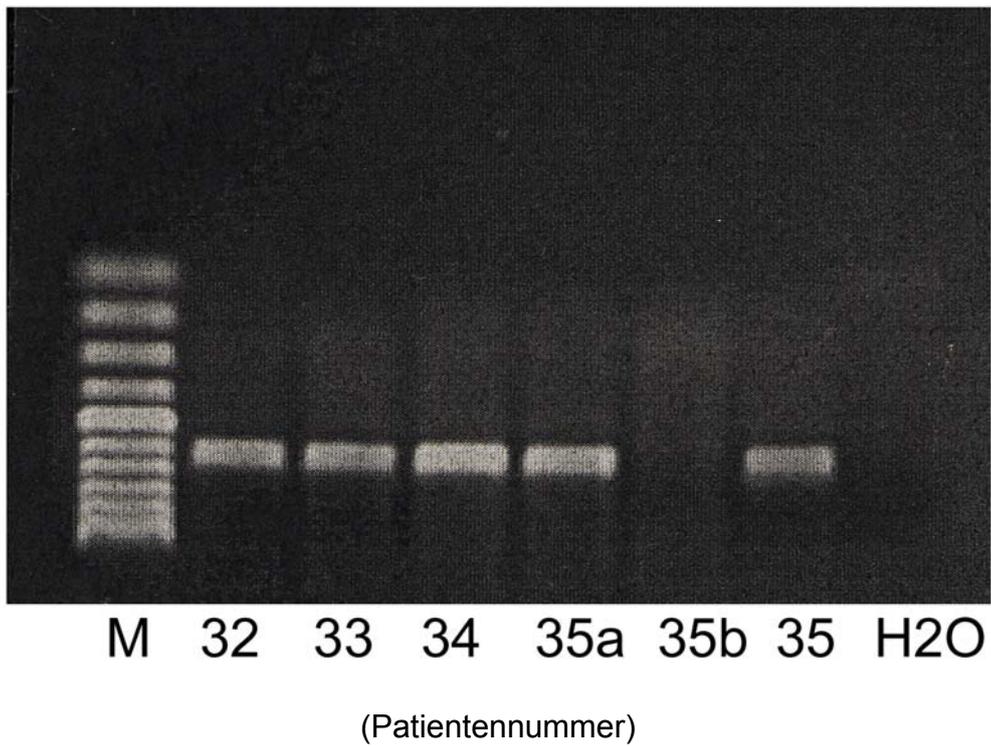


Abb. 5: RT PCR, Gelbelegung mit GAPDH

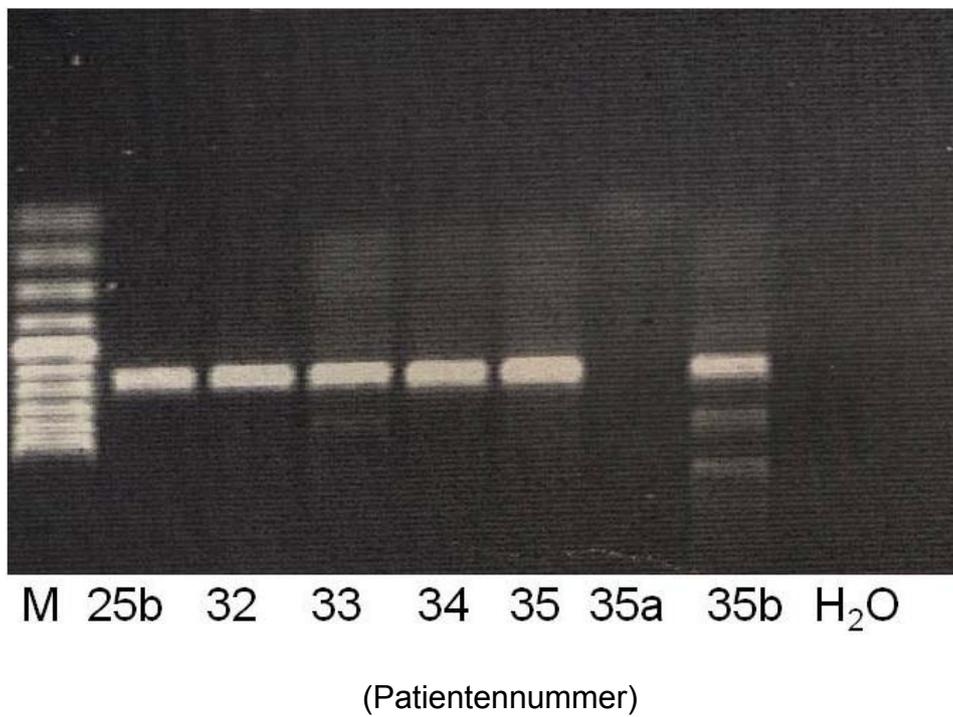


Abb. 6: RT PCR, THY1

2.6. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde SPSS für Windows (Version 11.5, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) benutzt.

Die vorliegenden Ergebnisse der retrospektiven Studie von 63 Neuroblastom-Patienten hatte zensierte Überlebenszeiten zu berücksichtigen. Eine graphische Darstellung dient der Veranschaulichung der Überlebensraten in Abhängigkeit von der Zeit. Mit Hilfe der Kaplan Meier-Methode wurden Überlebenskurven für Overall Survival und Event Free Survival der Patienten entworfen und unter Verwendung des log-rank Tests analysiert.

Für die Kreuztabellenstatistiken wurden der X²-Test (für zwei Variablen) und der exakte Test nach Fisher (für mehr als zwei Variablen) verwendet. Signifikante Aussagen dieser Arbeit beziehen sich auf p- beziehungsweise F-Werte bei zweiseitigen Tests, die < 0,05 waren.

3. Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse basieren auf der Auswertung der 63 Neuroblastom-Patientenakten. Nach dem immunhistochemischen Nachweis von THY1 im Tumorgewebe galt es einen Zusammenhang zwischen dem klinischen Verlauf und der THY1-positiven bzw. THY1-negativen Neuroblastom-Patienten herzustellen.

3.1. Auswertung der klinischen Daten

Die Erhebung der klinischen Daten aus den Patientenakten ergab die folgenden Ergebnisse, die in Tab. 2 wiedergegeben werden.

20 (32 %) der 63 retrospektiv analysierten Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger als 1 Jahr alt, 43 (68 %) Patienten waren älter.

Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung betrug 30,0 Monate.

Die Analyse der Primärtumorlokalisationen ergab 37 Patienten (59 %) mit adrenalem Primärtumor, 13 (20 %) lagen im thorakalen Bereich, 10 (17 %) waren abdominal gelegen und 3 Tumoren (4 %) waren anderweitig lokalisiert.

Die Auswertung des Metastasierungsstatus ergab zusammenfassend 24 Patienten (39 %) mit metastasiertem Neuroblastom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, bei 37 Patienten (60 %) lag eine auf den Primärtumor begrenzte Erkrankung vor.

28 Patienten (44 %) wurden in das INSS-Stadium 1 gruppiert, 13 (21 %) in das Stadium 2, 10 Patienten (16 %) erfüllten die Kriterien für das Stadium 3, 8 Patienten (13 %) die des Stadium 4 und 4 Patienten (6 %) in das Stadium 4S.

Den Daten bezüglich des histologischen Gradings nach Hughes et al. waren somit 22 Patienten (36 %) mit einem Neuroblastom Grad I, 17 (27 %) Patienten mit Grad II, 23 (37 %) mit Grad III, von einem (2 %) Patienten konnte das Tumorgewebe nicht klassifiziert werden, so dass diesbezüglich keine Information vorlag.

11 Tumorgewebe (21 %) zeigten einen Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 1 und bei 10 Patienten (16 %) war eine MYCN-Amplifikation dokumentiert.

Tabelle 1:

Klinisches, pathologisches, molekulares und immunhistochemisches Muster des Neuroblastoms (NBL)

Variable	Patienten- anzahl, n (%)	THY1 pos. NBL, n (% pos)	THY1 neg. NBL, n (% neg)
Summe	63	51	12
Diagnosealter <1.LJ	20 (32 %)	19 (37 %)	1 (18 %)
Diagnosealter >1.LJ	43 (68 %)	32 (63 %)	11 (92 %)
Rezidiv	9 (14 %)	5 (10 %*)	4 (33 %*)
Tod	9 (14 %)	4 (8 %*)	5 (42 %*)
INSS-Stadium			
1	28 (44 %)	26 (51 %)	2 (17 %)
2	13 (21 %)	10 (20 %)	3 (25 %)
3	10 (16 %)	7 (14 %)	3 (25 %)
4	8 (13 %)	4 (8 %)	4 (33 %)
4s	4 (6 %)	4 (8 %)	0
Histologisches Grading nach Hughes et al.			
Grad I	22 (36 %)	17 (34 %)	5 (42 %)
Grad II	17 (27 %)	15 (30 %)	2 (17 %)
Grad III	23 (37 %)	18 (36 %)	5 (42%)
Risikofaktoren			
MYCN-Amplifikation	10 (16 %)	6 (12 %)	4 (33%)
LOH p1	11 (21 %)	8 (19 %)##	3 (33%)#

* $p < 0,05$; # Prozentuale Angaben bezogen auf 54 Patienten, bei 9 Patienten waren keine Angaben zum LOH p1 Status

9 (14 %) der 63 Patienten erlitten ein Rezidiv, demzufolge waren 54 (86 %) rezidivfrei. Während des Beobachtungszeitraumes verstarben 9 der 63 Patienten (14 %).

51 der Patienten waren THY1 positiv, 5 (10%) dieser THY1 positiven Patienten erlitten ein Rezidiv und 4 (8%) verstarben. Von den 12 THY1 negativen Patienten erlitten 4 (33%) ein Rezidiv und 5 (42%) verstarben.

Das durchschnittliche Overall Survival der 63 Patienten betrug 65,5 Monate.

3.2. THY1-Expression im Neuroblastomgewebe

Die immunhistochemische Färbung der Tissue Microarrays ermöglichte THY1 im Tumorgewebe nachzuweisen.

Dabei zeigten sich zwei verschiedene Färbereaktionen: einmal eine für die Neurofibrillen spezifische Färbereaktion und zum anderen eine spezifische zelluläre Färbereaktion der Tumorzellen.

Beide Reaktionen erwiesen sich als spezifisch für THY1. Bei einem positiven Färbeergebnis wurden somit die Tumoren als THY1-positiv klassifiziert.

Von den vorliegenden 63 Neuroblastom-Proben erwiesen sich bei der Färbung 51 (81 %) als THY1 positiv und 12 (19 %) als THY1-negativ.

Die molekularbiologischen Daten wurden hinsichtlich der THY1-Expression mit den immunhistochemischen Daten verglichen. Die RT-PCR bestätigte die Ergebnisse der Immunhistochemie.

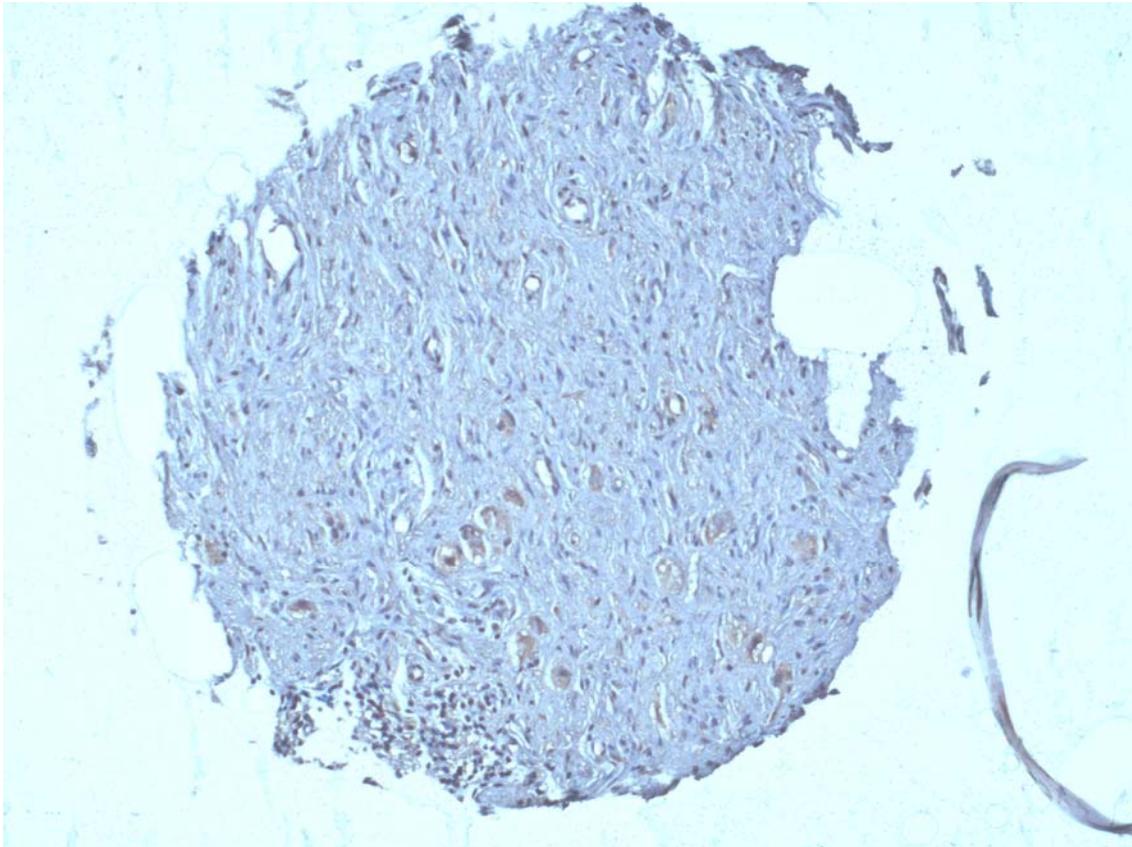


Abb. 7: Immunhistochemische Färbung eines THY 1-negativen Tissue
Microarrays

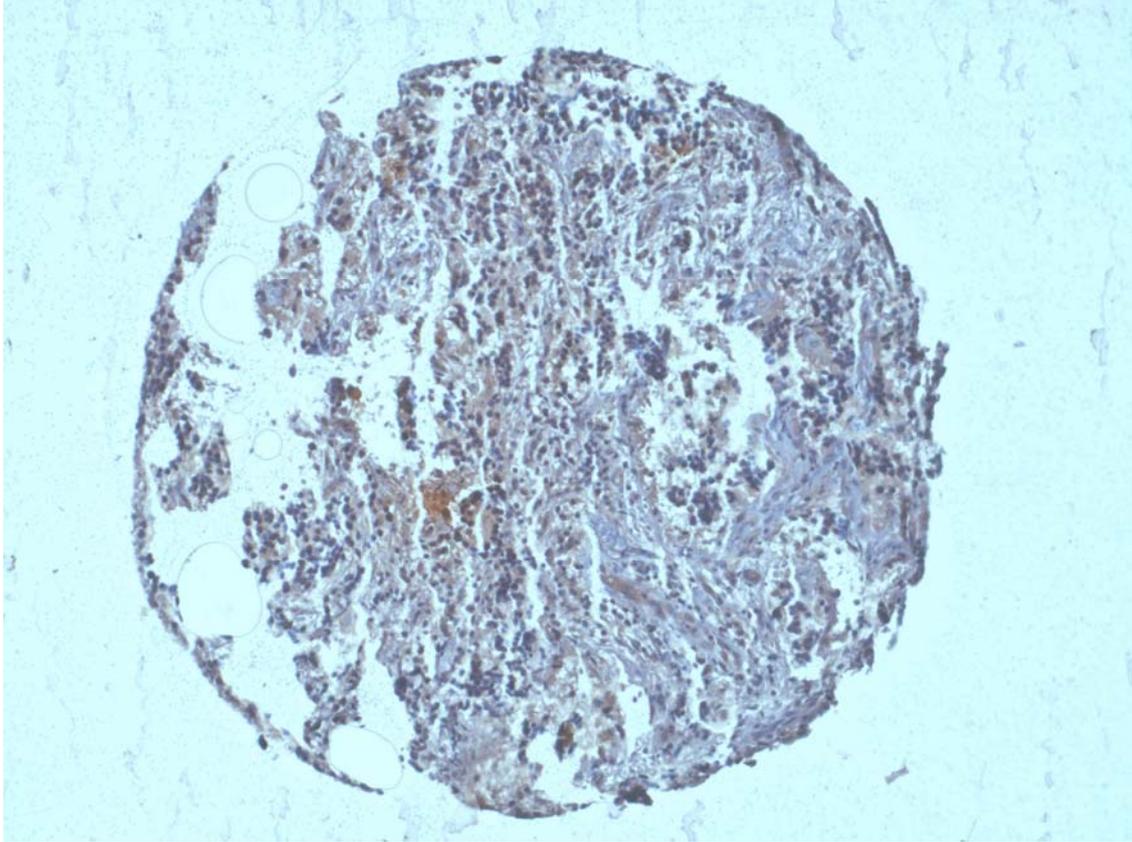


Abb. 8: Immunhistochemische Färbung eines THY1-positiven Tissue
Microarrays

3.3. THY1-Expression und Survival sowie Rezidiv und Tod

Um einen Zusammenhang zwischen der THY1-Expression und dem klinischen Verlauf ermitteln zu können, wurde im Folgenden eine Kaplan Meier-Überlebenskurve entworfen.

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde durch Anwendung des log rank-Tests sowie ANOVA untersucht.

Von den 63 Patienten dieser Studie verstarben 9 (14 %) und 9 (14 %) weitere Kinder hatten ein Rezidiv.

Von den 51 THY1-positiven Patienten erlitten 5 (10 %) ein Rezidiv und 4 (33 %) verstarben.

Von den 12 THY1-negativen Patienten hatten 4 (33 %) ein Rezidiv während des Beobachtungszeitraumes und 5 (41 %) verstarben.

Der im Vergleich prozentual höhere Anteil an Rezidiven und Tod im THY1-negativen Kollektiv war statistisch signifikant ($p < 0.05$ by F-Test).

Survival	THY1 + (N=51)	THY1- (N=12)
Overall	70.0 +/- 41.7	40.8 +/- 25.0
Event Free	63.0 +/- 40.1	39.2 +/- 26.3

Tabelle 2:

Anova-test: $p = 0.010$ (OS) / $p = 0.031$ (EFS)

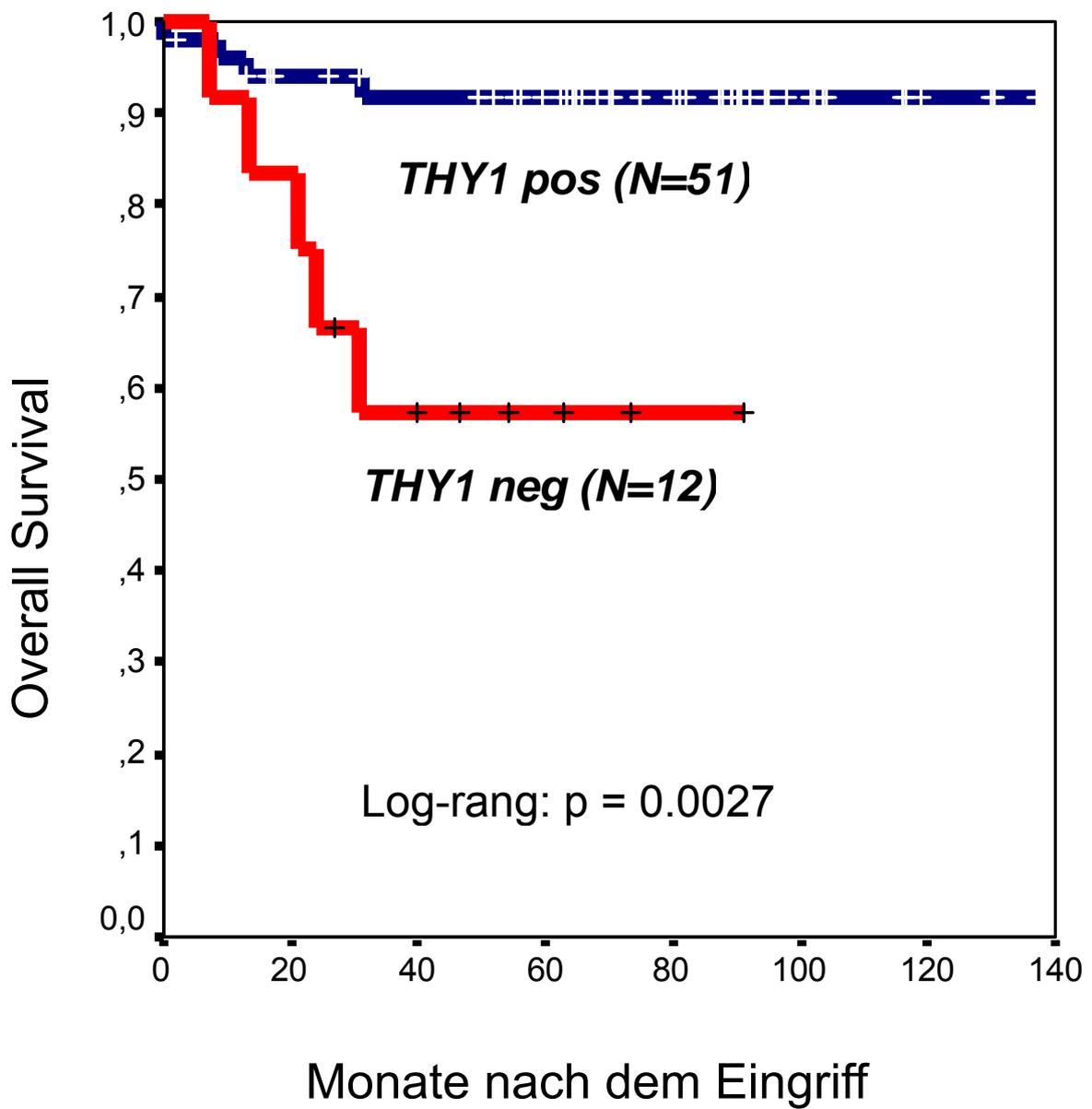


Abb. 9: Kaplan Meier-Kurve für das Overall Survival in Monaten

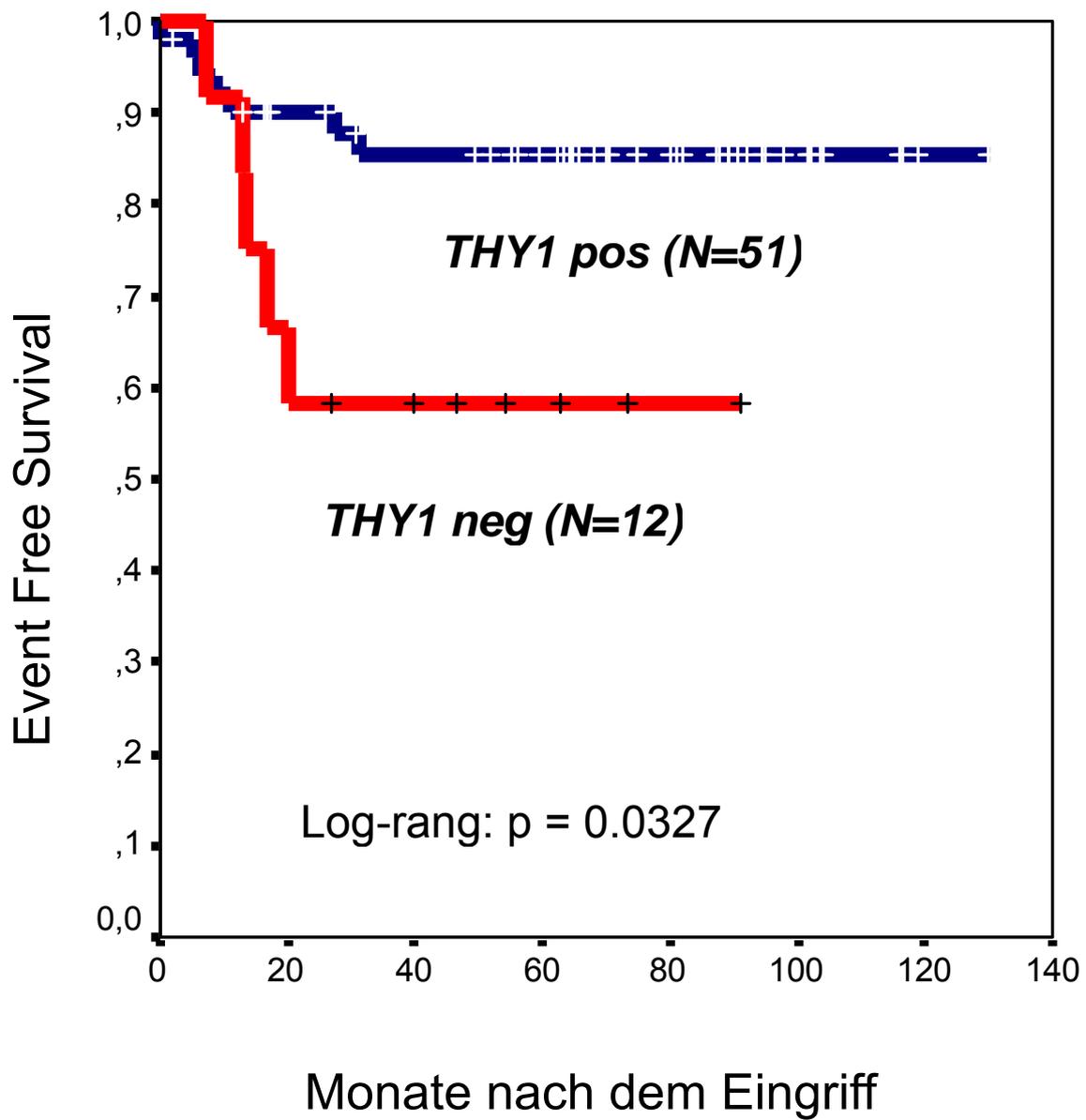


Abb. 10: Kaplan Meier-Kurve für das Event Free Survival

Die Analysen zeigen ein statistisch beeinträchtiges Overall Survival bei THY1-negativen (N=12) Patienten im Vergleich zu THY1-positiven (N=51) Patienten ($p=0.0027$ im log-rankTest).

Desweiteren zeigt die Kaplan Meier-Kurve einen signifikant kürzeren Event Free Survival bei THY1-negativen Patienten im Gegensatz zu den THY1-positiven ($p=0.0327$ im log-renk-test).

Tabelle 3:

THY1 Status der Patienten mit Event Free Survival

Ereignis	Patienten	THY1-positiv	THY1-negativ
Rezidiv	9	5	4
Tod	9	4	5

Insgesamt 45 Patienten erlitten weder Tod noch Rezidiv, sie blieben somit während des Beobachtungszeitraumes Event Free. In diesem Kollektiv hatte die signifikante Mehrheit von 42 Patienten THY1-positive Tumoren, 3 erwiesen sich als THY1-negativ.

3.4. THY1-Expression und histologisches Grading

In allen drei nach Hughes et al. unterschiedenen histologischen Graden wurde immunhistochemisch THY1-Expression nachgewiesen, wobei sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen THY1-Expression und dem histologischen Grad feststellen ließ.

Tabelle 4: THY1-Expression und histologisches Grading

Histologisches Grading nach Hughes et al.	Patienten	THY1-positive
Grad I	22 (36 %)	17 (34 %)
Grad II	17 (27 %)	15 (30%)
Grad III	23 (37 %)	18 (36 %)

3.5. THY1-Expression und klinische Charakteristika

Ein signifikant statistischer Zusammenhang zwischen den anderen untersuchten klinischen Charakteristika und der THY1-Expression konnte nicht nachgewiesen werden.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der THY1 positiven und THY1 negativen Patienten hinsichtlich MYCN-Amplifikation, LOH1p, INSS-Stadium und histologisches Grading nach Hughes.

20 (32 %) der 63 Patienten waren < 1 Jahr alt bei Diagnosestellung und 19 (95 %) von diesen 20 Patienten wiesen in ihrem Tumorgewebe eine THY1-Expression auf. Unter den 43 älteren Patienten waren 32 (63 %) THY1-positiv. Für 10 (16 %) der Patienten des Gesamtkollektivs war eine Amplifikation des Risikofaktors MYCN dokumentiert. 6 (60 %) davon wiesen eine THY1-Expression auf. Bei Insgesamt 11 Patienten lag ein Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 1 vor. Unter ihnen fanden sich 8 (73 %) THY1-positive und 3 THY1-negative Tumorgewebe.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von THY1 auf Neuroblastom-Gewebe untersucht. Insbesondere die Analyse des klinischen Verlaufes von 63 Patienten erbringt überraschende Ergebnisse. Im Rahmen der Risikogruppenstratifizierung von Neuroblastom-Patienten könnte THY1 als Prognosemarker zukünftig eine bedeutende Rolle spielen.

4.1. Expression von THY1 im Neuroblastomgewebe

Durch immunhistochemische Färbungen von Tissue Microarrays erfolgt in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von THY1 auf Neuroblastom-Gewebe. Aktuell finden sich in der Literatur diesbezüglich lediglich Berichte von Tumoren, die nahezu ausnahmslos im Erwachsenenalter auftreten (Lu et al. 2011, True et al. 2010, Yang et al. 2009). In dieser Arbeit konnte THY1 auf dem von uns untersuchten Originaltumorgewebe von Neuroblastompatienten nachgewiesen werden. Damit ist das Neuroblastom der einzige solide Tumor des Kindesalters, für den dies bisher bekannt ist.

Die immunhistochemischen Ergebnisse wurden durch die RT-PCR bestätigt. Bei der immunhistochemischen Untersuchung wurden zwei Färbemuster beobachtet, zum einen die der Neurofibrillen und zum anderen die zelluläre Färbereaktion der Tumorzellen.

Von den 63 untersuchten Tumorgeweben waren 51 THY1 positiv und 12 THY1 negativ. Die Färbungen erfolgten für alle drei Tumorgrade (Histologisches Grading nach Hughes et al.). Von den THY1 positiven Tumoren waren bei der Färbung 17/22 (77%) dem Grad 1 zuzuordnen, 15/17(88%) dem Grad 2 und 8/23 (78%) dem Grad 3 nach Hughes et al.

Hier wurden zwei unterschiedliche Methoden zum Nachweis von THY1 im Neuroblastomgewebe genutzt. Zum einen der Nachweis über die immunhistochemische Färbung und zum anderen durch den molekularbiologischen mRNA Nachweis.

Beide Ergebnisse waren nahezu identisch.

Unterschiedliche Studien hatten schon zuvor eine hohe THY1 Expression in Neuroblastomgeweben bestätigen können (Seeger et al. 1982; Kemshead et al. 1986).

Die Expression von THY1 als neuronaler Progenitorzellmarker konnte in vielen anderen Studien nachgewiesen werden (Uchida et al. 2000, Barnstable und Dräger 1984, Nash und Osborne 1999).

Da das Neuroblastom ein Tumor von neuronalen Progenitorzellen ist (Weinstein et al. 2003) könnte dies die naheliegendste Erklärung für die THY1 Expression in Neuroblastomgeweben darstellen.

4.2. THY1-Expression und klinische Überlebensdaten sowie klinische Prognose

Unsere Ergebnisse bezüglich der THY1-Expression in Neuroblastom-Proben decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien, die ebenso eine THY1-Expression im Neuroblastom wie auch im Knochenmark von Neuroblastom-Patienten nachweisen (Seeger et al. 1982, Kemshead et al. 1986). Allerdings wird in keiner der beiden Studien eine Korrelation zu klinopathologischen Patientenmerkmalen und dem klinischen Verlauf mit der THY1-Expression untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen erstmalig auf, dass eine fehlende THY1-Expression in Neuroblastomen im Zusammenhang mit einer reduzierten Überlebenserwartung steht.

Zudem wird bei THY1-negativen Patienten eine signifikant höhere Todesrate sowie Rezidivrate beobachtet. Dieses deutet darauf hin, dass die Expression von THY1 im Neuroblastom mit einer günstigeren Prognose gemessen am Überleben einhergeht.

Sowohl die Kaplan Meier-Kurven wie auch die statistischen Analysen zeigen bezüglich des Overall Survival als auch das Event Free Survival betreffend bessere Ergebnisse für das THY1-positive Patientenkollektiv im Gegensatz zu dem THY1-negativen Patientenkollektiv.

Die THY1-Expression auf Neuroblastomen korreliert mit einem signifikant längeren Event Free und Overall Survival. THY1 ist somit ein Marker für einen günstigen klinischen Verlauf und besitzt eine günstige prognostische Aussagekraft.

Aufgrund der hier präsentierten Ergebnisse könnte sich THY1 als neuer Prognosemarker für das Neuroblastom eignen.

Es stellt sich die Frage, ob der Bedarf nach einem weiteren diagnostischen Parameter überhaupt besteht?

Prognosemarker maligner Tumoren stellen die Basis für das Procedere der

Therapie dar, so dass die Mortalitätsrate wie auch Morbiditätsrate soweit wie möglich reduziert werden können. Unter Berücksichtigung der Tumorphistologie, dem INSS-Stadium, der vorliegenden Chromosomenabnormalität, werden die Patienten nach den gegenwärtigen Studienprotokollen klinisch den unterschiedlichen Therapieoptionen zugeführt.

Trotz der vorliegenden unterschiedlichen Therapiemodalitäten zeigen sich bei Neuroblastom-Patienten eine große Variabilität des klinischen Verlaufes (von einer Spontanregression bei Beobachtungspatienten bis hin zur fortgeschrittenen Metastasierung und hohen Rezidivrate bei Hochrisikopatienten), so dass die Risikoeinstufung von Neuroblastom-Patienten weiterhin eine Herausforderung darstellt. Die Heilungschancen sind aufgrund multimodaler Therapiemöglichkeiten wie Chemotherapie, Bestrahlungstherapie, chirurgische Exstirpation und autologe Stammzelltransplantation in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert worden. Die Suche nach ergänzenden Prognosemarkern bleibt trotz guter Heilungschancen bestehen.

Die Therapieoptionen haben in den letzten Jahren zugenommen, hiermit aber auch die Anzahl möglicher unerwünschter Arzneimittelwirkungen. Da diese gerade beim kindlichen Körper fatale Folgen haben können, kommt bei der Behandlung der betroffenen Patienten einer Supportivtherapie eine hohe Bedeutung.

Ziele aktueller Forschung sind die Charakterisierung von Regressions- und Differenzierungsmechanismen wie auch die weiterführenden molekulargenetischen Analysen zur Präzisierung von Prognoseeinschätzungen. Desweiteren werden innovative Therapiemethoden, wie zum Beispiel die Immuntherapie, zu etablieren erstmalig in klinischen Studien erprobt.

Die THY1-Expression könnte im Fall des Neuroblastoms als Prognosemarker dienen. Eine klare Aussage, ob die THY1-Expression bei Tumorgewebe auch im Erwachsenenalter generell eine prognostische Aussage erlaubt, ist gegenwärtig nicht mit Sicherheit möglich. Doch da Tumoren im Erwachsenenalter häufig im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden,

könnte ein frühzeitiger Nachweis hier zu einer geringeren Mortalität führen. Besonders für Patienten im Kindesalter, deren Körper in vielerlei Hinsicht empfindlicher als Erwachsene reagiert, ist dieser Aspekt möglicherweise bedeutsam. Aus diesem Grund ist es von außerordentlicher Bedeutung, für dieses Patientenklientel, eine möglichst eindeutige Definition für ein niedriges Risiko zu erzielen (Evans und D'Angio 2005). Wie unsere Fälle zeigen, kann der Nachweis von THY1-Expression als Prognosemarker ergänzend zu den bislang üblichen Patienten in günstigere Risikogruppen eingestuft werden. Ein Teil unserer Ergebnisse zeigt, dass einige Patienten durch den Nachweis von THY1 auf ihrem Tumorgewebe in günstigere Risikogruppen eingestuft werden könnten, als es mit den bisherigen Prognosemarkern der Fall ist. Dessen Konsequenz wäre bezüglich des Therapiestufenschemas eine weniger aggressive Therapie, z.B. eine mildere oder keine Chemotherapie. Damit einher ginge somit das geringere Risiko akuter oder chronischer unerwünschter Langzeitfolgen, wie z.B. atypische Infektionen durch Immunsuppression oder Chemotherapie-induzierter Zweitneoplasien.

4.3. THY1-Expression beim Neuroblastom im Vergleich mit THY1-Expression bei Tumoren des Erwachsenenalters

THY1 ist ein Glycoprotein, welches sich auf weiteren zahlreichen Zelloberflächen befindet (Tiveron et al. 1992). THY1 wurde als ein Marker verschiedener Typen von Stammzellen, wie z.B. hämatopoetischer Stammzellen (Craig et al. 1993), mesenchymaler Stammzellen (Pittenger et al. 1999, Jeong et al. 2005) und aktivierten T-Lymphozyten (Kroczeck et al. 1986) beschrieben. Weiterhin wurde eine Expression von THY1 von neuronalen Vorläuferzellen (Uchida et al. 2000, Piper et al. 2001) und Ganglienzellen der Retina (Nash und Osborne 1999, Barnstable und Dräger 1984) beschrieben.

Eine THY1-Expression konnte ebenfalls auf den Tumorzellen der gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) nachgewiesen werden. In einer Studie, die 2007 von Oikonomou et al. 2007, veröffentlicht wurde, konnten in 54 von 57 GIST-Gewebeproben eine THY1-Expression nachgewiesen werden. GIST ist ein Tumor neuronalen Ursprungs. Nach chirurgischer Resektion ist das Outcome kaum vorhersehbar und Patienten mit einem Rezidiv haben eine schlechte Prognose (De Matteo et al. 2000, Miettinen et al. 2002). In der besagten Studie erfolgte die Risikogruppenstratifizierung nach dem Fletcher Score (WHO 2002): sehr niedrig, niedrig, mittel und hoch.

In den 54 THY1-positiven GIST Gewebeproben konnte eine starke homogene Immunfärbung nachgewiesen werden. 3 von den 57 Gewebeproben waren THY1-negativ und gehörten der niedrigen Risikogruppe nach dem Fletcher Score an. Alle dieser THY1-negativen Patienten hatten im Gegensatz zu den anderen 54 THY1-positiven Patienten ein besseres Overall Survival und Disease Free Survival. Aufgrund des niedrigen Patientenkollektivs konnte hier zwar keine signifikante Aussage bezüglich der Assoziation zwischen dem klinischen Outcome und der THY1-Expression gemacht werden, doch alle drei der THY1-negativen Patienten hatten eine bessere Prognose als der Rest des THY1-positiven Patientenkollektivs.

In unserer Studie zeigte sich ein klarer Trend für eine bessere Prognose für

THY1-positive Neuroblastom-Patienten.

In einer weiteren Studie von Lu et al. 2011 wurde eine THY1-Expression im hepatozellulären Karzinom untersucht. Es wurden Tumorproben aus einem Patientenkollektiv bestehend aus 59 Patienten untersucht. Bei 76 % dieser Proben konnte eine THY1-Expression nachgewiesen werden. Desweiteren stellte man eine Korrelation der THY1-Expression mit gewissen klinisch-pathologischen Variablen, wie dem Alter der Patienten, der HBV Infektion und dem histologischen Grad her. Zum besseren Verständnis der Signifikanz der THY1-Expression im HCC wurde an Hand der klinisch pathologischen Gesichtspunkte das Patientenkollektiv in 3 Klassen kategorisiert. Der Chi-square-Test zeigte hier eine Korrelation der THY1-Expression mit dem Alter, der HBV-Infektion und dem histologischen Grad. Mit Hilfe dieser Klasseneinteilung wurde eine Kaplan Meier-Überlebenskurve erstellt. Diese zeigte, dass die Patienten, die der Klasse 1 zugeordnet wurden, eine schlechtere Überlebensprognose als die der Klasse 2 und 3 hatten. Schlussfolgernd wurde hier festgestellt, dass Patienten mit einer hohen THY1-Expression eine schlechtere Prognose haben als diejenigen, die eine niedrige THY1-Expression aufweisen.

4.4. Biologische Bedeutung der THY1-Expression im Tumoren

Wie zuvor durch Studien aufgeführt, stellt die THY1-Expression bei Tumoren im Erwachsenenalter einen ungünstigen Prognoseparameter im Gegensatz zur THY1-Expression bei Neuroblastomen im Kindesalter dar.

So scheint die THY1-Expression bei Tumoren im Erwachsenenalter (Oikonomou et al. 2007, Lu et al. 2011) eine ungeklärte Funktion zu haben.

In einer weiteren Studie konnte nach Isolierung von THY1 exprimierenden humanen neuronalen Vorläuferzellen aus fetalem menschlichem Gewebe eine neuronale Differenzierung dieser Zellen nach Transplantation in Mäusen gezeigt werden (Uchida et al. 2000). Dies ist ein weiterer Beweis, dass THY1 einen neuronalen Progenitorzellmarker darstellt.

Diese könnte die Erklärung dafür sein, dass THY1 als solcher Marker eine höhere Zelldifferenzierung darstellt und somit eine geringere Aggressivität des Tumors an den Tag gelegt wird.

Bei Karzinomen im Erwachsenenalter scheint es hingegen im Umkehrschluss eine verminderte Zelldifferenzierung darzustellen, was wiederum die schlechte Prognose bei THY1-Expression erklären könnte.

Diese hier aufgestellte These wäre in weiteren Studien nachzuweisen.

4.5. Ausblick

Die Ergebnisse unserer Studie stellen kein endgültiges Resultat bezüglich der Bedeutung von THY1 für Neuroblastome dar. Vielmehr mögen sie einen ersten und möglicherweise wichtigen Schritt für die Erforschung dieses Zelladhäsionsmoleküles als prognostischen Serumparameter für Neuroblastom-Patienten darstellen. Zukünftige Studien könnten an unsere Ergebnisse anschließen und im Hinblick auf folgende Themenbereiche konzipiert werden: Ein wichtiges Ziel sollte zunächst eine größere Fallzahl sein. Mit Hilfe dieses Kriteriums sollte ein besonderes Augenmerk auf HRG-Patienten gerichtet werden, um weiterführende Kenntnisse für das Zusammenspiel zwischen MYCN-Amplifikation und THY1-Expression zu gewinnen. Denn dieses Ergebnis unserer Arbeit könnte die Etablierung von THY1 als Prognosemarker darstellen.

Wir vermuten, dass die durch unsere Arbeit gezeigte Korrelation zwischen THY1-Expression und einem günstigen klinischen Verlauf von Neuroblastom-Patienten mit dem Reifegrad der Tumorzellen zu erklären ist. Diese These gilt es nun zu verfolgen. Gegenstand folgender Arbeiten könnte somit der Wilms-Tumor sein, der wie das Neuroblastom ein embryonaler Tumor des Kindesalters ist. Ließe sich THY1 in ähnlich konzipierten Studien auf Wilms-Tumor-Gewebe nachweisen, ist ein ähnliches Resultat hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft zu erwarten, im Falle der Richtigkeit unserer Hypothese.

Die Ergebnisse solcher Studien mag man mit großem Interesse erwarten und forcieren, um das Spektrum diagnostischer Mittel im Rahmen der Neuroblastom-Behandlung zu erweitern. Somit könnte den betroffenen Patienten eine noch besser angepasste Therapie zugutekommen, welche damit die Langzeitergebnisse optimieren würde.

5. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor, dessen Ursprung neuroektodermale Progenitorzellen des sympathischen Nervensystems sind. Es ist mit etwa 7 % aller kindlichen Krebserkrankungen-der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter.

Eine Herausforderung der gegenwärtigen Forschung auf diesem Gebiet ist, die Risikoeinschätzung der betroffenen Patienten durch die Identifikation neuer Prognosemarker zu optimieren.

Bei der hohen Variabilität des klinischen Verlaufes bleibt die Prognose von Hochrisikopatienten trotz fortschrittlicher Therapieverfahren weiterhin unerfreulich.

THY1 ist ein Progenitorzellmarker von Stammzellen und neuronalen Progenitorzellen. Eine Expression von THY1 sowie prognostischer Wert für eine ungünstige Prognose wurde bei neuroektodermalen Tumoren im Erwachsenenalter, z.B. beim GIST nachgewiesen. Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Expression von THY1 in Neuroblastomgewebe zu untersuchen und die Expression von THY1 mit klinopathologischen Patientenmerkmalen sowie mit dem Überleben der Patienten zu korrelieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Expression von THY1 auf Neuroblastomgewebe von 63 Patienten mittels immunhistochemischer Färbemethoden sowie Molekularbiologie. Die zugehörigen klinischen Daten wurden statistisch analysiert. Unter Verwendung von Kaplan Meier-Analysen untersuchten wir anschließend die Korrelation zwischen THY1-Expression und dem klinischem Verlauf der Neuroblastom-Patienten.

Die Resultate der Kaplan Meier Analysen zeigten, dass eine fehlende THY1-Expression bei Neuroblastom-Patienten signifikant mit einem reduzierten Gesamt- und ereignisfreien Überleben korreliert (Log-rang: $p= 0.0027$ Gesamt Überleben, Log-rang: $p= 0.0327$ Ereignisfreies Überleben). Weiterhin wurde ein signifikant höherer Anteil an Todes- und Rezidivfällen in der Gruppe der Patienten mit THY1-negativen Neuroblastomen beobachtet ($p<0.05$ by F-Test).

Schlussfolgernd zeigten die Analysen, dass die Expression von THY1 in Neuroblastomen mit einem deutlich günstigeren Überleben der Patienten und deutlich geringerer Anzahl an Todes- und –rezidivfällen assoziiert ist. Die Daten deuten möglicherweise an, dass THY1 als Marker des sich entwickelnden Nervensystems reifere neuroblastische Zellen identifizieren und ist deshalb mit einer geringeren Tumoraggressivität assoziiert ist. THY1 könnte daher zukünftig einen günstigen Marker mit einem hohen spezifischen prognostischen Wert für Neuroblastom-Patienten darstellen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die Abbildung zeigt die Struktur des THY1-Glykoproteins	11
Abbildung 2:	Die Abbildung zeigt ein Multi-Tissue-Array MTA	15
Abbildung 3:	RT PCR, Gelbelegung mit GAPDH	21
Abbildung 4:	RT PCR, THY1	21
Abbildung 5:	RT PCR, Gelbelegung mit GAPDH	22
Abbildung 6:	RT PCR, THY1	22
Abbildung 7:	Immunhistochemische Färbung eines THY1-negativen Tissue Microarrays	29
Abbildung 8:	Immunhistochemische Färbung eines THY1-positiven Tissue Microarrays	30
Abbildung 9:	Kaplan Meier-Kurve für das Overall Survival in Monaten	32
Abbildung 10:	Kaplan Meier-Kurve für das Event Free Survival	33

7. Literaturverzeichnis

1. Ambros I m., Benard J, Boavida M, Bown N, Caron H, Combaret V, Couturier J, Darnfors C, Delattre O, Freeman-Edward J, Gambini C, Gross N, Hattinger C m., Luegmayer A, Lunec J, Martinsson T, Mazzocco K, Navarro S, Noguera R, O'Neill S, Pötschger U, Rumpler S, Speleman F, Tonini G p., Valent A, Roy NV, Amann G, Bernardi BD, Kogner P, Ladenstein R, Michon J, Pearson A d. j., Ambros P f. Quality Assessment of Genetic Markers Used for Therapy Stratification. *JCO* 2003 Jan;21(11):2077–2084.
2. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB, Cohn SL, Pearson ADJ, Maris JM. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br. J. Cancer* 2009 Mai;100(9):1471–1482
3. Bagatell R, Beck-Popovic M, London WB, Zhang Y, Pearson ADJ, Matthay KK, Monclair T, Ambros PF, Cohn SL. Significance of MYCN Amplification in International Neuroblastoma Staging System Stage 1 and 2 Neuroblastoma: A Report From the International Neuroblastoma Risk Group Database. *Journal of Clinical Oncology* 2009 Jan;27(3):365 – 370.
4. Barnstable CJ, Dräger UC. Thy-1 antigen: A ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* 1984 Apr;11(4):847–855.
5. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J. Clin. Oncol* 1993 Aug;11(8):1466–1477.

6. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, eds. Principles and Practice of Pediatric Oncology, Fourth Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001:895-937
7. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. Nat Rev Cancer 2003 März;3(3):203–216.
8. Carachi R. Perspectives on neuroblastoma. Pediatric Surgery International 2002 Juli;18(5-6):299–305.
9. Caron H, van Sluis P, de Kraker J, Bökkerink J, Egeler M, Laureys G, Slater R, Westerveld A, Voûte PA, Versteeg R. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. N. Engl. J. Med. 1996 Jan;334(4):225–230.
10. Castleberry R., Pritchard J, Ambros P, Berthold F, Brodeur G., Castel V, Cohn S., De Bernardi B, Dicks-Mireaux C, Frappaz D, Haase G., Haber M, Jones D., Joshi V., Kaneko M, Kemshead J., Kogner P, Lee RE., Matthay K., Michon J., Monclair R, Roald B., Seeger R., Shaw P., Shimada H, Shuster J. The international neuroblastoma risk groups (INRG): a preliminary report. European Journal of Cancer 1997 Okt;33(12):2113–2116
11. Chan HS, Gallie BL, DeBoer G, Haddad G, Ikegaki N, Dimitroulakos J, Yeger H, Ling V. MYCN protein expression as a predictor of neuroblastoma prognosis. Clin. Cancer Res. 1997 Okt;3(10):1699–1706.
12. Cohn SL, Tweddle DA, MYCN amplification remains prognostically strong 20 years after its “clinical debut”. European Journal of Cancer 2004 Dez;18(40).2639-2642.

13. Conte M, Bernardi BD, Milanaccio C, Michelazzi A, Rizzo A, Montobbio G, Parodi S, Haupt R. Malignant neuroblastic tumors in adolescents. *Cancer Letters* 2005 Okt;228(1-2):271–274.
14. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 1993 Mai;177(5):1331–1342.
15. DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two Hundred Gastrointestinal Stromal Tumors. *Ann Surg* 2000 Jan;231(1):51.
16. Escobar MA, Grosfeld JL, Powell RL, West KW, Scherer III LR, Fallon RJ, Rescorla FJ. Long-term outcomes in patients with stage IV neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* 2006 Feb;41(2):377–381.
17. Evans AE, Gerson J, Schnauffer L. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Natl Cancer Inst Monogr* 1976 Nov;44:49–54.
18. Evans AE, D'Angio GJ. Age at Diagnosis and Prognosis in Children With Neuroblastoma. *JCO* 2005 Sep;23(27):6443–6444.
19. Fischer M, Oberthür A, Schweinitz D, Simon T. Das Neuroblastom. *Onkologe* 2005 Okt;11(10):1054–1064.
20. Grosfeld JL. Risk-based management of solid tumors in children. *The American Journal of Surgery* 2000 Nov;180(5):322–327.
21. Hase T, Ohta S, Tani T, Mizukuro T, Mekata E, Naitoh H, Shimadera S, Fujino S, Taga T. Outcome of infants with neuroblastoma detected by mass screening and surgically treated in Shiga Prefecture, Japan: what

- is the role of surgery? *Pediatric Surgery International* 2002 Juli;18(5-6):289–294.
22. Hero B, Berthold F. Neuroblastom. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2002 Juni;150(6):775–788.
23. Hughes M, Marsden HB, Palmer MK. Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer* 1974 Nov;34(5):1706–1711.
24. Jeong JA, Hong SH, Gang EJ, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Han H, Kim H. Differential Gene Expression Profiling of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells by DNA Microarray. *STEM CELLS* 2005;23(4):584–593.
25. Kemshead JT, Heath L, Gibson FM, Katz F, Richmond F, Treleaven J, Ugelstad J. Magnetic microspheres and monoclonal antibodies for the depletion of neuroblastoma cells from bone marrow: experiences, improvements and observations. *Br. J. Cancer* 1986 Nov;54(5):771–778.
26. Kroczek RA, Gunter KC, Seligmann B, Shevach EM. Induction of T cell activation by monoclonal anti-Thy-1 antibodies. *J. Immunol.* 1986 Juni;136(12):4379–4384.
27. Kushner BH, Cheung N-KV. Neuroblastoma--from genetic profiles to clinical challenge. *N. Engl. J. Med.* 2005 Nov;353(21):2215–2217.
28. Lu J-W, Chang J-G, Yeh K-T, Chen R-M, Tsai JJP, Hu R-M. Overexpression of Thy1/CD90 in human hepatocellular carcinoma is associated with HBV infection and poor prognosis. *Acta Histochemica* 2011 Dez;113(8):833–838.

29. Maris JM, White PS, Beltinger CP, Sulman EP, Castleberry RP, Shuster JJ, Look AT, Brodeur GM. Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma. *Cancer Res.* 1995 Okt;55(20):4664–4669.
30. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *The Lancet* 2007 Juni;369(9579):2106–2120.
31. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N. Engl. J. Med.* 1999 Okt;341(16):1165–1173.
32. McCluskey AG, Boyd M, Gaze MN, Mairs RJ. [131I]MIBG and topotecan: a rationale for combination therapy for neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2005 Okt;228(1-2):221–227.
33. Miettinen M, El-Rifai W, Sobin L, Lasota J. Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: A review. *Human Pathology* 2002 Mai;33(5):478–483.
34. Nash MS, Osborne NN. Assessment of Thy-1 mRNA levels as an index of retinal ganglion cell damage. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1999 Mai;40(6):1293 –1298.
35. Oikonomou D, Hassan K, Kaifi JT, Fiegel HC, Schurr PG, Reichelt U, Aridome K, Yekebas EF, Mann O, Kluth D, Strate T, Izbicki JR. Thy-1 as

- a potential novel diagnostic marker for gastrointestinal stromal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007 May;133(12):951–955.
36. Perez CA, Matthay KK, Atkinson JB, Seeger RC, Shimada H, Haase GM, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN. Biologic Variables in the Outcome of Stages I and II Neuroblastoma Treated With Surgery as Primary Therapy: A Children's Cancer Group Study. *JCO* 2000 Jan;18(1):18–18.
37. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr;284(5411):143–147.
38. Roald B.: Neuroblastoma. In: Souhami RL, Tannock I, Hohenberger, Hohenberger P, Horiot JC (Eds.): *Oxford Textbook of Oncology, Volume 2, 2nd Edition*. Oxford, UK, Oxford University Press, 2001:2601-2610
39. Riley RD, Heney D, Jones DR, Sutton AJ, Lambert PC, Abrams KR, Young B, Wailoo AJ, Burchill SA. A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. *Clin. Cancer Res* 2004 Jan;10(1 Pt 1):4–12.
40. Rubie H, De Bernardi B, Gerrard M, Canete A, Ladenstein R, Couturier J, Ambros P, Munzer C, Pearson ADJ, Garaventa A, Brock P, Castel V, Valteau-Couanet D, Holmes K, Di Cataldo A, Brichard B, Mosseri V, Marquez C, Plantaz D, Boni L, Michon J. Excellent Outcome With Reduced Treatment in Infants With Nonmetastatic and Unresectable Neuroblastoma Without MYCN Amplification: Results of the Prospective INES 99.1. *Journal of Clinical Oncology* 2011 Feb;29(4):449 –455.

41. Sano H, Bonadio J, Gerbing RB, London WB, Matthay KK, Lukens JN, Shimada H. International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. *European Journal of Cancer* 2006 May;42(8):1113–1119.
42. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983 Sep;305(5931):245–248.
43. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grzeschik KH, Naylor SL, Sakaguchi AY, Brodeur G, Trent J. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 1984 März;308(5956):288–291.
44. Schwab M, Shimada H, Joshi V, Brodeur GM. Neuroblastic tumors of adrenal and sympathetic nervous system. In: Chapter 9. Peripheral neuroblastic tumors. In: *Pathology and Genetics of tumours of the Nervous system*. Kleihues P, Cavenee WK (eds.). IARC Press, Lyon 2000; pp. 153-161.
45. Schwab M. MYCN in neuronal tumours. *Cancer Lett.* 2004 Feb;204(2):179–187.
46. Seeger RC, Danon YL, Rayner SA, Hoover F. Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody. *J. Immunol.* 1982 Feb;128(2):983–989.
47. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP. The

- International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 1999 Juli;86(2):364–372.
48. Spix C, Pastore G, Sankila R, Stiller CA, Steliarova-Foucher E. Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978-1997): Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer* 2006 Sep;42(13):2081–2091.
49. Tiveron M-C, Barboni E, Rivero FBP, Gormley AM, Seeley PJ, Grosveld F, Morris R. Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein. , Published online: 20 February 1992; | doi:10.1038/355745a0 1992 Feb;355(6362):745–748
50. True LD, Zhang H, Ye M, Huang C-Y, Nelson PS, von Haller PD, Tjoelker LW, Kim J-S, Qian W-J, Smith RD, Ellis WJ, Liebeskind ES, Liu AY. CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker. *Mod Pathol* 2010 Okt;23(10):1346–1356.
51. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000 Dez;97(26):14720 –14725.
52. Vasudevan SA, Nuchtern JG. Gene Profiling of High Risk Neuroblastoma. *World Journal of Surgery* 2005 Feb;29(3):317–324.
53. Weinstein JL, Katzenstein HM, Cohn SL. Advances in the Diagnosis and Treatment of Neuroblastoma. *The Oncologist* 2003 Juni;8(3):278 –292

54. Williams AF, Gagnon J. Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin. *Science* 1982 Mai;216(4547):696–703

55. Yang G, Chao K, Li X, Rao H, Deng H, Wu H, Xie D. [Significance of expression of THY1 protein in epithelial ovarian cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2009 März;31(3):203–207.

8. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen des Instituts für Kinderchirurgie, vor allem bei Frau Beate Roth und Birgit Appel für ihre Hilfsbereitschaft und Geduld bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Henning Fiegel für seine unermüdlichen Ratschläge und Herrn Dietrich Kluth für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und meinen beiden Schwestern, die immer an mich geglaubt und mich motiviert haben.

Meinem Freund Danke ich für seine Geduld und das immer währende Verständnis.

9. Publikationen

- Lack of Thy1 (CD90) expression in neuroblastomas is correlated with impaired survival. *Henning C. Fiegel, Jussuf T. Kaifi, Alexander Quaas, Emine Varol, Annika Krickhahn, Roman Metzger, Guido Sauter, Holger Till, Jakob R. Izbicki and Rudolf Erttmann, et al.,* *Pediatr Surg Int* (2008) 24:101-105.

- Posterdemonstration "Adominelles Kompartmentsyndrom eines bilateralen High Risk Neuroblastoms Stadium IV"; *E. Varol, C. Müller, M. Domanetzki, P. Wildbrett, H. Lode, H. Graf v. Einsiedel, W. Barthlen;* DGKJ Bielefeld; 2011

- Posterdemonstration „Infiltration of Major Blood Vessels by Neuroblastoma – A Contraindication for Surgery“, *D. Großmann, C. Kujath, C. Müller, E. Varol, H. N. Lode, W. Barthlen;* 129. Kongress DGCH Berlin; 2012

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: