

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main
Medizinische Klinik III
Hämatologie / Onkologie, Rheumatologie, Infektiologie
(Direktor : Prof. Dr. D. Hoelzer)

**Die Bedeutung des Wilms Tumor Gens (WT-1) für die Prognose und
das Monitoring der Akuten Myeloischen Leukämie**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der
Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Cornelius Miething
aus Berlin

Frankfurt am Main, 2001

Dekan: Prof. Dr. G. von Jagow

Referent: Prof. Dr. L. Bergmann

Koreferent: Prof. Dr. T. Klingebiel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2001

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung		
1.1.	Die Akute Myeloische Leukämie	S.10
1.2.	Das Wilms-Tumor Gen	S.13
II. Problemstellung		S.16
III. Material		
3.1.	Geräte	S.17
3.2.	Arbeitsmaterialien	S.18
3.3.	Chemikalien	S.18
3.4.	Radiochemikalien	S.19
3.5.	Enzyme und Antikörper	S.19
3.6.	Vektoren, Bakterienstämme und eukaryontische Zellen	S.20
3.7.	Zellkulturlösungen	S.20
3.7.1.	Medien im Umgang mit eukaryotischen Zellen	S.20
3.7.2.	Medien zur Anzucht von Bakterien	S.20
3.8.	Standardlösungen	S.21
3.9.	Fertiglösungen und Kitsysteme	S.22
3.10.	EDV	S.22
3.10.1.	Hardware	S.22
3.10.2.	Software	S.22
IV. Patienten und Methoden		
4.1.	Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA und RNA	S.23
4.1.1.	Präzipitation mit Ethanol	S.23
4.1.2.	Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform, Chloroform oder ... Ether	S.23
4.1.3.	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	S.23
4.1.3.1.	Photometrische Analyse	S.23

4.1.3.2.	Ethidiumbromid-Fluoreszenzmessung im Agarose-Gel	S.24
4.1.4.	DNA-Reinigung über Pharmacia oder G-50 Säulen	S.24
4.1.5.	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	S.24
4.1.6.	Präparation von Vektor-DNA	S.25
4.1.7.	Auffüllen von 3'-zurückliegenden Enden bzw. Entfernen von 3'-überhängenden Enden	S.26
4.1.8.	Ligation	S.27
4.1.9.	Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA	S.27
4.1.10.	Isolierung von Plasmid-DNA	S.27
4.1.10.1.	Mini-Präparation von Plasmid-DNA (Alkaline-Lysis)	S.27
4.1.10.2.	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA (Quiagen-Säule)	S.28
4.1.11.	RNA-Präparation nach Chomczynski und Sacchi	S.28
4.1.12.	cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	S.29
4.1.12.1.	cDNA-Synthese aus RNA mittels Oligo(dT)-Primern	S.29
4.1.12.2.	cDNA-Synthese aus RNA mittels spezifischen 3'-Primern	S.29
4.1.13.	cRNA-Synthese (In-Vitro-Transkription) mit der T7- Polymerase	S.30
4.2.	DNA-Elektrophorese-Techniken	S.30
4.2.1.	Agarose-Gele zur DNA-Trennung	S.30
4.2.2.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen (Gel-Elution).....	S.31
4.3.	Biochemische Methoden	S.31
4.3.1.	Zell-Lyse zur Proteingewinnung	S.31
4.3.2.	Proteinbestimmung nach Lowry	S.31
4.3.3.	Polyacrylamid-Gele zur Protein-Trennung (SDS-PAGE)	S.32
4.3.4.	Trocknen von Polyacrylamid-Gelen zur Autoradiographie	S.32
4.3.5.	Färben von Polyacrylamid-Gelen nach Poinceau und Coomassie	S.33
4.3.6.	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran (Western- Blot)	S.33
4.3.7.	Spezifische Detektion von Proteinen mittels Chemolumineszenz (ECL-System)	S.33
4.3.8.	In-Vitro-Translation von Proteinen (IVT-Kit von Promega)	S.34

4.4.	DNA-Markierungsmethoden	S.34
4.4.1.	Markierung von DNA mit dem Rediprime System	S.34
4.4.2.	Markierung von DNA 5´-Enden mit der Polynukleotidkinase ...	S.34
4.5.	DNA-Hybridisierungstechniken	S.35
4.5.1.	Transfer von DNA auf Hybond-N Filter	S.35
4.5.2.	Hybridisierung mit P ³² -markierten DNA-Fragmenten	S.36
4.6.	DNA-Amplifikation mit der Taq-Polymerase (PCR)	S.36
4.6.1.	Amplifikation des beta-Aktin Gens	S.40
4.6.2.	Amplifikation des Wilms´ Tumor Gens	S.41
4.6.3.	Koamplifikation des endogenen Wilms´ Tumor Gens mit kompetitivem Standard (Kompetitive PCR)	S.41
4.7.	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	S.45
4.7.1.	Zellkultur	S.45
4.7.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	S.45
4.7.3.	Ficoll-Separation mononukleärer Zellen	S.45
4.7.4.	Zellzahlbestimmung mit der Neubauerzählkammer	S.46
4.7.5.	FACScan-Analyse und Zell-Immunphänotypisierung	S.46
4.8.	Patienten: Einschlußkriterien, Diagnosestellung und Therapie...	S.47
4.9.	Statistische Methoden	S.48

V. Ergebnisse

5.1.	Die kompetitive PCR	S.49
5.2.	WT-1 Protein Expression in AML-Zelllinien	S.54
5.3.	Expression von wt-1 mRNA in AML-Zellen: Korrelation von wt-1 mRNA Expression, FAB-Typ, Alter, Geschlecht, Karyotyp und Immunphänotyp	S.56
5.4.	wt-1 mRNA Expression in aus peripherem Blut gewonnenen Mononukleären Zellen	S.60
5.5.	wt-1 mRNA Expression, Ansprechrate und Prognose (outcome) der Patienten	S.61
5.6.	wt-1 mRNA Expression im Verlauf der Erkrankung	S.69

VI.	Diskussion	
6.1.	Einleitung	S.71
6.2.	Wt-1 als Marker zur Detektion von Minimal Residual Disease (MRD)	S.72
6.3.	Expression von wt-1 mRNA bei Patienten mit AML und Korrelation mit FAB-Typ und Oberflächenmarkern	S.73
6.4.	Wt-1 Expression und Prognose	S.75
6.5.	Wt-1 und seine Rolle in der Pathogenese der AML	S.77
VII.	Zusammenfassung	S.79
VIII.	Literatur	S.80

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1	Die FAB-Klassifikation der AML	S. 11
Tab. 2	Übersicht Quantitative PCR	S. 49
Tab. 3	Übersicht der gemessenen Expressionsstärken	S. 52
Tab. 4	Korrelation von wt-1-Expression und FAB-Typ	S. 57
Tab. 5	Korrelation von wt-1- und Oberflächenmarker-Expression	S. 59
Tab. 6	Übersicht der Chromosomenanalyse	S. 60
Tab. 7	Prognostische Einteilung der Karyotypen und Korrelation mit wt-1-Expression	S. 60
Tab. 8	Korrelation von wt-1-Expression und Ansprechrate	S. 61
Tab. 9	Wt-1 Expression vor Auftreten eines Rezidivs	S. 70

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1	Verlauf der Tumorzelllast und Detektionsgrenzen bei Therapie der AML	S. 12
Abb. 2	Schematischer Aufbau eines Southernblots	S. 35
Abb. 3	Graphische Darstellung der Amplifikationskinetik	S. 37
Abb. 4	Schematische Darstellung der Produkte einer kompetitiven PCR.....	S. 38
Abb. 5	Vektorkarte von pBluescript™ KS mit wt-1 cDNA-Insert	S. 42
Abb. 6	Gelphoto einer PCR von Wildtyp und verkürztem wt-1 (Standard)	S. 43
Abb. 7	Gelphoto einer quantitativen PCR und Graph der entsprechenden Regressionsgeraden	S. 44
Abb. 8	Gelphoto und Southern-Blot einer quantitativen PCR einer wt-1 negativen Probe	S. 50
Abb. 9	Gelphoto und Southern-Blot einer quantitativen PCR einer schwach wt-1 positiven Probe	S. 51
Abb. 10	Gelphoto und Southern-Blot einer quantitativen PCR einer intermediär wt-1 positiven Probe	S. 51
Abb. 11	Gelphoto und Southern-Blot einer quantitativen PCR einer stark wt-1 positiven Probe	S. 52
Abb. 12	Gelphoto einer wt-1-PCR mehrerer Proben eines Patienten im Verlauf der Erkrankung	S. 53
Abb. 13	Scan eines Western-Blots einer In-Vitro-Translation der wt-1 cDNA im LC15-Vektor	S. 55
Abb. 14	Western-Blot einer wt-1 exprimierenden Zelllinie	S. 55

Abb. 15	Überlebenskurven aller Patienten nach Unterteilung in Risikogruppen aufgrund des Karyotyps	S. 62
Abb. 16	Überlebenskurven aller Patienten nach Unterteilung in zwei Altersgruppen (über bzw. unter 60 Jahren)	S. 63
Abb. 17	Überlebenskurven und -wahrscheinlichkeit aller untersuchten Patienten nach Kaplan-Meier	S. 63
Abb. 18	Krankheitsfreie Überlebenskurven und -wahrscheinlichkeit aller untersuchten Patienten nach Kaplan-Meier	S. 64
Abb. 19	Überlebenskurven und –wahrscheinlichkeit aller stark wt-1 exprimierenden gegenüber den schwach bzw. nicht wt-1 exprimierenden Patienten	S. 64
Abb. 20	Überlebenskurven und –wahrscheinlichkeit der stark wt-1 exprimierenden gegenüber den schwach bzw. nicht wt-1 exprimierenden Patienten unter 60 Jahren	S. 65
Abb. 21	Überlebenskurven und –wahrscheinlichkeit der stark wt-1 exprimierenden gegenüber den schwach bzw. nicht wt-1 exprimierenden Patienten mit de novo AML	S. 66
Abb. 22	Überlebenskurven und –wahrscheinlichkeit der stark wt-1 exprimierenden gegenüber den schwach bzw. nicht wt-1 exprimierenden Patienten unter 60 Jahren mit de novo AML	S. 66
Abb. 23	Überlebenskurven und –wahrscheinlichkeit der stark wt-1 exprimierenden gegenüber den schwach bzw. nicht wt-1 exprimierenden Patienten über 60 Jahren	S. 67
Abb. 24	Krankheitsfreie Überlebenskurven und –wahrscheinlichkeit aller stark wt-1 exprimierenden gegenüber den schwach bzw. nicht wt-1 exprimierenden Patienten	S. 67
Abb. 25	Krankheitsfreie Überlebenskurven und –wahrscheinlichkeit der stark wt-1 exprimierenden gegenüber den schwach bzw. nicht wt-1 exprimierenden Patienten unter 60 Jahren mit de novo AML ...	S. 68
Abb. 27	Übersicht über Verlauf der wt-1 Expression bei mehreren Patienten	S. 69

I. Einleitung

1.1. Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung, die auf dem Boden einer malignen Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle mit beginnender myeloischer Differenzierung entsteht. Die Transformation führt zu einer vermehrten Teilungsrate der Vorläuferzelle bei einer gleichzeitigen Blockade der weiteren Differenzierung; es erfolgt eine klonale Expansion und Akkumulation von Zellen mit den phänotypischen Charakteristika unreifer Myelozyten mit nachfolgender Verdrängung des gesunden Knochenmarks und daraus resultierendem Versagen der normalen Knochenmarksfunktion. Die klinische Symptomatik ist vor allem Ausdruck der Störungen im leukozytären (erhöhte Infektbereitschaft), erythrozytären (Anämie) und thrombozytären System (Petechien, verstärkte Blutungsneigung).

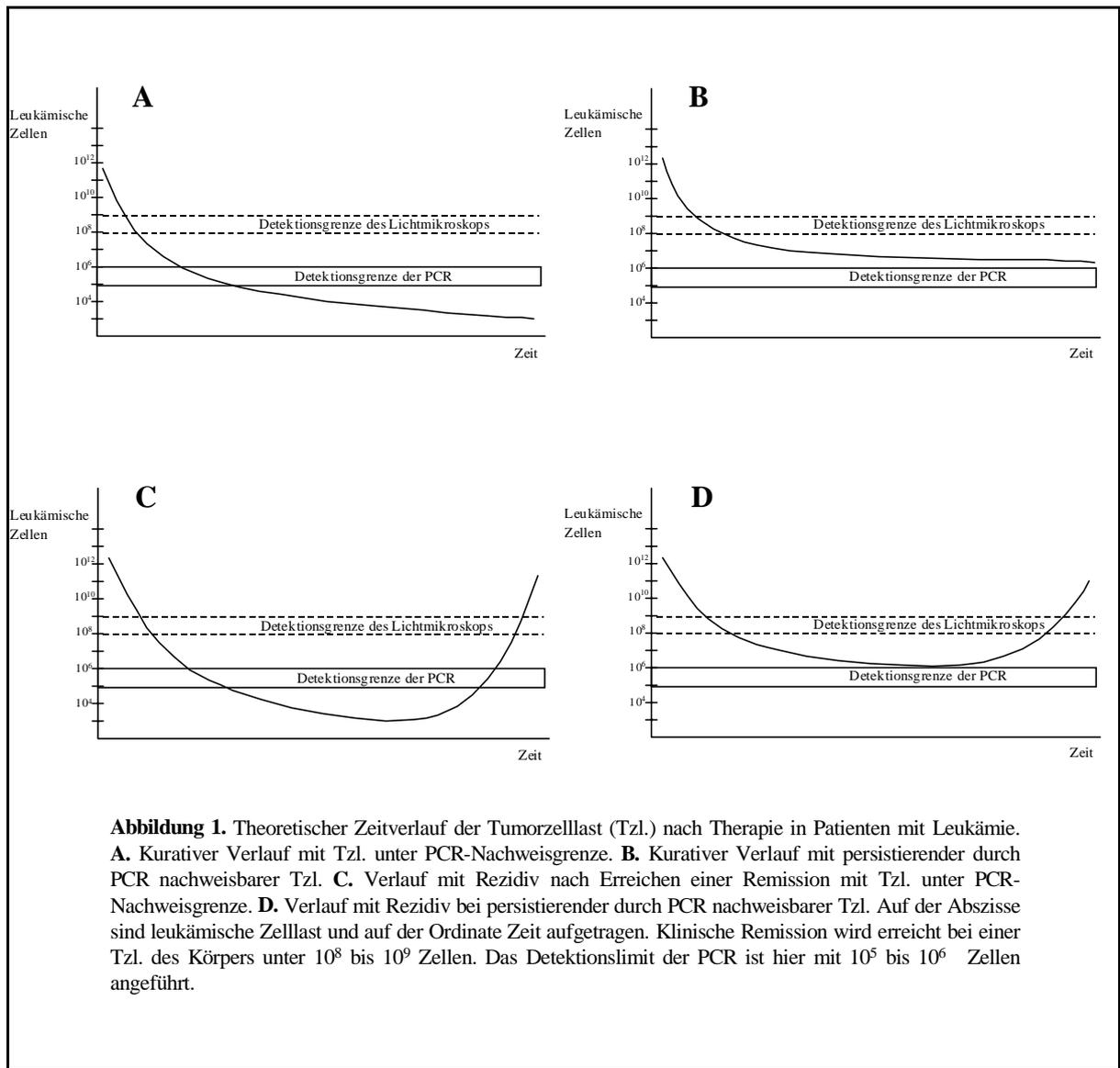
Der Anteil der Akuten Myeloischen Leukämie an akuten leukämischen Erkrankungen beträgt im Kindesalter in den westlichen Staaten zwischen 15% und 20%, im Erwachsenenalter liegt der Anteil bei 80%. Die jährliche Inzidenz der AML liegt in den Vereinigten Staaten bei etwa 2.3 auf 100000 Einwohner (1); das mediane Alter bei Erkrankung beträgt ca. 55 Jahre. Die Ursachen, die zur Entwicklung einer AML führen, sind noch unbekannt, jedoch konnten mehrere prädisponierende Faktoren wie hohe Strahlen-Exposition, häufiger Kontakt mit Benzol und seinen Derivaten als auch vorhergehende Chemotherapie z.B. mit alkylierenden Substanzen statistisch und im Laborversuch nachgewiesen werden. Bei Patienten mit verschiedenen hereditären Störungen oder Syndromen zeigte sich ebenfalls ein erhöhtes Risiko, an einer AML zu erkranken, so z.B. bei Patienten mit Fanconi-Anämie (2), Kostmann-Syndrom (3) und Trisomie 21 (4). Daß genetische Faktoren eine kausale Rolle spielen, wird auch daran deutlich, daß für monozygote Zwillinge bei Erkrankung eines Kindes die Wahrscheinlichkeit für das andere Kind wächst, an AML zu erkranken (5).

Es sind verschiedene Subtypen der AML bekannt, die sich in ihren biologischen (z.B. in Bezug auf Phänotyp und Karyotyp) als demgemäß auch in den klinischen Eigenschaften (in Bezug auf Symptomatik, Therapie und Prognose) unterscheiden. Die Einteilung der großen Zahl von Subtypen in ein überschaubares und allgemein akzeptiertes Klassifikations-System wurde in der letzten Dekade von der Französisch-Amerikanisch-Britischen (FAB) Kooperations-Gruppe geleistet (6).

Tabelle 1. FAB-Klassifikation der AML

FAB Typ	Blasten (%)	Morphologie	Zytochemie	Chromosomale Aberrationen
M0 M1	>30 >90	undifferenziert undifferenziert; < 10% Promyelozyten oder Monozyten; Akute Myeloblasten Leukämie	> 3% POX oder SBB+	unspezifisch
M2	30-89	> 10% Promyelozyten, Myelozyten, < 20% monozytische Zellen; AML mit partieller Reifung	POX+, SBB+, PAS-	t(8;21)(q22;q22) (AML1/ETO)
M3	30-89	> 20% abnormale hypergranuläre Promyelozyten; häufig Auerstäbchen; Akute Promyelozyten Leukämie	POX+, SBB+, PAS-	t(15;17)(q22;q11-12) (PML/RAR α)
M3v	30-89	Mikrogranuläre Variante, kann gefaltete Kerne aufweisen	POX+, SBB+, PAS-	t(15;17)(q22;q11-12) (PML/RAR α)
M4	30-79	> 20% Promonozyten und Monozyten; >20% granulozytische Komponenten; Blut-Monozyten >5x10 ⁹ /L oder Lysozym auf > 3fache erhöht	POX+, NASDA+	unspezifisch
M4Eo	30-79	> 5% Eosinophile mit abnormalen eosinophilen und basophilen Granula	POX+, NASDA+, Eosinophile sind PAS+	inv(16)(p12;q22) (CBF β /Myosin Heavy Chain)
M5a	>80	> 80% der monozytischen Zellen sind Monoblasten; Akute Monoblasten Leukämie	POX+, NASDA+	unspezifisch
M5b	>80	< 80% der monozytischen Zellen sind Monoblasten; Rest sind Promonozyten und Monozyten	POX+, NASDA+	unspezifisch
M6	>30	megaloblastoide, erythroide und myeloide Blasten; multinukleär; Erythroleukämie	PAS+, Ringsideroblasten mit Eisenfärbung	unspezifisch
M7	>30	große polymorphe Blasten, zytoplasmatische Ausstülpungen; gplb oder IIb/IIIa+; Myelofibrose; Akute Megakaryoblasten Leukämie	POX-, SBB-, NASDA+	unspezifisch

Prognostische Faktoren sind aus mehrfacher Sicht von Bedeutung. Zum einen dienen sie als Grundlage für die Entscheidung über die Aggressivität der Chemotherapie, zum anderen können prognostische Faktoren Hinweise auf pathogenetisch bedeutsame Differenzen im Zellaufbau sein. Als prognostische Zielparameter sind bei der AML vor allem das Erreichen einer kompletten Remission und die Gesamt-Überlebenszeit wichtig.



In verschiedenen Studien zeigte sich eine erniedrigte Ansprechrate und/oder eine verkürzte Überlebenszeit unter anderem bei bestimmten zytogenetischen Aberrationen des Chromosomensatzes der transformierten Zellen (bessere Prognose bei $t(15;17)$, $t(8;21)$, $inv(16)$, schlechter bei allen Anderen, insbesondere bei komplexen Aberrationen) (7), bei Alter des Patienten bei Diagnose von über 60 Jahren, bei sekundärer AML, bei Nicht-Erreichen einer kompletten Remission nach dem 1. Zyklus der Chemotherapie und bei schlechtem Allgemeinzustand des Patienten (8, 9). Mit dem wachsenden Einsatz molekularbiologischer Methoden wurden verschiedene zellbiologische Charakteristika mit einer vermuteten prognostischen Bedeutung entdeckt, so z.B. die Expression des P-Glykoproteins (10), die Expression bestimmter Oberflächenmarker (11) oder das Verhalten von Leukämie-Zellen unter bestimmten Bedingungen in vitro (12).

Der Status einer kompletten Remission wird klinisch bzw. mikroskopisch gesichert, jedoch finden sich meistens unmittelbar nach Chemotherapie immer noch Tumorzellen im

Knochenmark des Patienten (Minimal Residual Disease (MRD)), auch wenn unter der dem Mikroskop im Knochenmarkausstrich keine leukämischen Blasten mehr zu sehen sind.

Daher ist es wichtig, diese Zellen mit sensitiveren Methoden aufzuspüren, um das Ansprechen des Patienten auf die Therapie als auch ein mögliches Wiederaansteigen der Tumorzellzahl schnell und eindeutig erkennen zu können. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang das sogenannte *Molecular Monitoring*, das mit dem Begriff der Minimal Residual Disease eng verknüpft ist. Hierunter versteht man das Überwachen der Tumorzellaktivität mittels molekularbiologischer Verfahren in einem Patienten mit Leukämie, der sich mikroskopisch und klinisch in kompletter Remission befindet. Während jedoch für die CML mit der bcr-abl-Translokation (13,14) und für die ALL mit einem jeweils spezifischen T-Zell-Rezeptor- oder Ig-Rearrangement (15) geeignete Marker bekannt sind, ließen sich für die AML außer für bestimmte Subtypen (AML M3 mit t(15;17) Translokation und Nachweis des PML-RAR α -Fusions-Transkriptes) bisher keine universell anwendbaren Marker zum Molekularen Monitoring bzw. zur Bestimmung der MRD bestimmen.

1.2. Das Wilms-Tumor-Gen

Der Wilms-Tumor (Nephroblastom) ist eine maligne Neoplasie, welche fast ausschließlich im Kindesalter sowohl in einer sporadischen als auch einer hereditären Form auftritt (16). Zytogenetische Untersuchungen hereditärer Wilms-Tumoren stellten eine Verbindung zwischen der Entstehung des Tumors und Chromosomenaberrationen im Bereich 11p13-p15 her (17). In Analogie zu einem von Knudson für das Retinoblastom, einer anderen hereditären Tumorerkrankung, die mit chromosomalen Veränderungen assoziiert ist, entwickelten Modell wurde angenommen, daß die Inaktivierung eines Tumor-Suppressorgens am Chromosom-Locus 11p13-p15 ein wichtiger Schritt (*loss of heterozygosity (LOH)*) in der Entstehung des Wilms-Tumors sein muß (18). Das vermutete Tumor-Suppressorgen, dann Wilms-Tumor-Gen (wt-1) genannt, wurde 1990 bei Deletions-Analysen des Genoms von Familien mit kongenitalem Nephroblastom (Wilms-Tumor) entdeckt (19, 20). Die genomische DNA des wt-1 Gens umfaßt ca. $5 \cdot 10^4$ Basenpaare (bp) und enthält 10 kodierende Exons, von denen 2 alternativ gespliced werden, so daß 4 verschiedene mRNA-Varianten entstehen mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 3,5 kbp (21), welche vermutlich unterschiedliche DNA-Bindungseigenschaften aufweisen (22). Das WT-1 Protein hat eine Größe von ca. 52 kDa und enthält zwei Domänen, die eine Funktion als Transkriptionsfaktor

nahelegen. Das Carboxyl-Ende besteht aus 4 Cystein-Histidin *zinc-finger*-Domänen, welche eine deutliche Homologie zu den EGR-1 und EGR-2 Gen-Produkten aufweisen, auch konnte gezeigt werden, daß der WT-1 *zinc-finger*-Komplex an die EGR-1 DNA-Erkennungssequenz bindet (23). Der Amino-terminale Bereich des WT-1 Proteins enthält eine Prolin- und Glutamin-reiche Region, die die transaktivierenden Eigenschaften des Proteins vermittelt. Bei In-Vitro-Untersuchungen zeigte sich, daß WT-1 auf verschiedene Gene, die auf Wachstum, Differenzierung und auch Apoptose wirken, wie z.B. TGF- β 1, p53 und IGF-1, meist supprimierenden Einfluß ausübt.

Wt-1 mRNA wird Zeit- und Gewebe-spezifisch exprimiert. Beim Menschen fanden sich Transkripte in Geweben von Gehirn, Placenta, Niere, Milz und in einer Subpopulation von hämatopoetischen Vorläufer-Zellen (24,25). Die Expression ist physiologisch hoch in verschiedenen Geweben, die an der Entwicklung des Urogenital-Traktes beteiligt sind; das Expressionsmuster legt eine entscheidende Rolle des wt-1 Gens bei der Regulation der Entwicklung des urogenitalen Systems nahe. Klinisch unterstrichen wird dieser Zusammenhang zum einen durch die Tatsache, daß die hereditäre Form des Wilms-Tumors häufig mit dem WAGR-Syndrom (Wilms-Tumor, Aniridia, Genitourinäre Malformationen und mentale Retardierung) (26) und dem Denys-Drash-Syndrom (27) assoziiert ist, zum anderen fanden sich bei Patienten mit verschiedenen urogenitalen Malformationen Keimbahn-Mutationen des wt-1 Gens (28). Mäuse mit einer homozygoten Deletion des wt-1 Gens (sog. wt-1 Knock-Out-Maus) zeigten einen lethalen Phänotyp aufgrund ausgeprägter Mißbildungen des Urogenital-Traktes (29).

In verschiedenen Tumor-Geweben konnte wt-1 mRNA nachgewiesen werden, so z.B. bei Wilms Tumoren (30), in Zellen des Malignen Melanoms (31), bei Ovarial-Karzinomen (32), in Akuten Myeloischen und Lymphoblastischen Leukämien und in verschiedenen Leukämie-Zelllinien (33, 34, 35). Die Tatsache, daß wt-1 mRNA sowohl in hämatopoetischen Vorläuferzellen als auch in leukämischen Blasten zum Teil hoch exprimiert wird, deutet auf eine wichtige Funktion des Gens in der Hämatopoese hin; so konnten unter anderem auch Wechselwirkungen von wt-1 mit verschiedenen hämatopoetischen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren nachgewiesen werden (36, 37). Ob die Expression des Gens in den Tumorzellen verglichen mit den Vorläuferzellen aberrant hoch ist, oder ob sie nur als Epiphänomen während eines bestimmten Wachstums- und Differenzierungsstadiums der hämatopoetischen Zelle zu betrachten ist, wird unterschiedlich diskutiert (38,39).

Die klinische Bedeutung der wt-1 mRNA-Expression in akuten Leukämien scheint vor allem in der Verwendung als prognostischer Faktor und als Marker zur Verlaufskontrolle bzw. zur

Kontrolle von MRD, z.B. auch beim Purgung von Knochenmark bei autologer Knochenmarkstransplantation (KMT), zu liegen. Daten aus verschiedenen Publikationen und auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, daß eine hohe wt-1 mRNA-Expression mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit und einer schlechteren Prognose verbunden ist (40, 41). In einigen kürzlich erschienenen Veröffentlichungen konnte auch gezeigt werden, daß gegen wt-1 geprimte cytotoxische T-Zellen in der Lage sind, AML-Blasten spezifisch zu lysieren (42,43). Damit würde eine neue therapeutische Dimension zu der bisherigen Rolle des wt-1 Gens in der AML hinzukommen.

II. Problemstellung

Um die klinische Bedeutung der wt-1 mRNA-Expression für die AML zu beurteilen, waren eine Reihe von Fragen zu bearbeiten. Zunächst sollte das Expressionsmuster von wt-1 mRNA in Patienten mit AML untersucht werden. Dadurch können durch Korrelation der Expressionsstärke mit dem klinischen Verlauf der Patienten Hinweise auf die prognostische Bedeutung gewonnen werden. Weiterhin sollte über eine Untersuchung der Expression von wt-1 im Verlauf der Erkrankung eines Patienten (zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, nach Chemotherapie und bei Rezidiv der AML) eine Aussage über die prinzipielle Möglichkeit einer Verwendung von wt-1 als molekularen Marker zum Monitoring und Erkennen von MRD bei der AML getroffen werden.

Als Voraussetzung sollte daher erstens gezeigt werden, daß die wt-1 mRNA-Expression mittels RT-PCR im Abgleich gegen die Expression des beta-Aktin-Gens grob quantifiziert werden kann. Hierzu mußte eine kompetitive quantitative PCR für wt-1 etabliert und exemplarisch für mehrere Patientenproben der wt-1 mRNA Gehalt ermittelt und mit den mittels β -Aktin-Expression-Abgleich gewonnenen Werten verglichen und validiert werden.

Die leukämischen Blasten von Patienten mit der Diagnose einer AML, welche auch auf ihre Zytogenetik und Oberflächenmarkerexpression (Immunphänotypisierung) untersucht werden, sollten zweitens mittels RT-PCR auf ihre wt-1 mRNA Expression untersucht werden.

Die so gewonnenen Werte wurden drittens mit dem Therapieerfolg korreliert, und durch statistische Auswertung wurde ermittelt, ob die Stärke der wt-1 mRNA-Expression einen unabhängigen prognostisch relevanten Faktor darstellt.

Viertens wurde durch Korrelation der wt-1-mRNA Expressionsstärke mit dem klinischen Verlauf untersucht, ob das Gen als molekularer Marker verwendet werden kann.

Schließlich sollte auch fünftens versucht werden, die Wt-1 Protein-Expression in leukämischen Blasten zu untersuchen, um eine mögliche Bestimmung der WT-1 Protein-Expression mittels ELISA zu eruieren.

III. Material

3.1.

Geräte

Brutschränke	Heraeus, Hanau
Eismaschine	Colora Meßtechnik, Lorch
Elektrophoresekammern für DNA-Gele	Biorad, München
FacScan®-Gerät	Becton-Dickinson, Heidelberg
Filmentwicklungsmaschine	Kodak, Frankfurt
Hybridisierofen	Bachofer, Reutlingen
Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim
Mikrowellenherd	Bosch, Frankfurt
Mikroskop	Leitz, Wetzlar
pH-Meter CG 820	Schott, Mainz
PhosphorImager SI®	Molecular Dynamics, Krefeld
Schüttelwasserbad	Köttermann, Häningsen
Semi-dry-Protein-Blot Gerät	Biorad, München
Sofortbildkamera	Polaroid, Offenbach
Spannungsgeräte	Biorad, München
Spektralphotometer	Pharmacia, Freiburg
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Thermo-Cycler Modell 4800, 2400	Perkin Elmer, Langen
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vakuum Konzentrator	Bachofer, Reutlingen
Vortexer	Heraeus, Hanau
Waagen	Sartorius, Karlsruhe
Zentrifugen	
Eppendorfszentrifuge Modell 5414	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge RC2-B	Sorvall, Bad Homburg
Varifuge K	Heraeus, Hanau
Biofuge 13R	Heraeus, Hanau

3.2.

Arbeitsmaterialien

Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Kulturflaschen	Nunc, Heidelberg
Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen
Nylonmembranen, positiv geladen	Boehringer, Mannheim
Pipetten	Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilme Kodak XO-mat	Kodak/Siemens, Frankfurt
Sterilfilter-Tips	Biozym, Hameln
3 M-Filterpapier	Whatman, Nidderau
Ultrafilter	Millipore, Molsheim
Zentrifugenröhrchen	Sorvall, Bad Homburg

3.3.

Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	BRL, Eggenstein
Ammoniumperoxidsulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bakto-Trypton	Difco, Hamburg
Bakto-Hefeextrakt	Difco, Hamburg
BCIP	Boehringer, Mannheim
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FACS Lysis Solution	Becton-Dickinson, Heidelberg
Ficoll	Biochrom, Berlin
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glykogen	Boehringer, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Penicillin	Gibco, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe

Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
TEMED	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblaulösung	Merck, Darmstadt
Tween 20	Serva, Heidelberg
X-Gal	AGS, Heidelberg

Alle übrigen Chemikalien und Lösungsmittel wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3.4. **Radiochemikalien**

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ 3000Ci/mmol	DuPont, Dreieich
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ 3000Ci/mmol	DuPont, Dreieich

3.5. **Enzyme und Antikörper**

Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer, Mannheim
DNA Polymerase I (Klenow Fragment)	Boehringer, Mannheim
DNase-free RNase	Boehringer, Mannheim
MMLV Reverse Transkriptase	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Heidelberg
RNase-free DNase	Boehringer, Mannheim
TAQ DNA-Polymerase	Promega, Heidelberg
T4 DNA Ligase	Boehringer, Mannheim
T4 DNA Polymerase	Boehringer, Mannheim

Antikörper:

WT-C19 polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
--------------------------------	--------------------------------

Die für die Phänotypisierung der mononukleären Zellen verwendeten monoklonalen Antikörper waren PE bzw. FITC markiert und wurden von Becton-Dickinson (Heidelberg) und Dianova (Hamburg) bezogen.

3.6. **Vektoren, Bakterienstämme und eukaryontische Zellen**

Vektoren:

pBluescript KS ohne Insert Stratagene, Heidelberg
 LK15 (pBluescript SK mit kompletter wt-1 cDNA),
 freundlicherweise überlassen von M. Gessler, Würzburg

Bakterienstämme:

E. coli XL1-blue Stratagene, Heidelberg

Eukaryontische Zellen:

K562 (44) Erythroleukämische Zelllinie
 Hel 92.1.7 (45) Erythroleukämische Zelllinie

3.7. **Zellkulturlösungen**

3.7.1. **Medien im Umgang mit eukaryontischen Zellen**

RPMI 1640 Kulturmedium Gibco, Karlsruhe
 Fetales Kälberserum (FCS) HyClone/Greiner, Nürtingen

Zellnährmedium:	RPMI-Medium
	10 % FCS
	100 IE/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin

3.7.2. **Medien zur Anzucht von Bakterien**

LB-Medium:	5 g/l Bacto-Hefeextrakt
	10 g/l NaCl
	10 g/l Bakto-Trypton
SOB-Medium:	10 g/l Bakto-Hefeextrakt
	20 g/l Bakto-Trypton
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄

SOC-Medium:	20 mM Glucose in SOB-Medium
Selektionsmedien:	LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin

Zur Blau-Weiß-Selektion wird zusätzlich 150 µl einer X-Gal/IPTG-Lösung auf die Platten ausgebracht.

X-Gal/IPTG-Lösung:	10 mM IPTG (100 mM Stammlösung in H ₂ O) 0,8 % (w/v) X-Gal (2%ige Stammlösung)
--------------------	--

Alle Bakterien-Medien wurden auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert. Die Magnesiumsalze wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt.

3.8. Standardlösungen und Puffer

PBS (Phosphatpuffer ohne Ca²⁺ u. Mg²⁺) Gibco, Karlsruhe

TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,8 1 mM EDTA
TBE-Puffer (10x):	890 mM Tris-Base 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
TAE-Puffer (50x):	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA
SSC(20x):	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat mit HCl auf pH 7,0 einstellen

3.9. **Fertiglösungen und Kitsysteme**

ECL-System	Amersham, Braunschweig
Enhancer-Lösung	Amersham, Braunschweig
Pharmacia S200-Säulen	Pharmacia, Freiburg
Qiagen Maxi-Prep-Kit	Diagen, Düsseldorf
Quiagen Tip 20 und 500 Kits	Diagen, Düsseldorf
Quiagen Quiaquick Gel-Elutionskit	Diagen, Düsseldorf
Rediprime DNA-Labeling-Kit	Amersham, Braunschweig
RNAzol B®-Lösung	Wak Chemie, Bad Homburg
TnT In-Vitro-Translation Kit	Promega, Heidelberg

3.10. **EDV**

3.10.1. **Hardware:**

Zur statistischen und densitometrischen Analyse sowie zur Restriktions-Enzym-Kartierung wurden Computer der Firma Apple bzw. PC-Kompatible Computer eingesetzt.

3.10.2. **Software:**

MacVector	GCG, Madison, WI
GraphPadPrism	Graph Pad Software, Boston, MA
ImageQuant	Molecular Dynamics, Krefeld

IV. Methoden

Die folgenden Methoden und Vorschriften wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Laborhandbuch von Sambrook et al. (46) entnommen.

4.1. **Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA und RNA**

4.1.1. **Präzipitation mit Ethanol und Isopropanol**

Die Konzentration der Kationen in der DNA- bzw. RNA-Lösung wurde mit 3 M Na-Acetat pH 5.2 auf 0.3 M eingestellt. Die Probe wurde entweder bei DNA mit 2 Vol., bei RNA mit 2.5 Vol. -20°C kaltem Ethanol oder mit 0.7-1 Vol.% Isopropanol versetzt und gemischt. Die Präzipitation erfolgte 30 min bei -70°C oder über Nacht bei 4°C. Die Probe wurde durch 10 Min. Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei höchster Umdrehung pelletiert. Anschließend wurde mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und nochmals 10 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich bei Raumtemperatur (DNA) bzw. im Speedvac (RNA) getrocknet.

4.1.2. **Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform**

Die Extraktion mit Phenol bzw. Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1 ist eine Standardmethode zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurepräparationen. Die zu extrahierende DNA- bzw. RNA-Lösung wurde mit einem Volumenteil der vorgenannten Lösungen gut gemischt und drei Minuten zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde abgenommen und weiterverarbeitet, indem die gereinigte DNA mit Ethanol oder Isopropanol präzipitiert wurde.

4.1.3. **Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

4.1.3.1. **Photometrische Analyse**

Zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurden Absorptionsmessungen bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten durchgeführt. Für die Konzentrationsermittelung wurde von folgenden Richtwerten ausgegangen:

dsDNA :	1 A ₂₆₀ ≈ 50µg/ml
RNA :	1 A ₂₆₀ ≈ 40µg/ml

Als Reinheitskriterium diene der Quotient (A260/A280), der über 1.8 liegen sollte. Die Konzentrationsbestimmung einzelsträngiger Oligonukleotide (zB. PCR-Primer) erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\frac{\text{OD} \times 100 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{n(\text{T}) \times 0.92 + n(\text{A}) \times 1.54 + n(\text{C}) \times 0.75 + n(\text{G}) \times 1.17} = c \text{ } [\mu\text{M}]$$

4.1.3.2. Ethidiumbromid-Fluoreszenzmessung im Agarose-Gel

Für kleine DNA-Mengen empfiehlt sich diese Methode zur Konzentrationsbestimmung. Dabei werden auf einem 1% Agarosegel mit 0.5 µg Ethidiumbromid pro ml Gel 1 µl der DNA-Probe und 400 ng HindIII gespaltene lambda-DNA aufgetrennt. Die Fluoreszenzintensitäten der Probe und des Standards (die 2.3 kb Bande entspricht ca. 20 ng) wurden auf einem UV-Transilluminator verglichen und die ungefähre DNA-Konzentration der Probe bestimmt.

4.1.4. DNA-Reinigung über Pharmacia oder Quiaspin™ Säulen

Zur Abtrennung von Nukleotiden und/oder Oligonukleotiden wurden Kitsysteme wie Quiaspin oder Pharmacia-S200 verwendet.

4.1.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg lambda-DNA in einer Stunde zu spalten. Um sicherzustellen, daß der Verdau quantitativ abläuft, wurden die Enzymmenge und die Inkubationszeit verdoppelt.

Reaktionsansatz:	x µg	DNA
	2.5 µl	geeigneter Puffer
	3x U	Restriktionsendonuklease
	y µl	H ₂ O

	Gesamt:	25 µl

Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend ein Aliquot im Agarosegel analysiert. Präparative Spaltungen wurden in größeren Volumina und mit entsprechend mehr Enzym durchgeführt.

Als Reaktionspuffer wurde das New England Biolabs (NEB) Puffer-System verwendet. Das NEB-System besteht aus vier sogenannten Basalpuffern:

NEB-1:	10 mM Tris (pH 7)	NEB-2:	10 mM Tris (pH 8)
	10 mM MgCl ₂		10 mM MgCl ₂
	1 mM DTT		1 mM DTT
NEB-3:	50 mM Tris (pH8)	NEB-4:	20 mM Tris (pH8)
	10 mM MgCl ₂		10 mM MgAc ₂
	1mM DTT		1 mM DTT
	100 mM NaCl		50mM KAc

4.1.6. Präparation von Vektor-DNA

Die Plasmid-DNA wurde mit einer oder, wenn nötig, mit zwei geeigneten Restriktionsendonukleasen gespalten. Plasmide, die nur mit einer Restriktionsendonuklease gespalten worden sind, wurden anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt, um eine Religation des Vektors zu verhindern.

Phosphatasebehandlung:

Nach der Spaltung wurde die DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt.

Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 39 µl H₂O gelöst:

Ansatz:	39 µl	DNA in H ₂ O
	10 µl	5 x CIP-Puffer (0.5 M Tris/HCl pH 9, 10 mM MgCl ₂ , 1mM ZnCl ₂ , 10 mM Spermidin)
	1.0 µl	CIP (calf intestinal phosphatase, 25 U/µl)

	Σ	50 µl

Der Ansatz wurde bei 5'-überhängenden Enden 30 Min. bei 37°C, bei 3'-überhängenden und 'glatten' Enden 15 Min. bei 37°C und 15 Min. bei 56°C inkubiert. Für letztere wurde nach Zugabe eines weiteren μl CIP die Behandlung wiederholt. Die Reaktion wurde durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt; die Vektor-DNA wurde nach Phenol- und Chloroform-Extraktionen gefällt.

4.1.7. Auffüllen von 3'-zurückliegenden Enden bzw. Entfernen von 3'-überhängenden Enden

Reaktionsansatz zum Auffüllen von 3'-zurückliegenden Enden:

1 μg	DNA-Fragment
2.5 μl	10 x Klenow-Puffer (0.5 M Tris/HCl pH 7.6, 0.1 M MgCl_2)
1 μl	2 mM dNTP
1 μl	Klenow-Fragment 2 U/ μl
x μl	H_2O
<hr/>	
Σ 25 μl	

Der Ansatz wurde 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 10 Min. bei 60°C inkubiert und dann mit Phenol/Chloroform extrahiert, um das Enzym zu inaktivieren und entfernen. Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert und in H_2O oder TE aufgenommen.

Reaktionsansatz zum Entfernen von 3'-überhängenden Enden:

1 μg	DNA-Fragment
2 μl	10x T4-DNA-Polymerase-Puffer (330 mM Tris/Acetat pH 8.0, 660 mM KAc, 100 mM MgAc, 2.5 mM DTT, 1 mg/ml BSA)
1 μl	2 mM dNTP
1 μl	T4-DNA-Polymerase (2U)
x μl	H_2O
<hr/>	
Σ 20 μl	

Der Ansatz wurde 5 Min. bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 1 µl 0.5 M EDTA mit Phenol und Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt.

4.1.8. Ligation

Reaktionsansatz:	1 µl	Vektor-DNA (20 ng)
	4 µl	5 x Puffer (0.25 M Tris pH 7.6, 50 mM DTT, 50 mM MgCl ₂ , 5 mM ATP)
	x µl	DNA-Fragment (20-100 ng)
	1 µl	T4-DNA-Ligase (1 U/µl)

	Σ	20 µl

Das molare Verhältnis von Fragment- zu Vektor-DNA betrug bei der Ligation von Fragmenten mit kohäsiven Enden etwa 2 bis 3:1 und bei 'glatten' (blunt) Enden etwa 4-8:1. Die Inkubation erfolgte für Fragmente mit kohäsiven Enden für 4-16 Std. bei 16°, für Fragmente mit 'glatten' Enden bei Raumtemperatur.

4.1.9. Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA

Zur Transformation wurden chemokompetente Bakterien vom Typ XL1-blue (47) der Firma Stratagene verwandt. Die Transformation erfolgte nach Protokoll der Firma.

4.1.10. Isolierung von Plasmid-DNA

4.1.10.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA (Alkalische-Lyse)

5 ml steriles, mit dem Plasmid-Resistenzgen-entsprechenden Antibiotikum versetztes LB-Medium wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Die Bakterien ließ man über Nacht bei 37°C zu einer OD 600 von ca. 4 wachsen. 1.5 ml der Zellen wurden durch kurzes Zentrifugieren in einem Eppendorf-Cup pelletiert. Das Pellet wurde in 100 ml Glukose/Tris/EDTA-Lösung (GTE) aufgenommen und 5 Min. bei RT stehengelassen. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS-Lösung wurde das Gemisch kurz gevortext und 5 Min. auf Eis stehen gelassen. Dann wurde 150 µl Kaliumacetat-Lösung zugeben, gevortext und weitere 5

Min. auf Eis gestellt. Nun wurde das Gemisch 3 Min. bei 13000 U/Min. (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Cup geben, worauf sich eine Phenol-Extraktion anschloß (siehe 4.1.1.). Die Vektor-DNA wurde schließlich in 20-30 µl 0.25 M TE-Puffer aufgenommen und kontaminierende RNA durch Zugabe von 1µl einer 10 mg/ml DNase freien RNase-Lsg. entfernt.

GTE-Lösung:	50 mM glucose
	25 mM TrisCl, pH 8.0
	10 mM EDTA
NaOH/SDS-Lösung:	0.2 M NaOH
	1% (w/v) SDS
	(frisch anzusetzen von Stock)
5 M Kaliumacetat-Lsg. (pH 4.8):	29.5 ml Eisessig
	KOH-Plättchen bis pH 4.8
	H ₂ O auf 100 ml
	(bei RT zu lagern)

4.1.10.2. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA (Quiagen-Säule)

Die Maxi-Präparation von Vektor-DNA erfolgte nach Protokoll der Firma Quiagen.

4.1.11. RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen nach Chomczynski und Sacchi mittels RNazol B (48)

Nach mehrmaligem Waschen der Zellen und Bestimmung der Zellzahl wurden 4×10^7 Zellen mit 1 ml RNazol B-Lsg. versetzt und gut gevortext. Die Lösung wurde entweder zur späteren Verarbeitung bei -70°C eingefroren oder 15 Min. auf Eis stehen gelassen. Die Probe wurde weiterverarbeitet, indem 1/10 Vol. Chloroform hinzugegeben wurde und durch Vortexen die Lösung so gemischt wurde, daß sich eine weißliche Suspension bildete. Nach 15 Min. Inkubation auf Eis wurde die Probe mit einer gekühlten Tischzentrifuge 15 Min. bei 13000 U/Min. zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, mit eiskaltem 0.75 Vol. 70% Isopropanol versetzt und die RNA bei 4°C über Nacht präzipitiert. Anschließend wurde

die Probe erneut 15 Min. bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das RNA-Pellet gewaschen, indem es mit 1 ml eiskaltem 70% Ethanol überschichtet und erneut 15 Min. mit 13000 U/Min. zentrifugiert wurde. Zuletzt wurde das RNA-Pellet in der Kühlfalle (Speedvac) ca. 5 Min. getrocknet und, je nach Pelletgröße, in 10-30 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Nachdem die RNA wieder in Lösung gegangen war, wurde die Konzentration mittels Spektrometers bestimmt (siehe 4.1.3.).

4.1.12. cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

4.1.12.1. cDNA-Synthese aus RNA mittels Oligo(dT)-Primern

Die cDNA-Erststrangsynthese wurde mittels der MMLV-Reversen Transkriptase durchgeführt. 4 µg RNA wurden zusammen mit 1µg Oligo(dT)-Primern zu einem Gesamtvolumen von 20 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde 5 Min. bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde 10 µl folgenden Gemisches hinzugegeben und 60 Min. bei 37°C inkubiert:

6	µl	5 x MMLV-First-Strand-Puffer (250 mM Tris-HCl pH8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)
0.2	µl	100 mM dNTPs
0.9	µl	0.1 M DTT
1	µl	RNasin (40 U/µl)
1	µl	MMLV-RT (200 U/µl)

Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde die Lösung 5 Min. auf 95°C erhitzt und schließlich mit ddH₂O auf 50 µl verdünnt.

4.1.12.2. cDNA-Synthese aus RNA mittels spezifischen 3'-Primern

Da der bei der kompetitiven PCR eingesetzte Standard keine poly(A)-Sequenz enthielt, wurde für diesen Zweck mit einem für die wt-1 RNA spezifischen Primer anstatt mit Oligo(dT)-Primern umgeschrieben. Ansonsten war die Prozedur mit der oben beschriebenen (4.1.12.1.) identisch.

4.1.13. cRNA-Synthese (In-Vitro-Transkription) mit der T7-Polymerase

Im Rahmen der quantitativen PCR wurde der spezifische wt-1 mRNA-Gehalt einer Probe gegen einen Standard gemessen. Um Fehler zu vermeiden, die aus unterschiedlichen Transkriptionseffizienzen resultieren konnten, wurden die Proben- und die Standard RNA in einem Reagenzgefäß revers transkribiert. Dazu mußte jedoch zunächst die cRNA des Standards, der als DNA-Fragment in einem Bluescript KS-Vektor vorlag, hergestellt werden. Zur Transkription wurde die T7-Polymerase verwendet. Die Reaktion erfolgte in folgendem Ansatz:

je 2µl	10mM ATP, CTP, GTP und UTP
2µl	10 x Transkriptions-Puffer
2µl	T7-RNA-Polymerase (10 U/µl)
1 µl	RNAse-Inhibitor (20 U/µl)
2 µg	Plasmid-DNA (wt-1 Standard in Bluescript KS)
H ₂ O ad 20 µl	

Nach 60 Min. Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz mit 2 µl RNase-freier DNase (10 U/µl) für 15 Min. bei 37 °C inkubiert. Nach einem Phenolschritt und Präzipitation (siehe 4.1.3.) wurde die cRNA-Menge photometrisch bestimmt und zur Kontrolle der Vollständigkeit des DNase-Verdaus eine wt-1 PCR (siehe 4.6.2.) mit 1 µg cRNA als Template durchgeführt, die negativ sein mußte.

4.2. DNA-Elektrophorese-Techniken

4.2.1. Agarose-Gele zur DNA-Trennung

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zB. aus Restriktionsverdaus oder PCR-Reaktionen wurde die Probe auf ein je nach Fragmentlänge 0.5 bis 3 % (w/v) Agarose-Gel aufgetragen. Dazu wurden zB. für ein 1% Agarosegel 0.5 mg Agarose in 50 ml 1x TAE-Puffer durch aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurden 0.7 µl einer 10mg/ml Ethidiumbromidlösung hinzugegeben und die Agarose in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Gel-Kammer gegossen. Die DNA wurde zusammen mit einem entsprechenden Längen-Marker aufgetragen und ca. 20 Min. bei 70 mV (kleine Kammer) aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und photographiert.

4.2.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen (Gel-Elution)

Um DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen zu gewinnen, wurde das Quiaquick-Gel-Elution-Kit verwandt. Die Elution erfolgte nach Protokoll der Firma.

4.3. Biochemische Methoden

4.3.1. Zell-Lyse zur Proteingewinnung

Zur Gewinnung von endogenem WT-1-Protein in den hämatopoetischen Zelllinien HEL 92.1.7., HL60, K562, U937 und in AML-Blasten wurden die Zellen zunächst gewaschen, gezählt und durch Zentrifugation bei 200 x g sedimentiert. Das Zell-Sediment wurde in Zelllysatpuffer resuspendiert und 30 Min. auf Eis geschüttelt. Das Lysat wurde bei 13000 U/Min. 15 Min. zentrifugiert, der Überstand bis zum Gebrauch bei -80°C eingefroren.

Zelllysatpuffer:	Tris 1M pH 8,0	20 mM
	NaCl	137 mM
	EDTA	10 mM
	NP-40	1%
	Triton X-100	1%

Zusätzliche Protease-Inhibitoren (je 1 ml Lysis-Buffer):

PMSF	10 µl
Aprotinin	5 µl
Leupeptin	2 µl

4.3.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (49). Mit BSA als Standard wurden Eichkurven in Konzentrationen zwischen 0 und 100 µg Protein/Ansatz erstellt. Zu 200 µl Probe oder Eichlösung wurde 1 ml eines Hydrolysereagenzes (50 ml 2% (w/v) Na₂CO₃ in 0.1 N NaOH, +0.5 ml 2% (w/v) Kalium-Natriumtartrat, + 0.5 ml 1% (w/v) Kupfersulfat) pipettiert und gemischt. Nach Inkubation für 20 Minuten bei RT wurde unter gleichzeitigem

Mischen 0.1 ml eines 1:2 mit H₂O verdünnten Folin-Ciocalteu-Phenolreagenzes hinzugefügt und erneut für 30 Min. inkubiert. Die Extinktion des blauen Farbkomplexes wurde bei 750 nm im Doppelstrahlspektrophotometer gemessen.

4.3.3. **Polyacrylamid-Gele zur Protein-Trennung (SDS-PAGE)**

Nach der Methode von Lämmli (50) wurde für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ein diskontinuierliches System verwebdet. Die Flachgele bestanden aus 10% bzw. 12.5% Acrylamid-Trenngelen, mit 2.7% bzw. 3.2% N,N-Bisacrylamid und 4 % Acrylamid-Sammelgelen mit 0.11% N,N-Bisacrylamid und wurden in Mini Protean II (8.5 x 6.5 cm) oder Protean II (16 x 12 cm) Apparaturen der Firma Biorad für Gele mit 0.5 - 1.0 mm Dicke verwendet. Der Laufpuffer bestand aus 9.5 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS in 2.5 mM Tris-HCl pH8.8. Der Trenngelpuffer enthielt 0.375 M Tris-HCl pH 8.8 und der Sammelgelpuffer 0.125 M Tris-HCl pH 6.8. Die Polymerisierung wurde jeweils durch 0.05% (w/v) Ammoniumperoxiddisulfat gestartet, das Gel gegossen und mit Trenngelpuffer überschichtet. Nach 30 Min. konnte der Puffer abgesaugt, das Trenngel mit Sammelgelpuffer überschichtet, und der Teflonkamm eingesteckt werden. Nach einer Stunde war das Sammelgel polymerisiert. Die Proben und ein Protein-Längenmarker wurden in Probenpuffer (1% (w/v) SDS, 8% (v/v) Ethylenglykol in 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0.05% Bromphenol Blau) für 5 Min. auf 95°C erhitzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei Mini Protean II mit 200 V konstanter Spannung für eine Stunde, und bei Protean II mit 25 mA konstantem Stromfluß für etwa 6 Stunden.

4.3.4. **Trocknen von Polyacrylamid-Gelen nach Färbung oder zur Autoradiographie**

Um radioaktiv markierte Proteine auf dem Röntgenfilm zur Datrstellung zu bringen, wurden sie zunächst mittels SDS-PAGE (4.3.3.) aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel wurde nun zur Fixation 15 Min. in Fixationslösung (siehe 4.3.5.) eingelegt. Zur Erhöhung der Signalstärke wurde es dann für weitere 15 Min. in Enhance-Lösung (Fa. Amersham) geschüttelt. Schließlich wurde das Gel 1 Stunde in einer Gel-Trocknungs-Apparatur unter einem von einer Wasserstrahlpumpe erzeugten Unterdruck bei 60°C auf einem Whatman-Filter getrocknet. Coomassie-gefärbte Gele wurden in einen Rahmen zwischen 2 Pergamentblätter gespannt und so über Nacht bei RT getrocknet.

4.3.5. **Färben von Polyacrylamidgelen nach Coomassie**

Die Coomassie Blaufärbung erfolgte nach der Methode von Silver undt Stull (51). Dazu wurden die Polyacrylamidgele für 20 Min. in 0.15% (w/v) Coomassie R-250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure fixiert und gefärbt. Die überschüssige Farbe wurde durch waschen mit ddH₂O für 15 Min. entfernt und die Gele getrocknet.

4.3.6. **Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western-Blot)**

Die mittels SDS-PAGE (4.3.3.) aufgetrennten Proteinbanden wurden mit einer Semidry-Blot-Apparatur auf Nitrocellulose-Membranen überführt. Dazu wurde das Gel unmittelbar nach der Elektrophorese 20 Min. in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl pH 8.5, 20% (v/v) Methanol) äquilibriert. Sechs passend zugeschnittene 3MM Whatman-Papierfilter sowie die Nitrocellulose-Membran wurden in Transferpuffer getränkt und die Schichten entsprechend der Polung der Apparatur zusammengesetzt. Der Transfer erfolgte bei konstantem Stromfluß (1.2 mA/cm² Gel) in einer Stunde.

4.3.7. **Spezifische Detektion von Proteinen mittels Chemoluminiszenz (ECL-System)**

Zur Detektion spezifischer Proteinbanden wurde die geblottete Nitrocellulose-Membran zunächst 1 Stunde bei RT mit 5% (w/v) Trockenmilch in TBST-Puffer (siehe 3.9.) inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit TBST-Puffer für 5 Min. wurde die Membran für 2 Stunden mit einem WT-1 spezifischen Antikörper in einer Konzentration von 1:2000 bei RT inkubiert. es wurden sowohl der polyklonale kommerzielle Antikörper WT-C19 der Firma Santa Cruz, als auch verschiedene monoklonale Antikörper, die von Christoph Englert aus D. Habers Labor in Boston zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 Min. mit TBST gewaschen und eine weitere Stunde mit einem gegen den entsprechenden Primärantikörper gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Maus bzw. Anti-Ziege) bei RT inkubiert. Die Membran wurde wiederum zweimal 10 Min. in TBST gewaschen und dann in einer Dunkelkammer mit ECL-Substrat-Lösung getränkt. Nach Einwickeln der Membran in Saran-Folie wurden Röntgenfilme durch Auflegen für eine Zeit zwischen 10 Sek. und 5 Min. exponiert und entwickelt.

4.3.8. In-Vitro-Translation von Proteinen (IVT-Kit von Promega)

Um eine Positiv-Kontrolle für die WT-1 Antikörper zu gewinnen, wurde der Vektor LC-15 mit der kompletten wt-1 cDNA mit Hilfe des In-Vitro-Translationskits der Fa. Promega translatiert. Zur Kontrolle wurde das Protein mit radioaktivem S³⁵ markiert, durch SDS-Page aufgetrennt und mittels Autoradiographie dargestellt.

4.4. DNA-Markierungsmethoden

4.4.1. Markierung von DNA mit dem Rediprime® System

Zur Markierung von doppelsträngiger DNA mit ³²P wurde der Rediprime™-Kit der Fa. Amersham verwendet. Zur Herstellung einer wt-1 spezifischen Sonde wurde das Plasmid LK-15 mit den Enzymen BamH I und Rsr II geschnitten und ein 593 bp langes DNA-Fragment eluiert. Die Markierung erfolgte nach Protokoll der Firma nach einer von Feinberg und Vogelstein 1983 entwickelten Methode durch 'Random-Priming' mit Hexanukleotiden (52). Die nicht eingebauten Nukleotide wurden anschließend über eine Pharmacia-200S-Säule abgetrennt.

4.4.2. Markierung von DNA 5'-Enden mit der Polynukleotidkinase

Die dephosphorylierte DNA (Oligonukleotid) wurde am 5'-Ende phosphoryliert. Für die Reaktion wurde ein 2-3-facher molarer Überschuß von γ -³²P-ATP gegenüber der DNA eingesetzt.

Reaktionsansatz:	x μ l	Oligonukleotid (50 ng)
	2 μ l	1M Tris-HCl pH 8.3
	4 μ l	50 mM MgCl ₂
	2 μ l	0.1 M DTT
	2.5 μ l	γ - ³² P-ATP (10 μ Ci/ μ l)
	2 μ l	T4-Polynukleotidkinase (10 U/ml)
	mit H ₂ O auf 20 μ l	

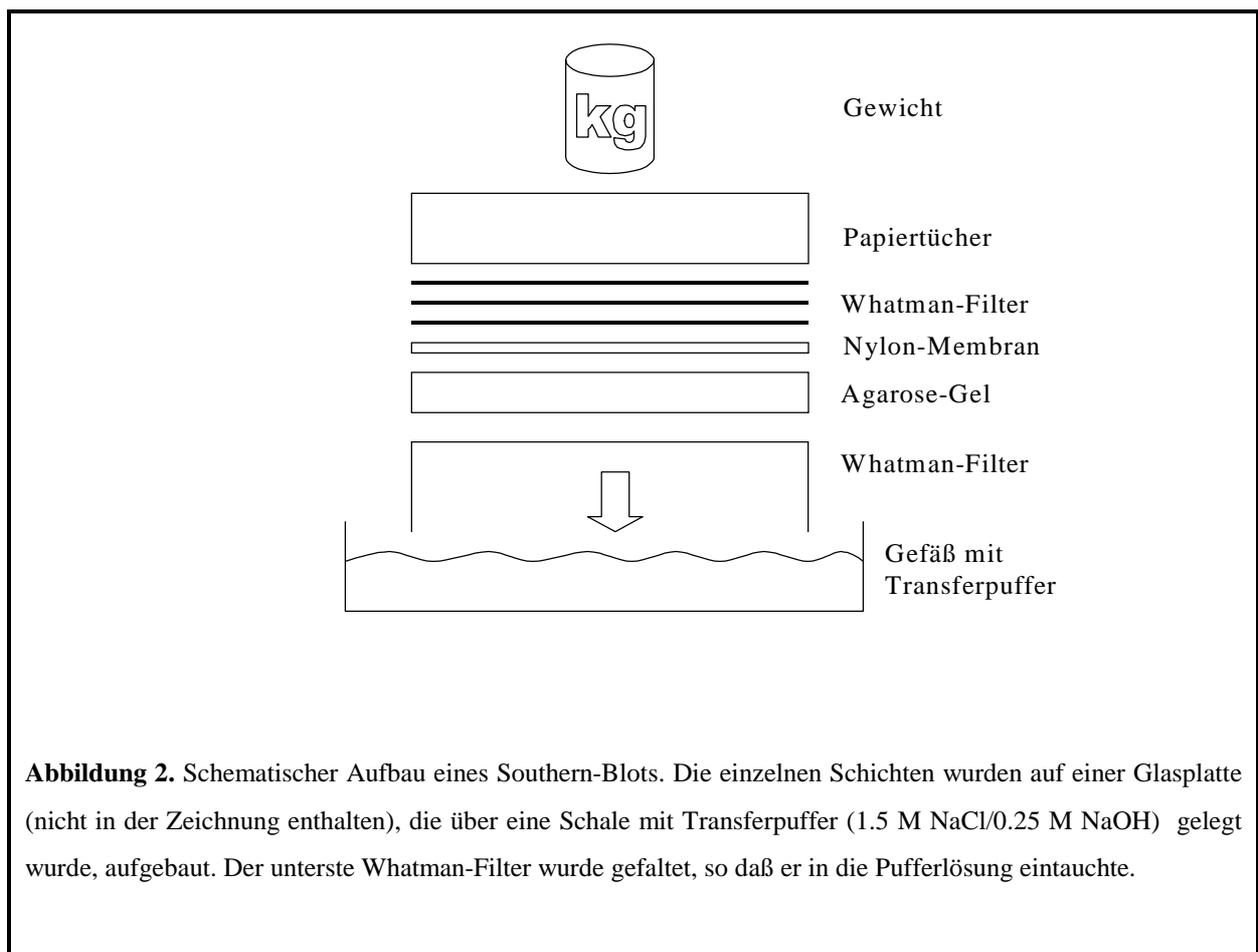
Nach 45 Min. Inkubation bei 37°C wurde das nicht eingebaute γ -³²P-ATP über eine Pharmacia-Säule abgetrennt.

4.5. DNA-Hybridisierungstechniken

4.5.1. Transfer von DNA auf Nylonfilter (Southern-Blot)

Der DNA-Transfer erfolgte nach einer von E. Southern entwickelten Methode (53).

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-Gel-Elektrophorese wurde das Gel bei RT 15 Min. in einer 0.25 M HCl-Lösung, anschließend 30 Min. in einer 1.5 M NaCl/0.5 M NaOH-Lösung und schließlich 15 Min. in 1.5 M NaCl/0.25 M NaOH inkubiert. Die DNA wurde mittels Kapillar-Blotting über Nacht auf den Nylonfilter übertragen.



Die DNA wurde auf dem Filter durch UV-Bestrahlung fixiert.

4.5.2. **Hybridisierung mit ³²P-markierten DNA-Fragmenten**

Zur Hybridisierung wurden die Filter mit der Hybridisierlösung 1 Stunde vorinkubiert. Anschließend wurde die markierte Sonde (siehe 4.4.) in einer Konzentration von 2 pmol/ml hinzugegeben und über Nacht bei 55°C hybridisiert. Die radioaktive Lösung wurde abgenommen und die Filter zunächst zweifach in 2 x SSC-Puffer/1.0% SDS bei RT für 5 Min., dann zweifach in 1 x SSC-Puffer/1.0% SDS bei 55°C für 15 Min. und schließlich einmal für 5 Min. bei RT in 1 x SSC-Puffer gewaschen. Die Filter wurden in Saran-Folie gewickelt und entweder auf Röntgenfilm oder auf einem PhosphorImager der Firma Molecular Dynamics exponiert.

4.6. **DNA-Amplifikation mit der Taq-Polymerase (PCR)**

Die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde 1986 von K. Mullis entwickelt (54). Sie beruht einerseits auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen, mittels semikonservativer Replikation einen DNA-Strang zu verdoppeln, andererseits auf der Thermostabilität bestimmter DNA-Polymerasen, die es ermöglichen, eine größere Reihe von Replikationszyklen zu durchlaufen. Durch exponentielle Amplifikation einer durch zwei 'Primer' (dies sind im Allgemeinen 20-30 bp lange Oligonukleotide, die sich spezifisch an komplementäre DNA-Stränge anlagern) definierten Nukleotidsequenz lassen sich sehr geringe Mengen, theoretisch sogar 1 Molekül, einer DNA oder cDNA (mRNA nach reverser Transkription (RT-PCR)) nachweisen. Eine Zyklenzahl von 35 entspräche theoretisch einer 2^{35} (=3.435.973.837)-fachen Amplifikation. Dies bedingt einerseits die sehr hohe Sensitivität der PCR, andererseits auch die hohe Anfälligkeit für Kontaminationen. Prinzipiell ist es möglich, 1 Zelle unter 10^5 - 10^6 anderen Zellen zu detektieren, vorausgesetzt, diese Zelle besitzt eine für sie spezifische DNA-Sequenz (bzw. mRNA-Sequenz bei RT-PCR). Die Sensitivität der PCR ist in erster Linie abhängig von der Wahl der Primer bzw. dem zu amplifizierenden Genabschnitt, und den gewählten Amplifikationsbedingungen (56). Weitere Faktoren, die die Detektionsgrenze beeinflussen, sind Effizienz der DNA- bzw. RNA-Extraktion, Effizienz der reversen Transkription, mögliche Kontaminationen, welche die Reaktion behindern, und mit welcher Methode die Amplifikate sichtbar gemacht werden.

Da die Amplifikationskurve nur über eine bestimmte, von Reaktion zu Reaktion variable Strecke gleichmäßig verläuft, lässt sich die Ausgangsmenge an DNA nur sehr ungenau quantifizieren. Vor allem bei hohen Amplifikatzahlen respektive hoher Anzahl von Zyklen und somit im oberen Bereich der Kurve entspricht die Amplifikationseffizienz nicht mehr dem theoretisch möglichen Faktor 2.

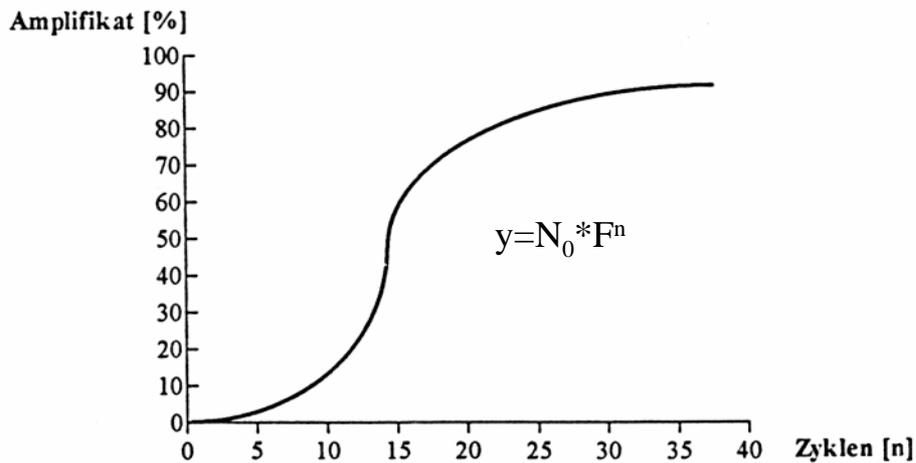


Abbildung 3. Sigmoidaler Verlauf der Amplifikationskurve einer PCR. Während die Amplifikationseffizienz im unteren Bereich noch in der Nähe des Faktors 2 liegt, sinkt sie im weiteren Verlauf der Reaktion deutlich darunter und nähert sich asymptotisch der 0. In der angegebenen Kurvengleichung entspricht N_0 der Anfangsmenge an DNA, F der Effizienz der Amplifikationsreaktion und n der Zahl der Amplifikationszyklen.

Für diese Abflachung der Amplifikationskurve sind verschiedene Gründe wie z.B. das Primer-Endprodukt-Verhältnis und die Stabilität der Taq-Polymerase maßgeblich, auf die ich hier im Einzelnen nicht näher eingehen kann. Entscheidend ist, daß daher zur groben Abschätzung der Expressionsstärke das Mitführen einer Kontroll-PCR eines in allen Zellen ungefähr gleich stark exprimierten Gens notwendig wird. Im Rahmen der Studie wurde ein mRNA-Abschnitt des β -Aktin-Gens zur Kontrolle der RNA-Extraktion und der reversen Transkription sowie zum Mengenabgleich amplifiziert (55). Das β -Aktin-Gen wird in allen untersuchten Zellen in ähnlicher Stärke exprimiert und kodiert für ein für den Zellhaushalt wichtiges Strukturprotein. Eine Amplifikations-Kinetik durch Entnahme von Proben nach 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen ergab, daß die Amplifikation des β -Aktin-Gens bei 30 Zyklen noch linear erfolgte bei gleichzeitig ausreichender Amplifikationsstärke, so daß diese Zyklenzahl für die β -Aktin-Amplifikation verwandt wurde. War bei einer Probe kein β -Aktin-Signal zu detektieren,

wurde die reverse Transkription wiederholt; war danach noch kein positives β -Aktin-Signal vorhanden, wurde die Probe verworfen.

Eine quantitative Aussage war aus oben genannten Gründen nur grob zu treffen. Nach Abgleich des β -Aktin-Signals wurde das wt-1-Signal visuell als negativ, schwach positiv, intermediär positiv und stark positiv eingeteilt. Um diese Einteilung zu validieren, wurde eine quantitative PCR mit homologem Standard etabliert und eine Reihe von Proben mit nach einfacher PCR ermittelten unterschiedlichen Expressionsstärken zur Kontrolle quantifiziert.

Das Prinzip der quantitativen PCR mit homologem Standard besteht in der Zugabe eines DNA-Fragmentes, das sich von dem zu Bestimmenden nur geringfügig unterscheidet (z.B. in der Länge oder in einer zusätzlich vorhandenen Restriktions-Schnittstelle). In diesem Fall wurde wie beschrieben (siehe 4.6.3.) ein um 145 bp verkürztes Fragment hergestellt, das sich so leicht von dem nativen wt-1 Fragment unterscheiden ließ. Eine Verkürzung von 100-150 bp scheint nach Untersuchungen von Wang et al. nur geringe Auswirkung auf das Amplifikationsverhalten zu haben (56), so daß dieses verkürzte Fragment als homologer Standard eingesetzt werden kann. Die Menge des zugegebenen Standards ist bekannt, und dieser kompetitiert nun mit der zu bestimmenden Sequenz (Template) um Amplifikation. Idealerweise sollten daher die Signale von Standard und Template bei gleicher Ausgangskonzentration auch gleich stark sein. Da jedoch die Ausgangskonzentration des Templates unbekannt ist und um mehrere Zehnerpotenzen schwanken kann, müssen zur Quantifizierung mehrere Ansätze mit unterschiedlicher Menge des Standards bei gleicher Menge Template amplifiziert werden.

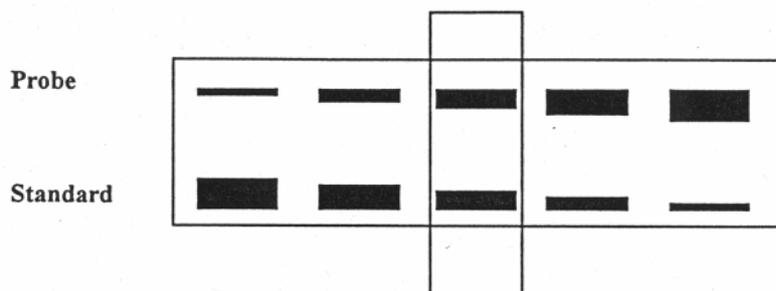


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Produkte einer kompetitiven PCR bzw. von fünf PCR-Reaktionen mit unterschiedlichem Standard-Proben-Verhältnis. Im Idealfall findet sich ein Reaktionsverhältnis, in dem das Signal von Standard und Probe gleich stark ist. Da von gleichen Amplifikationseffizienzen ausgegangen werden kann, entspricht in diesem Fall die eingesetzte Menge an Standard der Menge an Probe.

Nach der PCR-Reaktion können die Amplifikationsprodukte des Standards und des untersuchten Gens auf einem Agarosegel aufgrund der unterschiedlichen Länge aufgetrennt werden. Um eine höhere Sensitivität zu erreichen, wurde ein Southernblot mit anschließender Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden durch 'random priming' mit Hexanukleotiden (Feinberg und Vogelstein) hergestellt (siehe 4.4.1.), so daß man eine Reihe unterschiedlich langer Sonden-Fragmente erhält. Dies bedingt eine theoretisch bis zu 17% ($\text{Länge Template} - \text{Länge Standard} / \text{Länge Template} \times 100$) schwächere Signalintensität der Standard-Amplifikationsprodukte. Zur Korrektur wurden die mittels PhosphoImager ermittelten Dichtewerte (Schwärzung) der Banden mit einem Korrekturfaktor von 1,1 multipliziert. Trägt man den Logarithmus des Quotienten aus Dichtewert des Standards dividiert durch Dichtewert des Templates in einem Graph gegen die Menge des eingesetzten Standards auf, läßt sich eine Regressionsgerade durch die einzelnen Punkte (jeder Punkt entspricht einer kompetitiven Amplifikation) legen. An dem Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse, d.h. dem Punkt, an dem der Logarithmus des Quotienten Null ist, entspricht die Menge an Template der eingesetzten Menge an Standard und kann auf der X-Achse abgelesen werden. Zur Berechnung wurden die korrigierten Dichtewerte in das Programm GraphPadPrism eingegeben, das eine Regressionsgerade erstellte und den Schnittpunkt ermittelte.

Ein weiterer problematischer Faktor in der quantitativen PCR-Analyse stellen die Schritte der RNA-Extraktion und der reversen Transkription dar. Um zwei oder mehrere Proben auf die Expression eines Gens untereinander zu vergleichen, sollte die mRNA-Gewinnung und ihre Transkription in cDNA bei den zu vergleichenden Proben unter gleichen Bedingungen und so mit gleicher Effizienz verlaufen.

Zur Kontrolle der Extraktionseffizienz ist man auf einen Vergleich der eingesetzten Zellzahl und der entsprechend extrahierten Gesamt-RNA-Menge und/oder auf einen Abgleich über eine Amplifikation eines sogenannten „Haushalts-Gens“ (z.B. β -Aktin) angewiesen. Dies setzt gewisse Übereinstimmungen in der biologischen Struktur der untersuchten Zellen voraus; es lassen sich jedoch auf diese Weise reproduzierbare Werte erhalten.

Das Problem einer unterschiedlichen Effizienz der reversen Transkription wurde, wie oben beschrieben (4.1.13.), durch In-Vitro-Transkription des PCR-Standards in cRNA gelöst. Dadurch konnten die zu untersuchenden Proben vor der reversen Transkription mit einer

bekanntem Menge an Standard-cRNA versetzt und zusammen unter gleichen Bedingungen umgeschrieben werden.

Der mRNA-Gehalt der AML-Zellen bzw. der Zelllinien wurde mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bestimmt. Nach RNA-Extraktion (siehe 4.1.11.) und Reverser Transkription (siehe 4.1.12.) der zellulären mRNA in cDNA wurde diese in die PCR-Reaktion eingesetzt:

Reaktionsansatz:	3 µl	cDNA
	5 µl	10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 1% Triton X-100)
	3 µl	25 mM MgCl ₂
	1 µl	10 mM dNTP
	1 µl	5'-Primer (20 pmol/µl)
	1 µl	3'-Primer (20 pmol/µl)
	0.2 µl	Taq-Polymerase (5U/µl)

	Aqua a. I. auf 50 µl	

Der Ansatz wurde mit 50 µl Öl überschichtet, um Verdunstung der Lösung zu verhindern. Anschließend wurde je nachdem, welches Gen zu amplifizieren war (siehe unten), die entsprechende PCR-Sequenz begonnen.

4.6.1. Amplifikation des β -Aktin Gens

Das β -Aktin Gen ist ein sogenanntes 'housekeeping'-Gen, das in fast allen eukaryontischen Zellen mit ähnlicher Stärke exprimiert wird. Daher eignet es sich gut, um die Qualität und Integrität der RNA zu prüfen und den RNA-Gehalt zweier Zellen grob vergleichbar zu machen.

Zur Amplifikation des β -Aktin Gens wurden der 5'-Primer 5'-AGCAAGAGAG GCATCCTGACC-3' und der 3'-Primer 5'-CTTCATGATGGAGTTGAAGGTAG-3' verwendet. Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen mit 30 Sek. bei 94°C, 30 Sek. bei 62°C

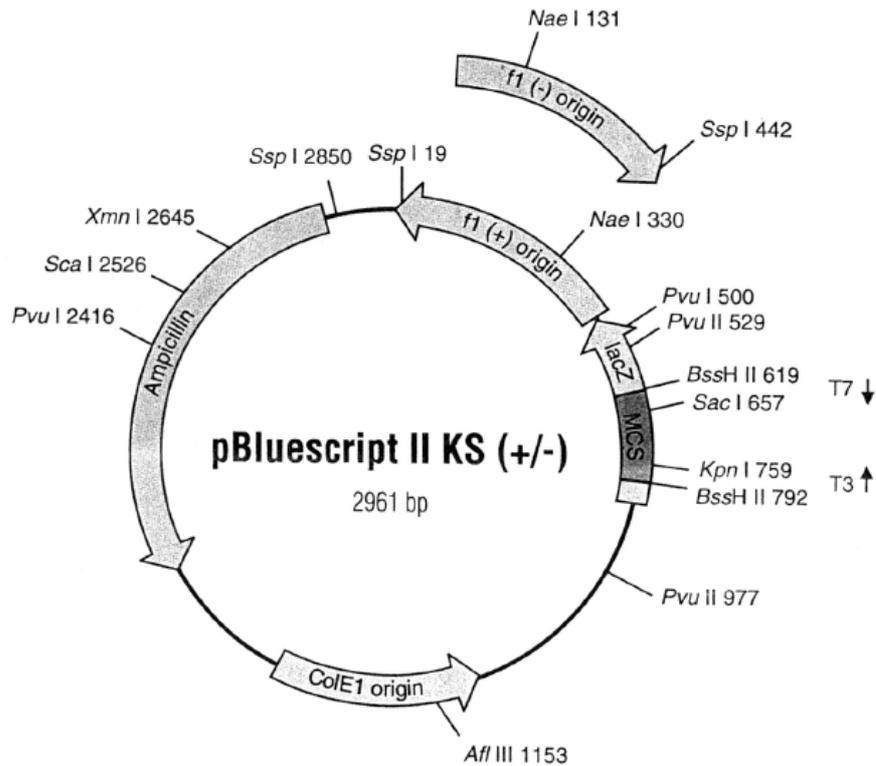
und 45 Sek. bei 72°C. Abschließend wurde 7 Min. bei 72°C extendiert. Die amplifizierte DNA wurde mit einem 1% Agarose-Gel analysiert.

4.6.2. **Amplifikation des Wilms' Tumor Gens**

Zur Amplifikation des wt-1 Gens wurden der 5'-Primer 5'-ATGAGGA TCCCATGGGCCAGCA-3' und der 3'-Primer 5'-CCTGGGACACTGAACGGTCCCCGA-3' verwendet. Um die Spezifität des Verfahrens zu erhöhen und Mispriming zu vermeiden, wurde die Taq-Polymerase erst nach Erhitzen der Probe für 5 Min. bei 94°C hinzugegeben ('Hotstart-PCR'). Die Amplifikation erfolgte nun in 35 Zyklen mit 30 Sek. bei 94°C, 30 Sek. bei 64°C und 45 Sek. bei 72°C. Abschließend wurde 7 Min. bei 72°C extendiert. Die amplifizierte DNA wurde mit einem 1% Agarose-Gel analysiert. Die Expressionsstärke wurde zu der Expressionsstärke des β -Aktin Gens in Beziehung gesetzt und je nach Bandenstärke in negativ (-), einfach positiv (+), zweifach positiv (++) und dreifach positiv (+++) unterteilt.

4.6.3. **Koamplifikation des endogenen Wilms' Tumor Gens mit kompetitivem Standard (Kompetitive PCR)**

Zur genaueren Bestimmung der wt-1 mRNA-Expression wurde eine kompetitive PCR in Anlehnung an eine von Becker und Hahlbrock (57) bzw. der Firma Clontech (58) publizierte Methode etabliert. Hierzu wurde zunächst die wt-1 cDNA aus dem Plasmid LK-15 mit den Enzymen Sac II/Eco R I geschnitten und in das pBluescript™ KS-Plasmid 3'-wärts des T7-Polymerase-Promotors subkloniert.



wt-1 Restriktions-Enzym Karte

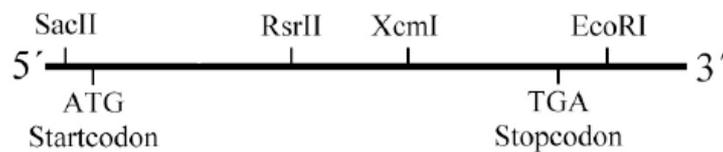


Abbildung 5. Restriktions-Enzym Karte der wichtigsten Schnittstellen des Plasmids pBluescript™ KS und der wt-1 cDNA. Die Vollängen-cDNA aus dem Plasmid Lk15 wurde mit Hilfe der Enzyme SacII und EcoRI ausgeschnitten und in die Multiple Cloning Site (MCS) des pBluescript KS-Vektors unmittelbar unterhalb des T7-Promotors kloniert.

Die cDNA wurde nun mit Hilfe der Enzyme Rsr II und Xcm I verkürzt, indem ein 145 bp langes Fragment herausgeschnitten wurde. Die Plasmid-Enden wurden mit der T4-Polymerase geglättet und konnten nun wieder religiert werden (siehe 4.1.7.). Eine PCR von diesem Plasmid als Template mit üblichen wt-1 Primern (siehe 4.6.2.) ergab Fragmente von 706 bp Länge, im Gegensatz zu 851 bp bei der 'nativen' wt-1 cDNA.

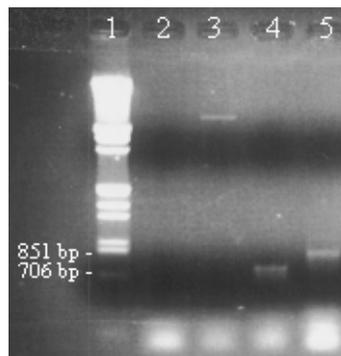
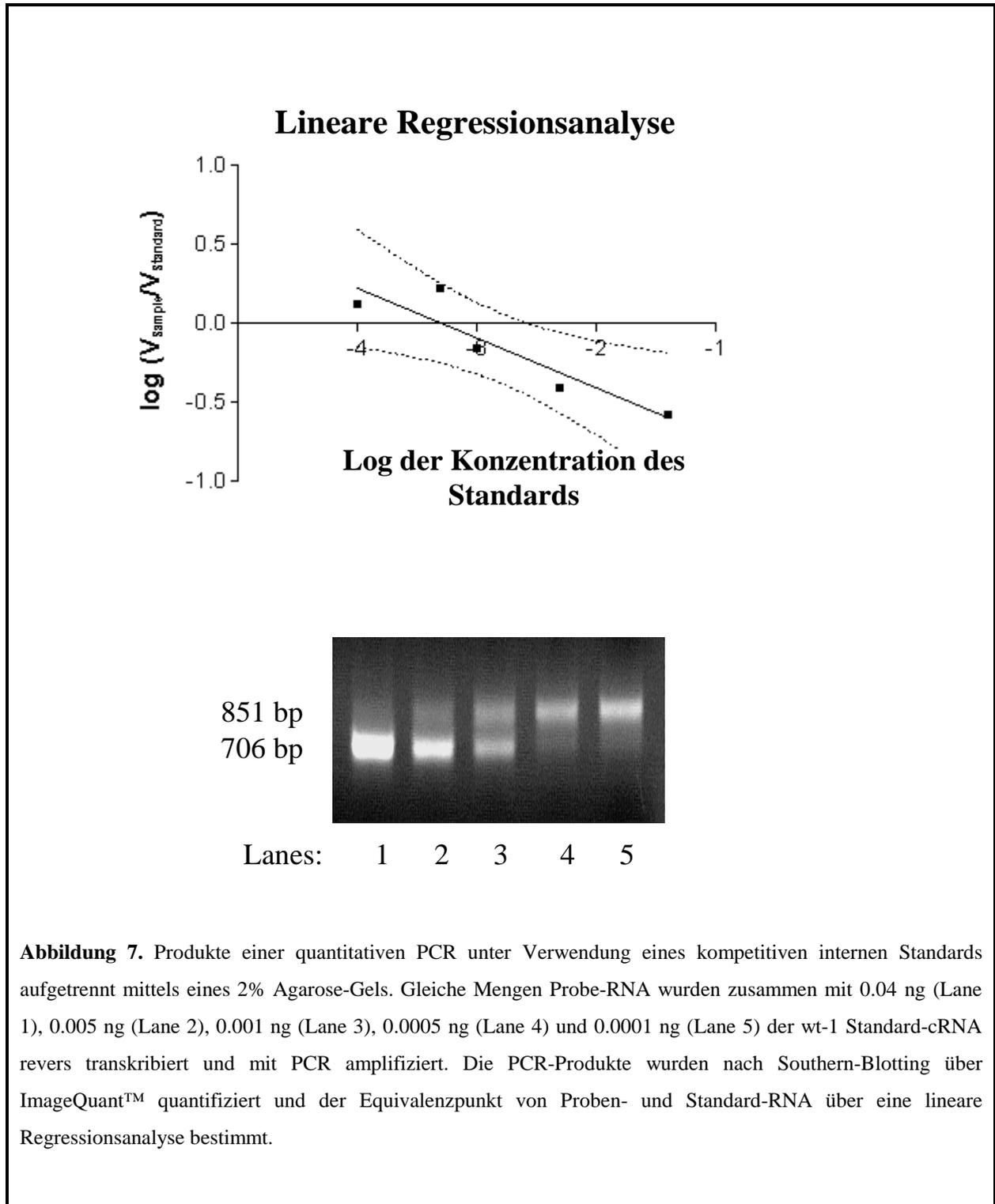


Abbildung 6. Photo eines Agarosegels einer PCR des Standards und unverkürzter wt-1 cDNA. Lane 1: H/E-Marker, Lane 2: Negativkontrolle, Lane 3: unverdauter Vektor, Lane 4: verkürzter wt-1-Standard, Lane 5: native wt-1 cDNA.

Um Ungenauigkeiten bei der reversen Transkription aufgrund unterschiedlicher Transkriptionseffizienz zu vermeiden, wurde die Plasmid-cDNA in cRNA umgeschrieben (siehe 4.1.13.). Die wt-1-Standard cRNA wurde ausgemessen und eine Verdünnungsreihe angelegt, so daß die cRNA in Konzentrationen von 0.04 ng/ μ l, 0.005 ng/ μ l, 0.001 ng/ μ l, 0.5 pg/ μ l, 0.1 pg/ μ l und 0.01 pg/ μ l vorlag. Um einen bestimmten Meßbereich besser aufzutrennen, wurden fallweise noch weitere Verdünnungen des Standards verwendet. Um den wt-1 mRNA-Gehalt einer Zelle zu bestimmen, wurden nun jeweils 5-0.5 μ g GesamtmRNA (die Menge richtete sich nach der vorhandenen Gesamtmenge; wenn ausreichend Proben-RNA zur Verfügung stand, wurde bis zu 5 μ g eingesetzt) zusammen mit je 1 μ l cRNA der obigen Verdünnungen in einem Ansatz mit wt-1 spezifischen Primern revers transkribiert (siehe 4.1.12.2). Die Gemische wurden mittels PCR amplifiziert (siehe 4.6.2.) und geblottet (siehe 4.5.). Die Southern-Blots wurden auf dem PhosphoImager exponiert, die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageQuant™ auf einem Apple MacIntosh™-Computer. Dabei wurde jeder DNA-Bande ein Helligkeitswert in Form einer Integerzahl zugewiesen. Der Logarithmus des Quotienten aus dem Helligkeits-Wert der wt-1 mRNA-Probe (bei 851 bp) und dem Helligkeitswert des Standards (bei 706 bp) wurde als Abszisse in einem Graph gegen den Logarithmus der jeweiligen Konzentration des Standards (als Ordinate) aufgetragen. Mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism™ wurde eine Regressionsgerade durch die so gewonnenen Punkte gelegt, wobei der Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse dem Punkt entsprach, an dem die Konzentration des Standards gleich der der Probe war und aus dem Wert der X-Koordinate berechnet werden konnte.



4.7. Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

4.7.1. Zellkultur

Als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle für PCR und Western-Blot wurden die Suspensions-Zelllinien HEL 92.1.7. und U937 in Kultur gehalten. Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Zellen in PPMI 1640+ Medium mit 5-10% fetalem Kälberserum (FKS), bei wassergesättigter Atmosphäre, 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Die Nährmedien wurden bei 4°C gelagert. Zur Zellkultur wurden sie in einem Schüttelwasserbad auf 37°C erwärmt. Das FKS wurde nach Hitzeinaktivierung hinzugegeben, die Lagerung erfolgte bei -20°C. Zur Hitzeinaktivierung wurden jeweils 500 ml FKS langsam bei 4°C aufgetaut und im Anschluß für 30 Minuten bei 56°C im Schüttelwasserbad inaktiviert. Nach Abkühlen auf RT wurde es in entsprechenden Konzentrationen den Medien zugesetzt.

4.7.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen (Kryokonservierung)

5 ml einer Zellsuspensionskultur wurden bei 200 x g für 5 Min. sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Einfriermedium (RPMI 1640+Medium, 20% FKS versetzt mit Dimethylsulfoxid (DMSO) 1:10 (v/v)) resuspendiert und auf 5 vorgekühlte Kryoröhrchen verteilt, die in einer Styroporschachtel bei -80°C eingefroren wurden. Für eine längere Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die dem Stickstofftank entnommenen Kryoröhrchen für eine Minute bei RT gehalten und dann in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden sofort in 5 ml eiskaltes RPMI 1640+Medium überführt und durch Zentrifugation bei 200 x g für 5 Min. sedimentiert. Das Zellpellet wurde in RPMI 1640+Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

4.7.3. Ficoll-Separation mononukleärer Zellen

Mononukleären Zellen (MNC) wurden unter einer Steril-Bank aus heparinisiertem Knochenmark oder Vollblut von Patienten bzw. gesunden Normalpersonen isoliert. Die Probe wurde mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt und über einen diskontinuierlichen Ficoll-Hypaque Gradienten der Dichte 1,077 geschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei RT mit 720 x g reichern sich die MNC als Interphase an der Grenzschicht zum diskontinuierlichen

Dichtegradienten an, während die Erythrozyten und Granulozyten durch das Ficoll-Hypaque Medium sedimentieren und das thrombozytenhaltige Plasma im Überstand verbleibt. Die von der Grenzschicht abgehobenen MNC wurden zweimal mit PBS gewaschen, gezählt (siehe 4.7.4.) und anschließend zur FACScan-Analyse (siehe 4.7.5.) oder zur RNA-Extraktion (siehe 4.1.11.) verwendet oder nach nochmaligem Waschen in Kulturmedium in Kultur genommen.

4.7.4. Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer

Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 2-10 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit pH 7,4 resuspendiert. 20 μl der Suspension wurden 1:10 mit Türkslösung verdünnt und in der Neubauerzählkammer ausgezählt. Es wurden die äußeren vier äußeren Groß-Quadrate ausgezählt. Die Zelldichte wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$\frac{n \text{ (gezählte Zellen)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{0.1 \mu\text{l Suspension} \times \text{Anzahl der gez. Quadrate}} = x \text{ Zellen}/\mu\text{l}$$

4.7.5. FACScan-Analyse und Zell-Immunphänotypisierung

Zur immunphänotypischen Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen von Patienten mit akuten Leukämien wurden die mononukleären Zellen nach Ficoll-Separation mit Hilfe des 'Fluorescence Activated Cell Scanner' (FACscan) der Fa. Becton-Dickinson analysiert.

Hierbei werden zunächst zellspezifische Oberflächenantigene durch einen mit einem fluoreszierenden Farbstoff (zB. R-Phycoerythrin (PE), gekoppelten Antikörper markiert. Durch geeignete Druck- und Strömungsbedingungen wird eine 'perlenschnurartig' geordnete Wanderung der Zellen durch die Messeinheit bewirkt. Hier wird jede einzelne Zelle durch einen Laserstrahl erfaßt und die Fluoreszenz des zellgekoppelten Farbstoffes und andere bestimmte Streulichtphänomene (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC u. SSC)), mit deren Hilfe Aussagen über physikalische Eigenschaften der Zelle (Größe der Zelle (FSC) bzw. Granularität (SSC)) getroffen werden können, detektiert und die Signale über EDV

ausgewertet. Durch Markierung mit mehreren Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern können auch Subpopulationen gemessen werden.

Zur Phänotypisierung von MNC aus Blut oder Knochenmark wurden relevante Oberflächenantigene mittel FACScan bestimmt. Hierzu wurden 100 µl Vollblut mit 20 µl des jeweiligen FITC- oder PE-markierten Antikörpers versetzt. MNC aus Knochenmark wurden zunächst über Ficoll-Separation (siehe 4.7.3.) isoliert und auf $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml mit PBS eingestellt. Bei Vollblut wurde die Probe mit 2 ml einer 1:10 verdünnten FACS Lysis Solution (zur Lyse der Erythrozyten) gemischt und 10 Min. inkubiert. Die lysierten Erythrozyten wurden dann durch Zentrifugation entfernt (5 Min. 1200 U/Min. bei RT). Der Überstand wurde dekantiert und die sedimentierten MNC zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe des Antikörpers wurden die Zellen 15 Min. an lichtgeschützter Stelle inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS konnten die Zellen mit dem FACScan analysiert werden.

4.8. **Patienten: Einschlußkriterien, Diagnosestellung und Therapie**

Alle Patienten dieser Studie wurden im Rahmen verschiedener klinischer Studien behandelt. Die Diagnosestellung erfolgte nach den morphologischen und zytochemischen Kriterien der Französisch-Amerikanisch-Britischen Studien-Gruppen Klassifikation. Zusätzlich wurden die leukämischen Zellen der Patienten auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker untersucht.

Aus Knochenmark (KM)-Aspiraten von 129 Patienten bei Erstdiagnose und 32 Patienten im 1. Rezidiv, wovon bei 10 Patienten nur Proben im 1. Rezidiv gewonnen werden konnten, wurden mononukleäre Zellen einschließlich der leukämischen Blasten mittels Ficoll-Hypaque Dichte-Gradienten-Sedimentation isoliert und zur RNA-Extraktion eingesetzt. Bei 77 Patienten wurde die wt-1 Expression im Verlauf der Erkrankung kontrolliert. Dazu wurden KM-Aspirate bei Erstdiagnose, nach jedem Zyklus Chemotherapie und alle folgenden 3 Monate im Rahmen von routinemäßig durchgeführten Kontrollen auf das morphologische und zytochemische Weiterbestehen einer kompletten Remission als auch auf wt-1 mRNA Expression untersucht.

In verschiedenen klinischen Stadien (Erstdiagnose, CR, Rezidiv) wurden auch Proben von aus peripherem Blut gewonnenen MNC auf wt-1 mRNA Expression untersucht, um ein mögliches Monitoring der Erkrankung über Kontrolle der wt-1 Expression im leichter zugänglichen peripheren Blut zu beurteilen.

Von 59 Patienten konnte eine Chromosomenanalyse der leukämischen Blasten durchgeführt werden; es wurden nicht alle Patienten analysiert, da erst zu einem relativ späten Zeitpunkt der Studie die routinemäßige Untersuchung des blastären Karyotyps stattfand.

Die Behandlung der Patienten erfolgte nach dem DAV-Schema (IDAV für Patienten mit sekundärer AML). Das Behandlungsschema umfasste meist zwei Induktionszyklen mit einem frühen Konsolidationszyklus, welche aus einer Kombination der Chemotherapeutika Cytosin-Arabinosid (AraC), Etoposid (VP-16) und einem Anthracyclin (Daunorubicin oder Idarubicin) bestanden. KM-Punktionen erfolgten wie schon erwähnt bei Diagnose, am Tag 15 nach Beginn der Therapie, vor Beginn des 2. Zyklus, vor Beginn des 3. Zyklus und alle folgenden 3 Monate. Patienten bis 50 Jahre erhielten eine späte Konsolidationstherapie nach einem Hoch-Dosis AraC Schema. Patienten mit einem Alter von über 50 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhielten eine Konsolidation mit einer Intermediär- bis Hoch-Dosis AraC. Patienten mit 1. Rezidiv wurden mit Intermediär- bis Hoch-Dosis AraC und Etoposid behandelt (59).

4.9. Statistische Methoden

Die Gesamtüberlebenszeit (OS) wurde vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum Tod des Patienten bzw. bis zu einer Zensur (z.B. aufgrund einer KMT des Patienten) gerechnet, das Krankheitsfreie Überleben (DFS) vom Zeitpunkt des Erreichens einer 1. Remission bis zum 1. Rezidiv oder Zensur. Die Überlebenskurven wurden nach der Kaplan-Meier Methode bestimmt (60), der Log-Rang-Test wurde zur Berechnung der Signifikanz der Unterschiede im Überleben der verschiedenen Gruppen benutzt (61). Fisher's exact test wurde zur Analyse der Kontingenz-Tafeln des Ansprechens der Patienten auf die Therapie im Verhältnis zur wt-1 mRNA Expression verwendet. Signifikante Unterschiede in Bezug auf wt-1 mRNA Expression und AML-FAB-Typ, Oberflächenmarkerexpression, Karyotyp, Alter, Geschlecht oder Remissionsraten wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney U-Tests und des Chi-Quadrat-Tests ermittelt. Um zu bestimmen, ob die wt-1 mRNA Expression als ein von Alter und Karyotyp unabhängiger prognostischer Faktor zu betrachten ist, wurde von Dr. Ackermann (Abt. für Biomathematik der Universitätsklinik der J. W. Goethe-Universität) eine Cox-Regressions-Analyse durchgeführt.

V. Ergebnisse

5.1. Die kompetitive PCR

Zur Etablierung der kompetitiven Polymerase-Ketten-Reaktion (kPCR) wurde wie im Kapitel Methoden unter Punkt 4.6.3. beschrieben vorgegangen. Zur Validierung der mit einfacher Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gewonnen Ergebnisse wurden insgesamt 20 Patienten-Proben mit unterschiedlich starker wt-1 mRNA Expression untersucht. Es wurden zehn Proben mit fehlendem Signal (-), zwei mit einfach positivem (+), drei mit zweifach positivem (++) sowie fünf mit dreifach positivem Signal (+++) analysiert.

Patient	Alter	Geschlecht	FAB-Typ	Klin.Status	wt-1 Expr.	mRNA (pg/ μ g)
T.M.	61	w	M2	1.CR	-	0
K.A.	40	m	M1	1.CR	-	0
D.O.	17	w	M2	1.CR	-	0
D.O.	17	w	M2	1.CR	-	0
D.O.	17	w	M2	1.CR	-	0,00024
T.M.	61	w	M2	2.CR	-	0
T.M.	61	w	M2	2.CR	-	0
D.O.	17	w	M2	1.CR	-	0
P.W.	32	m	M4	1.CR	-	0
G.M.	72	w	M2	de novo	-	0
J.M.	22	m	M2	de novo	+	0,02334
S.G.	38	m	M2	de novo	+	0,22106
B.A.	72	m	M2	de novo	++	0,18692
P.D.	23	w	M4	de novo	++	2,00254
W.G.	64	w	M4	de novo	++	0,367
K.A.	40	m	M1	de novo	+++	0,15225
T.M.	61	w	M2	de novo	+++	0,8968
D.O.	17	w	M2	de novo	+++	19,03715
T.M.	61	w	M2	1.Rez.	+++	6,99885
D.O.	17	w	M2	1.Rez.	+++	9,48418

Tabelle 2. Übersicht über die mittels kompetitiver PCR untersuchten Patientenproben. Die Mengenangabe erfolgt in pg wt-1 mRNA auf 1 μ g Gesamt-RNA.

Keine der wt-1-Signal negativen Proben zeigten im Agarosegel oder im noch sensitiveren Southern-Blot ein Signal.

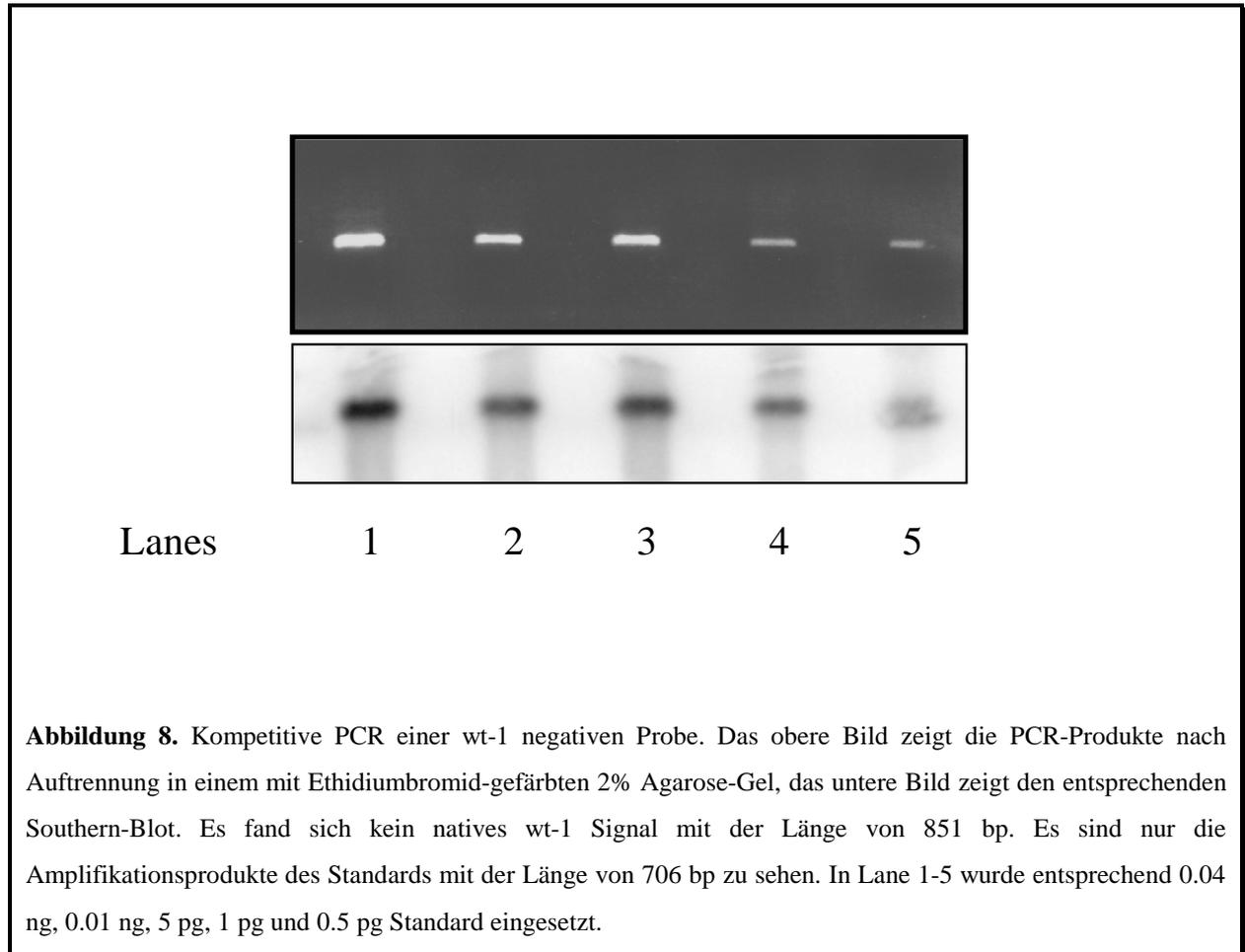


Abbildung 8. Kompetitive PCR einer wt-1 negativen Probe. Das obere Bild zeigt die PCR-Produkte nach Auftrennung in einem mit Ethidiumbromid-gefärbten 2% Agarose-Gel, das untere Bild zeigt den entsprechenden Southern-Blot. Es fand sich kein natives wt-1 Signal mit der Länge von 851 bp. Es sind nur die Amplifikationsprodukte des Standards mit der Länge von 706 bp zu sehen. In Lane 1-5 wurde entsprechend 0.04 ng, 0.01 ng, 5 pg, 1 pg und 0.5 pg Standard eingesetzt.

Die niedrigste mittels kPCR zu detektierende wt-1 RNA Konzentration lag bei ca. 0.001 pg spezifische RNA auf 1 µg Gesamt-RNA. Die wt-1 (+) Proben zeigten ein schwaches Signal, und über die in 4.6.3. beschriebene Regressions-Analyse konnte die wt-1 mRNA Konzentration in der Probe ermittelt werden.

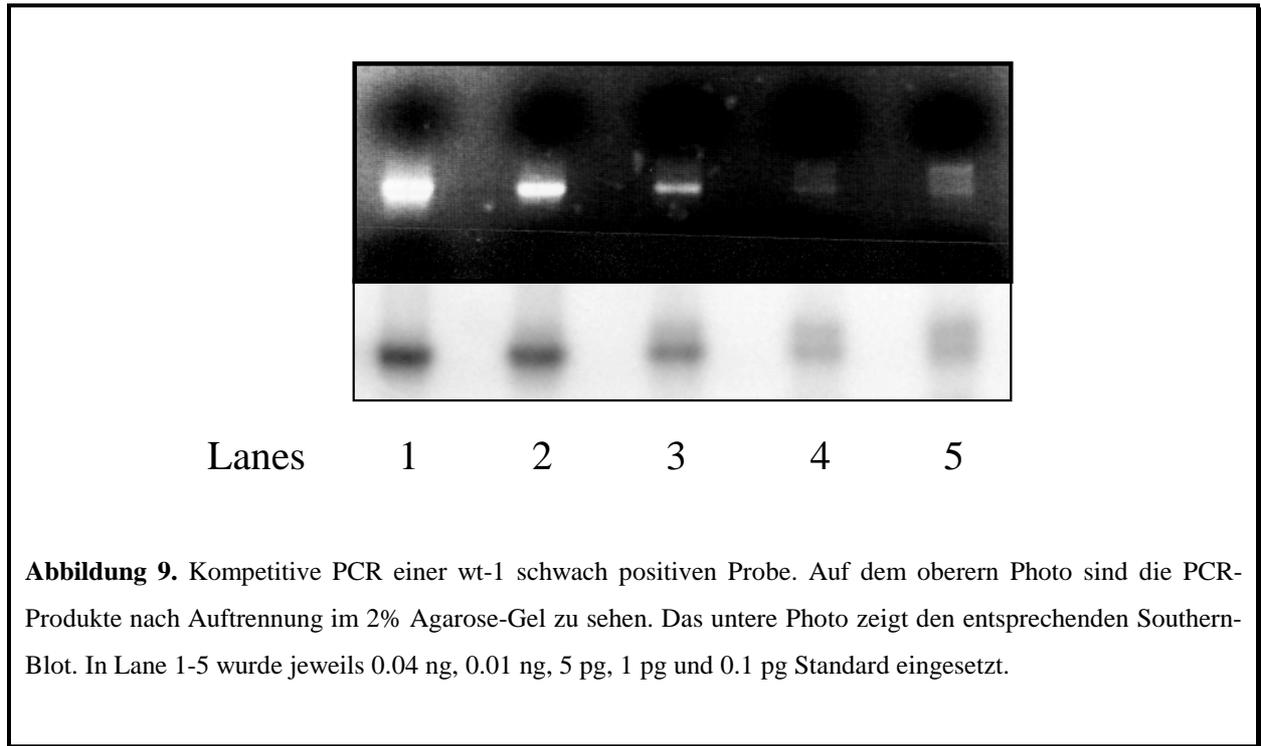


Abbildung 9. Kompetitive PCR einer wt-1 schwach positiven Probe. Auf dem oberem Photo sind die PCR-Produkte nach Auftrennung im 2% Agarose-Gel zu sehen. Das untere Photo zeigt den entsprechenden Southern-Blot. In Lane 1-5 wurde jeweils 0.04 ng, 0.01 ng, 5 pg, 1 pg und 0.1 pg Standard eingesetzt.

Bei den untersuchten schwach wt-1 mRNA exprimierenden Proben lag die mittlere Konzentration bei 0.09 pg (± 0.11) spezifische wt-1 mRNA auf 1 μ g Gesamt-RNA und damit ca. 1-2 \log_{10} höher als bei wt-1 mRNA negativen Proben. In den mittelstark (++) wt-1 exprimierenden Proben lag die Anzahl der spezifischen Transkripte deutlich höher, hier ergab sich eine mittlere Konzentration von 0.8522 pg (± 0.45) wt-1 mRNA in 1 μ g Gesamt-RNA.

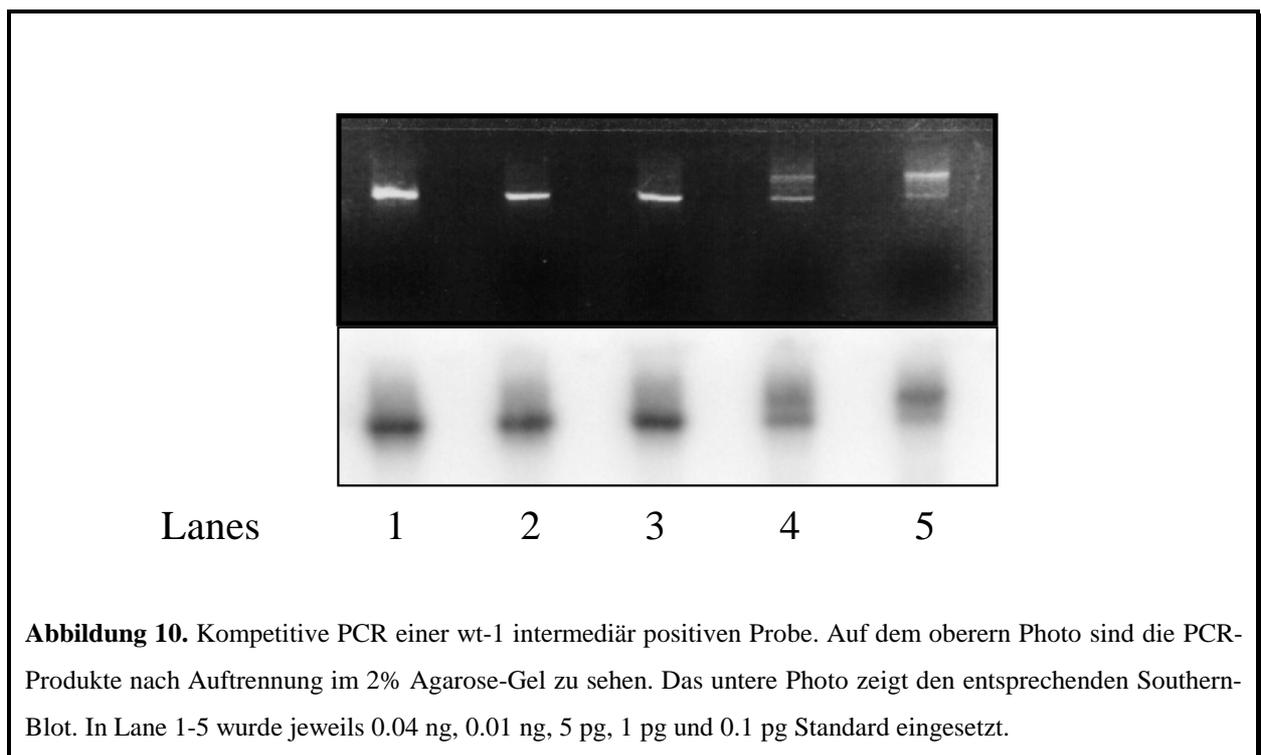


Abbildung 10. Kompetitive PCR einer wt-1 intermediär positiven Probe. Auf dem oberem Photo sind die PCR-Produkte nach Auftrennung im 2% Agarose-Gel zu sehen. Das untere Photo zeigt den entsprechenden Southern-Blot. In Lane 1-5 wurde jeweils 0.04 ng, 0.01 ng, 5 pg, 1 pg und 0.1 pg Standard eingesetzt.

Die mittlere Konzentration in wt-1 hoch exprimierenden Proben überstieg die der zweifach positiven Proben noch einmal um mehr als das zehnfache, sie betrug bei den fünf untersuchten Proben gemittelt 8,92 pg (± 7.8) wt-1 mRNA in 1 μ g Gesamt-RNA.

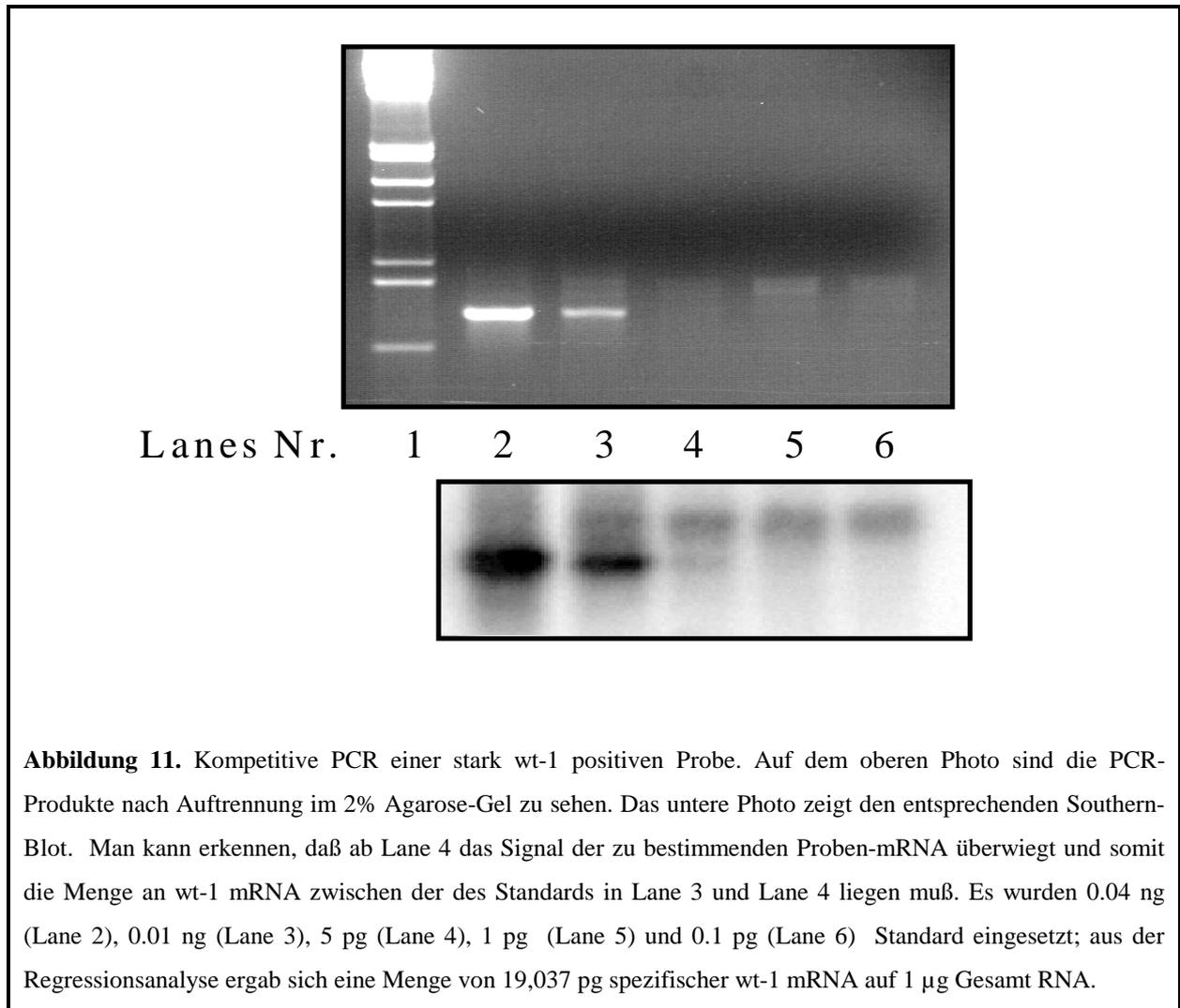


Abbildung 11. Kompetitive PCR einer stark wt-1 positiven Probe. Auf dem oberen Photo sind die PCR-Produkte nach Auftrennung im 2% Agarose-Gel zu sehen. Das untere Photo zeigt den entsprechenden Southern-Blot. Man kann erkennen, daß ab Lane 4 das Signal der zu bestimmenden Proben-mRNA überwiegt und somit die Menge an wt-1 mRNA zwischen der des Standards in Lane 3 und Lane 4 liegen muß. Es wurden 0.04 ng (Lane 2), 0.01 ng (Lane 3), 5 pg (Lane 4), 1 pg (Lane 5) und 0.1 pg (Lane 6) Standard eingesetzt; aus der Regressionsanalyse ergab sich eine Menge von 19,037 pg spezifischer wt-1 mRNA auf 1 μ g Gesamt RNA.

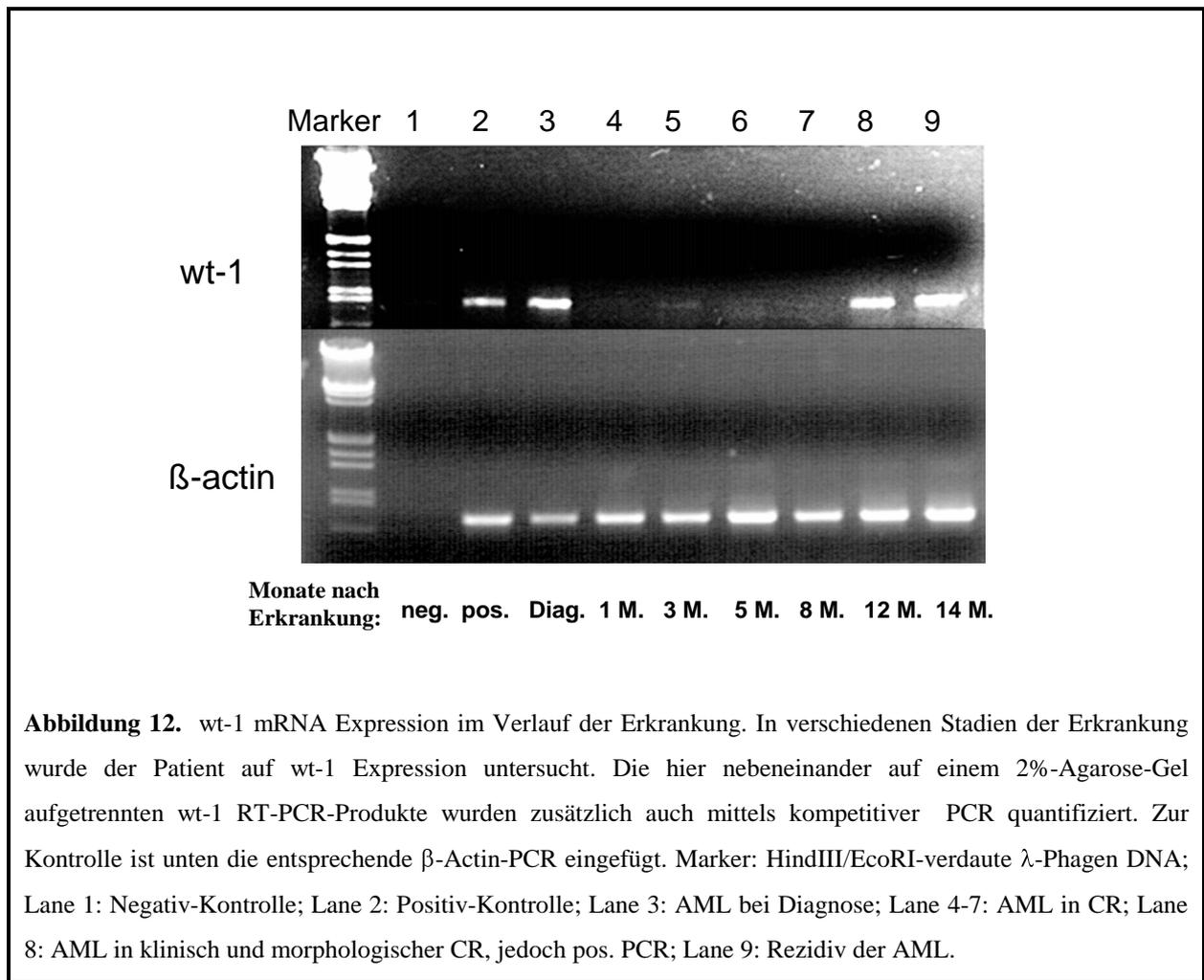
Die Untersuchungen zeigten eine deutliche Übereinstimmung zwischen den mittels einfacher PCR und den mit kompetitiver PCR gewonnenen Werten. Die Expressionsstärke in den einzelnen Gruppen (wt-1 negativ, schwach positiv, intermediär positiv und stark positiv) unterschied jeweils um mindestens eine Zehnerpotenz.

wt-1 Expression:	wt-1 mRNA (pg wt-1 mRNA in 1 μ g RNA)	% (+++ = 100%)
-	< 0,001	0,00
+	0,09	1,23
++	0,85	11,65
+++	7,31	100,00

Tabelle 3. Vergleich der prozentualen Expressionsstärken der einzelnen Gruppen anhand der mittels kompetitiver PCR gewonnenen Daten.

Diese Tatsache erlaubte es, die Gruppe der wt-1 mRNA negativen mit der der schwach positiven und die Gruppe der intermediär positiven mit der der stark positiven zur Berechnung der Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der wt-1 mRNA Expression zusammenzufassen.

Unter dem Aspekt des Monitoring der AML war es von besonderem Interesse, die wt-1 mRNA Expression im Verlauf der Erkrankung quantitativ zu bestimmen. Dazu wurden bei einem Patienten mit einer AML FAB M2 Proben aus Knochenmarkspunktionen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, nach einem Monat (in 1. CR), nach 3 Monaten, nach 5 Monaten, nach 8 Monaten, nach 12 Monaten und nach 14 Monaten bei 1. Rezidiv (klinisch und morphologisch) mittels kompetitiver PCR untersucht.



Bei Diagnose fand sich eine starke wt-1 mRNA Expression mit 19.037 pg spezifischer RNA auf 1 µg Gesamt RNA. Nachdem der Patient nach einem Monat eine komplette Remission erreicht hatte, konnten keine wt-1 mRNA-Transkripte mehr nachgewiesen werden. Während der folgenden Monate waren die Proben bei anhaltender klinischer und morphologischer Remission weiterhin wt-1 mRNA negativ. 12 Monate nach Diagnosestellung fand sich jedoch trotz fehlendem klinischem und morphologischem Hinweis auf ein Rezidiv eine mittelstarke

wt-1 mRNA Expression. Leider konnte diese Probe nicht quantifiziert werden, da nicht ausreichend Material zur Verfügung stand. Bei der zwei Monate später aufgrund klinischer Symptomatik (Blutwertveränderungen) erfolgten Kontrollpunktion zeigte sich morphologisch ein Rezidiv der AML. Die wt-1 mRNA Konzentration in dieser Probe lag bei 9.484 pg in 1 µg Gesamt-RNA.

5.2. WT-1 Protein Expression in AML-Zelllinien

Zu Beginn der Studie lag der Gedanke nahe, neben der wt-1 mRNA Expression auch die WT-1 Protein Expression zu bestimmen, da sich die Protein Expression gegebenenfalls leicht und präzise über ein ELISA messen ließe. Hierzu wurde zunächst die Expression des WT-1 Proteins mittels Western-Blot in verschiedenen leukämischen Zelllinien, die in der PCR wt-1 mRNA positiv waren (HL60, K562, HEL 92.1.7.), analysiert. Es ließen sich jedoch bei Untersuchungen mit dem polyklonalen Antikörper WT-C19 der Firma Santa Cruz unter Verwendung verschiedener Zellyse-Protokolle keine spezifischen Banden nachweisen. Dieses Phänomen wurde auch von anderen Gruppen berichtet (62), während wiederum einige WT-1 Protein-Expression in leukämischen Zelllinien zeigen konnten (89). Um die prinzipielle Funktionalität des Nachweisverfahrens zu demonstrieren, wurde WT-1 Protein mittels In-Vitro-Translation hergestellt. Hierzu wurde der von M. Gessler (20) freundlicherweise zur Verfügung gestellte wt-1 cDNA-Klon LK15 (komplette wt-1 cDNA kloniert in die Eco RI-Schnittstelle vor dem T3-Promotor eines pBluescript SK-Vektors in einen Bluescript KS-Plasmid umklont und die ersten 300 bp mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sac II herausgeschnitten, da sich 5'-wärts des vermuteten Start-ATG des WT-1 Proteins eine Reihe eventuell interferierender anderer Start-Kodons befinden (63, 64). Retikulozyten-Lysat eines IVT-Kits der Firma Promega wurde mit diesem Plasmid (LC15) programmiert, wobei das entstehende Protein durch Einbau von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert wurde. Zur Kontrolle wurden 2 µl des Lysats mittels Acrylamid-Gel aufgetrennt und nach einem Trocknungsvorgang autoradiographiert. Es zeigte sich eine Bande bei 50 kDa, welche dem rekombinanten WT-1 Protein entsprach.

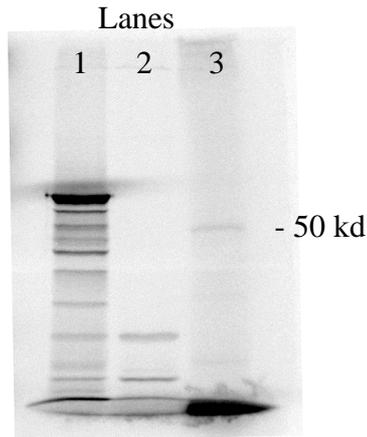


Abbildung 13. Autoradiographie von Produkten einer In-Vitro-Translation nach SDS-Page-Elektrophorese. Lane 1: Retikulozyten-Lysat mit leerem Vektor programmiert. Lane 2: Kontrolle (β -Kette des IFN- γ -Rezeptors). Lane 3: Mit LC 15 (Voll-Längen wt-1 cDNA) programmiertes Lysat.

Mit dem durch IVT gewonnenen WT-1 Protein als Positiv-Kontrolle wurde nun die Untersuchung der endogenen WT-1 Protein Expression in verschiedenen leukämischen Zelllinien wiederholt; jetzt zeigte sich z.B. in K562 Zellen auch eine Bande auf der WT-1 entsprechenden Höhe von 50 kD.

WT-1 Western-Blot



Abbildung 14. Western-Blot eines Lysats von K562 Zellen. 1×10^6 Zellen wurden abzentrifugiert und in $100 \mu\text{l}$ 2x SDS-Sample-Buffer 10 min. bei 95°C gekocht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden $20 \mu\text{l}$ Lysat mittels SDS-Page aufgetrennt und das endogene WT-1 Protein nach Blotting auf eine PVDF-Membran mittels des Antikörpers WT-C19 detektiert.

Da der spezifische Nachweis des endogenen WT-1 Proteins mit den vorhandenen Antikörpern in leukämischen Zelllinien nur dann gelang, wenn man die Zellen minutenlang in SDS-Samplebuffer kochte, wohingegen mit verschiedenen Lysisbuffern keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde von dem Versuch, im Rahmen der Studie ein ELISA zum Nachweis des WT-1 Proteins in leukämischen Blasten der Patienten zu etablieren, jedoch Abstand genommen.

5.3. Expression von wt-1 mRNA in AML-Zellen

Im Rahmen der Studie wurde in mehr als 500 Proben die wt-1 mRNA Expression mittels RT-PCR bestimmt. Mononukleäre Zellen wurden mittels Ficoll-Gradienten-Sedimentierung (siehe 4.7.3.) aus dem Knochenmark (KM) von Patienten, die sich jeweils gerade in Behandlung befanden und punktiert wurden, gewonnen. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert (siehe 4.1.10.), mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe 4.1.12.) und die β -Aktin und wt-1 mRNA mit entsprechenden spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert (siehe 4.6.). Die β -Aktin mRNA Expression wurde bei allen Proben mituntersucht. Dies geschah zum einen als Kontrolle für die erfolgreiche RNA-Extraktion und Transkription, zum anderen um die Expressionsstärke des wt-1 Gens mit der des β -Aktin-Gens, das als sogenanntes 'Housekeeping-Gene' in den meisten Zellen ungefähr gleich stark exprimiert wird (65), zu korrelieren und einen Vergleich der wt-1 Expression in verschiedenen Proben zu ermöglichen. Die Expression wurde, wie oben beschrieben, je nach Stärke des Signals der mit Ethidiumbromid gefärbten Transkripte im Agarosegel in negativ (-), schwach positiv (+), intermediär (++) und stark positiv (+++) eingeteilt.

Insgesamt wurden 129 Patienten mit neu diagnostizierter AML untersucht, davon 114 Patienten mit de novo AML und 15 mit vorhergehendem Myelodysplastischem Syndrom (MDS). Bei 32 Patienten wurde im 1. Rezidiv die wt-1 mRNA Expression in Zellen aus dem Knochenmark analysiert, davon bei 22 Patienten, die auch schon bei Erstdiagnose untersucht werden konnten.

Von den 161 Proben von Patienten mit klinisch und morphologisch manifester Erkrankung waren 124 wt-1 mRNA positiv (d.h. wt-1 mRNA (+), (++) oder (+++)), das entspricht 77%. Es gab keine deutlichen Unterschiede in der Expressionshäufigkeit zwischen Patienten mit de novo AML und Patienten mit AML nach MDS (74,6 % gegenüber 73,3 %). Bei Patienten im 1. Rezidiv lag die Expressionshäufigkeit jedoch bei 87,5%. Die wt-1 Expression scheint vom Alter der Patienten unabhängig zu sein. Unterteilte man die Patienten nach der therapeutisch

und prognostisch wichtigen Grenze von 60 Jahren in zwei Gruppen, so zeigte sich kein Unterschied in der Expressionshäufigkeit (76,1% in der Gruppe der Patienten unter 60 Jahren gegenüber 76,6% in der Gruppe über 60 Jahren). Die wt-1 mRNA Expressionsstärke zeigte keine altersabhängigen Schwankungen.

Die Expressionshäufigkeit lag bei den männlichen Patienten geringfügig höher als bei den weiblichen Patienten (73,1% gegenüber 79,2%).

Da die FAB-Klassifikation der AML insbesondere auch die verschiedenen Entwicklungsstadien der myeloischen Zelle vom Myeloblast zur jeweils spezifischen Ausdifferenzierung berücksichtigt, lag eine Verbindung zwischen FAB-Typ und wt-1 mRNA Expression nahe. Die Expressionshäufigkeit war jedoch bei allen FAB-Typen ähnlich hoch, ausgenommen von Patienten mit AML FAB-Typ M5; hier zeigte sich eine signifikant ($p = 0,0025$) seltenere wt-1 mRNA Expression mit nur 40%.

	wt-1 positive Patienten	Prozent
AML Patienten insgesamt*	124/161	77
Patienten mit de novo AML	85/114	74,6
Patienten mit AML n. MDS	11/15	73,3
AML Patienten mit 1.Rez.*	28/32	87,5
FAB-Subtyp der de novo AML		
M0	3/3	100
M1	8/9	88,9
M2	29/39	74,4
M3	7/8	87,5
M4	28/36	77,8
M5	6/15	40
M6	3/3	100
ND	1/1	
AML Patienten unter 60 Jahren	70/92	76,1
AML Patienten über 60 Jahren	36/47	76,6

Tabelle 4. Wt-1 Expression in Patienten mit AML entsprechend ihres FAB-Subtyps und ihres Alters. Alle Patienten, die schwach, mittelgradig oder stark wt-1-Signale in der PCR aufwiesen, wurden zu der Gruppe der wt-1 positiven Patienten gerechnet. Bei einem Patienten konnte der FAB-Typ nicht bestimmt werden (ND).

* 22 Patienten aus dieser Gruppe wurden sowohl zum Zeitpunkt der Diagnose als auch im 1. Rezidiv der Erkrankung untersucht.

In Patienten mit AML FAB M5 wurde wt-1 signifikant seltener exprimiert ($P < 0,0025$).

Zur Abwägung etwaiger Zusammenhänge zwischen wt-1 mRNA- und Oberflächenantigen-Expression wurden ca. $1 \cdot 10^6$ mononukleäre Zellen, wie in 4.7.5. beschrieben, mit einem

gegen das entsprechende Oberflächenantigen gerichteten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper inkubiert und die prozentuale Häufigkeit der für das Antigen positive Zellen bestimmt. Zur Beurteilung von Expressionsunterschieden der Oberflächenantigene im Verhältnis zur wt-1 mRNA Expression wurde die mittlere Expressionshäufigkeit des jeweiligen Oberflächenmarkers bei allen Patienten bestimmt und danach die Patienten in jeweils eine Gruppe, die eine über bzw. unter dem Durchschnitt liegende Oberflächenmarkerexpression aufwies, unterteilt. Nun konnte untersucht werden, ob die niedrig bzw. die hoch wt-1 mRNA exprimierenden Patienten sich gehäuft in einer der beiden Gruppen wiederfanden.

Die Immunphänotypisierung erfolgte im Rahmen einer Studie über die Bedeutung der Oberflächenmarkerexpression für die Diagnosefindung, als Verlaufsparemeter und als möglicher prognostischer Faktor. Da die Patienten nicht routinemäßig immunphänotypisiert wurden, liegen nicht für alle Patienten Befunde über die Oberflächenmarkerexpression vor. Im Einzelnen wurde die Expression der Oberflächen-Antigene CD 7, CD 11c, CD 14, CD 15, CD 19, CD 33 und CD 34 untersucht. CD 7 ist ein Pan-T-Antigen, CD 11c, CD 14 und CD 15 werden insbesondere als Monozyten-, Granulozyten- und NK-Zelloberflächenantigene exprimiert, CD 19 ist ein B-Zell-Marker, das CD 33 Antigen findet sich vor allem auf Monozyten, auf leukämischen Zellen fast aller AML-Typen und auf myeloischen Vorläuferzellen, und CD 34 ist ein Marker für frühe myeloische Vorläuferzellen und hämatopoetische Stammzellen.

Bei Korrelation von Oberflächenantigen- und wt-1 mRNA Expression zeigte sich bei den Markern CD 33 ($p=0.005$) und CD 34 ($p=0.036$) ein signifikanter Zusammenhang.

wt-1 Expression	Anzahl Patienten insgesamt	-/+	++/+++	P-Wert
CD ³⁴⁺ > 37%	65	40 (62)	25 (38)	
CD ³⁴⁺ < 37%	58	48 (48)	38 (52)	< 0,036
CD ¹⁵⁺ > 38%	62	35 (56)	27 (44)	
CD ¹⁵⁺ < 38%	64	29 (45)	35 (55)	NS
CD ³³⁺ > 92%	62	24 (39)	38 (61)	
CD ³³⁺ < 92%	69	44 (64)	25 (36)	< 0,005
CD ^{11c+} > 35%	62	28 (45)	34 (55)	
CD ^{11c+} < 35%	63	36 (57)	27 (43)	NS
CD ¹⁹⁺ > 25%	59	28 (47)	31 (53)	
CD ¹⁹⁺ < 25%	60	30 (50)	30 (50)	NS
CD ⁷⁺ > 19%	65	34 (52)	31 (48)	
CD ⁷⁺ < 19%	64	30 (47)	34 (53)	NS

Tabelle 5. Wt-1 mRNA Expression im Verhältnis zur Oberflächenmarker-Expression (OFME) der AML-Blasten. Als Cut-Off-Wert wurde der Median aller gemessenen prozentualen OFME gewählt. Die Gesamtzahl der jeweilig auf eine bestimmte OFME untersuchten Patienten schwankt, da nicht alle Proben einer Untersuchung zugänglich waren. Die Zahlen sind die Anzahl von Patienten mit den Prozentzahlen in Klammern. 'NS' bedeutet nicht signifikant.

Der Oberflächenmarker CD 33 fand sich im Mittel auf 92% der Zellen aller Patienten. Dabei lag bei 44 von 64 (69%) wt-1 mRNA niedrig exprimierenden Patienten die CD 33 Expression unter 92%, wohingegen nur 25 von 63 (40%) wt-1 mRNA hoch exprimierenden Patienten mehr als 92% CD 33 Expression aufwiesen. Das Oberflächenantigen CD 34, welches eine mittlere prozentuale Expressionshäufigkeit von 37% aufwies, wurde dagegen häufiger auf Zellen von wt-1 mRNA niedrig exprimierenden Patienten gefunden (40 von 88 (45%) wt-1 (-)/(+) > 37% Expression gegenüber 38 von 63 (60%) wt-1 (++)/(+++ < 37%). Tendenziell scheint also eine niedrige wt-1 mRNA Expression mit einer erhöhten CD 34 und einer verminderten CD 33 Expression und umgekehrt eine hohe wt-1 mRNA Expression mit einer niedrigen CD 34 und einer hohen CD33 Expression einherzugehen.

Die Analyse auf chromosomale Aberrationen in den leukämischen Zellen wurde zum Teil mit Hilfe der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis spezifischer Veränderungen, insbesondere der mit einer günstigen Prognose verbundenen Karyotypen t(15;17), t(8;21) und inv(16), durchgeführt.

Karyotyp	Anzahl Proben	%	wt-1(-)	wt-1(+)	wt-1(++)	wt-1(+++)
Normaler Karyotyp	27	45,8	9	5	7	6
Irregulärer Karyotyp	22	37,3	6	10	2	4
inv(16)	3	5,1	0	1	2	0
t(8;21)	3	5,1	1	1	1	0
t(15;17)	4	6,8	1	1	0	2
Gesamt	59	100	17	18	12	12

Tabelle 6. Übersicht der wt-1 Expression und Karyotyp.

Komplexe Veränderungen wie numerische Aberrationen wurden mittels 'klassischer' Chromosomenanalyse diagnostiziert. Zu einzelnen Gruppen zusammengefaßt wurden danach Patienten mit den oben genannten mit günstiger Prognose verbundenen Karyotypen, Patienten mit normalem Karyotyp sowie Patienten mit verschiedenen komplexen, mit einer schlechten Prognose behafteten Karyotypen. Insgesamt war die Chromosomenanalyse von 59 Patienten verfügbar, davon wiesen die leukämischen Zellen von 10 Patienten einen günstigen Karyotyp auf, 27 Patienten zeigten keine chromosomale Veränderungen und 22 Patienten hatten komplexe Aberrationen. Die wt-1 mRNA Expression war in allen drei Gruppen ähnlich, wobei auffiel, daß der Anteil der Patienten mit ungünstigem Karyotyp in der Gruppe der niedrig (negativ (-) und schwach positiv (+)) wt-1 exprimierenden mit 16 von 22 (73%) hoch war, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

Karyotyp	Proben Gesamt	wt-1 -/+	wt-1 ++/+++
Günstiger Karyotyp	10	5 (50)	5 (50)
Normaler Karyotyp	27	14 (52)	13 (48)
Ungünstiger Karyotyp	22	16 (73)	6 (27)

Tabelle 7. Korrelation wt-1 Expression mit prognostisch unterschiedlichem Karyotypen.

5.4. wt-1 mRNA Expression in aus peripherem Blut gewonnenen Mononukleären Zellen

Es wurden insgesamt 33 Proben von PBMNC auf ihre wt-1 Expression untersucht. Bei 21 Proben konnten parallel dazu zur gleichen Zeit aus dem Knochenmark gewonnene Zellen

mittels wt-1 RT-PCR untersucht werden. Die Ergebnisse aus Knochenmark und peripherem Blut korrelierten gut; es zeigte sich ein annähernd übereinstimmendes Expressionsmuster. In 16 von 21 Proben lag die wt-1 Expressionsstärke im peripheren Blut ebenso hoch bzw. in 3 Fällen sogar leicht höher als die im Knochenmark. Nur in zwei Fällen fand sich eine deutlich schwächere wt-1 Expression im peripheren Blut als im Knochenmark.

5.5. wt-1 mRNA Expression, Ansprechen und Prognose der Patienten

Um einen möglichen Einfluß der wt-1 Expression auf das Ansprechen der Patienten auf die Chemotherapie beurteilen zu können, wurde ermittelt, wieviele Patienten mit jeweils negativer, schwach positiver, intermediär positiver und stark positiver wt-1 mRNA Expression nach dem ersten oder zweiten Zyklus eine komplette Remission (CR) erreichten. Gelangten die Patienten nach zwei Zyklen Chemotherapie nicht in CR, wurden sie als Therapieversager gewertet, auch wenn sie im weiteren Verlauf noch in CR kamen.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Ansprechraten zwischen den einzelnen Gruppen.

wt-1 Expression	Anzahl Patienten insgesamt	-/+	++/+++	P-Wert
CR _{alle}	91/139 (65)	49/71 (69)	42/68 (62)	NS
CR _{de novo}	76/114 (67)	42/59 (71)	34/55 (62)	NS

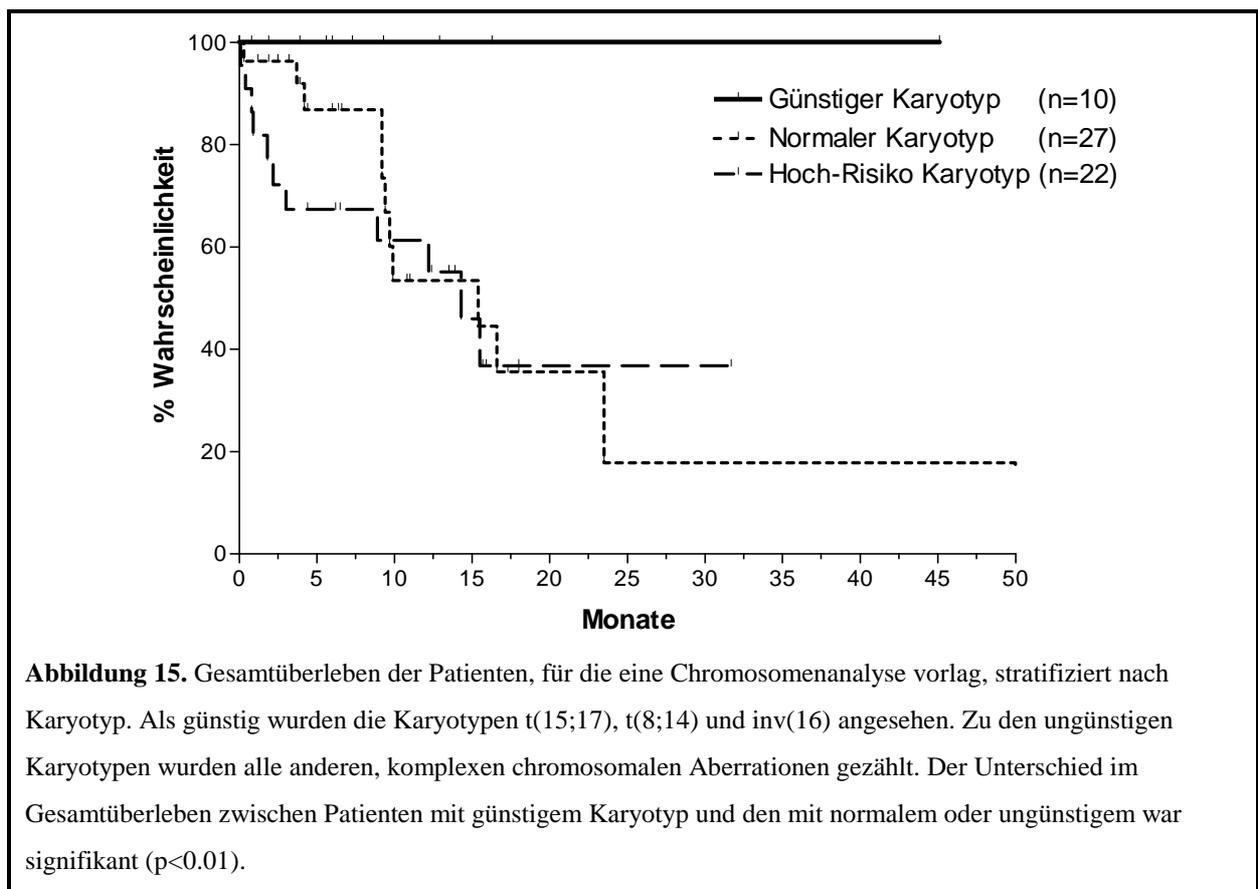
Tabelle 8. Ansprechraten in den Patienten-Gruppen mit niedriger (-/+) gegenüber der Gruppe mit hoher (++) wt-1 Expression. In den Klammern sind die Werte in Prozent angegeben.

Jedoch war eine Tendenz zu höheren Ansprechraten bei den nicht- bzw. niedrig wt-1 exprimierenden Patienten sichtbar. Im Einzelnen erreichten von allen Patienten 69,7% der Patienten mit negativer, 68,4% mit schwacher, 61,7% mit intermediär positiver und 64,7% mit starker wt-1 Expression eine CR nach maximal zwei Zyklen. In der Gruppe der Patienten mit AML de novo waren die Unterschiede noch etwas deutlicher, mit einer CR-Rate von 72,4% bei wt-1 negativen Patienten, 70% bei schwach wt-1 positiven Patienten, 59,2% bei intermediär positiven Patienten und 64,3% bei stark wt-1 positiven Patienten.

Zur Beurteilung eines möglichen Einflusses der wt-1 mRNA Expression auf die Prognose der AML wurde das Krankheits-freie Überleben und das Gesamt Überleben der AML-Patienten in

Relation zur jeweiligen wt-1 mRNA Expression untersucht. Das Krankheits-freie Überleben ist definiert als der Zeitraum ab dem Erreichen einer kompletten Remission bis zum 1. Rezidiv oder einem anderen zensierenden Ereignis. Das Gesamt-Überleben ist definiert als der Zeitraum von der Diagnosestellung bis zum Tod des Patienten. Die Überlebenskurven wurden nach einer Methode von Kaplan und Meier erstellt, wobei die Unterschiede in den Kurvenverläufen mittels des Log-Rank-Tests auf mögliche Signifikanzen geprüft wurden. Zum Vergleich wurden die wt-1 negativen und die schwach wt-1 mRNA exprimierenden Patienten ebenso wie die intermediär und stark wt-1 exprimierenden Patienten zu jeweils einer Gruppe zusammengefaßt. Die Patienten, die autolog oder allogenen Knochenmark-transplantiert wurden, wurden zum Zeitpunkt der Transplantation zensiert.

Es sind verschiedene Faktoren bekannt, die sich auf die Überlebenszeit auswirken. Als bedeutendste sind das Alter des Patienten sowie der Karyotyp der AML-Zellen zu nennen. Diese Faktoren stellten auch in unserem untersuchten Patientenkollektiv signifikante prognostische Faktoren da.



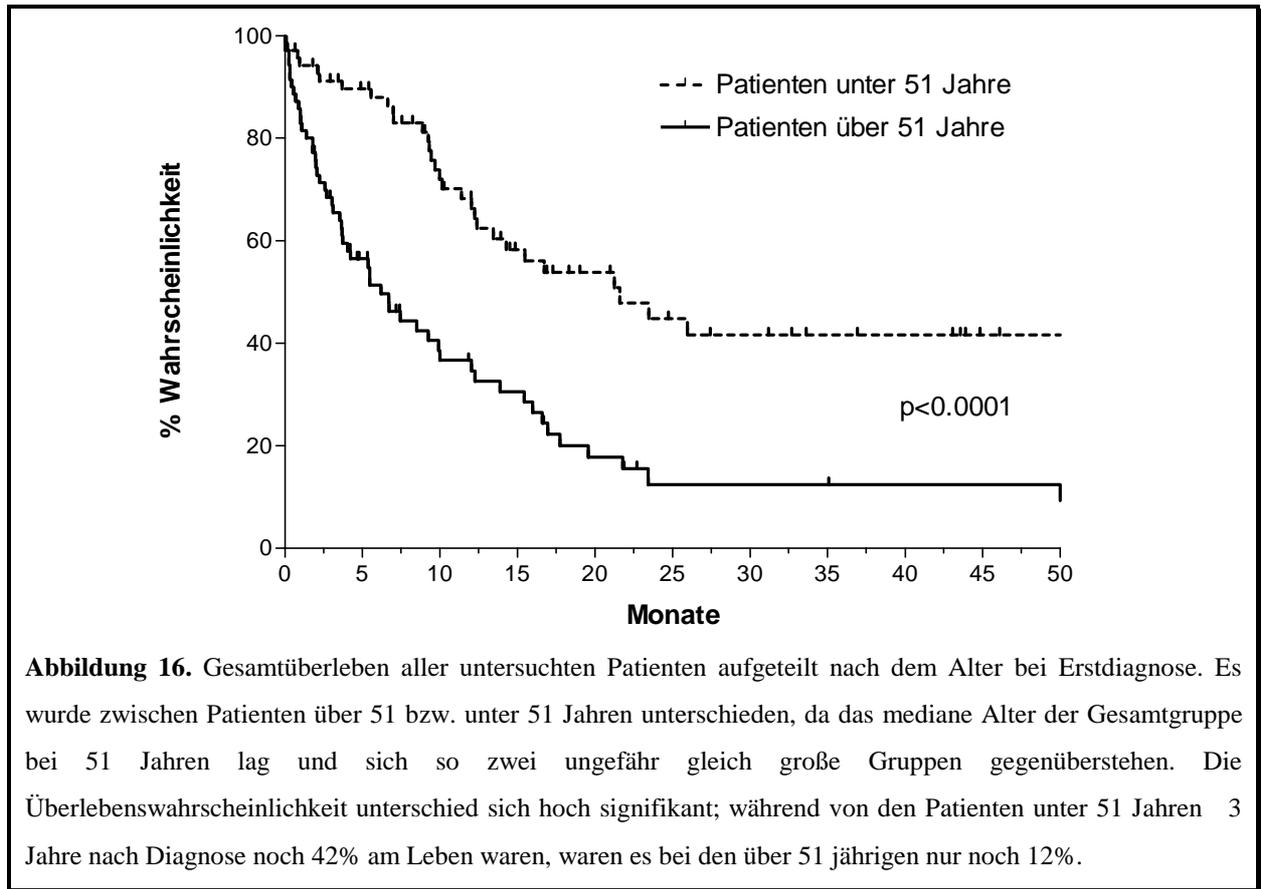


Abbildung 16. Gesamtüberleben aller untersuchten Patienten aufgeteilt nach dem Alter bei Erstdiagnose. Es wurde zwischen Patienten über 51 bzw. unter 51 Jahren unterschieden, da das mediane Alter der Gesamtgruppe bei 51 Jahren lag und sich so zwei ungefähr gleich große Gruppen gegenüberstehen. Die Überlebenswahrscheinlichkeit unterschied sich hoch signifikant; während von den Patienten unter 51 Jahren 3 Jahre nach Diagnose noch 42% am Leben waren, waren es bei den über 51 jährigen nur noch 12%.

Der mediane Beobachtungszeitraum lag bei 27,44 Monaten für alle Patienten bzw. bei 24,44 Monaten bei Patienten mit de novo AML.

Die 1- und die 3-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit für alle Patienten lag bei 48% und 24%.

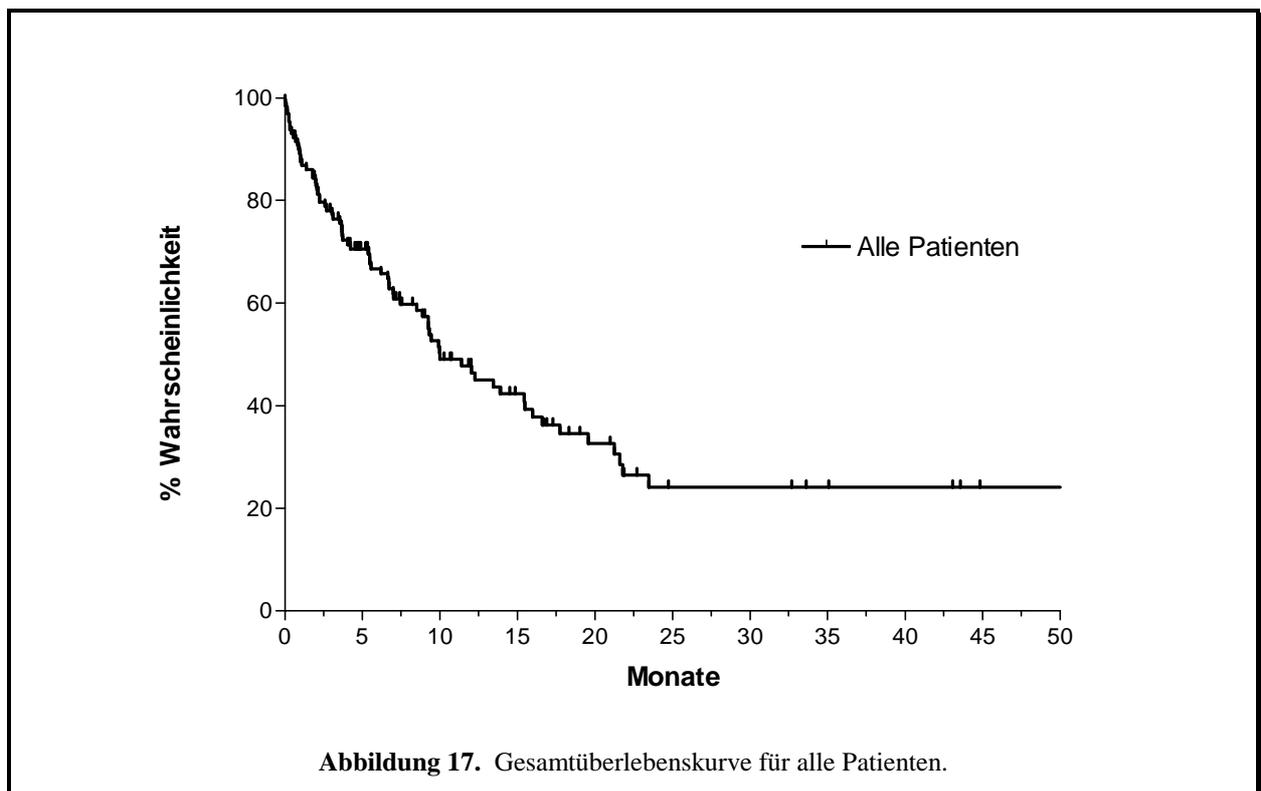
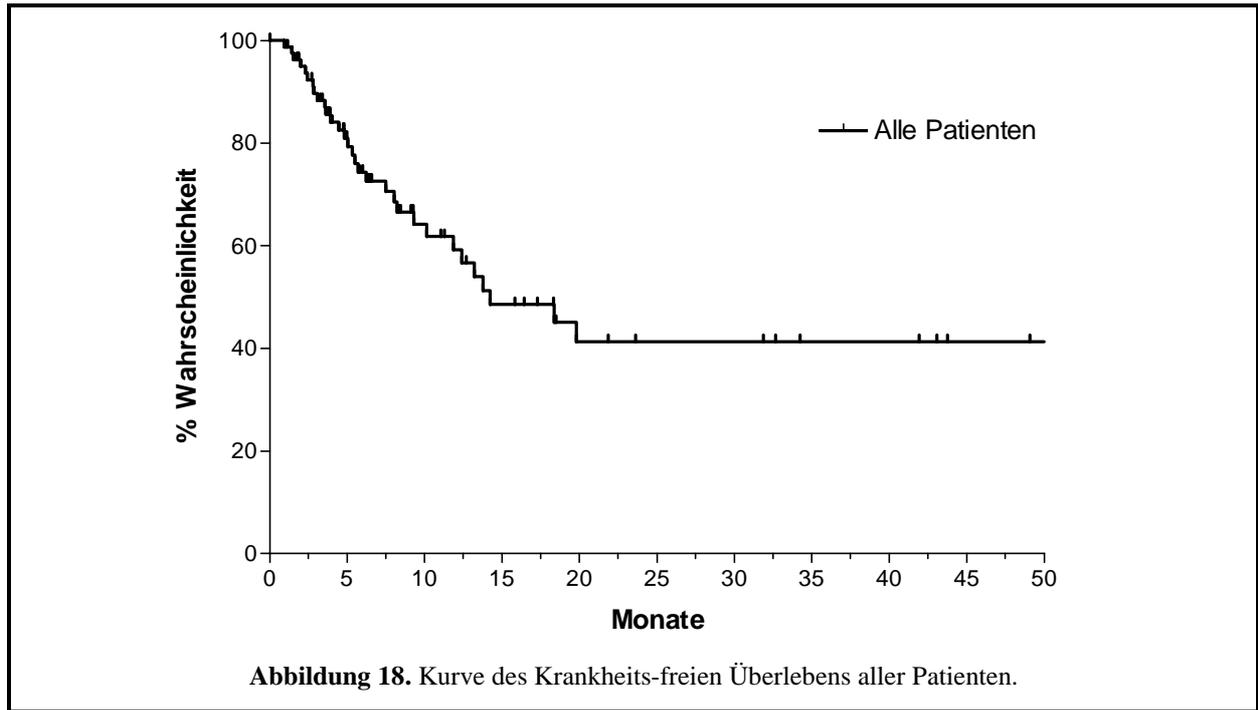
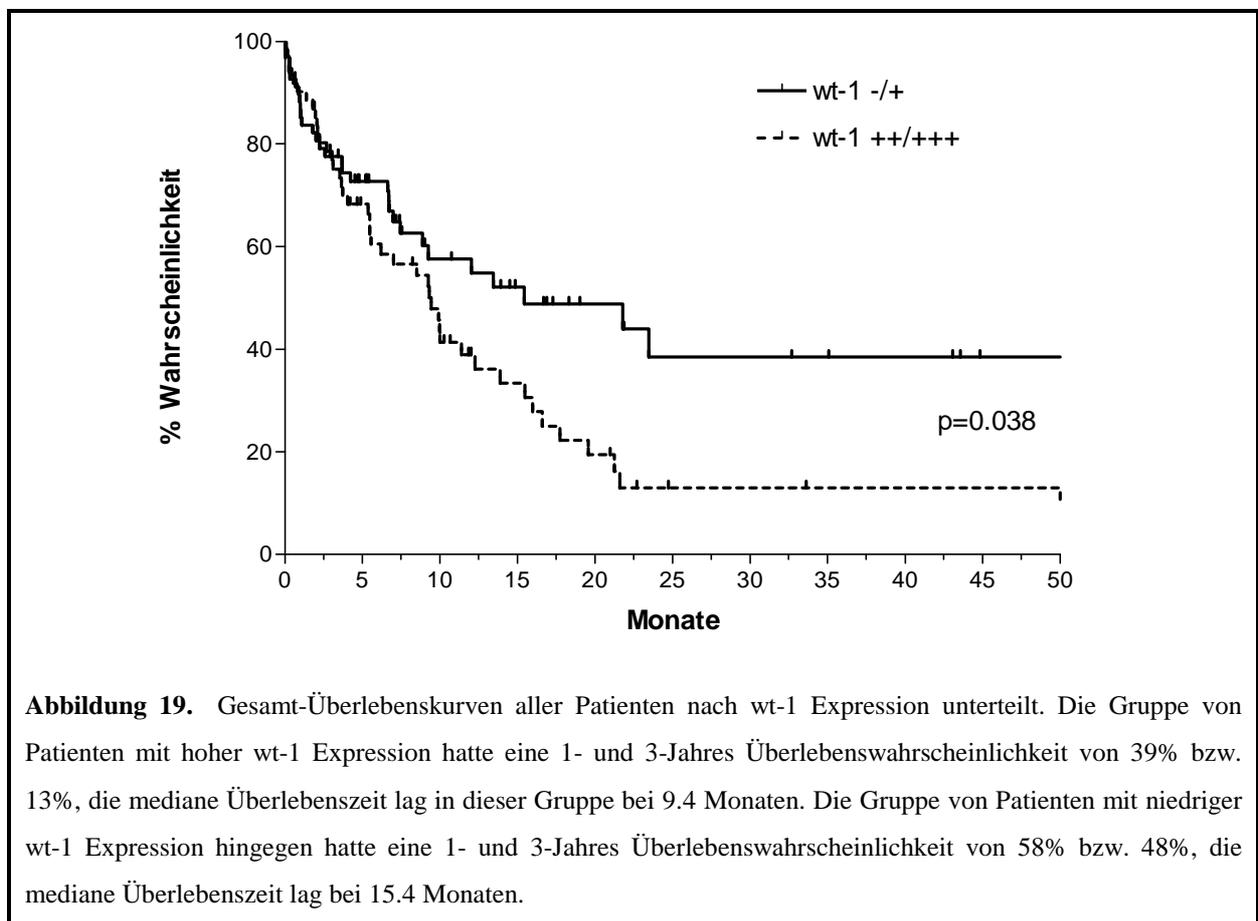


Abbildung 17. Gesamtüberlebenskurve für alle Patienten.

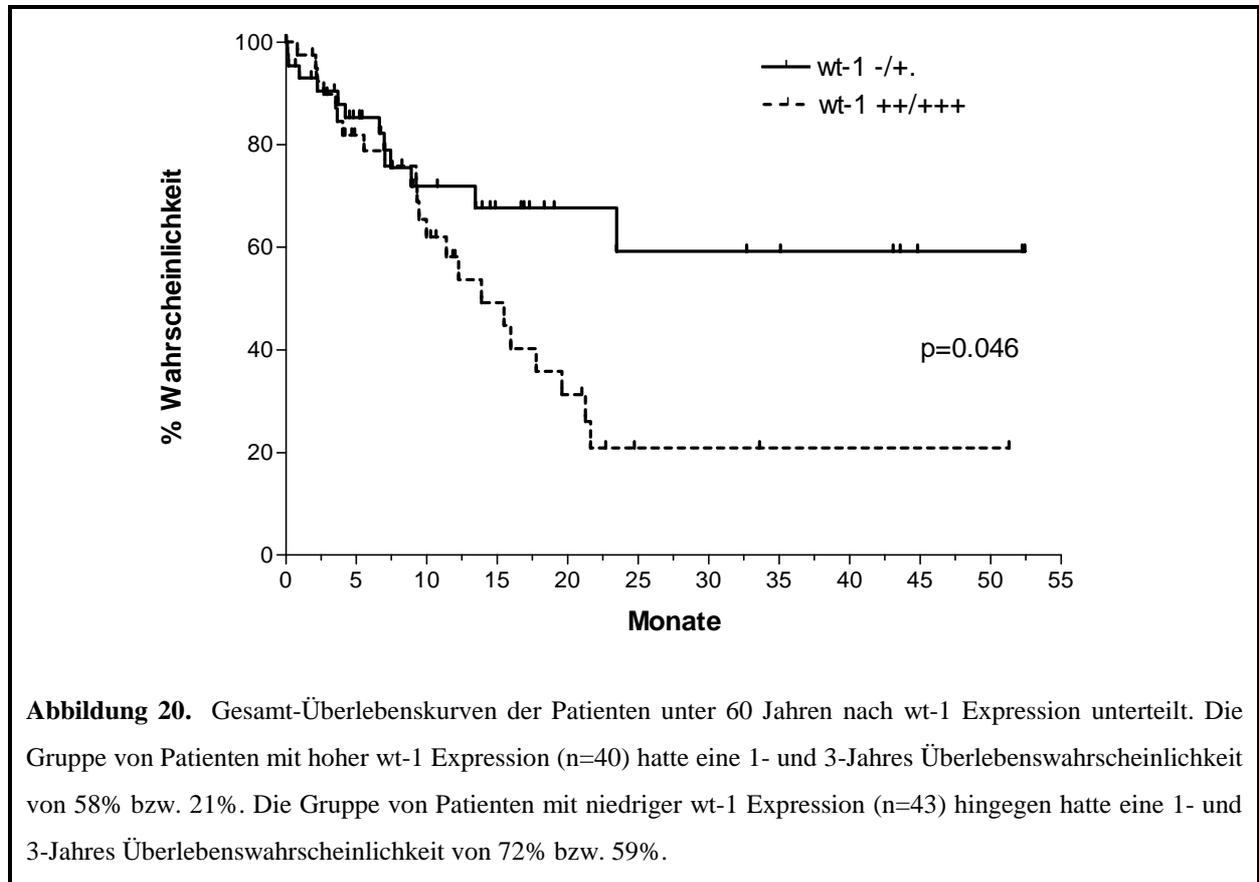
Das Rezidiv-freie Überleben lag bei 58% nach 1 bzw. 41% nach 3 Jahren.



Vergleich man die Gruppe von Patienten mit niedriger wt-1 Expression mit der mit hoher Expression, so zeigte sich ein deutlicher Unterschied. Die 3-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit lag bei Patienten mit niedriger wt-1 mRNA Expression bei 38% gegenüber 13% in der Gruppe mit hoher wt-1 Expression ($p = 0.038$).

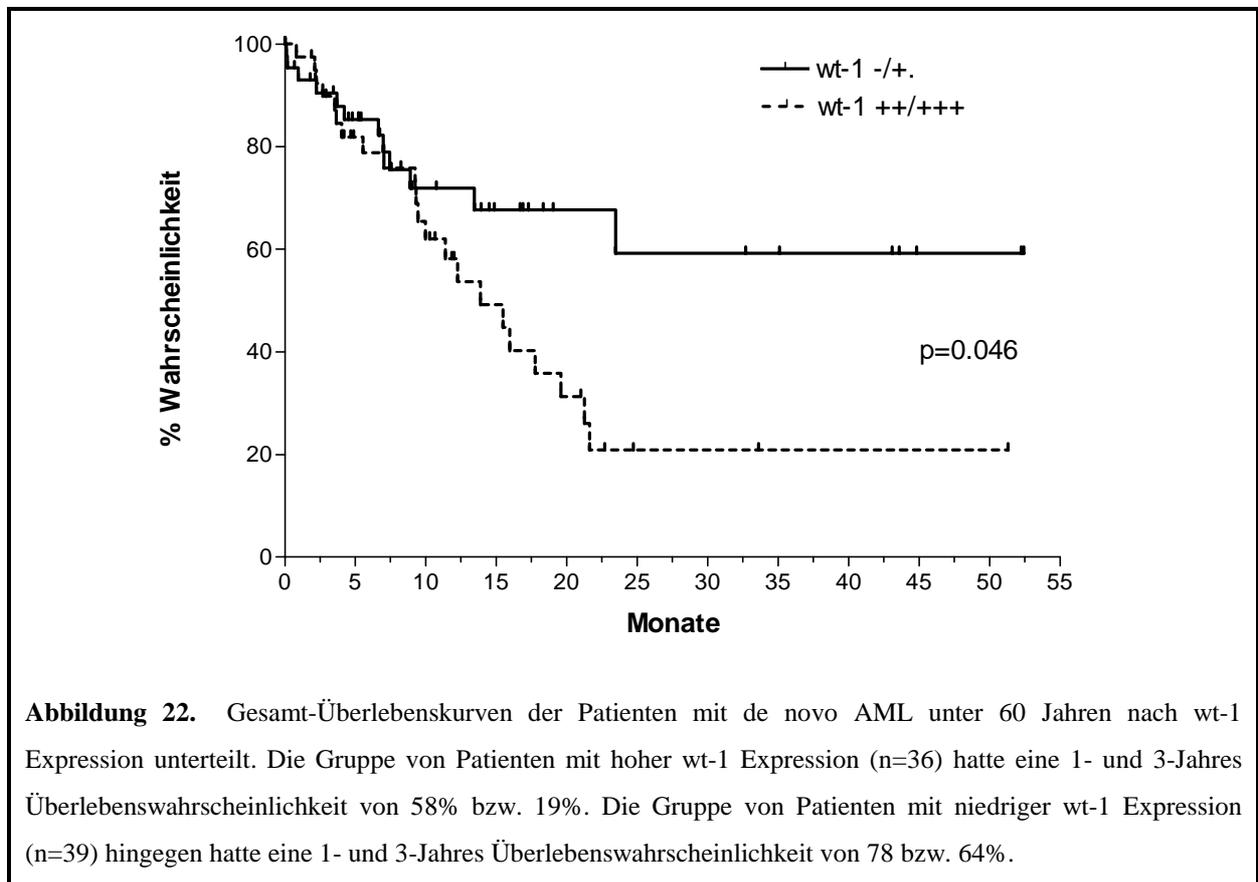
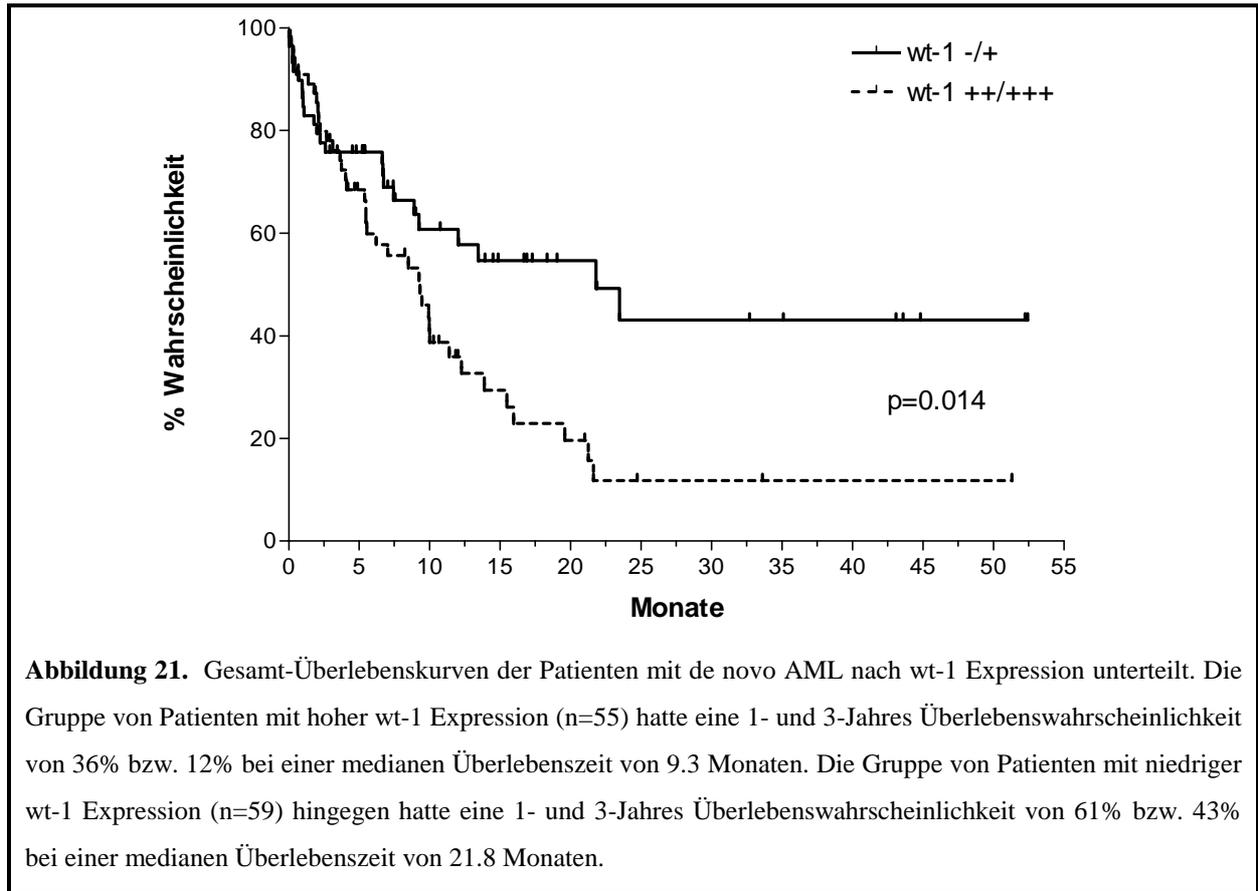


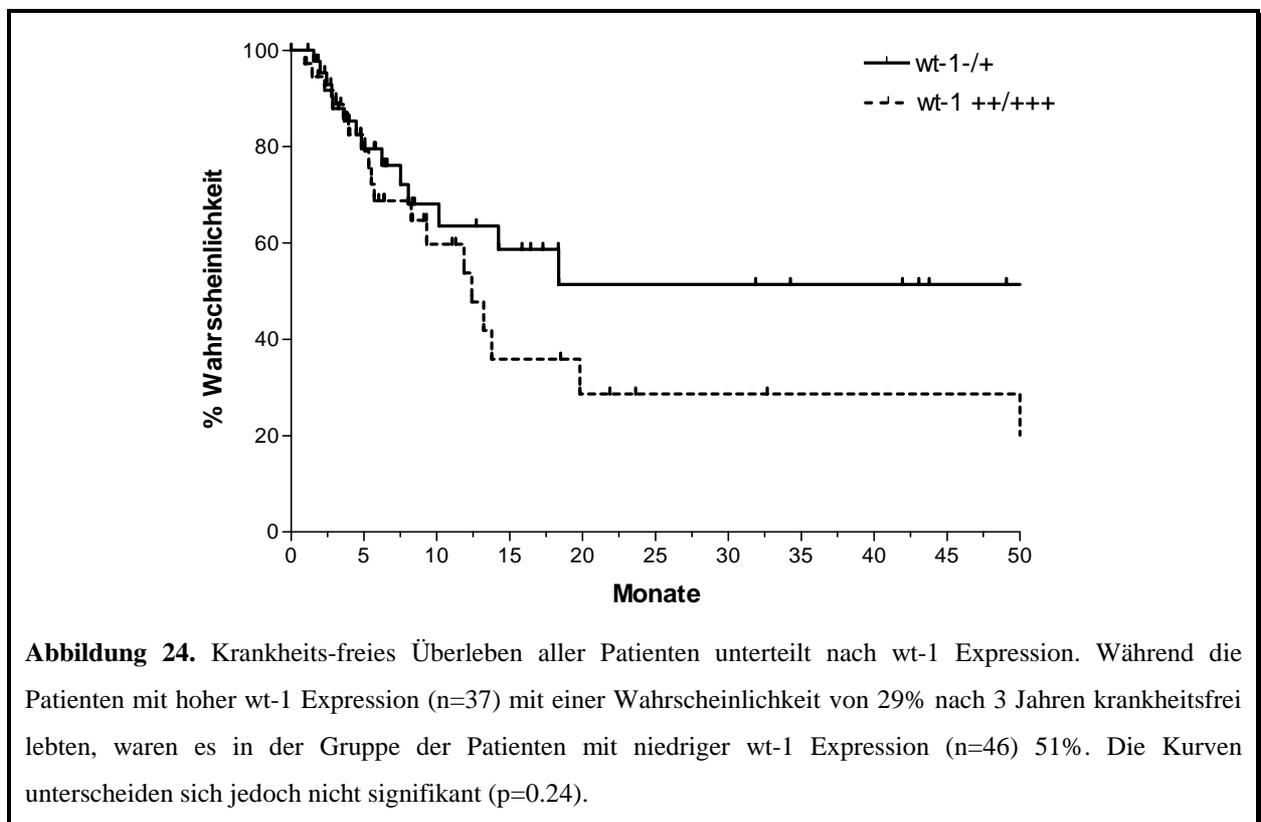
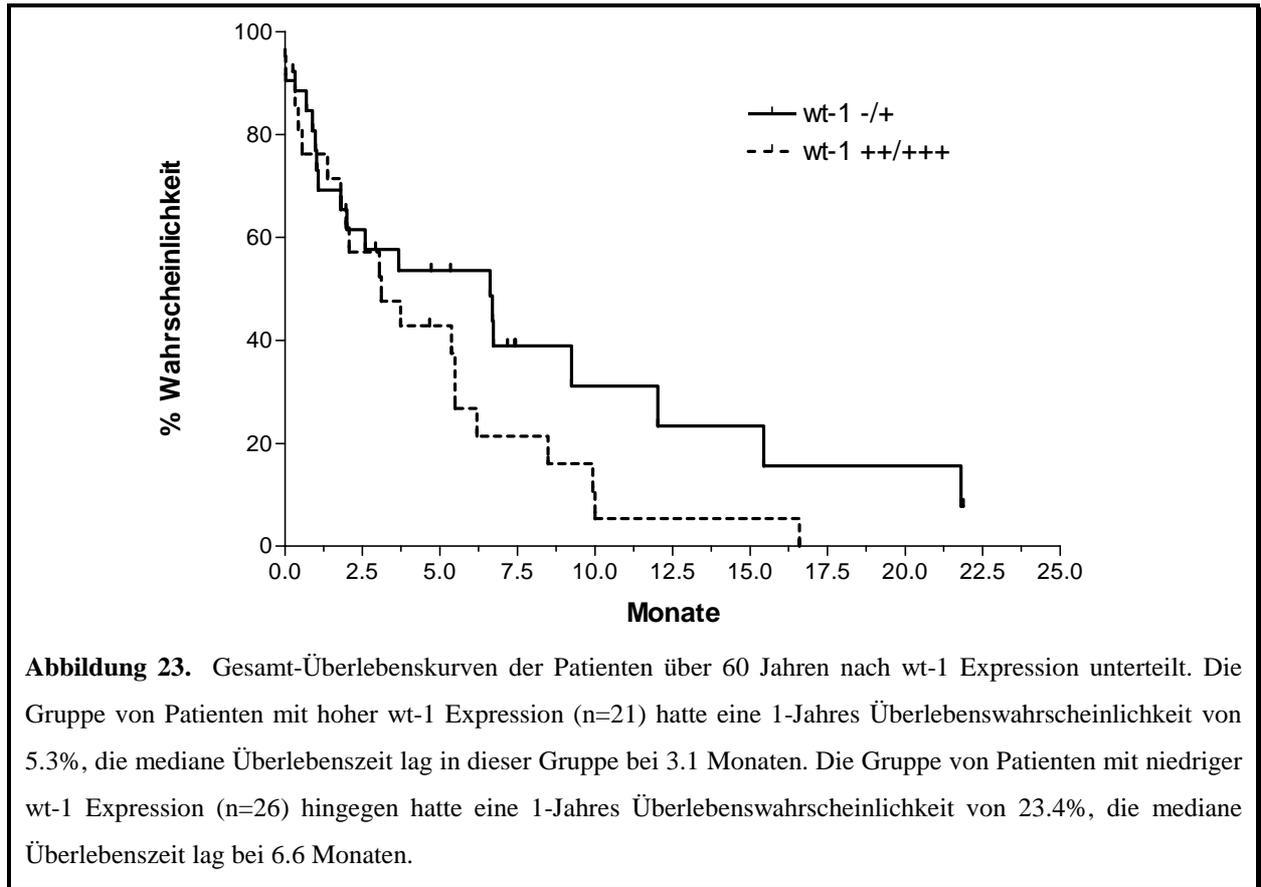
Betrachtete man nur die Patienten unter 60 Jahren, so zeigte sich bei niedrig wt-1 exprimierenden Patienten eine 3-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von 59% gegenüber 21% in der wt-1 hoch exprimierenden Gruppe ($p = 0.046$).



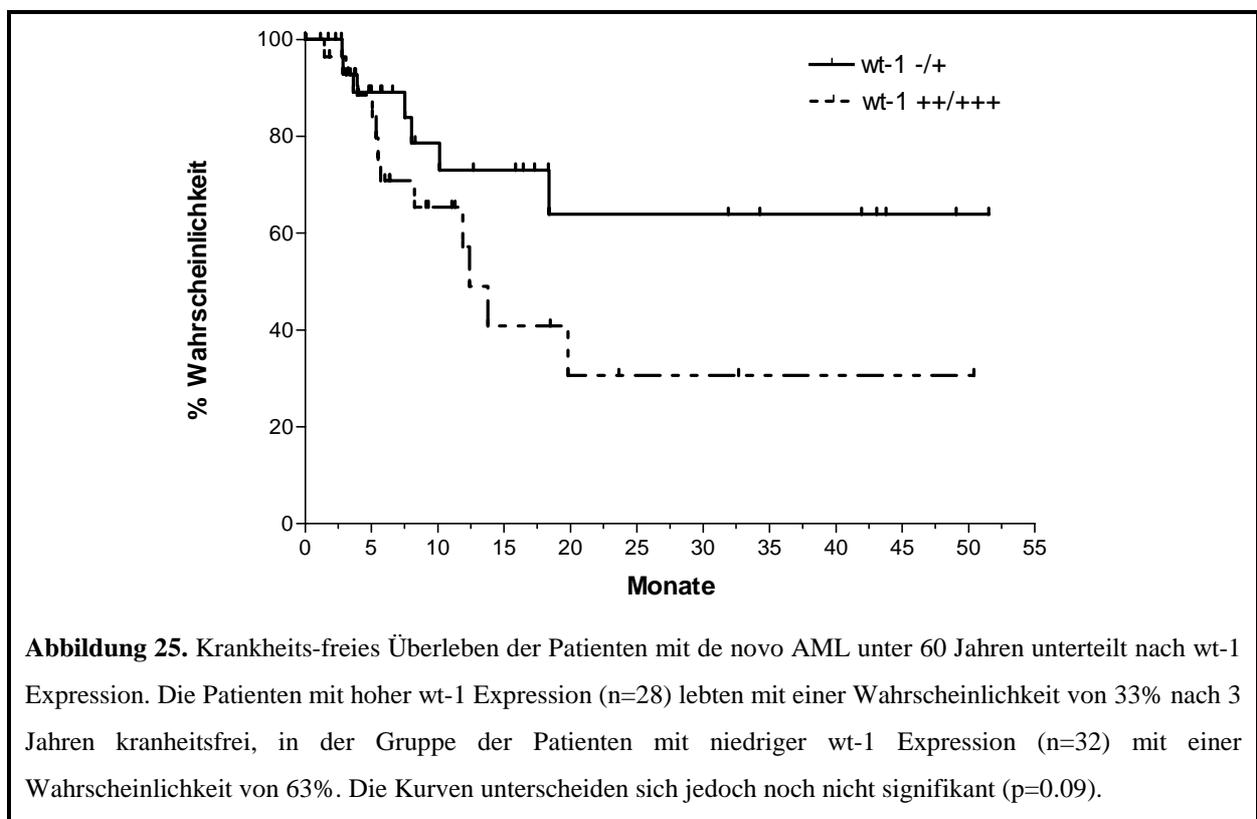
Bei Analyse nur der Patienten mit de novo AML ergab sich ein noch deutlicher prognostischer Unterschied in der 3- Jahres Überlebensrate zwischen der niedrig wt-1 exprimierenden (43%) und der hoch wt-1 exprimierenden Gruppe (12%) ($p = 0.014$).

Dieser deutliche Unterschied zeigte sich auch in der Patientengruppe mit AML de novo unter 60 Jahren (64% gegenüber 19% 3-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit, $p = 0.018$). In der Gruppe der Patienten über 60 Jahre gab es auch aufgrund der geringeren Fallzahlen keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben ($p=1.2$), jedoch lag auch hier die 1-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit der wt-1 hoch exprimierenden Patientengruppe mit 5.3% bei einer medianen Überlebenszeit von 3.1 Monaten niedriger als in der niedrig exprimierenden Gruppe mit 23.4% und 6.6 Monaten.





Auch in Bezug auf das Krankheits-freie Überleben zeigten sich Unterschiede zwischen der wt-1 niedrig und der wt-1 hoch exprimierenden Gruppe. Jedoch waren diese Differenzen noch nicht signifikant. So lag bei Analyse aller Patienten mit AML die Wahrscheinlichkeit für 3 jähriges Rezidiv-freies Überleben in der Gruppe mit niedriger wt-1 mRNA Expression bei Diagnosestellung bei 51% gegenüber 29% für Patienten mit hoher wt-1 Expression. Betrachtete man nur die Patienten mit de novo AML unter 60 Jahren, so fand sich sogar eine Wahrscheinlichkeit für Krankheits-freies Überleben von 63% für Patienten mit hoher wt-1 Expression bei Diagnose, während die Wahrscheinlichkeit für die niedrig wt-1 exprimierende Gruppe bei 33% lag, jedoch war auch dieser Unterschied nicht signifikant ($p = 0.09$).



5.6. Die wt-1 mRNA Expression im Verlauf der Erkrankung

Die wt-1 mRNA Expression im Knochenmark des Patienten wurde bei Diagnosestellung, nach jedem Zyklus Chemotherapie, nach Erreichen einer kompletten Remission und im Falle eines Rezidives analysiert. Der Vergleich der klinischen Situation mit der wt-1 mRNA Expression im Knochenmark der Patienten zielte darauf ab, Aufschluß über den Zusammenhang zwischen Expressionsstärke und Aktivität der Erkrankung zu gewinnen und in der Folge beurteilen zu können, ob sich das molekulare Monitoring der wt-1 Expression als Methode zur Rezidiv-Früherkennung bzw. zur Detektion einer Minimal Residual Disease (MRD) eignet.

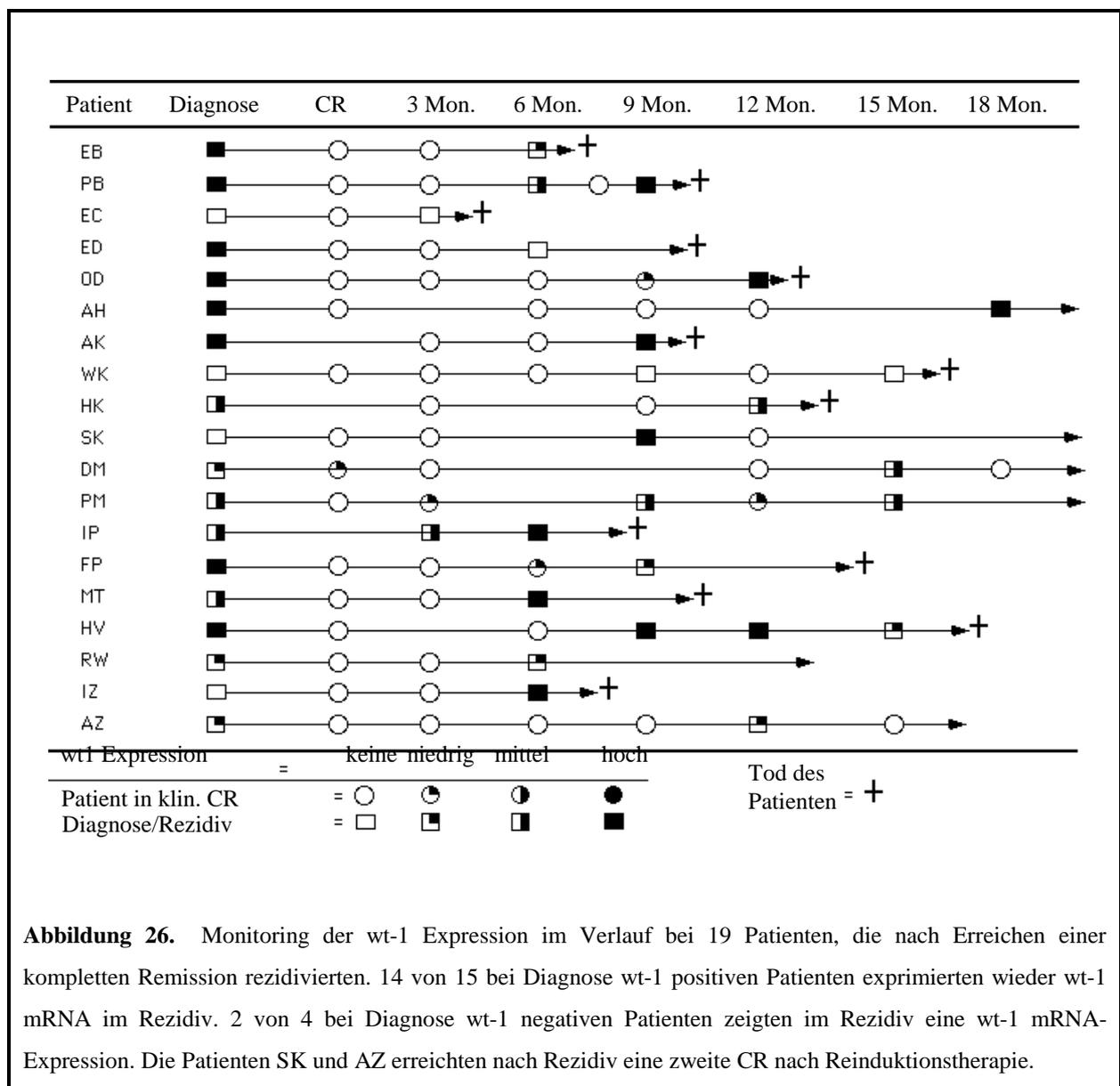


Abbildung 26. Monitoring der wt-1 Expression im Verlauf bei 19 Patienten, die nach Erreichen einer kompletten Remission rezidierten. 14 von 15 bei Diagnose wt-1 positiven Patienten exprimierten wieder wt-1 mRNA im Rezidiv. 2 von 4 bei Diagnose wt-1 negativen Patienten zeigten im Rezidiv eine wt-1 mRNA-Expression. Die Patienten SK und AZ erreichten nach Rezidiv eine zweite CR nach Reinduktionstherapie.

Bei 50 Patienten waren 3 oder mehr wt-1 Expressionswerte im Verlauf verfügbar. Von diesen ließ sich bei 37 Patienten bei Diagnose ein wt-1 Signal nachweisen, 13 waren wt-1 mRNA negativ.

Alle Patienten, die bei Diagnosestellung wt-1 mRNA positiv waren, verloren das Signal nach Erreichen einer CR. 15 Patienten, die bei Diagnosestellung wt-1 positiv waren und in CR kein wt-1 Signal aufwiesen, bekamen ein Rezidiv; davon exprimierten 14 Patienten im Rezidiv wieder wt-1 mRNA. 4 der 13 bei Diagnose wt-1 negativen Patienten rezidierten, von diesen exprimierten nun 2 Patienten wt-1 mRNA auf einem hohen Level. Das Wiederauftreten von wt-1 mRNA Transkripten korrelierte absolut mit dem Wiederauftreten von AML-Blasten respektive einem Rezidiv der AML. Dabei ging in einigen Fällen das Wiederauftreten von wt-1 mRNA der klinisch-morphologischen Diagnose eines Rezidivs um bis zu 3 Monaten voraus.

Patient	Monate wt-1+ vor Rez.	wt-1 bei Diagnose	wt-1 bei Rez.
O.D.	1,64	+++	+++
L.K.	0,16	-	+
D.O.	2,52	+	++
M.D.	1,54	+	++
I.P.	0,69	++	++
F.P.	2,98	+++	+
R.W.	0,36	+	+
I.Z.	2,82	-	+++

Tabelle 9. Liste der Patienten, bei denen eine erhöhte wt-1 Expression vor klinisch und morphologischer Diagnose eines Rezidivs auftrat. Alle Patienten waren nach Erreichen der CR wt-1 negativ. Bei Kontrolluntersuchungen wurde im Mittel 6 Wochen (1,5 Monate) nachdem sich ein erhöhtes wt-1 Signal fand ein Rezidiv diagnostiziert.

VI. Diskussion

6.1. Einleitung

Zur Interpretation der Ergebnisse der Untersuchungen sind einige Annahmen zu berücksichtigen. Diese liegen sowohl in den biologischen Charakteristika der untersuchten Zellen als auch in den Untersuchungsmethoden. Eine für die Detektion von MRD wichtige Annahme ist, daß wt-1 nur bzw. zumindest deutlich stärker in AML-Blasten als in normalen Blutzellen exprimiert wird. Dies stellt für die Untersuchung zur prognostischen Bedeutung der wt-1 Expression keinen entscheidenden Faktor dar, da hier nicht an der Detektionsgrenze gearbeitet wird. Zur Untersuchung der Frage nach der wt-1 Expression in gesunden hämatopoetischen Zellen wurden Mononukleäre Zellen (MNC) aus dem peripheren Blut von Normalpersonen untersucht. Es ließ sich keine wt-1 Expression feststellen. Bei Untersuchung von MNC aus dem Knochenmark von gesunden Spendern fand sich bei sehr unreifen CD34+ Zellen eine nachweisbare wt-1 Expression, die jedoch im Laufe der Ausdifferenzierung verschwand (25). Die Expressionsstärke von wt-1 in diesen Zellen scheint jedoch sicher unter der der malignen Zellen zu liegen, da sich mit der in dieser Arbeit verwendeten PCR in drei untersuchten Fällen (mehr Material stand im Rahmen der Arbeit nicht zu Verfügung), bei denen mit einer sensitiveren PCR wt-1 mRNA amplifiziert werden konnte, kein wt-1 nachweisen ließ. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Fraizer et al. (24) überein, während Maurer et al. in (39) eine ungefähr gleich starke Expression fand. Die Divergenz der Ergebnisse ist vielleicht durch die Tatsache bedingt, daß jeweils unterschiedliche Bedingungen zur reversen Transkription bzw. kompetitiven PCR gewählt wurden.

Im Rahmen der Arbeit wurden Expressionshäufigkeit des Wilms-Tumor-Gens wt-1 und eine mögliche Korrelation mit anderen klinischen und experimentell gewonnenen Daten untersucht. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Expressionshäufigkeit eine Funktion der Sensitivität der Untersuchungsmethode ist. Die Sensitivität der PCR ist prinzipiell hoch, jedoch kann die Nachweisgrenze einer PCR je nach Wahl der oben beschriebenen Bedingungen um bis zu zwei Zehnerpotenzen schwanken (66). So lässt sich z.B. durch Verwendung einer 'Nested'-PCR mit Zweifach-Amplifikation oder Detektion der Amplifikate mittels Southern-Blot eine höhere Sensitivität erzielen (67). Dies ist bei allen Angaben über die Expressionshäufigkeit zu berücksichtigen und spielt auch bei der Verlaufskontrolle und der Detektion einer MRD (siehe 6.4.) eine Rolle.

Im Fall der im Rahmen der Arbeit gewählten wt-1 RT-PCR zeigte sich eine Nachweisgrenze von einer wt-1 mRNA exprimierenden Zelle unter 10^4 - 10^5 wt-1 negativen Zellen (Brieger et al. leukemia). Die Primersequenzen der wt-1 RT-PCR wurden aus einer früheren Publikation (68) übernommen und waren nicht auf maximale Sensitivität optimiert. Allerdings erhöht sich mit der Sensitivität der Methode auch die Anfälligkeit für Kontaminationen (69), und es ist mit einer höheren Zahl von falsch positiven Ergebnissen zu rechnen.

Wt-1 wird in der Mehrzahl von Patienten mit AML exprimiert, d.h. bei der Mehrzahl der Patienten ließ sich wt-1 mRNA mittels PCR nachweisen. Dabei schwankt die Expressionsstärke, wie sich aufgrund der Messungen durch quantitative PCR zeigte (siehe V.1.), zwischen weniger als 0,001 pg und 19,37 pg wt-1 spezifischer mRNA pro μ g eingesetzter Gesamt-RNA.

6.2. Wt-1 als Marker zur Detektion von Minimal Residual Disease (MRD)

Als Alternative zu der mit erhöhter behandlungsbedingter Mortalität behafteten allogenen KMT bietet sich die autologe KMT an (70); wobei jedoch das Risiko eines Rezidives nach Transplantation größer ist. Ursache hierfür sind zum einen der geringere Graft-versus-Leukemia-Effekt, zum anderen die Tatsache, daß sich im Transplantat noch residuelle Leukämiezellen befinden können. In diesem Zusammenhang ist eine Detektion von MRD relevant, z.B. insofern als bei Nachweis von leukämischen Zellen im entnommenen KM oder PBMNZ das Rezidivrisiko durch intensiveres 'Purging', d.h. Behandlung des Transplantats mit antileukämischen Substanzen wie Mafosfamid oder Ifosfamid, gesenkt werden kann (71). Es sind bisher nur wenige Marker zur Verlaufskontrolle und Detektion von MRD in der AML bekannt. Insbesondere in diesem Bereich scheint die PCR als Methode gut geeignet, da sie eine sehr hohe Sensitivität aufweist. Mittels Nachweis einer für die Leukämiezelle spezifischen chromosomalen Aberration lässt sich so z.B. bei M3-Leukämien mit der t(15;17) Translokation untersuchen, ob MRD vorliegt (72).

Um den prinzipiellen Nutzen eines MRD Nachweises über das Monitoring der wt-1 Expression zu untersuchen, waren zwei Dinge von Bedeutung. Zum einen musste untersucht werden, ob wt-1 ausschließlich von AML-Blasten exprimiert wird. Dies ist wie oben beschrieben hinreichend der Fall. Zum anderen wurde untersucht, wie sich im Verlauf einer

Erkrankung die wt-1 Expression verhält, d.h. ob ein Wiederanstieg der wt-1 Expression einem klinischen Rezidiv vorausgeht und wenn ja, in welchem zeitlichen Abstand.

Wie auch schon bei kleineren Fallzahlen in früheren Untersuchungen festgestellt werden konnte (33, 40), zeigte sich, daß alle Patienten, bei denen bei Diagnosestellung wt-1 Transkripte nachweisbar waren und die nach Chemotherapie eine komplette Remission erreichten, wt-1 negativ wurden. Non-Responder oder Patienten mit Frührezidiv dagegen blieben wt-1 positiv.

In einer Studie von Inoue et al. (40) konnte erstmals gezeigt werden, daß ein Anstieg des wt-1-Levels nach einer Remission einen Progress bzw. ein Rezidiv ankündigt. Bei 4 AML-Patienten zeigte sich ein erneutes Auftreten von wt-1 in der PCR 2 bis 8 Monate vor Einsetzen eines Rezidivs. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei 8 Patienten, die nach Erreichen einer kompletten Remission wt-1 negativ waren, ein Wiederauftreten der wt-1 Expression 2 Wochen bis 3 Monate vor den ersten Anzeichen auf ein klinisches Rezidiv nachgewiesen werden. Der kürzere Zeitabstand zwischen Wiederauftreten eines Signals in der PCR und klinischem Rezidiv im Vergleich zu der Studie von Inoue et al. (40) ist vor allem auf eine geringere Sensitivität der in dieser Arbeit verwendeten PCR zurückzuführen.

Die Ergebnisse legen nahe, daß sich das Monitoring der wt-1 Expression zur Detektion von MRD eignet. Da im Rahmen dieser Arbeit die Kontrolle der wt-1 Expression im Verlauf der Erkrankung nur bei wenigen Patienten lückenlos durchgeführt werden konnte, liess sich kein statistisch gesichertes Urteil fällen, jedoch konnte bei einzelnen Patienten die wt-1 Expression engmaschig kontrolliert werden und korrelierte gut mit dem klinischen Verlauf (siehe Abbildung 12). Da die Bestimmung der wt-1 Expression aus dem peripheren Blut ähnlich sensitiv zu sein scheint wie aus dem Knochenmark (eigene Ergebnisse und 76), ließe sich eine Validierung der Untersuchung hierüber leichter durchführen. Dabei wäre auch die Verwendung neuerer Methoden wie der semiquantitativen Real-Time-PCR in Betracht zu ziehen.

6.3. Expression von wt-1 mRNA bei Patienten mit AML und Korrelation mit FAB-Typ und Oberflächenmarkern

Unter den oben angesprochenen Voraussetzungen und in Einklang mit früheren Untersuchungen (33, 40, 41) fand sich ein wt-1-Signal in 77% der Patienten mit AML. Bei Patienten mit Rezidiv lag die wt-1 Expression in Übereinstimmung mit einer Studie von Tamaki et al. (73) höher (87,5%). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der

Expressionshäufigkeit in Bezug auf Alter, Geschlecht oder zwischen Patienten mit de novo AML und Patienten mit sekundärer AML. Bei Korrelation von wt-1 Expression und FAB-Typ fand sich jedoch eine deutlich niedrigere Expressionshäufigkeit in Patienten mit FAB M5 Leukämien. Dies ist wahrscheinlich auf die differenzierungsspezifische Expression von wt-1 in hämatopoetischen Zellen zurückzuführen. Es stützt, wie auch die Untersuchungen über die wt-1 Expression in ausdifferenzierenden Stammzellen (25), die Vermutung, daß wt-1 insbesondere in unreifen hämatopoetischen Zellen exprimiert und die Expression während der Ausdifferenzierung herunterreguliert wird. Ebenfalls auffällig und im Widerspruch zu oben angeführten und auch früher publizierten Ergebnissen (40) lag die wt-1 Expression bei Patienten mit einem hohen Anteil an CD 34⁺ Zellen niedrig, hingegen bei Patienten mit hohem Anteil an CD33⁺ hoch. Ansonsten fanden sich keine signifikanten Korrelationen mit den übrigen untersuchten Oberflächenmarkern. Während, wie oben angeführt, Differenzierungsstudien in normalem Knochenmark und auch die Ergebnisse der Korrelation mit dem FAB-Typ eher darauf hinweisen, daß wt-1 vor allem von unreifen Zellen in einer frühen Phase der Differenzierung exprimiert wird, deutet die Korrelation bei den Oberflächenmarkern eher auf das Gegenteil hin. Allerdings sind die Korrelations-Ergebnisse schwer zu interpretieren, da der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen stark vom gewählten Cut-Off Wert abhängt, und natürlich zu fragen ist, welche Bedeutung eine quantitative Analyse der Oberflächenmarkerexpression gegenüber der qualitativen Untersuchung besitzt, ob der entsprechende Marker überhaupt auf der Oberfläche des AML-Blasten exprimiert wird oder nicht. Der Cut-Off wurde willkürlich gewählt und muß nicht eine biologische Gegebenheit reflektieren. Der Stellenwert der CD34-Expression als Marker einer frühen hämatopoetischen Stammzelle ist nicht eindeutig; es gibt ebenso Hinweise auf die Existenz einer CD34-negativen Stammzelle (74). Auch ist nur wenig über die Bedeutung der CD34-Expression auf AML-Blasten bekannt. In diesem Licht sind über die Korrelation mit Oberflächenmarkern Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad der wt-1 exprimierenden Zelle nur mit Vorsicht zu ziehen, und die Ergebnisse stellen somit eher einen Anknüpfungspunkt dar, dem noch weiter nachzugehen ist. Es kann aber festgestellt werden, daß mit der in dieser Arbeit gewählten Methode eine wt-1 Expression bei einer der Literatur entsprechenden Anzahl von Patienten gefunden werden konnte, und daß in bestimmten FAB-Subtypen mit einem stärker differenzierten Blastenanteil wt-1 schwächer exprimiert wird.

6.4. Wt-1 Expression und Prognose

Zu einer effizienten und adäquaten Therapie akuter Leukämien sind Risikostratifizierung aufgrund prognostischer Faktoren und frühzeitige therapeutische Intervention bei Auftreten eines Rezidives von besonderer Bedeutung, um z.B. Patienten mit prognostisch ungünstigen Leukämien einer aggressiveren Therapie oder einer KM-Transplantation (KMT) zuzuführen. In der Non-Hodgkin-Lymphom Therapie ist nach Einführung einer risikoadaptierten Therapie die paradoxe Situation entstanden, daß Patienten mit ehemals als 'Hoch-Risiko'-Lymphom eingestuftten Erkrankungen eine zum Teil bessere 10-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit 'Niedrig-Risiko'-Lymphomen erreichen (75). Insofern ist zu beachten, daß prognostische Faktoren unter veränderten Therapiebedingungen zwar noch zur Therapiestratifizierung, jedoch nicht unbedingt mehr zur Beurteilung der Überlebenswahrscheinlichkeit herangezogen werden können.

Für die AML gelten Alter über 60 Jahren, bestimmte chromosomale Aberrationen (-5/5q- oder -7/7q-), schlechter Allgemeinzustand, schlechtes Ansprechen auf Therapie, sekundäre (Therapie-assoziierte) AML sowie AML nach MDS (8, 9, 10) als ungünstige prognostische Faktoren. In einzelnen Studien konnten weitere Faktoren, welche die Rezidiv- bzw. Überlebensrate negativ beeinflussen, nachgewiesen werden, wie z.B. erhöhte Leukozytenzahlen, erniedrigte Fibrinogen-Spiegel, erhöhte MDR1-Expression, hohe Blasten-Wachstumsrate und andere (siehe Einleitung). Die Ergebnisse konnten jedoch zum Teil in anderen Studien nicht bestätigt werden (76, 77).

Inoue et al. beschrieben erstmals, daß Leukämie-Patienten mit einer hohen wt-1 Expression bei Diagnose eine schlechtere Prognose zu haben scheinen (40). Bei noch kleinen Fallzahlen zeigte sich bei Patienten mit erhöhter wt-1 Expression ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie und eine kürzere Krankheitsfreie- und Gesamtüberlebenszeit. In der vorliegenden Arbeit wurde ein größeres Patientenkollektiv über einen längeren Zeitraum verfolgt und die wt-1 Expression bei Diagnose mit dem Ansprechen auf Chemotherapie, der Rezidivrate, dem Krankheitsfreien- (DSF) sowie dem Gesamtüberleben (OS) korreliert. Dabei wurde über eine Multivariat-Analyse der Einfluss anderer, bekannter prognostischer Faktoren (Alter, Karyotyp) analysiert und ausgeschlossen. Die Ergebnisse von Inoue et al. konnten prinzipiell bestätigt und gesichert werden. Patienten mit hoher wt-1 Expression wiesen ebenfalls ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben auf. Es zeigte sich eine klare Tendenz

zu einem verkürzten DSF-Überleben bei erhöhter wt-1 Expression, jedoch war der Unterschied zwischen der hoch und der niedrig wt-1 exprimierenden Patientengruppe nicht signifikant. Auffällig war, daß die Unterschiede im DSF und OS bei Betrachten einer Untergruppe von Patienten, die jünger als 60 Jahre bei Diagnose waren und de novo an einer AML erkrankten, zunahmen. Dies scheint darauf hinzudeuten, daß der prognostische Wert der wt-1 Expression bei älteren Patienten und Patienten mit sekundären Leukämien eine geringere Aussagekraft besitzt; möglicherweise liegen bei diesen Erkrankungen, bei denen die AML-Blasten häufig auch komplexe chromosomale Veränderungen aufweisen, andere molekulare Mechanismen vor, die eine niedrigere wt-1 Expression bedingen. In Gegensatz zu dieser Überlegung allerdings beschreiben Tamaki et al. auch eine meßbare wt-1 Expression in der Transformation von MDS zu AML (78).

Ebenfalls unterschiedlich, jedoch nicht signifikant, war auch die Ansprechrate zwischen den beiden Gruppen. Die Tatsache, daß sich die Patientengruppen mit hoher bzw. niedriger wt-1 Expression in ihrem OS signifikant unterschieden, jedoch nicht in ihrem DSF bzw. in der Ansprechrate, mag daran liegen, daß die Patientenzahlen noch nicht ausreichten, um einen signifikanten Unterschied aufzuweisen. Ein anderer Grund mag die Tatsache sein, daß die Quantifizierung der wt-1 Expression nur relativ grob erfolgte, so daß bei einem etwas anders gewähltem, besser differenzierendem Cut-Off die Unterschiede noch deutlicher hätten sein können. In der Tat spielt die Sensitivität der PCR-Nachweisreaktion und die Exaktheit der Quantifizierung eine sehr große Rolle. An dieser liegt es wahrscheinlich, daß Inoue et al. schon bei deutlich kleineren Patientenzahlen signifikante Unterschiede zeigen können. Ebenso kann dies den Umstand erklären, daß Schmid et al. (79) in ihrer Untersuchung keine Korrelation zwischen wt-1 Expression und Prognose fanden. In dieser Arbeit wurde die wt-1 Expression gar nicht quantifiziert, und bei gleichzeitiger Anwendung einer sogenannten 'Nested'-Zweischritt-PCR liegt zusätzlich auch die Gefahr falsch positiver Resultate höher, so daß die Ergebnisse kaum mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, daß die wt-1 Expression einen von anderen prognostischen Faktoren wie Alter und Karyotyp unabhängigen Wert besitzt. Um eine verlässliche Risikostratifizierung über die wt-1 Expression zu ermöglichen, muß aber die Meßmethode standardisiert und eine genaue Expressionsquantifizierung durchgeführt werden. Mit neueren Methoden wie der Real-Time-PCR sollte es möglich sein, einen Cut-Off mit hoher Trennschärfe zu definieren, anhand dessen dann Spezifität und Sensitivität der wt-1 Messung präziser zu bestimmen ist. Ob der Einfluss der wt-1 Expression auf die Prognose auf eine besondere, eigenständige Rolle von wt-1 in der Pathogenese der AML zurückzuführen

ist, oder ob die erhöhte Expression von wt-1 konkomitant auf einer anderen, unbekanntem kausalen Veränderung in der Zelle beruht, ist nur durch weitergehende funktionale Studien zu beantworten.

6.5. Wt-1 und seine Rolle in der Pathogenese der AML

Die Frage nach der Rolle der wt-1 Expression in der Pathogenese wurde durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nur gestreift. Ob die erhöhte Expression in AML-Zellen nur ein Epiphänomen einer allgemein hochregulierten Transkriptionsaktivität in der malignen, sich schnell teilenden Zelle ist, oder ob die hohe wt-1 Expression Teil oder sogar Ursache des autonomen Wachstums des AML-Blasten ist, kann aufgrund der bisherigen Untersuchungen nicht eindeutig beantwortet werden. Wenn auch insbesondere die Untersuchung der prognostischen Bedeutung von wt-1 für die AML diese Frage berührte, lag der Schwerpunkt der Arbeit auf der deskriptiven Analyse des Zusammenhangs zwischen wt-1 Expression und klinischem Verlauf der AML und dessen praktisch-klinischer Bedeutung. Deshalb will ich mich hier auf einen kurzen Überblick über den Stand der Forschung beschränken.

Das wt-1 Gen wurde ursprünglich in Zusammenhang mit der Entstehung des Nephroblastoms als Tumorsuppressor-Gen charakterisiert (19, 20). Mittels Northern-Blot-Analyse konnte unter anderem eine sehr schwache Expression in hämatopoetischem Gewebe gezeigt werden (s.o.). In verschiedenen Arbeiten wurde nachgewiesen, daß die Expression von wt-1 in unreifen Zellen höher ist und sowohl in Zell-Linien als auch in normalem Knochenmark im Laufe der Differenzierung absinkt (25, 80, 81, 82). Widersprüchlich sind die Aussagen zu einem durch wt-1 Überexpression induzierbarem Differenzierungsblock (83, 84, 85, 86, 87). Durch Überexpression von wt-1 Antisense-Oligonukleotiden scheint das Wachstum einiger leukämischer Zelllinien gehemmt zu werden (88, 89). Nicht völlig im Einklang dazu führt allerdings die Überexpression von wt-1 in einer leukämischen Zelllinie zum G1-Arrest und Apoptose bzw. verringert die Tumorigenizität (90, 91). Aus der Untersuchung von sogenannten 'Knock-Out'-Mäusen, in denen das wt-1 Gen durch gezielte Mutation in allen Zellen des Körpers ausgeschaltet worden ist, liessen sich keine Schlüsse über die Rolle von wt-1 in der Hämatopoese ziehen (29). Weitere Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von wt-1 an der Leukämogenese liefern Untersuchungen, in welchen bei Patienten mit AML in ca. 15% (heterozygote) Mutationen in der kodierenden Sequenz von wt-1 nachgewiesen werden konnten (92, 93). Bei biphenotypischen Leukämien lag die Mutationshäufigkeit noch etwas

höher (bei ca. 20%), während sich bei Patienten mit ALL sogar wie keine Mutationen fanden. Im Rahmen dieser Untersuchung fiel desweiteren auf, daß Patienten mit wt-1 Mutationen eine erhöhte Chemotherapie-Resistenz aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß bisher noch kein eindeutiger Hinweis für eine kausale Rolle von wt-1 in der Leukämogenese gefunden werden konnte. Vieles deutet daraufhin, daß wt-1 eine Rolle in der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen spielt. Wo jedoch genau der Zusammenhang zwischen wt-1 und Leukämogenese liegt, bleibt noch zu klären.

VII. Zusammenfassung

Das Tumor-Suppressor-Gen wt-1 (Wilms Tumor Gen) kodiert ein Zink-Finger DNA-bindendes Protein mit vorwiegend Transkriptions-hemmenden Eigenschaften. Da wt-1 Expression auch in leukämischen Blasten von Patienten mit akuten Leukämien nachgewiesen werden konnte, war das Ziel der Arbeit, das Expressionsmuster von wt-1 mRNA in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu untersuchen. Dabei war die Expressionsstärke visuell in negativ (-), schwach positiv (+), mittelgradig positiv (++) und stark positiv (+++) zu unterteilen. Die Ergebnisse, in ausgesuchten Fällen durch eine kompetitive PCR validiert, sollten mit FAB-Klassifikation, Karyotyp, Oberflächenmarker-Expression, Alter, Geschlecht und klinischem Verlauf verglichen werden, um eine Aussage über die Bedeutung der wt-1 Expression für Prognose, Verlaufskontrolle und das Erkennen von Minimal Residual Disease (MRD) zu treffen.

Es wurden insgesamt mehr als 500 Proben von Patienten (mononukleäre Zellen (MC) aus Knochenmark (KM) und peripherem Blut (PB)) untersucht. Davon wurden insgesamt 129 Patienten bei Erstdiagnose und 32 Patienten bei 1. Rezidiv untersucht. Bei 77 Patienten konnte die wt-1 Expression im Verlauf untersucht werden. wt-1 mRNA fand sich bei 124 von 161 (77%) der Patienten bei Erstdiagnose und 1. Rezidiv. Die wt-1 Expression war unabhängig vom Alter, vorhergehendem myelodysplastischem Syndrom (MDS), Geschlecht und FAB-Subtyp mit Ausnahme einer signifikant niedrigeren wt-1 Expressionshäufigkeit in FAB M5 Leukämien von nur 40% ($P=0,0025$). Es fand sich keine Korrelation zwischen wt-1 mRNA Expressionsstärke und den durch den Karyotyp definierten prognostischen Gruppen. Die Ansprechrate auf Therapie war zwar umso höher, je niedriger die wt-1 Expression lag; es fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Expressions-Gruppen. Patienten mit hoher wt-1 mRNA Expression (++,+++) zeigten eine deutlich schlechtere Gesamt-Überlebens-wahrscheinlichkeit (OS) als solche mit niedriger Expression (-,+). Das 3-Jahres-OS für alle neu diagnostizierten AML-Patienten lag bei 13% bei starker und 38% bei schwacher wt-1 Expression ($P=0,038$); bei Patienten mit de novo AML bei 12% und 43% ($P=0,014$). Der Unterschied war bei der Patientengruppe unter 60 Jahren noch stärker ausgeprägt. Im Verlauf ließ sich bei allen Patienten, die eine komplette Remission (CR) erreichten, keine wt-1 Transkripte mehr nachweisen. Bei Rezidiv trat in den meisten Fällen erneut erhöhte wt-1 Expression auf. In einigen Fällen ging dies dem klinischen Befund eines Rezidivs voraus.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß wt-1 von der Mehrzahl der AML-Patienten exprimiert wird und mittels PCR nachgewiesen werden kann, ein von Karyotyp und Alter unabhängiger prognostischer Faktor ist und sich mit Einschränkung zur Verlaufskontrolle und Detektion von MRD anbietet.

VIII. Literatur

1. **Cutler SJ, Young JL. Eds.** Third national cancer incidence data. National Cancer Institute Monograph No.41. 1975. Washington, DC, US Government Printing Office
2. **Mulvihill JJ.** Congenital and genetic diseases. In: Fraumeni JF, ed. Persons at high risk of cancer. San Diego, Academic Press, 1975:3.
3. **Rosen RB, Kang S-JA.** Congenital agranulocytosis terminating in acute myelomonocytic leukemia. *J Pediatr* 1979; 94:406.
4. **Rosner F, Lee SL.** Down's syndrome and acute leukemia: myeloblastic or lymphoblastic? *Am J Med* 1972; 53:203
5. **Linnet MS.** The leukemias: epidemiologic aspects. In: Lilienfeld AM, ed. Monographs in epidemiology and biostatistics. New York, Oxford University Press, 1985:1.
6. **Bennett JM, Catovsky D, et al.** Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med* 1985; 103:626.
7. **Arthur DC, Berger R, et al.** The Clinical Significance of Karyotype in Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 40:203-216
8. **Estey E, Smith TL, et al.** Prediction of survival during induction therapy in patients with newly diagnosed acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1989; 3:257.
9. **Swirsky DM, de Bastos M, et al.** Features affecting outcome during remission induction of myeloid leukemia in 619 adult patients. *Br J Haematol* 1986; 64:435.
10. **Wood P, Burgess R, McGregor A, Yin JAL.** P-Glykoprotein Expression on Acute Myeloid Leukaemia Blast Cells at Diagnosis Predicts Response to Chemotherapy and Survival. *Br J Haematol* 1994; 87:509-514.

11. **Bradstock K, Matthews J, et al.** Prognostic Value of Immunophenotyping in Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 1994; 84:1220-1225.
12. **Hunter AE, Rogers SY, et al.** Autonomous growth of blast cells is associated with reduced survival in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1993; 82:899-903.
13. **Hochhaus A, Reiter A, et al.** Molecular monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients after therapy. *Recent Results Cancer Res* 1998; 144: 36-45.
14. **Cross NC, Feng L, et al.** Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood* 1993; 82:1929-1936.
15. **Macintyre EA, d'Auriol L, et al.** Use of oligonucleotide probes directed against T cell antigen receptor gamma delta variable-(diversity)-joining junctional sequences as a general method for detecting minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *J Clin Invest* 1990; 86:2125-2135.
16. **Haber DA, and Housman DE.** The Genetics of Wilms tumor. *Adv Cancer Res* 1992; 59:41-68.
17. **Orkin SH, Goldmann DS, et al.** Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilms' tumour. *Nature* 1984; 309:172-174.
18. **Knudson AG.** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68; 820-823.
19. **Call KM, Glaser T, et al.** Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990; 60:509
20. **Gessler M, Poustka A, et al.** Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 1990; 343:774-778.

21. **Haber DA, Sohn RL, et al.** Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:9618-9622.
22. **Larsson SH, Charlier JP, et al.** Subnuclear Localization of WT1 in Splicing or Transcription Factor Domains Is Regulated by Alternative Splicing. *Cell* 1995; 81:391-401.
23. **Rauscher FJ, Morris JF, et al.** Binding of the Wilms' Tumor Locus Zinc Finger Protein to the EGR-1 Consensus Sequence. *Science* 1990; 250:1259-1262.
24. **Fraizer GC, Patmasiriwat P, et al.** Expression of the Wilms' tumor gene in both human and mouse bone marrow. *Blood* 1995; 86:4704 (letter).
25. **Maurer U, Brieger J, et al.** The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro. *Exp Hematol.* 1997; 25:945-50.
26. **Francke U, Holmes LB, et al.** Aniridia-Wilms' tumor association: evidence for specific deletion of 11p13. *Cytogenet Cell Genet* 1979; 24:185-192.
27. **Drash A, Sherman F, et al.** A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J Pediatr* 1970; 76:585-593.
28. **Bruening W, Bardessy N, et al.** Germline intronic and exonic mutations in the Wilms' tumor gene (WT1) affecting urogenital development. *Nature Genet* 1992; 1:144-148.
29. **Kreidberg JA, Sariola H, et al.** WT-1 Is Required for Early Kidney Development. *Cell* 1993; 74:679-691.
30. **Pritchard-Jones K, Fleming S., et al.** The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990; 346:194-196.

31. **Rodeck U, Bossler A, et al.** Expression of the Wilms' tumor gene by normal and malignant human melanocytes. *Int J Cancer* 1994;59:78-82.
32. **Viel A, Giannini F, et al.** Molecular mechanisms possibly affecting WT1 functions in human ovarian tumors. *Int J Cancer* 1994; 57:515-521.
33. **Miwa H, Beran M, and Saunders GF.** Expression of the Wilms' tumor gene (wt-1) in human leukemias. *Leukemia* 1992; 6:405-409.
34. **Menssen HD, Renkl HJ, et al.** Presence of the Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 1995; 9:1060-1067.
35. **Miyagi T, Ahuja H, et al.** Expression of the candidate Wilms' tumor gene, WT1, in human leukemia cells. *Leukemia* 1993; 7:970-977.
36. **Zhang X, Xing G, et al.** Transactivation of an intronic hematopoietic-specific enhancer of the human Wilms' tumor 1 gene by GATA-1 and c-Myb. *J Biol Chem* 1997; 272:29272-29280.
37. **Wu Y, Fraizer GC, et al.** GATA-1 transactivates the WT1 hematopoietic specific enhancer. *J Biol Chem* 1995; 270:5944-5949.
38. **Inoue K, Ogawa H, et al.** Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 1997; 89:1405-1412.
39. **Maurer U, Weidmann E, et al.** Wilms tumor gene (wt1) mRNA is equally expressed in blast cells from acute myeloid leukemia and normal CD34+ progenitors. *Blood* 1997; 90:4230-4232 (letter).

40. **Inoue K, Sugiyama H, et al.** WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994; 84:3071-3079.
41. **Brieger J, Weidmann E, et al.** The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia* 1994; 8:2138-2143.
42. **Oka Y, Udaka K, et al.** Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J Immunol.* 2000; 164:1873-80.
43. **Gao L, Bellantuono I, et al.** Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood* 2000; 95:2198-203.
44. **Andersson LC, Nilsson K, et al.** K562 human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer* 1979; 23:143-147.
45. **Martin P, Papayanuopoulou T.** HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science* 1978; 200: 1153-1154.
46. **Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T.** *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory 1989; Cold Spring Harbor, New York, USA.
47. **Bullock WO et al.** XL1-blue: A high efficient plasmid transforming recA-Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Bio-Techniques* 1987; 5:376-379.
48. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
49. **Lowry OH, et al.** Protein measurement with the Folin reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

50. **Lämmlli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
51. **Silver PJ, and Stull JT.** Myosin light chain phosphorylation in smooth muscle and nonmuscle cells as a probe of calmodulin function. *Methods Enzymol* 1983; 102:62-74.
52. **Feinberg AP, Vogelstein B** A technique for rediolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132(1):6-13.
53. **Southern EM.** Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98:503.
54. **Saiki RK, Gelfand DH et al.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-91.
55. **Kinoshita T, Imamura J et al.** Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1992; 206:231-5.
56. **Wang AM, Doyle MV et al.** Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:9717-9721.
57. **Becker-André M, Hahlbrock K.** Absolute mRNA quantification using polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res* 1989; 17:9437.
58. **Siebert PD (Author).** Quantitative RT-PCR. *Methods&Applications Book 3.* Clontech Laboratories 1993; Palo Alto, California, USA.
59. **Bergmann L, Heil G, et al.** Interleukin-2 bolus infusion as late consolidation therapy in 2nd remission of acute myelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1995; 16:271.

60. **Kaplan EM, Meier P.** Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53:457.
61. **Mantel N.** Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966; 50:163.
62. **Morris JF, Madden SL, et al.** Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT1 Wilms' tumor locus. *Oncogene*. 1991; 6:2339-48.
63. **Campbell CE, Huang A, et al.** Antisense transcripts and protein binding motifs within the Wilms tumour (WT1) locus. *Oncogene* 1994; 9:583-595.
64. **Pelletier J, Schalling M, et al.** Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev* 1991; 5:1345.
65. **Nakajima-Iijima S, Hamada H, et al.** Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: Interspecies homology in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:6133.
66. **Farrell RE Jr.** DNA amplification. *Immunol Invest* 1997 26:3-7.
67. **Haff LA.** Improved quantitative PCR using nested primers. *PCR Methods Appl* 1994; 3:332-7
68. **Brenner B, Wildhardt G, et al.** RNA polymerase chain reaction detects different levels of four alternatively spliced wt-1 transcripts in Wilms' tumors. *Oncogene* 1992; 7:1431-1433.
69. **Kwok S, Higuchi R.** Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339(6221):237-8
70. **Zittoun RA, Mandelli F, et al.** Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)*

and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell' Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med* 1995; 332:217-223.

71. **Gorin NC.** Autologous stem cell transplantation in acute myelocytic leukemia. *Blood* 1998; 92:1073-1090.
72. **Diverio D, Pandolfi PP, et al.** Absence of reverse transcription-polymerase chain reaction detectable residual disease in patients with acute promyelocytic leukemia in long-term remission. *Blood* 1993; 82:3556-9.
73. **Tamaki H, Ogawa H.** Increased expression of the Wilms tumor gene (WT1) at relapse in acute leukemia. *Blood* 1996; 88:4396.
74. **Osawa M, Hanada H, et al.** Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996; 273: 242-245
75. **Shipp MA, Harrington DP, et al.** The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project; A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329:987-994.
76. **Ino T, Miyazaki H et al.** Expression of P-Glycoprotein in De Novo Acute Myelogenous Leukemia at Initial Diagnosis: Results of Molecular and Functional Assays, and Correlation With Treatment Outcome. *Leukemia* 1994; 8:1492-1497.
77. **Reuss-Borst MA, Bühring HJ et al.** AML: Immunophenotypic Heterogeneity and Prognostic Significance of c-kit Expression. *Leukemia* 1994; 8:258-263.
78. **Tamaki H, Ogawa H, et al.** The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1999; 13:393-9.
79. **Schmid D, Heinze G, et al.** Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1997; 11:639-43.

80. **Baird, P. N. and Simmons, P. J.** Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol.* 1997; 25:312-20.
81. **Sekiya M, Adachi M, et al.** Downregulation of Wilms' tumor gene (wt1) during myelomonocytic differentiation in HL60 cells. *Blood* 1994; 83:1876-82.
82. **Phelan SA, Lindberg C, et al.** Wilms' tumor gene, WT1, mRNA is down-regulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Cell Growth Differ.* 1994; 5:677-86.
83. **Smith SI, Weil D, et al.** Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, is upregulated by leukemia inhibitory factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells. *Blood* 1998; 91:764-73.
84. **Svedberg H, Chylicki K, et al.** Constitutive expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in the leukemic cell line U937 blocks parts of the differentiation program. *Oncogene* 1998; 16:925-32.
85. **Inoue K, Tamaki H, et al.** Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1998; 91:2969-76.
86. **Deuel TF, Guan LS, et al.** Wilms' tumor gene product WT1 arrests macrophage differentiation of HL- 60 cells through its zinc-finger domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254:192-6.
87. **Svedberg H, Chylicki K, et al.** Downregulation of Wilms' tumor gene (WT1) is not a prerequisite for erythroid or megakaryocytic differentiation of the leukemic cell line K562. *Exp Hematol.* 1999; 27:1057-62.
88. **Algar EM, Khromykh T, et al.** A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene* 1996; 12:1005-14.

89. **Yamagami T, Sugiyama H, et al.** Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* 1996; 87:2878-84.
90. **Murata Y, Kudoh T, et al.** The Wilms tumor suppressor gene WT1 induces G1 arrest and apoptosis in myeloblastic leukemia M1 cells. *FEBS Lett.* 1997; 409:41-5.
91. **Smith SI, Down M, et al.** Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, reduces the tumorigenicity of the leukemic cell line M1 in C.B-17 scid/scid mice. *Cancer Res.* 2000; 60:808-14.
92. **King-Underwood L, Renshaw J, et al.** Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood* 1996; 87:2171-9.
93. **King-Underwood, L. and Pritchard-Jones, K.** Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood* 1998; 91:2961-8.

Danksagung

Meinen Dank möchte ich aussprechen:

Herrn Prof. Dr. L. Bergmann und Herrn Prof. Dr. P.S. Mitrou für die Überlassung des Themas und des Laborplatzes, als auch für ihre freundliche Unterstützung, ihre stete Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt ihre Geduld bei der Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. D. Hoelzer für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Allen Mitarbeitern der III. Med. Klinik, insbesondere der Labore Ei50, Ei40, Ei33 und der hämatologischen Routinelabore für ihre Hilfsbereitschaft, ihre Unterstützung und die angenehme, freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. U. Kalina für seine unschätzbare Hilfe und seine Freundschaft.

Lebenslauf

Name: Christoph Cornelius Miething
Anschrift: Gabelsbergerstr. 85, 80333 München
Geburtsdatum: 11.12.1970
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig
Schulausbildung: bis 1990 Besuch des Gymnasiums an der Stadtmauer in Bad Kreuznach, Abiturprüfung am 18.6.1990

Studium:

1991 Beginn des Medizinstudiums an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt am Main
1992 Beginn des Studiums der Philosophie als Doppelstudium
1993 Physikum im Frühjahr 1993
1994 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Frühjahr 1994
1994 Erster Teil des Amerikanischen Medizin-Examens (USMLE Step1)
1994 Zwischenprüfung Philosophie im Sommersemester 1994 und Tätigkeit als Tutor in der Philosophie während des Wintersemesters 1994/95
1995 Beginn der Promotionsarbeit in der Hämatologisch-Onkologischen Abteilung (Medizinische Klinik III) der Universitätsklinik Frankfurt im Frühjahr 1995
1997 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Frühjahr 1997
1997 Zweiter Teil des amerikanischen Medizin-Examens (USMLE Step2) im Frühjahr 1997
1997 Im Oktober 1997 Beginn des Praktischen Jahrs (PJ)
1998 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Herbst 1998

Praktische Ausbildung:

Famulaturen in der Universitätsklinik Frankfurt am Main und im Bürgerhospital Frankfurt am Main. PJ in der Universitätsklinik Frankfurt, am Hospital for Sick Children in Toronto, Kanada und am Hôpital Pitié-Salpêtrière in Paris, Frankreich

April 1999 – Oktober 2000 Arzt im Praktikum in der Abteilung für Innere Medizin III des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Peschel

Ab Oktober 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Labor für Leukämogenese, AG Dr.Duyster der III. Med. Klinik des Klinikums rechts der Isar

Wissenschaftl. Ausbildung:

1995-1997 Promotion in der Abteilung Hämatologie/Onkologie von Prof. Hoelzer in der Arbeitsgruppe von Prof. Bergmann und Prof. Mitrou
1997 Halbjährige Forschungsarbeit über das IL-18 Zytokin in der Abteilung Hämatologie/Onkologie von Prof.Hoelzer in der Arbeitsgruppe von Dr. Ottmann/Dr.Kalina
1999-2000 Arbeit im Leukämieforschungslabor der Arbeitsgruppe Dr.Duyster in der Abteilung für Innere Medizin III des Klinikums rechts der Isar über Interaktionspartner von Bcr-Abl. Untersuchungen zur Signaltransduktion von NPM-ALK. Etablierung eines Mausmodells der CML sowie des Großzellig-Anaplastischen Lymphoms.

München, den 08.01.2001



Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die, dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

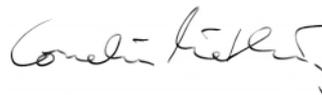
Die Bedeutung des Wilms Tumor Gens (WT-1) für die Prognose und das Monitoring der Akuten Myeloischen Leukämie

im Zentrum der Inneren Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. L. Bergmann mit Unterstützung durch Prof. Dr. P.S. Mitrou ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan: *Blood 1997; 90:1217-25*
veröffentlicht.

München, den 08.01.2001



Cornelius Miething