Aus der Abteilung für Hämatologie und Onkologie

(Prof. Dr. med. L. Trümper)

im Zentrum Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Expression von Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 (PIN1) in Blasten von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hanne Hangen
aus
Mainz

Göttingen 2011

Dekan:	**Prof. Dr. med. C. Frömmel**
I. Berichterstatter:	**Prof. Dr. med. G. Wulf**
II. Berichterstatter:	**Priv.-Doz. Dr. rer. Nat. H. Bastians**
Tag der mündlichen Prüfung:	**05.07.2011**

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 9
1.1 Leukämien ... 9
1.2 Akute myeloische Leukämie (AML) ... 10
1.2.1 Leukämogenese ... 10
1.2.2 Epidemiologie ... 10
1.2.3 Klinik der AML ... 11
1.2.4 Risikofaktoren und Prognose ... 11
1.2.4.1 Prognosefaktor Zytogenetik ... 13
1.2.5 Klassifikation der AML ... 13
1.2.6 Therapie der AML ... 14
1.3 Pin1 ... 16
1.3.1 Cis-Trans-Isomerie in der Struktur von Proteinen ... 16
1.3.2 Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerasen ... 18
1.3.3 Pin1 (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1) ... 18
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit ... 19
2 Material und Methoden ... 20
2.1 Material ... 20
2.1.1 Chemikalien ... 20
2.1.2 Antikörper ... 21
2.1.3 Primer ... 22
2.1.4 Verbrauchsmaterial ... 22
2.1.5 Geräte und Zubehör ... 23
2.1.6 gebräuchliche Puffer ... 24
2.1.7 Software ... 25
2.1.8 Patientenmaterial/ Ethik ... 25
2.1.9 Zelllinien ... 26
2.2 Methoden ... 27
2.2.1 Molekuarbiologische Methoden ... 27
2.2.1.1 RNA-Extraktion ... 27
2.2.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung ... 27
2.2.1.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription ... 28
2.2.1.4 konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 28
2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese ... 29
2.2.1.6 quantitative Realtime (Echtzeit)-PCR ... 30
2.2.1.7 Software-gestützte Auswertung der qPCR-Daten ... 32
2.2.2 Zellbiologische Methoden ... 32
2.2.2.1 Gewinnung mononukleärer Zellen ... 32
2.2.2.2 Kontinuierliche Zellkultur ... 33

2.2.2.3 Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung ... 33
2.2.2.4 Kryokonservierung ... 33
2.2.2.5 Revitalisierung von kryokonservierten Zellen ... 34
2.2.2.6 Zytospinzentrifugen-Präparate ... 34
2.2.2.7 Immunzytochemische Färbung von Zytospin-Präparaten ... 34
2.2.2.8 Durchflusszytophotometrie ... 35
2.2.3 Klinisch-deskriptive und statistische Methoden ... 36

3 Ergebnisse ... 38

3.1 Deskriptive Statistik der AML-Patientenkollektive ... 38
3.2 Pin1-Expression auf RNA-Ebene ... 40
3.2.1 konventionelle PCR ... 40
3.2.1.1 Standardisierung ... 40
3.2.1.2 Pin1-Expression in AML-Zelllinien ... 41
3.2.1.3 Pin1-Expression in gesunden Probanden ... 41
3.2.1.4 Pin1-Expression der AML-Patienten (konventionelle PCR) ... 42
3.2.1.5 Pin1-Expression in Proben kindlicher AML ... 42
3.2.1.6 Pin1-Expression in Proben erwachsener AML-Patienten ... 43
3.2.2 Quantitative Realtime-PCR (qPCR) von AML-Patienten-Proben ... 45
3.2.2.1 Nachweis der qPCR-Qualität ... 45
3.2.2.2 Zusammenfassung der qPCR-Daten ... 49
3.3 Pin1-Expression auf Proteinebene ... 53
3.3.1 Immunzytochemische Färbungen ... 53
3.3.2 Durchflusszytophotometrie (FACS) ... 55
3.4 Zusammenschau der Pin1-Expression ... 57

4 Diskussion ... 58

4.1 Kritik der Methoden ... 58
4.1.1 RNA-Extraktion ... 58
4.1.2 Konventionelle PCR ... 58
4.1.3 Quantitative Realtime-PCR (qPCR) ... 59
4.1.4 Immunzytochemische Färbungen ... 59
4.1.5 Durchflusszytophotometrie ... 60
4.1.6 Vergleichbarkeit der Ergebnisse von PCR, immunzytochemischen Färbungen und Durchflusszytophotometrie ... 61
4.2 Kritik der Ergebnisse ... 63
4.2.1 Patientencharakteristika ... 63
4.2.2 Pin1-Expression bei Gesunden ... 63
4.2.3 Analyse der Pin1-Expression auf RNA-Ebene ... 64
4.2.4 Prognostische Relevanz der Pin1-Expression bei AML-Patienten ... 65
4.2.5 Pin1-Expression und andere prognostische Marker bei AML ... 66
4.2.6 Nachweis von Pin1 auf Proteinebene ... 66
4.3 Schlussfolgerungen ... 68

5 Zusammenfassung ... 69

6 Abkürzungsverzeichnis 70

7 Anhang: Tab. 6-8, Abb. 28 74

8 Literaturverzeichnis 77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gesamtüberlebensraten bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, aufgetrennt nach Behandlungszeiträumen, Daten des MD Anderson Cancer Center, Texas, USA. (Jabbour et al. 2006, S. 250) 12
Abbildung 2: Reaktion zweier Aminosäuren (a) zu einem Dipeptid (b), grau unterlegt die Peptidbindung mit Darstellung des Grenzzustandes zur Doppelbindung in (c) 16
Abbildung 3: Cis-Trans-Isomerie bei Aminosäurefolgen (a), speziell bei X-Pro-Sequenzen (b), Quelle: modifiziert nach Abb. 2.25 und Abb. 2.26 in „Biochemistry“ (Berg et al. 2007, S. 38)..... 17
Abbildung 4: Emissionsspektra von SYBR Green I (grün) und ROX (blau) (Fluorescence SpectraViewer, Invitrogen)..... 31
Abbildung 5: Häufigkeiten der vertretenen FAB-Subtypen in Prozent 38
Abbildung 6: Altersverteilung bei Erstdiagnose AML, a) Kinder 17 ≤ Jahre, b) Erwachsene 39
Abbildung 7: Gesamtüberlebenskurven in Abhängigkeit von der zytogenetischen Prognose; a) alle Patienten, b) Erwachsene, c) Kinder..... 39
Abbildung 8: Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit von der zytogenetischen Prognose a) alle Patienten, b) Erwachsene, c) Kinder..... 40
Abbildung 9: Amplifikation von Abl/Pin1 aus HL60-cDNA, 1-7: Abl (1:NTC, 2-7: 15-40 Zyklen), 8: 300bp-DNA-Leiter, 9-15: Pin1 (9:NTC, 10-15: 15-40 Zyklen).... 41
Abbildung 10: Amplifikation von a) Abl und b) Pin1 , jeweils von HL60-cDNA, graphische Darstellung der semiquantitativen Gelauswertung. 41
Abbildung 11: Abl/Pin1-Expression in AML-Zelllinien (1: HL60-Abl, 2: NB4-Abl, 3: U937-Abl, 4: H2O-Abl, 5: 300bp-DNA-Leiter, 6: H2O-Pin1, 7: U937-Pin1, 8: NB4-Pin1, 9: HL60-Pin1)..... 41
Abbildung 12: PCR bei Zelllinien und gesunden Probanden: K562 = Pin1-neg Zelllinie, HL60 = Pin1-pos Zelllinie, CB= Cord blood (Nabelschnurblut Gesunder), KM= Knochenmarksproben ohne pathologischen Befund, PB = peripheres Blut gesunder Probanden 42
Abbildung 13: Überlebenskurven in Abhängigkeit von Pin1-Expression, a) OAS, b) EFS…. 45
Abbildung 14: Threshold beta-Actin, a) linear, b) logarithmisch 46
Abbildung 15: Threshold Pin1, a) linear, b) logarithmisch 47
Abbildung 16: Standardverdünnungskurve von Beta-Actin, schwarze Quadrate: Ct-Werte der einzelnen HL60-Verdünnungen, rote Kreuze: Ct-Werte der Patienten-Proben 48
Abbildung 17: Standardverdünnungskurve von Pin1, schwarze Quadrate: Ct-Werte der einzelnen HL60-Verdünnungen, rote Kreuze: Ct-Werte der Patienten-Proben 48
Abbildung 18: Schmelzkurven (Patientenproben), a) beta-Actin, b) Pin1 49
Abbildung 19: Quantitative PCR-Analyse von Patientin S.F. (hellgrün=Pin1, dunkelgrün=beta-Actin) 50

Abbildung 20: Gesamtüberleben aller Patienten in Abhängigkeit von der Pin1-Expression, statistische Signifikanz im log-rang-test (p=0,009) 51
Abbildung 21: Ereignisfreies Überleben aller Patienten in Abhängigkeit von der Pin1-Expression 51
Abbildung 22: Überlebenskurven der Erwachsenen und der Kinder a) OAS-Erw, b) EFS-Erw, c) OAS-Kinder, d) EFS-Kinder..... 52
Abbildung 23: Immunzytochemische Färbung verschiedener AML-Zelllinien mit Pin1-AK HL60 (a=200x, b=1000x), NB4 (c=200x, d=1000x), U937 (e=200x, f=1000x) 53
Abbildung 24: Immunzytochemische Färbung von AML-Patientenproben mit Pin1-AK Pat.1 (a=400x, b=1000x), Pat.2 (c=200x, d=1000x), Pat.3 (e=200x, f=1000x), Pat.5 (g=200x, h=1000x) 54
Abbildung 25: FACS-Analyse von HL60 (AML M2-Zelllinie) - Koexpression von Pin1 & CD13/33: a) FSC vs SSC, b) keine AK, c) Pin1-FITC (X-Achse), d) CD13/33-PE (Y-Achse), e) Pin1-FITC (X-Achse) & CD13/33-PE (Y-Achse); R1 = „Blastengate“ 55
Abbildung 26: FACS-Analyse von Pat. A.S. (AML M7) a) FSC vs SSC, b) keine AK, c) Pin1-FITC, d) Pin1-FITC & CD34-PE, e) Pin1-FITC & CD13/33-PE, f) Pin1-FITC & CD3-PE; R1 = „Blastengate“;..... 56
Abbildung 27: Vergleichsuntersuchungen PCR, FACS und Immunzytochemie an 3 Proben 57
Abbildung 28: Konventionelle PCR: Überlebenskurven der Kinder in Abhängigkeit von Pin1-Expression, a) OAS, b) EFS..... 76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete AML-Zelllinien 26
Tabelle 2: Pin1-Expression der pädiatrischen AML-Proben in Abhängigkeit von der FAB-Klassifikation 43
Tabelle 3: Pin1-Expression in den Proben von Erwachsenen mit AML in Abhängigkeit von der FAB-Subklassifikation 44
Tabelle 4: 2x2-Feldertafel für Analyse der CR-Rate in Abhängigkeit von Pin1-Werten, Erwachsene 44
Tabelle 5: 2x2-Feldertafel für Analyse der CR-Rate in Abhängigkeit von Pin1-Werten, alle Patienten 52
Tabelle 6: Zytogenetische Klassifikation der AML (Heilmeier et al. 2007, S. 302) 74
Tabelle 7: FAB-Klassifikation der AML (Bennett et al. 1976; Bennett et al. 1985b; Krause 2000) 74
Tabelle 8: WHO-Klassifikation der AML (Vardiman et al. 2002; Vardiman et. al. 2009) 75

1 Einleitung

Bei einem stetig steigenden durchschnittlich zu erwartenden Lebensalter fällt den Tumorerkrankungen immer größere Bedeutung zu. Tumoren entstehen aufgrund von Veränderungen der DNA von Zellen. Hierbei können verschiedene ursächliche Mechanismen exogener (z.B. chemisch, physikalisch, viral) und endogener (genetische Disposition) Natur unterschieden werden. Die resultierenden Genveränderungen (Mutationen) führen über die Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zu einer fehlenden Kontrolle der Zellautonomie durch den Organismus und zu unkontrolliertem Wachstum (Spandidos 2007; Willman und Fenoglio-Preiser 1987). Mit Pin1 wurde 1996 ein Protein beschrieben, das eine wichtige Funktion in der Zellzyklusregulierung (Lu KP et al. 1996) hat und in Tumorzellen vieler Gewebe deutlich überexprimiert gefunden wurde (Bao et al. 2004); genannt seien beispielhaft das Mamma-Karzinom (Wulf et al. 2001), das Plattenepithel-Karzinom der Mundhöhle (Miyashita et al. 2003) und das kolorektale Karzinom (Kuramochi et al. 2006). Eine prognostische Bedeutung dieser Überexpression konnte beispielsweise bereits für Prostata-Karzinome (Ayala et al. 2003) nachgewiesen werden. Pin1 scheint demnach eine wichtige Rolle in der Tumorigenese zu spielen und könnte einen möglichen Angriffspunkt für die Entwicklung einer gezielten Therapie darstellen.

1.1 Leukämien

Leukämien sind Neoplasien der hämatopoetischen Vorläuferzellen, wobei es zu der Expansion eines maligne transformierten Zellklons mit Übertritt der Zellen ins Blut kommt. Der Begriff wurde erstmalig von Rudolf Virchow verwendet, der bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie „weißes Blut“, entsprechend einer Umkehr der Verhältnisse von Erythrozyten zu Leukozyten im peripheren Blut, beobachtete und den an das Griechische angelehnten Begriff „Leukämie“, von λευκός (griech.) weiß und αἷμα (griech.) Blut, prägte (Virchow 1847).

Die Leukämien werden nach dem leukozytären Zelltyp in myeloische oder lymphatische Leukämien eingeteilt und nach dem klinischen Verlauf in akute und chronische. Während Patienten mit einer akuten Leukämie ohne Behandlung innerhalb von wenigen Tagen bis Wochen versterben, kann es bei Patienten mit einer chronischen Leukämie zu einem stabilen Verlauf über mehrere Jahre kommen.

1.2 Akute myeloische Leukämie (AML)

1.2.1 Leukämogenese

Bei der AML kommt es durch Fehlregulationen der Hämatopoese zu einem unkontrollierten Wachstum einer Vorläuferzelle mit der Ausbildung einer klonalen Zellpopulation, welche typischerweise die Merkmale (morphologische, zytochemische und immunologische) einer myeloischen Zellreihe trägt. Im Gegensatz zur normalen Hämatopoese reifen die entarteten Zellen jedoch nicht regelgerecht aus, stattdessen beobachtet man einen Differenzierungsstop auf Höhe der unreifen Vorstufen, welche man als „Blasten“ bezeichnet. Blasten imponieren lichtmikroskopisch in der panoptischen Färbung nach Pappenheim als mittelgroße Zellen (12-20 µm Durchmesser) mit bläulich gefärbtem Zytoplasma und einem runden/ovalen, nicht gelappten Kern. Sie zeichnen sich durch eine hohe Kern-Zytoplasma-Relation und eine feinretikuläre Chromatinstruktur des Kerns aus. Auch im Knochenmarkausstrich Gesunder finden sich Blasten (diese entsprechen den regelhaft vorhandenen frühen Vorläuferzellen), jedoch darf ihre Zahl 5% nicht überschreiten. Der Nachweis von Blasten im peripheren Blut ist immer als pathologisch anzusehen, wobei nicht zwangsweise eine Leukämie die Ursache hierfür darstellt (Fuchs 2002; Löwenberg et al. 1999; Naegeli 1900). Der aktuellen Lehrmeinung nach gibt es eine entartete „leukämische Stammzelle“, immunologisch charakterisiert durch CD34-Antigennachweis bei CD38-Negativität, welche durch zeitlich unbegrenzte Selbsterneuerung immer neue Leukämiezellen hervorbringt (Bonnet und Dick 1997; Lapidot et al. 1994). Allerdings wird seit Jahren kontrovers diskutiert, ob diese leukämischen Stammzellen durch Entartung regulärer pluripotenter hämatopoetischer Vorläuferzellen entstehen oder auf einem Wiedererlangen von Stammzelleigenschaften „reiferer“, linienspezifischer Vorläuferzellen mit nachfolgendem unkontrolliertem Wachstum beruhen (Cozzio et al. 2003; Passegue et al. 2003). Auf molekularer Ebene könnte Pin1 im Rahmen des Ras-Signalweges an der Leukämogenese der AML beteiligt sein. (Fröhling et al. 2005; Ryo et al. 2002; Wulf et al. 2001).

1.2.2 Epidemiologie

Die akute myeloische Leukämie ist vorwiegend eine Erkrankung des Erwachsenen, deren Inzidenz mit steigendem Lebensalter zunimmt. Weltweit liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 60-67 Jahren und die Inzidenz bei circa 3,5/100.000 Einwohner pro Jahr. Insgesamt erkranken Männer entsprechend dem Verhältnis 1,15:1 etwas häufiger als Frauen an AML (Altekruse et al. 2010). Hieraus errechnet sich, dass einer von 272 Menschen im Laufe seines Lebens an AML erkrankt (Hayat et al. 2007).

Das Risiko, an AML zu erkranken, wird durch Exposition gegenüber bestimmten Schadstoffen wie organischen Lösungsmitteln (Austin et al. 1988) oder ionisierender Strahlung (Levine und Bloomfield 1992) und durch eine vorangegangene Chemotherapie, insbesondere mit Alkylanzien (Pedersen-Bjergaard et al. 1993), erhöht. Einige genetische Aberrationen wie die Trisomie 21 (Evans und Steward 1972; Krivit und Good 1957) oder die Fanconi-Anämie (Auerbach und Allen 1991) sind mit einer erhöhten Erkrankungsrate an AML assoziiert.

1.2.3 Klinik der AML

Das Vollbild der akuten myeloischen Leukämie entwickelt sich innerhalb weniger Tage bis Wochen und besteht in der Regel aus dem Bild eines massiven Blastenexzesses mit den Komplikationen einer Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Hieraus resultiert ein klinisches Bild geprägt von Blutungsneigung (Thrombopenie), schweren systemischen Infektionen (absolute Leukopenie und insbesondere Neutropenie der regulären, nicht dem leukämischen Klon angehörenden Zellen) und Schwächegefühl bis hin zu einer ausgeprägt reduzierten Belastbarkeit (Anämie). Bei einer in ca. 40-50% der Fälle bereits bei Diagnosestellung aufgetretenen massiven Ausschwemmung von unreifen Vorläuferzellen (Blasten) in das periphere Blut treten teilweise lebensbedrohliche Mikrozirkulationsstörungen infolge einer Hyperviskosität auf (Fuchs 2002).

Ohne eine aggressive Chemotherapie versterben Patienten mit akuter myeloischer Leukämie oft schon nach wenigen Tagen bis Wochen (Löwenberg et al. 1989).

1.2.4 Risikofaktoren und Prognose

Die 5-Jahres-Überlebensrate bei AML beträgt weltweit aktuell 21% (<65Jahre: 35% 5JÜR, >65Jahre: 4% 5JÜR), wobei die Prognose in den vergangenen Jahrzehnten durch Modifikationen der Therapie etwas verbessert werden konnte (Hayat et al. 2007). In den westlichen Ländern mit hohem Lebensstandard und einer umfassenden Gesundheitsversorgung konnten die Langzeitüberlebensraten bei jüngeren Patienten (<65 Jahre) durch neuere Therapiestrategien wie der allogenen Stammzelltransplantation mit 30-40% deutlich verbessert werden (Jabbour et al. 2006). Beispielhaft ist dies anhand der Überlebenskurven des MD Anderson Cancer Center (Jabbour et al. 2006) in Abbildung 1 zu erkennen (weitere vergleichbare Überlebenskurven siehe auch bei Grimwade (Grimwade 2001). Patienten, bei denen über drei Jahre eine komplette Remission erreicht werden konnte, können als potentiell geheilt angesehen werden, es besteht jedoch immer noch eine Rezidivrate von 10% im Verlauf (de Lima et al. 1997).

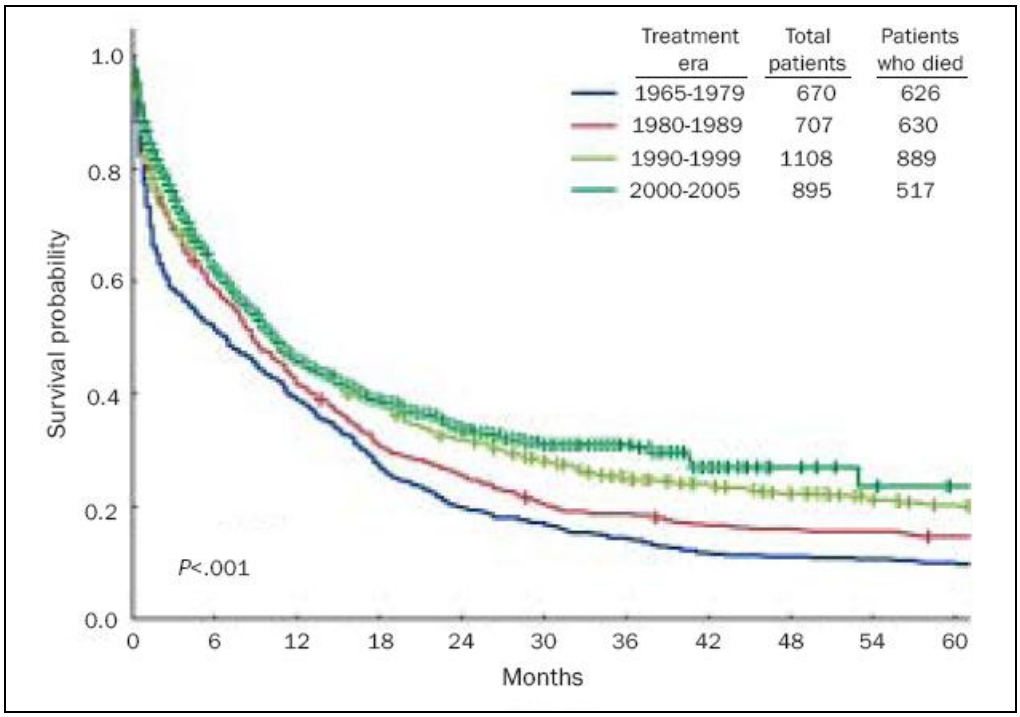

Abbildung 1: Gesamtüberlebensraten bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, aufgetrennt nach Behandlungszeiträumen, Daten des MD Anderson Cancer Center, Texas, USA.
(Jabbour et al. 2006, Seite 250)

Die derzeit wichtigsten prognostischen Faktoren bei der AML stellen das Erkrankungsalter und der zytogenetische Status des Patienten dar (Stone et al. 2004). Die prognostische Bedeutung zytogenetischer Veränderungen wird daher im nachfolgenden Unterpunkt (1.2.4.1, Seite 13) noch genauer dargestellt werden.

Die Prognose des Einzelnen wird darüber hinaus vom Allgemeinzustand des Patienten, der LDH im Serum, der Leukozytenzahl im peripheren Blut, dem Vorhandensein von extramedullären Manifestationen oder schweren Infektionen und dem Ansprechen auf die primäre Chemotherapie bestimmt. Tritt eine Leukämie als sekundäre Erkrankung nach Chemotherapie auf oder entwickelt sich aus einem myelodyplastischen oder myeloproliferativen Krankheitsbild, haben die Patienten eine deutlich schlechtere Prognose. (Fuchs 2002)

In jüngster Vergangenheit wird das Ausmaß der progonostischen Bedeutung molekularer Marker (z.B. FLT3-ITD-Mutation als negativer und NPM1-Mutation als positiver prognostischer Marker bei Patienten mit ansonsten normalem Karyotyp) deutlich (Gaidzik und Dohner 2008; Mrozek et al. 2007; Thiede et al. 2006). Teils werden diese Erkenntnisse bereits bei Therapieentscheidungen eingebunden, beispielsweise in der Hinzunahme von Target-spezifischen Medikamenten im Rahmen von klinischen Studien (Einsatz eines Tyrosinkinasehemmers bei FLT3-Mutation, sowie weitere Studien der AMLSG bei AML-Patienten ohne zytogenetisch nachweisbare Aberrationen). Ein weltweit anerkannter Prognosescore auf der Basis der Molekulargenetik wurde bisher allerdings noch nicht formuliert (Baldus und Bullinger 2008; Gaidzik und Dohner 2008).

1.2.4.1 Prognosefaktor Zytogenetik

Bei 55% aller AML-Patienten lassen sich zytogenetische Aberrationen nachweisen, deren wichtige prognostische Relevanz im Verlauf des vergangenen Jahrzehnts nachgewiesen wurde (Grimwade et al. 1998; Grimwade 2001; Grimwade et al. 2004; Heilmeier et al. 2007; Schoch und Haferlach 2002). Die prognostisch ungünstigen therapieassoziierten sekundären AMLs weisen beispielsweise korrelierend eine deutlich höhere Rate (50% gegenüber 15% bei primären AMLs) an komplexen zytogenetischen Aberrationen auf (Alvarez und Cigudosa 2005). Es besteht die Vermutung, dass die Rate klonaler genetischer Aberrationen noch deutlich höher liegt und derzeit aufgrund technischer Grenzen und kryptischer Rearrangements verfälscht wird (Grimwade 2001).

In den Klassifikationen der großen AML-Studiengruppen wie der deutschen AMLCG (AML coordination group), der CALGB (cancer and leukemia group B, USA), der SWOG (southwest oncology group, USA), der ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group, USA) und weiteren, erfolgt die Einteilung in drei weitgehend übereinstimmende prognostische Gruppen (Grimwade et al. 2004), wie in der im Anhang aufgeführten Tabelle 6 dargestellt.

1.2.5 Klassifikation der AML

Die akute myeloische Leukämie wird seit 1976 gemäß der FAB-Klassifikation aufgrund von zytomorphologischen Merkmalen in Subgruppen unterteilt (Bennett et al. 1976; Bennett et al. 1985a; Bennett et al. 1985b; Bennett et al. 1991). Es existieren die Klassen M0-M7 (siehe im Anhang Tabelle 7), welche teilweise mit einzelnen zytogenetisch definierbaren Aberrationen korrelieren.

Der Nachweis der elementaren prognostischen Bedeutung von zytogenetischen Aberrationen bei AML sowie die Einführung der Zytogenetik in die Standarddiagnostik der AML bedingten die Entwicklung einer neuen Klassifikation (WHO-Klassifikation), welche sich vor allem an zytogenetisch eindeutig definierbaren Subtypen und erst zweitrangig an morphologischen Kriterien orientiert (siehe Anhang, Tabelle 8). Die Eingruppierung gemäß der WHO-Klassifikation setzt sich zunehmend auch in der Praxis durch.

1.2.6 Therapie der AML

Gegenwärtig ist das primäre Ziel einer Therapie der AML das Erreichen einer kompletten Remission (CR, von engl. complete remission), welche formal erfüllt ist, wenn bei regenerierter Hämatopoese der Blastenanteil im Knochenmark weniger als 5% beträgt und gleichzeitig im peripheren Blut keine Blasten mehr nachzuweisen sind. Liegt der Blastenanteil im Knochenmark bei mehr als 5%, konnte bereits von Cheson et al. gezeigt werden, dass in der Regel keine dauerhaften Remissionen zu erwarten sind (Cheson et al. 1990).

Die initiale Chemotherapie, auch Induktions-Chemotherapie, hat zunächst die Reduktion der Tumorlast und des Weiteren das Erreichen einer kompletten zytomorphologischen Remission zum Ziel. Hierfür werden in der Regel Cytarabin-haltige Chemotherapie-Regimes in zwei Blöcken durchgeführt, auch Doppelinduktion genannt. Eine komplette Remission wird durch die Induktionschemotherapie bei jüngeren Patienten in 75-80% der Fälle erreicht, bei älteren Patienten oder Patienten mit prognostisch schlechten zytogenetischen Aberrationen hingegen sind die Remissionsraten mit ≤50% deutlich schlechter (Hiddemann et al. 2006; Melchert 2006; Stone 2002). Hinzu kommt, dass auch nach Erreichen einer formal kompletten Remission in der Regel noch residuelle Leukämiezellen vorhanden sind, welche ohne weitere Therapie in hohem Maß zu einem Rezidiv der Erkrankung führen (Lo et al. 1992; San Miguel et al. 1997). Als Postremissionstherapie schließt sich daher immer eine weitere Therapie an. Je nach Risikoprofil und Therapieziel beinhaltet diese weitere Zyklen einer klassischen Chemotherapie oder auch eine Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzellretransfusion oder eine allogene Stammzelltransplantation vom Familien- oder Fremdspender.

Nach den Empfehlungen der EBMT (European group for blood and marrow transplantation) ist bei AML M3 und anderen zytogenetisch als günstig einzustufenden AMLs die Chemotherapie das Mittel der Wahl. Bei intermediärem Risiko werden die autologe Transplantation nach Hochdosis-Chemotherapie oder die allogene Stammzelltransplantation vom Familienspender in erster Remission empfohlen. Bei Hochrisiko-Patienten steht die Empfehlung zur allogenen Transplantation (verwandt oder unverwandt) bei Erreichen der ersten kompletten Remission. Mit dem ersten Rezidiv der Erkrankung wird, unabhängig von der initialen prognostischen Eingruppierung, die allogene Stammzelltransplantation auch vom unverwandten Spender empfohlen. (Fey et al. 2005; Frassoni 2004)

Die Überwachung der formal kompletten Remission kann bei zuvor diagnostizierten molekulargenetischen Veränderungen mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgen. Hierdurch lassen sich auch geringe Zahlen von Leukämiezellen detektieren.

Das Monitoring der eventuell vorhandenen oder wieder auftretenden Leukämiezellen wird mit MRD-Diagnostik (von MRD = engl. minimal residual disease = minimale Resterkrankung) bezeichnet. Hierdurch lassen sich beispielsweise der Erfolg einer allogenen Stammzelltransplantation mit weiterer Abnahme der MRD-Parameter durch Graft-versus-Leukemia-Reaktion, oder aber das Rezidiv der Erkrankung bei Anstieg der Parameter frühzeitig erkennen (Venditti et al. 2000).

Neuere Therapien, sogenannte „targeted therapies“, greifen an spezifisch nachgewiesenen Veränderungen der transformierten Zellen an. Vorreiter war hier ATRA bei der AML M3 (Daenen et al. 1986; Huang et al. 1988), aktuell werden beispielsweise Tyrosinkinase-Inhibitoren, Farnesyltransferase-Inhibitoren oder Histon-Deacetylase-Inhibitoren in klinischen Studien eingesetzt (Fröhling et al. 2005).

1.3 Pin1

1.3.1 Cis-Trans-Isomerie in der Struktur von Proteinen

Proteine bestehen aus Aminosäuren (AS), die über Peptidbindungen (siehe Abbildung 2) miteinander verknüpft sind und dadurch Ketten bilden. (Doenecke 2005)

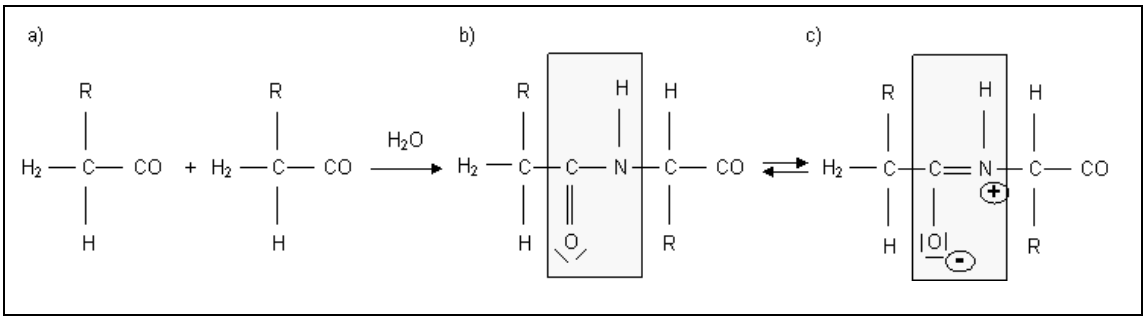

Abbildung 2: Reaktion zweier Aminosäuren (a) zu einem Dipeptid (b), grau unterlegt die Peptidbindung mit Darstellung des Grenzzustandes zur Doppelbindung in (c)

Peptidbindungen zeichnen sich durch einen partiellen Doppelbindungscharakter aus (siehe Abbildung 2), welcher zu einer starreren Raumstruktur führt und die freie Rotation der beiden Bindungspartner um die Bindungsachse einschränkt. Hierdurch ergeben sich zwei mit cis und trans bezeichnete mögliche Konfigurationen (Proteinstrukturen, die nicht ohne Lösung von Bindungen durch einfache Rotation ineinander überführt werden können) bei jeder Peptidbindung. Diese Proteine, die sich nur durch die Position der Reste voneinander unterscheiden, werden als Isomere bezeichnet:

In trans-Stellung sind die zentralen C-Atome der angrenzenden Aminosäuren diagonal zueinander in der Peptidbindung angeordnet. In cis-Konfiguration hingegen liegen die C-Atome benachbart nebeneinander (siehe Abbildung 3).

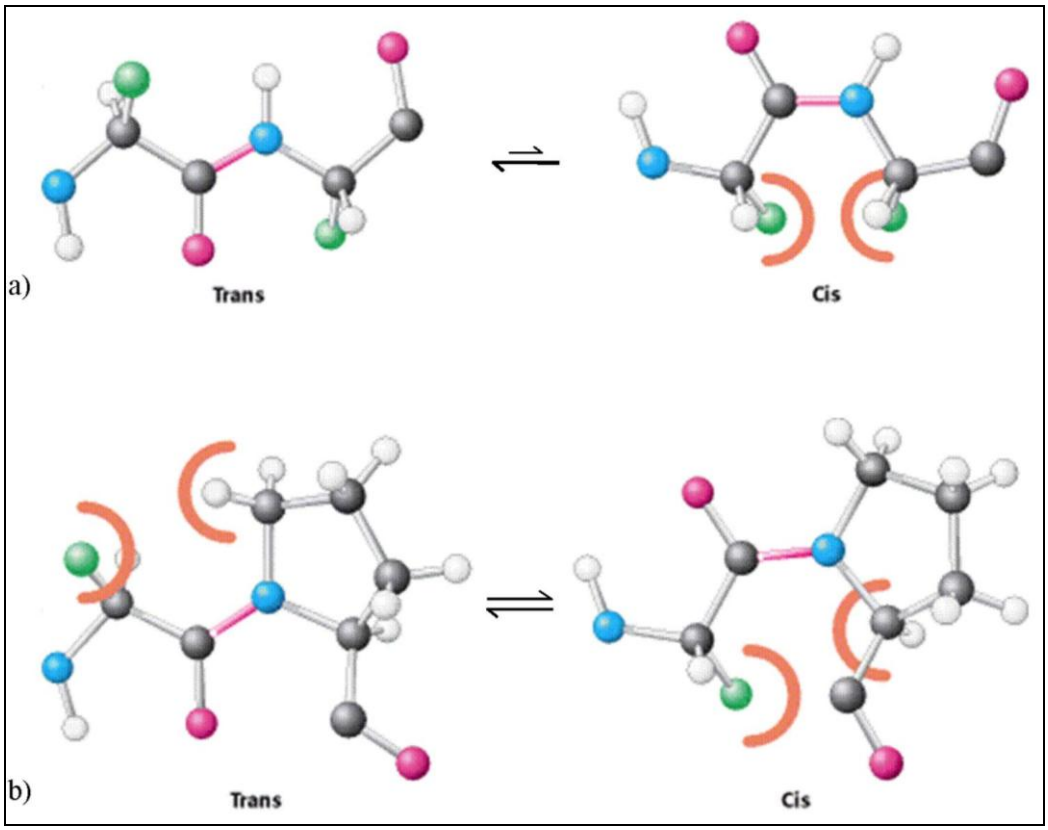

Abbildung 3: Cis-Trans-Isomerie bei Aminosäurefolgen (a), speziell bei X-Pro-Sequenzen (b), Quelle: modifiziert nach Abb. 2.25 und Abb. 2.26 in „Biochemistry“ (Berg et al. 2007, Seite 38)

Bei Peptidbindungen herrscht in mehr 90 Prozent der Fälle die Trans-Konfiguration vor, da die Cis-Stellung durch Interferenzen größerer Aminosäurereste energetisch ungünstig und damit labil ist. In einigen Ausnahmefällen trifft diese Aussage jedoch nicht zu: Peptidbindungen mit carboxyterminalem Prolin zeichnen sich durch annähernd gleiche freie Energien aus, somit besteht ein geringeres Ungleichgewicht zwischen Cis- und Trans-Isoform. Aufgrund der sterischen Verhältnisse infolge des Prolin-Ringes ist jedoch eine hohe Aktivierungsenergie zur Überführung der beiden Formen ineinander nötig. Die spontane Isomerisierung läuft dementsprechend nur sehr langsam ab.

Das Vorliegen der Cis- oder Trans-Konfiguration an Peptidyl-Prolyl-Sequenzen bewirkt entscheidende Veränderungen in der Faltung des jeweiligen Proteins. Die isomeren Proteine unterscheiden sich teilweise sehr deutlich in ihrer Aktivität, Stabilität, ihrem Phosphorylierungsstatus, dem Degradationsweg oder ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle (Schmid 1993).

1.3.2 Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerasen

Enzyme, die einen Übergang zwischen cis- und trans-Konfiguration beschleunigen, sogenannte Cis-Trans-Isomerasen, beeinflussen entscheidend die Eigenschaften ihrer Zielproteine (siehe 1.3.1, Seite 16). Isomerasen, welche zusätzlich eine Spezifität für Sequenzen mit einem carboxyterminal gelegenen Prolin besitzen, werden Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerasen (kurz PPIasen) genannt. Die Hauptvertreter dieser Enzym-Klasse wurden in den 1980er und 1990er Jahren beschrieben (Fischer et al. 1984; Rahfeld et al. 1994; Schmid et al. 1993) und setzen sich aus drei strukturell unterschiedlichen Subklassen zusammen: Cyclophiline (Interaktion mit dem Namensgeber Ciclosporin A), FK506-bindende Proteine (Interaktion mit dem Namensgeber FK506 bzw. Tacrolimus) und Parvulin-ähnliche PPIasen (Hauptvertreter Parvulin, keine Interaktion mit Ciclosporin A oder FK506).

1.3.3 Pin1 (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1)

Pin1 (Klassifikation: EC 5.2.1.8) wurde erstmalig 1996 beschrieben (Lu KP et al. 1996) und stellt einen Vertreter der Parvulin-ähnlichen PPIasen dar.

Das auf Chromosom 19p13.2 gelegene Gen Pin1 hat eine Länge von 14,359 kB (Campbell et al. 1997). Die messenger RNA von 997 Basenpaaren besitzt eine Protein-kodierende Sequenz von 492 Basenpaaren (Lokalisation: mRNA-Basenpaare 23-514), welche einem Protein von 163 Aminosäuren (AS) mit einem Molekulargewicht von 18.243 Dalton entspricht (Lu KP et al. 1996; Strausberg et al. 2002).

Das Protein Pin1 besteht aus zwei, für seine Funktion elementaren Untereinheiten: Die aminoterminal gelegene WW-Domäne (AS 1-39) gehört zur Subklasse IV der WW-Domänen und bewirkt die spezifische Erkennung von und Bindung an Sequenzen des Typs phosphoSerin-Prolin oder phosphoThreonin-Prolin (Ranganathan et al. 1997; Verdecia et al. 2000). Hierdurch wird die Interaktion der für die eigentliche enzymatische Aktivität von Pin1 verantwortlichen PPIase-Domäne (AS 52-163) ermöglicht.

Pin1 ist ein nukleäres Protein und korreliert mit der Teilungsaktivität von Zellen. In geringem Grad ist Pin1 auch im Zytoplasma entsprechend teilungsaktiver nicht-entarteter Zellen nachweisbar (Bao et al. 2004). Eine übermäßige Präsenz von Pin1 im Zytoplasma wurde im Zusammenhang mit einer Überexpression im Rahmen einer malignen Entartung beschrieben (Ayala et al. 2003; Wulf et al. 2001).

Die Stabilität und enzymatische Aktivität von Pin1 selbst wird ebenfalls durch Phosphorylierung gesteuert. Beispielsweise ist die Dephosphorylierung von Ser-16 im Bereich der WW-Domäne Voraussetzung für die Bindungsaktivität und somit für die Funktion von Pin1 als PPIase (Lu PJ et al. 2002). Im Bereich der PPIase-Domäne erfolgt über die Phosphorylierung von Ser-65 die Stabilisierung durch Verhinderung des Abbaus

durch Ubiquitinierung (Eckerdt et al. 2005). Als Aktivatoren der Pin1-Genexpression wurden E2F-Proteine nachgewiesen (Ryo et al. 2002). Pin1 wird des Weiteren über seinen proteolytischen Abbau via Proteasomen reguliert (Basu et al. 2002).

Die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro-Sequenzen durch Proteinkinasen ist einer der wichtigsten Vorgänge in der Onkogenese (Blume-Jensen und Hunter 2001; Hanahan und Weinberg 2000). Die durch Pin1 katalysierte nachfolgende Konformationsänderung nimmt somit Einfluss auf so bedeutsame Signalwege wie den Wnt-Signalweg und den Ras/AP-1-Signalweg (Lu KP et al. 2002). Pin1 ist an entscheidenden Prozessen wie der in-vivo-Proteinfaltung, Transkriptionsaktivierung, Translation, Signaltransduktion und Zellzykluskontrolle beteiligt (Fujimori et al. 1999; Lu KP et al. 1996; Winkler et al. 2000; Zhou et al. 1999).

Als Substrate von Pin1 seien hier beispielhaft die Transkriptionsfaktoren NF-kappaB (Ryo et al. 2003) und c-Jun (Wulf et al. 2001), der Transkriptionsaktivator β-Catenin (Ryo et al. 2001), der Zellzyklusregulator Cyclin D1 (Kuramochi et al. 2006; Liou et al. 2002; Miyashita et al. 2003; Nakashima et al. 2004; Wulf et al. 2004) und der antiapoptotische Faktor Bcl-2 (Basu et al. 2002) genannt.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Seit der Erstbeschreibung von Pin1 im Jahre 1996 mehrten sich innerhalb weniger Jahre die Hinweise auf die bedeutsame Rolle einer Pin1-Überexpression bei unterschiedlichen Tumoren. Die mit der weiteren Erforschung von Pin1 gewonnenen Erkenntnisse über dessen Funktion sowie die Tatsache, dass in ersten Screening-Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe HL60 als AML-Zelllinie hohe Expressionsraten für Pin1 zeigte, führten zu der Hypothese, dass Pin1-Überexpression auch eine Rolle bei der akuten myeloischen Leukämie spielen könnte.

Ziel dieser Arbeit war es, die Prävalenz und Intensität der Expression von Pin1 in Zellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie zu ermitteln sowie die Überlebenszeiten der Patienten auf eine mögliche negative oder positive Assoziation mit der Höhe der Pin1-Expression hin zu analysieren. Zum Nachweis einer Pin1-Expression auf RNA-Ebene erfolgte hierzu die molekularbiologische Untersuchung, zunächst in orientierenden Untersuchungen mittels konventioneller RT-PCR und gelelektrophoretischer Analyse, und im weiteren Verlauf mittels quantitativer Realtime-(Echtzeit)-PCR. Des Weiteren sollte mittels immunzytologischer Färbung Pin1 auf Proteinebene in Blasten der akuten myeloischen Leukämie nachgewiesen und die Möglichkeit eines Proteinnachweises mittels intrazellulärer FACS-Analyse von Pin1 evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad ‚pro analysi' bestellt.

100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, D
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein, D
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Baysilone Paste, mittelviskös	Bayer AG, Leverkusen, D
Borsäure	Sigma, Deisenhofen, D
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Deoxyribonuclease I, Ampl. Grade	Invitrogen, Karlsruhe, D
dNTP Mix 100 mM	Invitrogen, Karlsruhe, D
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	J.T.Baker, USA
Ethidiumbromid	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, D
Fast Red Substrate-Chromogen (K0597)	DakoCytomation, USA
Fetales Rinderserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein, D
Ficoll 400	Biochrom AG, Berlin, D
Fix&Perm	Caltag Laboratories, Hamburg, D
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt, D
Glycogen	Invitrogen, Karlsruhe, D
Isopropanol / 2-Propanol	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen, D

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Penicillin	Sigma, Deisenhofen, D
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, D
Random primers	Invitrogen, Karlsruhe, D
RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe, D
RPMI 1640	Gibco BRL, Eggenstein, D
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen, D
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, D
Taq DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tris	Sigma, Deisenhofen, D
TRIzol Reagent	Sigma, Deisenhofen, D
Trypan Blue Solution	Sigma, Deisenhofen, D
Tween 20	Bio-Rad Lab. GmbH, München, D
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt, D
10x PCR Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
5x First Strand Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Invitrogen, Karlsruhe, D
DTT 0.1 M	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.2 Antikörper

1.	α-human CD6-PE	BD, Heidelberg, D
2.	α-human CD13-PE	DakoCytomation GmbH, Hamburg, D
3.	α-human CD33-PE	BD, Heidelberg, D
4.	α-human CD34-PE	BD, Heidelberg, D
5.	α-human Pin1, mouse, monoclonal	Biomol, USA
6.	α-human Pin1, rabbit, polyclonal	Cell Signaling Technology, USA
7.	α-mouse ChemMate AP Kit (K 5005)	DakoCytomation GmbH, Hamburg, D
8.	α-mouse Ig-FITC, goat, polyclonal	DakoCytomation GmbH, Hamburg, D
9.	Isotypkontrolle Mouse-IgG-FITC	BD, Heidelberg, D

10. Isotypkontrolle Mouse-IgG-PE	BD, Heidelberg, D
11. mouse serum (normal)	DakoCytomation GmbH, Hamburg, D

2.1.3 Primer

Alle Primer wurden über IBA GmbH, Göttingen, D, bezogen. Die Primerkombination Pin1 F1/R1 führt zur Amplifikation eines Produktes von 304 Basenpaaren (bp), die Kombination von Abl115`/113` zu einem Produkt von 296 bp. Durch Einsatz der qPCR-Primerkombinationen Pin1 qF1/qR1 wird ein Produkt von 85 bp, durch die beta-Actin qF1/qR1-Kombination ein Produkt von 100 bp amplifiziert.

Primer	Position	Größe	Nukleotid-Sequenz (von 5' nach 3')
Abl 115'	Vorwärts	21 bp	GGC CAG TAG CAT CTG ACT TTG
Abl 113'	Rückwärts	22 bp	ATG GTA CCA GGA GTG TTT CTC C
Beta-Actin qF1	Vorwärts	22 bp	CTC CTC CTG AGC GCA AGT ACT C
Beta-Actin qR1	Rückwärts	23 bp	TCG TCA TACT CC TGC TTG CTG AT
Pin1 F1	Vorwärts	20 bp	TGC TCG CAC CTG CTG GTG AA
Pin1 R1	Rückwärts	20 bp	GTG GAT GCC GGA ATC CGT GA
Pin1 qF1	Vorwärts	18 bp	CGG CAG GAG AAG ATC ACC
Pin1 qR1	Rückwärts	19 bp	CCT CCT CTC CCG ACT TGA T

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden, D
DakoCytomation Pen	DakoCytomation GmbH, Hamburg, D
Deckgläser, eckig	Knittel Glaser, Braunschweig, D
FACS-Röhrchen 5 ml PP	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filter Cards (für Zytospins)	Shandon Inc., USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	AppliedBiosystems, Foster City, USA
Objektträger, geschliffen, Mattrand	Knittel Glaser, Braunschweig, D
Photometer Kuvetten	Eppendorf, Hamburg, D

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
PP-PCR-Plate, 384 Well	Greiner Bio-One, Essen , D
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäß 1,5 ml SafeSeal	Sarstedt, Nümbrecht, D
PCR-Röhrchen 0,5 ml	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Auslaufpipetten 5 ml,10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhrchen (Schraubverschluss) 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Wägepapier	Machery Nagel, Düren, D
Zellkulturflaschen 50 ml, 250 ml	BD, Heidelberg, D

2.1.5 Geräte und Zubehör

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Brutschrank Cytoperm 8080	Heraeus, Langenselbold, D
Cryo 1 C Freezing Container	Nalgene, USA
Elektrophoresis Power Supply 500/400	Pharmacia Gene Power, Schweden
Erlenmeyerkolben 50 ml, 100 ml, 2000 ml	Schott, Mainz, D
FACScan 82532	BD, Heidelberg, D
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Gerlingen, D
Gefrierschrank -80°C	Bosch, Gerlingen, D
Kühlschrank 4°C	Bosch, Gerlingen, D
Magnetrührgerät Ikamag RET	IKA Labortechnik, Staufen, D
Messzylinder 100 ml, 1000 ml	Schott, Mainz, D
Mikroskop Axiovert 100	Carl ZEISS, Jena, D
Mikroskop Standard 25	Carl ZEISS, Jena, D
Mikrowelle FX112Z-d	AEG, Nürnberg, D
Mini-Gelelektrophorese-Kammern	AGS, Heidelberg, D
Neubauer Zählkammer	Assistent, Sondheim/Rhön, D
Pipetten Pipetman P2, P20, P200, P1000	Gilson, Bad Camberg, D
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand, Wertheim, D

Sterilbank Class II Type A/B3	Nuaire, USA
Thermocycler TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
Thermopapier-Drucker P91D	Mitsubishi Electric, Ratingen, D
UV-Kamera	Intas, Göttingen, D
UV-Tray TI 3	Biometra, Göttingen, D
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Waage MC BA 100	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge 1-15 K	Sigma Laborzentrifugen, Osterode, D
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Langenselbold, D
Zentrifuge Cytospin2	Shandon Inc., USA
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Langenselbold, D
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus, Langenselbold, D

2.1.6 gebräuchliche Puffer

PBS:

10x Stammlösung:

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na_2HPO_4

2,4 g KH_2PO_4 ad 1 Liter Aqua dest.

TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer):

10x Stammlösung:

55,03 g Borsäure (0,89 M)

7,44 g Na_2-EDTA x $2H_2O$ (0,2 M)

107,81 g Tris (0,89 M) ad 1 Liter Aqua dest.

Agarosegel-Ladepuffer:

6x Stammlösung:

15% (w/v) Ficoll 400

0,1% (w/v) Phenolblau in Aqua dest.

2.1.7 Software

ABI PRISM SDS 2.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Cell Quest	BD, Heidelberg, D
GDS Application	Intas, Göttingen, D
ImageJ 1.34s	Wayne Rashband, NIH, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
Statistica Version 8	StatSoft GmbH, Hamburg, D
WinMDI 2.8	The scripps research institute, USA

2.1.8 Patientenmaterial/ Ethik

Alle im Rahmen dieser Dissertation unternommenen Analysen erfolgten an archivierten Proben der hämatologischen Routinediagnostik. Es wurden nur Erstdiagnosen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) verwendet. Die Proben der an AML erkrankten Erwachsenen wurden aus andernfalls verworfenen Asservaten der Routinediagnostik entnommen. Das Vorhaben war der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen vorgelegt worden, von deren Seite keine Einwände erhoben wurden (Ethikantrag-Nummer 23/4/04). Die Untersuchung kindlicher AMLs erfolgte an asservierten Knochenmarkproben der kindlichen BFM98-Studie, die freundlicherweise von PD. Dr. D. Reinhard aus Hannover bereitgestellt wurden. Eine Einwilligung für Untersuchungen an diesem Material wurde mit Einschluss in die Studie gegeben.

2.1.9 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die nachfoldend aufgeführten AML-Zelllinien untersucht:

Tabelle 1: verwendete AML-Zelllinien

Name	Entität	Quelle	Referenz
HL60	AML M2	DSMZ	(Collins et al. 1977; Dalton, Jr. et al. 1988)
NB4	AML M3	DSMZ	(Lanotte et al. 1991; Duprez et al. 1992)
U937	AML M4	DSMZ	(Sundstrom und Nilsson 1976; Dimberg et al. 2000)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekuarbiologische Methoden

2.2.1.1 RNA-Extraktion

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels alkoholischer Fällung unter Verwendung eines modifizierten Protokolls der 1987 entwickelten Chloroform-Phenol-Methode (Chomczynski und Sacchi 1987).

Als Ausgangsmaterial wurden 5-10 x 10^6 Zellen verwendet. Diese wurden zunächst ein Mal mit PBS gewaschen (1600 rpm für 10 Minuten bei RT in einer Megafuge 1.0 R, Heraeus) und durch Zugabe von 1 ml TRIZOL Reagent (Phenol, Guanidin-Isothiocyanat) lysiert. Nach Abzentrifugieren von unvollständig lysierten Zellresten (4000 G, 4°C, 5 Minuten) wurde der Proteine, RNA und DNA enthaltende Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 200µl Chloroform versetzt. Nach vollständiger Homogenisierung der Suspension und 15 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Auftrennung in die einzelnen Phasen durch Zentrifugieren (15500 G, 4°C, 15 Minuten, Zentrifuge: 1-15 K). Die RNA-haltige wässrige oberste Phase wurde in ein RNAse-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol und 2 µl Glycogen (Kristallisationskeim) vermischt, um hierdurch die RNA auszufällen. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte die erneute Zentrifugation (15.500 G, 4°C, 15 Minuten). Anschließend wurde das erhaltene RNA-Pellet in 1 ml Ethanol 70% gewaschen, getrocknet und in 50 µl sterilem destilliertem Wasser gelöst.

Die Proben wurden hiernach photometrisch untersucht (siehe 2.2.1.2) und anschließend bei -80°C gelagert. Sie wurden nicht länger als 2 Monate gelagert, bevor sie zur cDNA-Synthese verwendet wurden.

2.2.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren führen zu einer Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm. Das Lambert-Beer-Gesetz $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ (E = Extinktion bei der Wellenlänge λ, ε = molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ, c = Konzentration der Teilchen der Lösung in mol/l) ermöglicht die Konzentrationsberechnung von Nukleinsäuren nach photometrischer Bestimmung der Extinktion:

$$[c] = E_{260} \cdot k/d$$

[c] = Konzentration der Nukleinsäure in µg/ml, E_{260} = Extinktion bei 260 nm, k = 40 µg/ml (RNA-spezifischer Koeffizient), d = 1 cm (Dicke der durchstrahlten Küvette)

Bei der RNA-Extraktion kann in den Proben eine Verunreinigung mit Proteinen auftreten, die durch Absorption in der Peptidbindung bei 280 nm Wellenlänge nachweisbar ist. Zur Abschätzung des Reinheitsgrades wurde daher das E260/E280-Verhältnis bestimmt, welches im Optimalfall zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

2.2.1.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Um die aus den Proben isolierte RNA einer Polymerase-Kettenreaktion zuzuführen, ist die Umschreibung in komplementäre cDNA erforderlich. Dieser Reverse Transkription genannte Umwandlungsschritt (Taylor et al. 1976) erfolgt mit Hilfe des ursprünglich in Retroviren nachgewiesenen Enzyms Reverse Transkriptase (Temin und Mizutani 1970).

Es wurden hierfür die Reverse Transkriptase SuperScript II von Invitrogen und das folgende Protokoll verwendet:

1,2 µg Gesamt-RNA wurden mit 200 ng Random-Primern (=4 µl), 1 µl 10mM dNTP Mix und sterilem destilliertem Wasser ad 12 µl in einem RNase-freien Reaktionsgefäß (0,5 ml) vermischt. Nach 5 Minuten Erhitzen auf 65°C und anschließender Kühlung auf Eis, wurden nach kurzer Zentrifugation 4 µl 5x First-Strand Puffer, 2 µl 0.1 M DTT sowie 1 µl RNase-OUT zugegeben. Es folgten eine 10 minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur, erneute Durchmischung (Schüttler-Gerät), Zugabe von 1 µl SuperScript II und die anschließende Inkubation bei 42°C über 50 Minuten. Zuletzt wurde die Reverse Transkriptase durch Erhitzen für 15 Minuten auf 70°C inaktiviert, die Proben bei 4°C gekühlt und schließlich bei -20°C bis zu ihrem Einsatz in der PCR gelagert.

2.2.1.4 konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1983 von K.B. Mullis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al. 1986; Mullis 1990; Saiki et al. 1985) ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung eines DNA-Fragments, wodurch der Nachweis auch kleinster Mengen spezifischer Ausgangs-DNA möglich wird.

Von allen Proben wurden jeweils PCRs mit Abl-Primern (Abl = Housekeeping-Gen) und mit Pin1-Primern durchgeführt. Die Abl-Primer wurden hierbei so gewählt, dass einerseits eine Überprüfung auf Intaktheit der RNA, und andererseits eine interne Kontrolle bezüglich Verunreinigung mit genomischer DNA erfolgte. Im Falle einer Verunreinigung umfasst die amplifizierte Sequenz auch ein Intron, welches zu dem gleichzeitigen Nachweis eines 859 Basenpaar (bp) -Templates neben der erwarteten 296 bp-Bande führt. Des Weiteren wurde jeweils als Negativkontrolle eine Probe mit reinem sterilem destilliertem Wasser und zur Positivkontrolle und Standardisierung eine Probe der Pin1-positiven AML-Zelllinie HL60 mitgeführt. Die benötigten Reagenzien und

cDNA-Proben wurden nach dem Auftauen durchgehend auf Eis gelagert. Zur Minimierung von Pipettierfehlern erfolgte zunächst die Herstellung eines Gesamtansatzes aller Reagenzien, ausreichend für n+1 der zu untersuchenden Proben der Anzahl n. Hierzu wurden pro Probe 5,0 µl 10x PCR Puffer, 2,0 µl 50mM $MgCl_2$, 1,0 µl 10mM dNTP Mix, 1,0 µl 10µM 5'-Primer, 1,0 µl 10µM 3'-Primer, 0,4 µl Taq Polymerase (= 2 Units) und 37,6 µl steriles destilliertes Wasser in den sich aus der Probenanzahl ergebenden Mengen vermischt, davon jeweils 48 µl in die einzelnen Reaktionsgefäße überführt und 2 µl cDNA-Probe zugegeben. Die PCR erfolgte auf einem Thermo-Cycler (TRIO-Thermoblock) mit beheiztem Deckel nach dem folgenden Programm, wobei die Schritte 2. - 4. insgesamt 30mal (entsprechend 30 Zyklen) durchlaufen wurden:

1.		95°C	4 Minuten
2.		95°C	1 Minute
3.	Pin1	55°C	1 Minute
	Abl	60°C	1 Minute
4.		72°C	1 Minute
5.		72°C	10 Minuten
6.		4°C	bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente tragen eine negative Ladung und wandern in einem elektrischen Spannungsfeld zur Anode (positiv geladene Elektrode). Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt im Wesentlichen von der Beschaffenheit des Trägermediums (z.B. Gel-Agarosekonzentration) und von der Größe der Moleküle ab. DNA unterschiedlicher Länge wird auf diese Weise in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Färbt man das Gel mit Ethidiumbromid, welches in doppelsträngige DNA interkaliert, so lassen sich die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar machen. Durch gleichzeitiges Auftragen eines geeigneten Längenstandards ist die Größenabschätzung der einzelnen Banden möglich.

Die mit Hilfe der PCR amplifizierten Pin1- bzw. Abl-Fragmente haben eine Größe von ungefähr 300 Basenpaaren. Für diesen Größenbereich wurde die optimale Agarosegel-Konzentration von 1,5% (2,25 g Agarose in 150 ml TBE) gewählt.

Nach Zusammengeben von Agarose und TBE in einem Erlenmeyerkolben wurde die Mischung in der Mikrowelle unter Vermeidung eines Aufkochens erhitzt. Anschließend erfolgte der Zusatz von Ethidiumbromid zur Agaroselösung im Verhältnis 1:20.000 und die Beladung der Gelschlitten mit jeweils ca. 50 ml der Lösung.

Die Gele wurden anschließend in Elektrophoresekammern gegeben und mit TBE-Puffer überschichtet. Von jeder Probe, inklusive Positiv- und Negativkontrolle wurden 10 µl der PCR-Probe (+2 µl 6xLadepuffer) sowie 1 µl 100 Basenpaar-Längenstandard

(+ 1 µl 6x-Ladepuffer) aufgetragen, und die Proben bei einer Spannung von 100 V über ungefähr eine Stunde aufgetrennt

Die Gele wurden direkt im Anschluss unter UV-Licht betrachtet, fotografiert und ausgedruckt sowie in digitaler Form gespeichert.

2.2.1.6 quantitative Realtime (Echtzeit)-PCR

Die quantitative Realtime-PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR, erlaubt jedoch im Gegensatz zu dieser auch eine sensitive Analyse der Ausgangskonzentrationen der amplifizierten cDNA-Templates. Analog zur konventionellen RT-PCR mit Endpunkt-Analyse der cDNA-Konzentration erfolgt auch hier die zyklische Amplifikation von cDNA, welche im Idealfall jeweils eine Verdoppelung der vorhandenen cDNA-Templates pro Zyklus bewirkt. Durch kontinuierliches Monitoring der cDNA-Konzentration mit Hilfe eines zugesetzten Fluoreszenzfarbstoffes (in dieser Arbeit Sybr Green I), welcher unter Interkalation mit doppelsträngiger DNA verstärkt fluoresziert und mit der Menge an vorliegender doppelsträngiger cDNA korreliert, wird eine genaue Verlaufsdarstellung der Template-Amplifikation ermöglicht (Higuchi et al. 1993). Mathematisch verläuft jede PCR zunächst als Exponentialfunktion $N = N_0 \times (\text{Effizienz}+1)^n$ (im Idealfall Effizienz=1 bzw =100%). Da im Verlauf jeder PCR ein Verbrauch von Substraten (dNTPs, Primer) erfolgt, der letztlich zu einem ungleichen Abfall der Effizienzen mit Abweichung der Konzentrationskurven von der initial durch die genannte Exponentialfunktion vollständig beschriebenen Kettenreaktion und zur Ausbildung eines Konzentrations-Plateaus führt, ist die Echtzeit-Analyse der Fluoreszenzen zur Ermittlung der Phase von exponentieller Vervielfältigung zwingende Voraussetzung für eine quantitative Analyse einer jeden PCR. Die gleichzeitige Effizienzermittlung anhand von standardisierten Verdünnungsreihen und der Einsatz von in der Literatur beschriebenen Analyseverfahren der Rohdaten ermöglicht im Bereich der nachgewiesenen exponentiellen Phase der qPCR einen quantitativen Rückschluss auf die ursprüngliche absolute oder relative Konzentration der Targets in den untersuchten Proben (Kubista et al. 2006; Pfaffl 2001; VanGuilder et al. 2008). Durch Zusatz eines passiven Fluoreszenzmarkers (ROX), welcher nicht in doppelsträngiger DNA interkaliert und ein konstantes, zu SYBR Green I spektral differentes Fluoreszenz-Signal je Well liefert, können durch Zusatz zu den Mastermixes Ungenauigkeiten (im Verlauf der Pipettierschritte bis zur Auftragung der einzelnen Proben) bei der späteren Datenanalyse von Auswertungsprogrammen erfasst und korrigiert werden (siehe auch Abbildung 4).

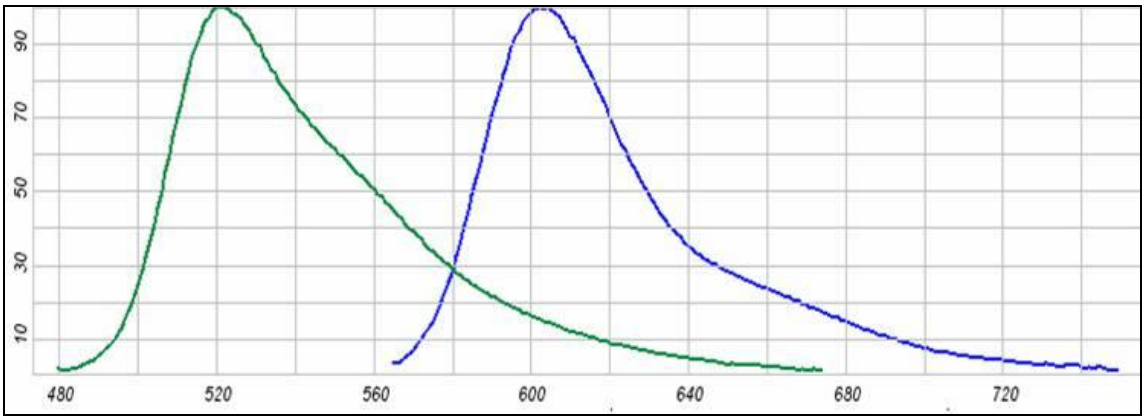

Abbildung 4: Emissionsspektra von SYBR Green I (grün) und ROX (blau) (Fluorescence-SpectraViewer, http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html)

In dieser Arbeit erfolgte eine quantitative Realtime-PCR zur Ermittlung der relativen Expression von Pin1 zu dem Referenzgen Beta-Actin nach dem im Folgenden beschriebenen Protokoll:

Zur Durchführung der qPCR wurden die mittels reverser Transkription erhaltenen cDNA-Proben (cDNA-Synthese mittels reverser Transkription2.2.1.3) sowie das QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) und die Primer-Kombinationen Pin1 qF1/qR1 bzw. Beta-Actin qF1/qR1 verwendet. Während der Pipettierschritte lagerten sämtliche Materialien auf Eis. Es erfolgte zunächst die Herstellung von Mastermix-Ansätzen für das Zielgen Pin1 und das Referenzgen Beta-Actin. Für den Pin1-Mastermix wurden in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß pro geplanter Einzelreaktion 5 µl Quantitect SYBR Green, je 0,3 µl von Pin1 qF1 und Pin1 qR1 sowie 3,9 µl H_2O (DNase-frei, mitgeliefert im PCR-Kit) angesetzt. Der Ansatz des Beta-Actin-Mastermixes erfolgte analog unter Verwendung der Beta-Actin-Primerkombination. In einem weiteren Schritt wurden in einzelnen 0,5 ml-Reaktionsgefäßen Unter-Mastermixes für die jeweils zu analysierenden Triplikate der einzelnen Proben, Standards und Kontrollen erstellt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 1,5 µl Proben-cDNA, H_2O (Negativkontrolle) oder HL60-cDNA-Verdünnungen zu den Unter-Mastermixes und das Auftragen von Triplikaten mit jeweils 10 µl Reaktionsvolumen auf eine 384-Well-PCR-Platte. Bei jeder qPCR wurden zusätzlich zu den zu analysierenden Proben Negativkontrollen (NTC =engl. no target control) mit H_2O und Verdünnungsreihen ($1:10^n$, n={0;…;7}) der cDNA der Referenzzelllinie HL60 (AML-Zelllinie mit bekannt hoher Pin1-Expression) mitgeführt. Da bereits in der konventionellen PCR mittels Amplifikation des Referenzgens Abl anhand der Banden eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte, wurde in der qPCR auf das Mitführen einer non-RT-Kontrolle verzichtet.

Unmittelbar nach Auftragung sämtlicher Proben wurde die PCR-Platte mit selbstklebender transparenter Folie (MicroAmp Optical Adhesive Film) versiegelt, und es erfolgte die zeitgleiche Analyse der Proben mittels qPCR für Pin1 und Beta-Actin. Hierfür wurde der Taqman-Thermocycler 7900 mit der zugehörigen Software ABI PRISM SDS 2.1 mit den nachfolgenden Einstellungen verwendet.

Nach Auswahl des Protokolls „Absolute Quantifizierung“, der Wahl der passiven Referenz (ROX, im Quantitect SYBR-Green-Mix enthalten) und des Detektors SYBR Green sowie der Markierung und Beschriftung der zu analysierenden Reaktionsgefäße in der Vorlagendatei für die Rohdatenspeicherung erfolgte der eigentliche Start der Reaktion. Zur initialen vollständigen DNA-Denaturierung wurden die Proben zunächst auf 50°C für 2 min und nachfolgend auf 95°C für 10 min erhitzt. Anschließend folgten 40 Zyklen mit je 95°C für 15 sec (DNA-Denaturierung), 58°C für 45 sec (Primerannealing/-hybridisierung) und 72°C für 1 min (Elongation). Am Ende jeder durchlaufenen Elongation erfasste das Gerät automatisch die Fluoreszenz-Aktivitäten von SYBR Green und ROX, welche in den Rohdaten gespeichert wurden. Zuletzt wurde eine Schmelzkurvenmessung durchgeführt (Erhitzen auf 95°C für 15 sec zur erneuten Denaturierung, Abkühlung auf 60°C für 15 sec mit Bildung von doppelsträngiger cDNA durch die komplementären Template-Stränge und Interkalation von SYBR Green, erneutes kontinuierliches Erhitzen auf 95°C für 15 sec unter Analyse der Fluoreszenzaktivitäten durch das Gerät).

2.2.1.7 Software-gestützte Auswertung der qPCR-Daten

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte nach Abschluss der Messungen mit dem Programm SDS2.1 Dieses wurde zur Effizienzberechnung mittels Auswertung von standardisierten Verdünnungsreihen und zur vereinfachten Anwendung der ddCT-Methode zur relativen Quantifizierung der Proben eingesetzt (ABI PRISM 2004; Pfaffl 2001).

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Gewinnung mononukleärer Zellen

Knochenmark bzw. peripheres Blut von Patienten wurde im Verhältnis 1 zu 1 mit PBS vermischt und dann über die gleiche Menge Ficoll geschichtet. Hierzu wurden 50 ml-Röhrchen mit Schraubverschluss verwendet. Anschließend folgte die Dichtegradienten-Separation durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 2200 rpm ohne Bremse (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Die mononukleären Zellen konnten an der Grenze zwischen PBS und Ficoll mit einer Pasteurpipette gesammelt und in ein 15 ml-Spitzröhrchen überführt werden. Es folgte ein initialer Waschgang mit PBS bei 1400 rpm für 10 Minuten und zwei weitere Waschgänge mit PBS bei 1200 rpm für 10 Minuten (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Zuletzt wurde das erhaltene Zellpellet in 1 ml PBS gelöst und die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.2.3).

2.2.2.2 Kontinuierliche Zellkultur

Die Zelllinien HL60, NB4 und U937 (siehe auch 2.1.9, S.26) wurden bei 37°C, 5% CO_2-Gehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 95% in einem Inkubator (Cytoperm 8080, Heraeus Instruments) kultiviert. Die Handhabung der Zellen fand grundsätzlich unter sterilen Bedingungen statt. Alle zwei Tage wurden Wachstum und Aussehen der Zellen unter dem Mikroskop (Axiovert 100, Carl Zeiss) beurteilt. In der Erhaltungszellkultur wurden die Zellen gemäß ihren Wachstumsbedingungen weiterkultiviert (Drexler 2005). Dabei wurde durch Abnehmen von Zellen und Zugabe von auf 37°C vorgewärmtem Frischmedium die Zellzahl auf $0{,}5 - 1{,}0 \cdot 10^6$/ml zwecks kontinuierlicher Kultur durchgeführt.

Kulturmedium:

Die in Tabelle 1 aufgeführten Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert, welches um 10% FCS, Antibiotikazusätze (Penicillin 100 E/ml, Streptomycin 100 µg/ml) und 1% 200mM L-Glutamin ergänzt wurde.

2.2.2.3 Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Zellen erfolgte routinemäßig beim Wechsel des Nährmediums der Zellen und vor ihrer Verwendung für Versuche die Verdünnung eines Aliquots auf 1:50 mit Trypanblau und anschließend die Auszählung der Zellzahl per Neubauer Zählkammer (Standard 25, Zeiss). Hierbei wurden nur die vitalen Zellen, in welche kein Trypanblau eingedrungen war, gezählt.

2.2.2.4 Kryokonservierung

Aus Patientenblut gewonnene mononukleäre Zellen sowie Zellkulturzellen wurden zur vorübergehenden Asservation bei -152°C kryokonserviert. Hierzu wurden alle drei Zelllinien in einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in ein Einfriermedium überführt, bestehend aus 70% RPMI1640-Medium, 20% FCS und 10% DMSO. Die Kryoröhrchen wurden in einer Isopropanol-Einfrierbox in einem –80°C Eisschrank untergebracht. Mit Hilfe der Einfrierbox wurde eine schonende Herunterkühlung von circa 1°C pro Minute durch einen umgebenden Isopropanol-Mantel sichergestellt. Nach 24 Stunden wurden die kryokonservierten Zellen in eine -152°C-Truhe bzw. einen Stickstofftank überführt und hier bis zur Revitalisierung gelagert.

2.2.2.5 Revitalisierung von kryokonservierten Zellen

Bei -152°C gelagerte Zell-Proben wurden zügig in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut und anschließend direkt in ein großes 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit vorgelegtem angewärmtem Medium überführt. Nach Zentrifugation bei 500g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl und Überprüfung der Vitalität der Zellen, erfolgte die Kultivierung in handelsüblichen Zellkulturflaschen für Suspensionszelllinien bei einer Zellzahl von $1 \cdot 10^6$/ml, bzw. die Aufbereitung der Proben für PCR, immunzytochemische Färbung oder die durchflusszytofotometrische Analyse.

2.2.2.6 Zytospinzentrifugen-Präparate

Für jeden Zytospin wurde eine Zellsuspension von $1 \cdot 10^4 – 2 \cdot 10^5$ Zellen in 100 µl verwendet. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden für 10 Minuten bei 800 rpm mit Hilfe einer Cytospin2-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden hiernach für ca. 2 h luftgetrocknet und anschließend direkt gefärbt (siehe 2.2.2.7) oder bei -80°C asserviert.

2.2.2.7 Immunzytochemische Färbung von Zytospin-Präparaten

Um Pin1 in HL60 und Patientenmaterial auch auf Protein-Ebene nachzuweisen, erfolgte die zytochemische Färbung von Zytospinpräparaten mit einem monoklonalen Pin1-Antikörper (Maus) und einem kommerziell vertriebenen, auf der Streptavidin-Biotin-Technik beruhenden, sekundären Antikörper gegen Maus-generierte-Antikörper (Dako Chem Mate AP Kit K 5005). Der biotinylierte Sekundärantikörper (Brückenantikörper, im folgenden „Link“ genannt) bindet Konjugate von Strepavidin und Alkalischer Phosphatase (im folgenden „Label“ genannt). Nach Zugabe des Chromogens Fast Red (Dako Cytomation) wird dieses von der Alkalischen Phosphatase in einer farbgebenden Reaktion umgesetzt, was zu einer Rotfärbung im Bereich von Pin1-Antigenpräsenz führt.

Die Zytospin-Präparate wurden für 10 Minuten bei 4°C mit konzentriertem Aceton fixiert und anschließend in Tris-Puffer gewaschen. Nach Eingrenzung des zu färbenden Areals mittels DakoPen erfolgte die einstündige Inkubation mit dem primären Pin1-Antikörper (Antikörper 5., siehe 2.1.2., Seite 21) in einer Verdünnung von 1:50 bei Raumtemperatur sowie erneutes Waschen in Tris-Puffer. Hieran schlossen sich jeweils 20 Minuten Inkubation mit Reagenz A (Link) und Reagenz B (Label) und Waschgänge mit Tris-Puffer an. Zuletzt wurde das Chromogen Fast Red (DakoCytomation) für 10 Minuten hinzugegeben, die Objektträger in Aqua dest. gespült und eine Hämalaun-Gegenfärbung für 1 Minute durchgeführt. Die Präparate wurden gründlich gespült

und mit mittelvisköser Siliconpaste (Baysilone, Bayer) und Deckplättchen versiegelt. Es erfolgte die unmittelbare mikroskopische Auswertung und die anschließende Archivierung unter Lichtausschluss.

2.2.2.8 Durchflusszytophotometrie

Zur Analyse von Oberflächenmarkern (CD(cluster of differentiation)-Antigenen) sowie intrazellulärer Merkmale (z.B. Pin1-Protein) vitaler Zellen steht seit Anfang der 1970er Jahre die fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS = engl. fluorescence activated cell sorting) bzw die Durchflusszytophotometrie zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch die Möglichkeit einer intrazytoplasmatischen Pin1-Antigendetektion mittels fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und Analyse per Durchflusszytofotometer untersucht werden.

Das verwendete Protokoll stellt eine Adaptation der von Dürig et al. beschriebenen Methode dar (Dürig et al. 2003). Zur intrazellulären Färbung von Pin1-Protein wurde hierbei ein kommerziell vertriebenes Kit (Fix&Perm, Caltag Laboratories) zur Hilfe genommen, da bei vitalen Zellen ohne diese spezielle Vorbehandlung nur Oberflächenantigene adäquat eingefärbt werden würden. Die verwendeten Antikörper (Details siehe 2.1.2, S.21) wurden in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Es erfolgten hierbei Ansätze in mehreren Röhrchen jeweils in der Kombination Pin1/2.AB-FITC versus anti-human-CD-PE (CD13/33, CD34, CD3); zum Ausschluss einer unspezifischen Fluoreszenz-Färbung erfolgte außerdem in einem weiteren Ansatz die Kontrolle mittels Isotyp-Antikörpern (Isotyp-PE und Isotyp-FITC) sowie zur Ermittlung der Eigenfluoreszenz ein Ansatz mit ungefärbten Zellen. Ein Waschgang bestand jeweils aus der Zugabe von 10-15 ml PBS/1%FCS und milder Abzentrifugation der Zellen.

Revitalisierung im Fall von kryokonservierten Zellen

2 x Waschgang

Zellzählung in eine Neubauer-Zählkammer

Lösung von $1 \cdot 10^6$ Zellen in 100 µl PBS in einem FACS Röhrchen

100 µl Fix&Perm Reagenz A

Inkubation: 15 min. bei Raumtemperatur

1 x Waschgang

Resuspension in 100 µl Fix&Perm Reagenz B

2 µl monoklonaler α-Pin1-AB (Maus IgG1 kappa) (=primärer Antikörper) – kurzer Vortex

Inkubation: 20 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit

2 x Waschgang

Resuspension in 100 µl PBS/ 1%FCS
2 µl polyklonaler α–mouse Ig-FITC (Ziege) (=sekundärer Antikörper) – kurzer Vortex
Inkubation: 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit
1 x Waschgang
Resuspension in 90 µl PBS/ 1%FCS
10 µl normales Maus-Serum – kurzer Vortex (kein Waschschritt!)
Inkubation: 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit
10 µl anti-human CD-Antikörper (PE-gekoppelt)
Inkubation: 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit
2 x Waschgang
sofortige Messung am FACS-Gerät

Die Durchflusszytophotometrie erfolgte mit einem FACScan Cytometer (BD, Heidelberg) unter Verwendung der Software CellQuest. Für die Nachbearbeitung und Analyse der Daten und zur Erstellung der Abbildungen des Ergebnisteils wurde später das Programm WinMDI verwendet.

2.2.3 Klinisch-deskriptive und statistische Methoden

Als deskriptive Analysen des Patientenkollektivs (PCR-Proben) wurden neben der Rate von Pin1-positiven Patienten die Rate der kompletten Remissionen (Blastenanteil im KM-Aspirat von <5%) in Abhängigkeit von Pin1-Positivität, das Ereignisfreie Überleben (EFS = engl. Event free survival) sowie das Gesamtüberleben (OAS =engl. Overall survival) ermittelt. Gesamtüberleben bedeutet hierbei die Überlebenszeit der einzelnen Patienten in Tagen ab Erstdiagnose der Erkrankung bis zum ihrem Tod oder bis zum letzten Nachuntersuchungsdatum bei noch lebenden Patienten (in den Überlebenskurven als zensiert markierte Punkte). Das ereignisfreie Überleben wurde als Zeitraum in Tagen ab Erreichen einer kompletten Remission bis zum Auftreten eines ungünstigen Ereignisses definiert. Ungünstige Ereignisse stellten die Diagnose eines Erkrankungsrückfalls, das Auftreten eines sekundären Malignoms oder der Tod des Patienten (inklusive nicht-erkrankungsbedingter Gründe) dar. Trat kein ungünstiges Ereignis ein, entsprach das EFS dem Zeitraum vom CR-Datum bis zum Datum der letzten Nachbeobachtung. Die Daten für OAS und EFS wurden kodiert nach vollständiger oder zensierter Beobachtung (vollständig = das zu untersuchende Ereignis ist eingetreten, zensiert = der Endpunkt der Beobachtung/das Ereignis ist noch nicht erreicht).

Die Überlebenszeiten von OAS und EFS wurden graphisch mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven veranschaulicht (Bland und Altman 1998; Ziegler et al. 2007b). Diese finden in der Medizin vielfältige Anwendungsmöglichkeiten und werden beispielsweise für den Vergleich zweier Therapien oder des Einflusses einer bestimmten Variable auf den Krankheitsverlauf angewendet. Im Falle von entsprechend statistisch gepowerten Analysen kann aus den Kurven auch eine Prognose bezüglich der zu erwartenden Überlebenszeit oder der Zeit des ereignisfreien Überlebens abgeschätzt werden. Neben Überlebenszeiten zu beliebigen Zeitpunkten kann auch der empirische Median der Überlebenszeit abgelesen werden. Die Methode wurde gewählt, da hiermit variable Zeitintervalle als Grundlage für die Berechnung von kumulativen Überlebensraten verwendet werden und somit den Versterbezeitpunkten angepasst werden können. Die Wahrscheinlichkeiten, einzelne Intervalle zu überleben, werden berechnet und anschließend miteinander multipliziert, um die kumulative Überlebensrate, d.h. die Wahrscheinlichkeit, ein bestimmtes Intervall (z.B. 1 Jahr) zu überleben, zu ermitteln. Durch die Zensierung von Daten (siehe oben) wird dabei die Beeinflussung des Ergebnisses vermieden.

Als Signifikanztests wurde bei kategorischen Variablen der Yates-korrigierte Chi-Quadrat-Test und bei Überlebenszeit-Analysen der Log-rang-Test (Ziegler et al. 2007a), welcher sich durch eine Unabhängigkeit von der Gestalt der Kurve und der Verteilung der Überlebenszeiten auszeichnet, verwendet.

Eine statistische Auswertung der immunzytochemischen Färbungen und der in der Durchflusszytophotometrie erhobenen Daten erfolgte aufgrund der kleinen Probenzahl bei nur orientierender Fragestellung nicht.

Zur klinisch-deskriptiven Analyse des Patientenkollektivs und zu Kaplan-Meier-Survival-Analysen wurden die Programme Excel (Microsoft) und Statistica 8 (Statsoft) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Statistik der AML-Patientenkollektive

In der qualitativen Analyse mittels konventioneller PCR wurden insgesamt 123 Patientenproben untersucht. Bei den Patienten handelte es sich um 80 Kinder sowie 43 Erwachsene. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 725 Tage, die mediane Nachbeobachtungszeit 741 Tage. Es waren alle AML-Subklassen im Patientenkollektiv vertreten, die Verteilung auf die einzelnen Subtypen entsprach in etwa den in der Literatur zu findenden Prozentanteilen (Arber et al. 2003; Castoldi et al. 1993; Vidriales et al. 1995; Webb et al. 2001).

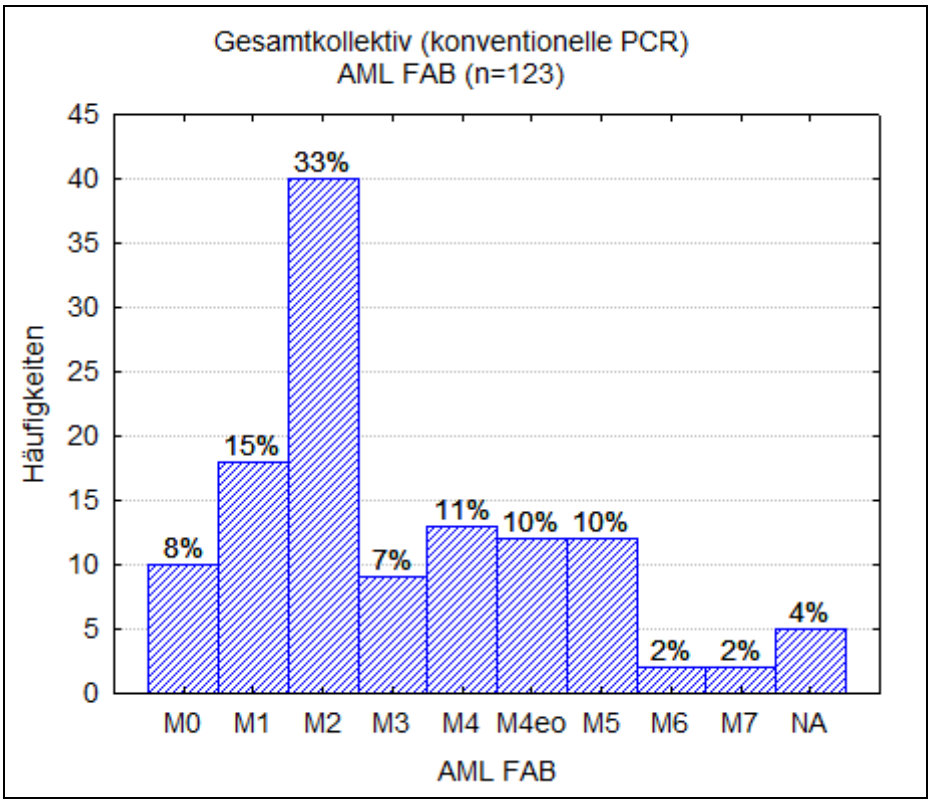

Abbildung 5: Häufigkeiten der vertretenen FAB-Subtypen in Prozent

Das mediane Erkrankungsalter der Erwachsenen lag bei 57 Jahren, das mittlere Erkrankungsalter bei 54 Jahren. Das mittlere Erkrankungsalter der Kinder betrug 10 Jahre, das mediane Erkrankungsalter 11 Jahre. Graphisch dargestellte Altersverteilungen, aufgeschlüsselt nach Erwachsenen und Kindern, finden sich in Abbildung 6, wobei Patienten ab einem Alter von 18 Jahren den Erwachsenen zugeordnet wurden.

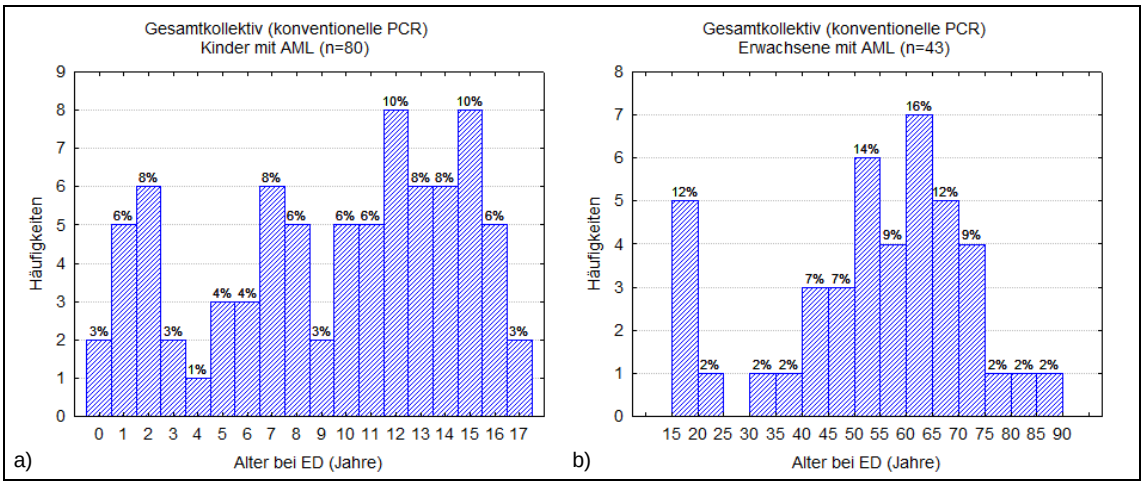

Abbildung 6: Altersverteilung bei Erstdiagnose AML, a) Kinder 17 ≤ Jahre, b) Erwachsene

Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten betrug 1 zu 1,1 wobei die Geschlechtsverteilung bei den Erwachsenen mit 1 zu 2,3 (regulär 1,15 zu 1) nicht der üblichen Verteilung bei AML entsprach; die der Kinder stimmte mit 1 zu 0,8 mit den veröffentlichten Werten überein (Creutzig und Reinhardt 2006). In 92 % der Fälle lag eine de novo-AML vor, in 8% (10 Fällen) eine sekundäre AML nach MDS bzw. eine therapie-assoziierte AML nach vorangegangener Chemo/Radiotherapie.

Ein zytogenetischer Befund lag bei insgesamt 82% der Patienten vor. Die Aufschlüsselung nach zytogenetischem Risiko erfolgte gemäß Grimwade et al. und ist in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt (Grimwade et al. 2004).

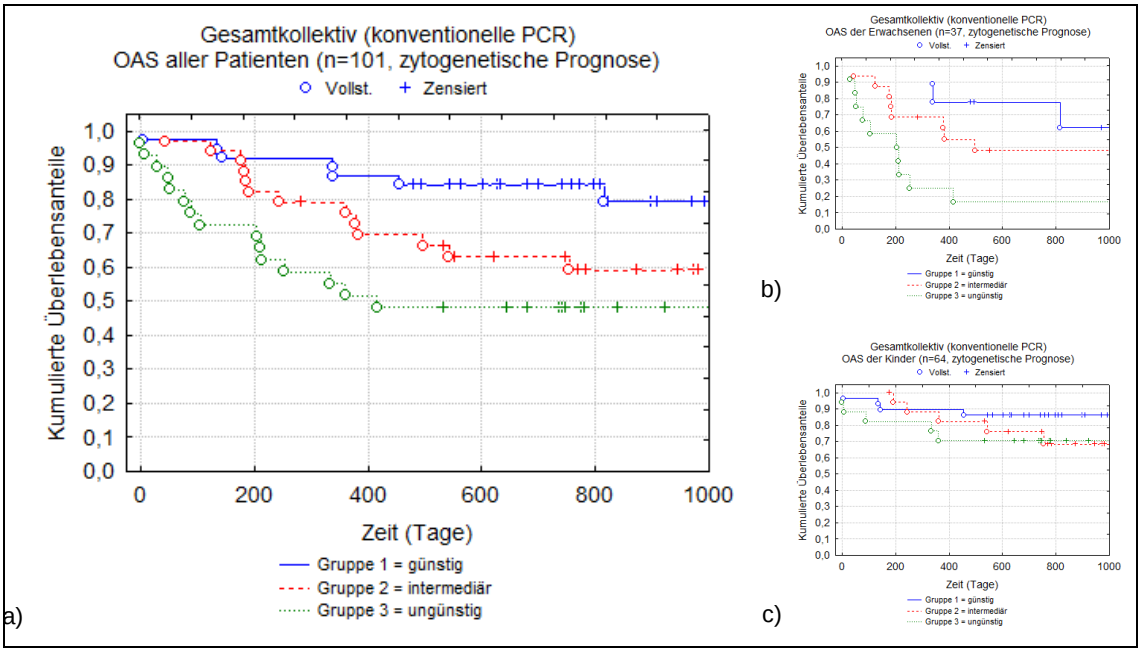

Abbildung 7: Gesamtüberlebenskurven in Abhängigkeit von der zytogenetischen Prognose; a) alle Patienten, b) Erwachsene, c) Kinder

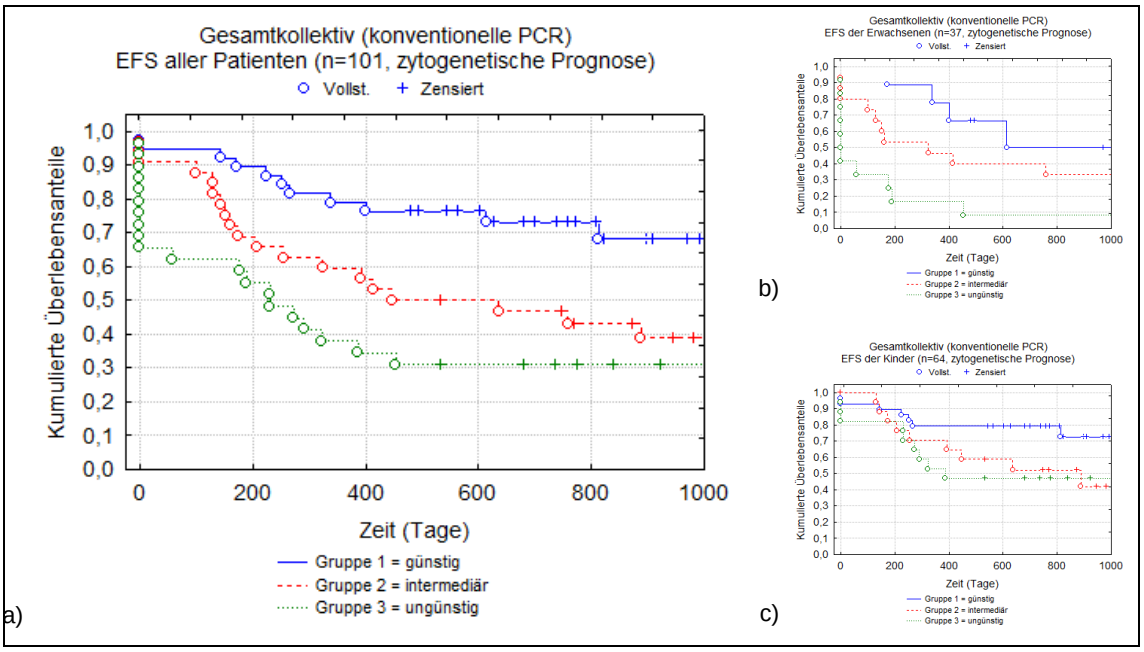

Abbildung 8: Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit von der zytogenetischen Prognose
a) alle Patienten, b) Erwachsene, c) Kinder

Für die weitere quantitative Analyse der Pin1-Expression auf RNA-Ebene stand Probenmaterial von 64 Patienten zur Verfügung. Dieses Patientenkollektiv stimmte in der Altersverteilung und der Aufteilung auf die zytogenetischen Prognoseklassen mit dem Gesamtkollektiv der 123 qualitativ ausgewerteten Patienten überein.

3.2 Pin1-Expression auf RNA-Ebene

3.2.1 konventionelle PCR

3.2.1.1 Standardisierung

Zur Standardisierung der PCR wurden ABL- und Pin1-PCRs von HL60-Proben über jeweils 15, 20, 25, 30, 35 und 40 Zyklen durchgeführt. Parallel dazu wurde eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die gewählte Zykluszahl von 30 Zyklen nicht im Plateaubereich, sondern im oberen Bereich der exponentiellen Amplifikation lag (Abbildung 9 und Abbildung 10).

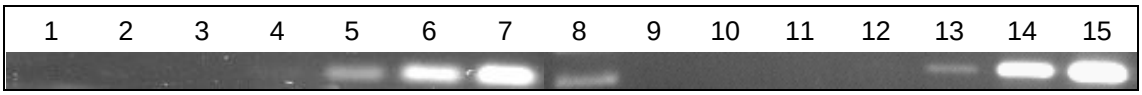

Abbildung 9: Amplifikation von Abl/Pin1 aus HL60-cDNA, 1-7: Abl (1:NTC, 2-7: 15-40 Zyklen), 8: 300bp-DNA-Leiter, 9-15: Pin1 (9:NTC, 10-15: 15-40 Zyklen)

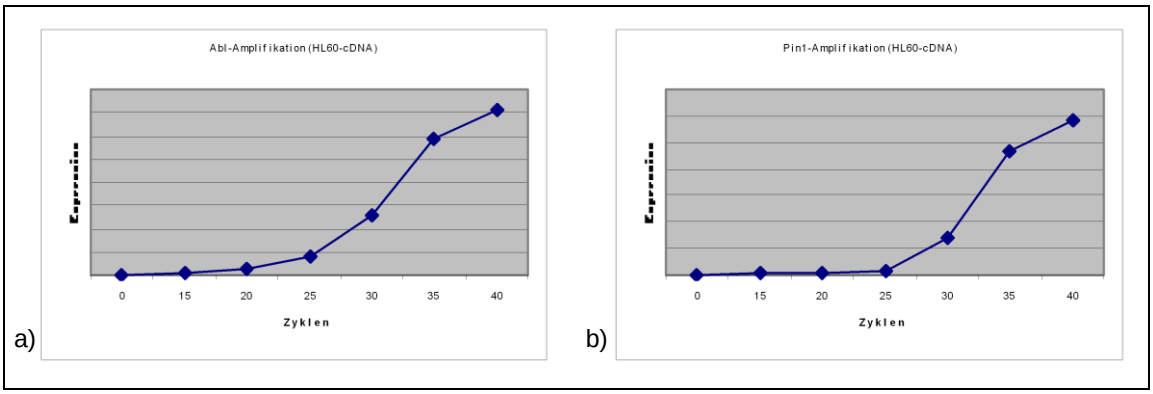

Abbildung 10: Amplifikation von a) Abl und b) Pin1 , jeweils von HL60-cDNA, graphische Darstellung der semiquantitativen Gelauswertung.

3.2.1.2 Pin1-Expression in AML-Zelllinien

Im Rahmen von Untersuchungen an in vitro gehaltenen Leukämie- und Lymphomzelllinien erfolgte per konventioneller PCR unter anderem die Analyse von drei AML-Zelllinien: HL60 (AML M2), NB4 (AML M3) und U937 (AML M4). Alle drei Zelllinien zeigten einen hohen Grad von Pin1-Expression (Abbildung 11) mit einem Pin/ABL-Quotienten von ≥1.

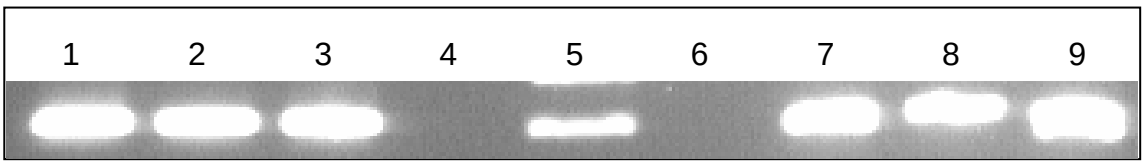

Abbildung 11: Abl/Pin1-Expression in AML-Zelllinien (1: HL60-Abl, 2: NB4-Abl, 3: U937-Abl, 4: H2O-Abl, 5: 300bp-DNA-Leiter, 6: H2O-Pin1, 7: U937-Pin1, 8: NB4-Pin1, 9: HL60-Pin1)

3.2.1.3 Pin1-Expression in gesunden Probanden

Zu Beginn der Untersuchungen erfolgte zudem die Analyse von nicht an AML erkrankten Probanden. Hierunter befanden sich 2 anonymisierte Nabelschnurblut-Proben sowie jeweils 2 Proben peripheren Blutes bzw. Knochenmarks von gesunden Spendern. Es zeigte sich, dass auch bei Gesunden, insbesondere im peripheren Blut, eine Pin1-Expression nachweisbar war, wie in der Abbildung 12 zu erkennen ist.

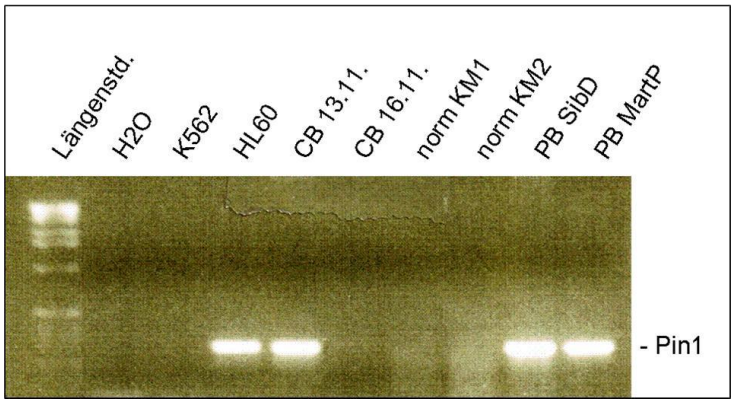

Abbildung 12: PCR bei Zelllinien und gesunden Probanden:
K562 = Pin1-neg Zelllinie, HL60 = Pin1-pos Zelllinie, CB= Cord blood (Nabelschnurblut Gesunder), KM= Knochenmarksproben ohne pathologischen Befund, PB = peripheres Blut gesunder Probanden

3.2.1.4 Pin1-Expression der AML-Patienten (konventionelle PCR)

Die qualitative Bestimmung der Pin1-Expression bei 123 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie erfolgte zunächst mittels konventioneller RT-PCR. Die Ergebnisse werden im Folgenden nach Erwachsenen und Kindern getrennt aufgeführt, um Altersunterschieden in der Biologie der Erkrankung Rechnung zu tragen.

3.2.1.5 Pin1-Expression in Proben kindlicher AML

Bei 90% der Kinder war mittels konventioneller PCR eine Pin1-Expression nachweisbar. Die Analyse aufgeschlüsselt nach FAB-Subklassifikation findet sich in der nachfolgenden Tabelle 2. Hier lässt sich für die Subklassen M1 bis M3 sowie M4eo und M5 eine Tendenz zu einem hohen Anteil Pin1-positiver Befunde erkennen. Statistische Signifikanztests erübrigen sich bei insgesamt kleinen Zahlen in den einzelnen Subgruppen und einer deutlichen Asymmetrie der Verteilung von Pin1-positiven zu Pin1-negativen Ergebnissen.

Tabelle 2: Pin1-Expression der pädiatrischen AML-Proben in Abhängigkeit von der FAB-Klassifikation

FAB-Klass.	Pin1-pos	Pin1-neg
M0	4	3
M1	12	0
M2	28	1
M3	6	0
M4	5	1
M4eo	7	0
M5	6	2
M6	1	0
M7	1	1

Insgesamt 88% der kindlichen AML-Patienten erreichten nach Induktionschemotherapie eine komplette Remission. Es zeigte sich keine Korrelation der CR-Rate mit dem zytogenetischen Risiko nach Grimwade (Grimwade et al. 2004). Für Pin1-positive zeigte sich eine leichte Tendenz zu höheren Remissionsraten mit 90,5%, bei den Pin1-negativen lag die Remissionsrate mit 82% etwas niedriger. Statistisch ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen.

Die Abhängigkeit des Gesamtüberlebens und des Ereignisfreien Überlebens von der Höhe der Pin1-Expression wurde mittels Kaplan-Meier-Kurven (siehe Abbildung 13, Seite 45) visuell und mittels dem Zwei-Stichprobentest Log-Rang-Test rechnerisch unter der Wahl unterschiedlicher Trennwerte des PIN/ABL-Expressionsquotienten (0,25 bis 1,0) analysiert. Andeutungsweise ließ sich jeweils in den Survival-Kurven ein möglicher Trend zu einem besseren Überleben von Pin1-positiven Patienten erahnen, eine prognostische Signifikanz konnte jedoch unabhängig von dem ausgewählten Quotienten nicht gezeigt werden (siehe Abbildung 28, Seite 76: beispielhafte Survivalkurven der Kinder bei einem trennenden PIN/ABL-Quotienten von 0,25).

3.2.1.6 Pin1-Expression in Proben erwachsener AML-Patienten

Bei 81% der erwachsenen AML-Patienten konnte eine Pin1-Expression mittels konventioneller PCR nachgewiesen werden. Eine Aufschlüsselung der Pin1-Expression nach FAB-Subklassifikation (siehe auch Tabelle 3) zeigte, dass insbesondere bei Patienten mit einer AML M3, M4eo und M5 Pin1 nachweisbar war, ein Signifikanzniveau konnte hierbei nicht erreicht werden (Begründung siehe Analyse der Kinder-Daten).

Tabelle 3: Pin1-Expression in den Proben von Erwachsenen mit AML in Abhängigkeit von der FAB-Subklassifikation

FAB-Klass.	Pin1-pos	Pin1-neg
M0	2	1
M1	3	2
M2	10	2
M3	3	0
M4	5	2
M4eo	5	0
M5	4	0
M6	0	1
M7	0	0

Die Rate an kompletten Remissionen betrug bei den Erwachsenen 72%, wobei pin1-positive Patienten (cut-off PIN/ABL-Quotient 0,25) mit 85% eine deutlich höhere Remissionsrate erzielten als die pin1-negativen mit lediglich 53% (siehe auch 2x2-Tafel, Tabelle 4). Die statistische Analyse unter Verwendung des Yates-korrigierten Chi-Quadrat-Tests verfehlte knapp das Signifikanzniveau von α=5% (p=0,0553).

Tabelle 4: 2x2-Feldertafel für Analyse der CR-Rate in Abhängigkeit von Pin1-Werten

Erwachsene (n=43)	CR	keine CR
Pin1 >0,25	22	4
Pin1 ≤0,25	9	8

In Übereinstimmung mit den vorgenannten Beobachtungen ergab sich bezüglich des Gesamtüberlebens bei den erwachsenen AML-Patienten in der Survival-Analyse der zwei unverbundenen Stichproben mit dem Log-Rang-Test ein statistisch knapp signifikanter Unterschied (p=0,00489) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

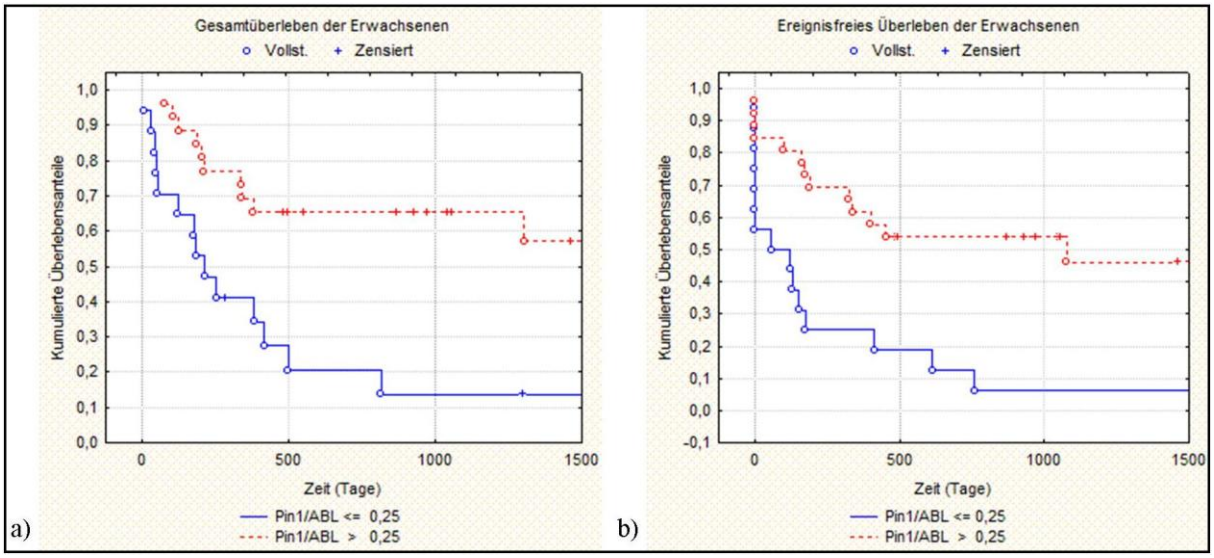

Abbildung 13: Überlebenskurven in Abhängigkeit von Pin1-Expression, a) OAS, b) EFS

3.2.2 Quantitative Realtime-PCR (qPCR) von AML-Patienten-Proben

Die qPCR wurde ergänzend durchgeführt bei unerwartetem Ausfall der Ergebnisse der konventionellen PCR. Von den bereits mittels konventioneller PCR untersuchten Proben von Primärmaterial stand in 63 Fällen noch ausreichend Material für die Durchführung einer qPCR zur Verfügung. Zur Erstellung einer Verdünnungskurve wurde cDNA der Zelllinie HL60 eingesetzt, auf welche auch anschließend alle Ergebnisse normiert wurden. Als Referenzgen wurde beta-Actin verwendet.

3.2.2.1 Nachweis der qPCR-Qualität

Als Voraussetzung für die verlässliche quantitative Analyse von qPCR-Daten ist die Überprüfung auf das Vorliegen grundlegender Qualitätskriterien notwendig (Bustin et al. 2009; Udvardi et al. 2008).

Nach Ausschluss von Hintergrundfluoreszenz durch Setzen einer passenden Baseline (ca. 1 Zyklus vor Anstieg der frühesten exponentiellen Kurven, in der Regel Zyklen 3 bis 19) erfolgte die Wahl eines Thresholds im frühen Bereich der exponentiellen Phase der qPCR. Die korrekte Lage des Threshold wurde für alle zu analysierenden Patientenproben (neben den HL60-Verdünnungsreihen) sowohl in der linearen als auch in der logarithmischen Darstellung der Fluoreszenz in Bezug auf die Zykluszahl überprüft (siehe beispielhaft für Patienten-Proben Abbildung 14 und Abbildung 15).

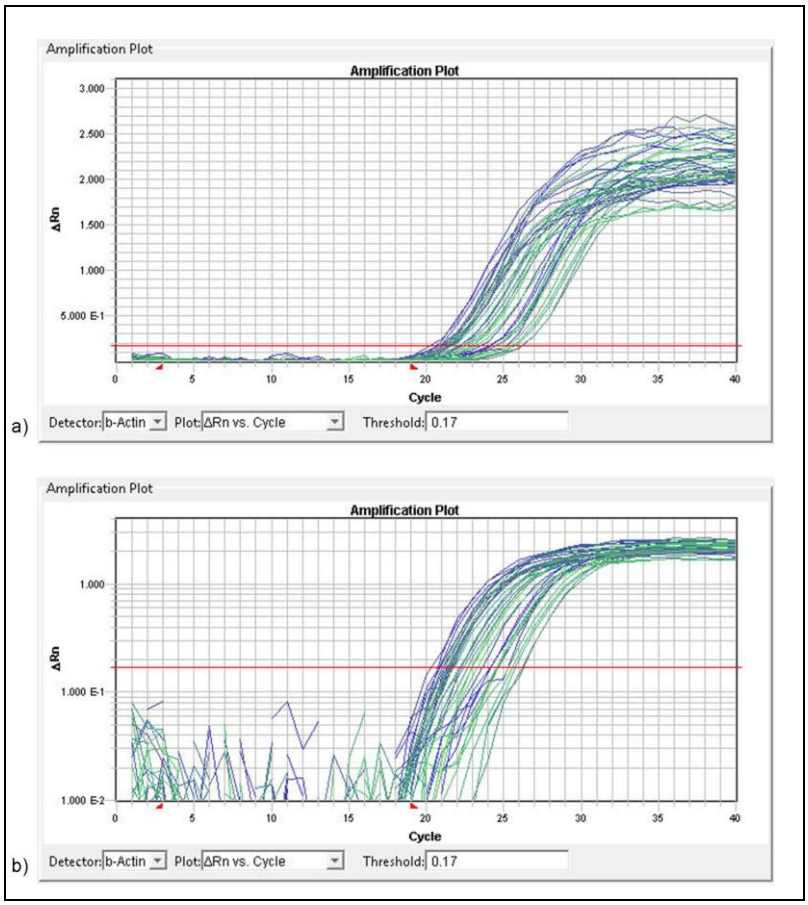

Abbildung 14: Threshold beta-Actin, a) linear, b) logarithmisch

Erläuterung zu Abbildung 14 (und 15): Beispielhafte Darstellung von Housekeeper (beta-Actin)-Probendaten (bzw. von parallel in demselben PCR-Lauf erhobenen Gene-of-interest (Pin1)-Daten), ausgewertet mit dem Programm SDS2.1.

Im Abbildungsteil a) wurden in Abhängigkeit von der Zykluszahl (Abszisse) die gemessenen Änderungen des Fluoreszenzniveaus zu Ende eines jeden Amplifikationszyklus (Ordinate) aufgetragen. Die rote parallel zur X-Achse verlaufende Gerade stellt hierbei die Höhe des gewählten Thresholds dar. Der jeweilige Schnittpunkt der Kurven mit dem Threshold ergibt den Ct-Wert, welcher orientierend graphisch durch Ablesen der X-Koordinate erhältlich ist. Genauere Ct-Werte zur weiteren Analyse wurden unter Verwendung von SDS2.1 mittels eines implementierten mathematischen Algorithmus bestimmt.

Im Abbildungsteil b) wurde eine logarithmische Darstellung der Daten gewählt, welche eine bessere Überprüfung einer korrekten Wahl des Thresholds ermöglicht und demonstriert, dass die Wahl des Thresholds auf den frühen Anstieg der exponentiellen Kurve fallen muß, um nicht Ct-Werte im Bereich einer bereits nicht mehr exponentiell verlaufenden Kurve zu bestimmen.

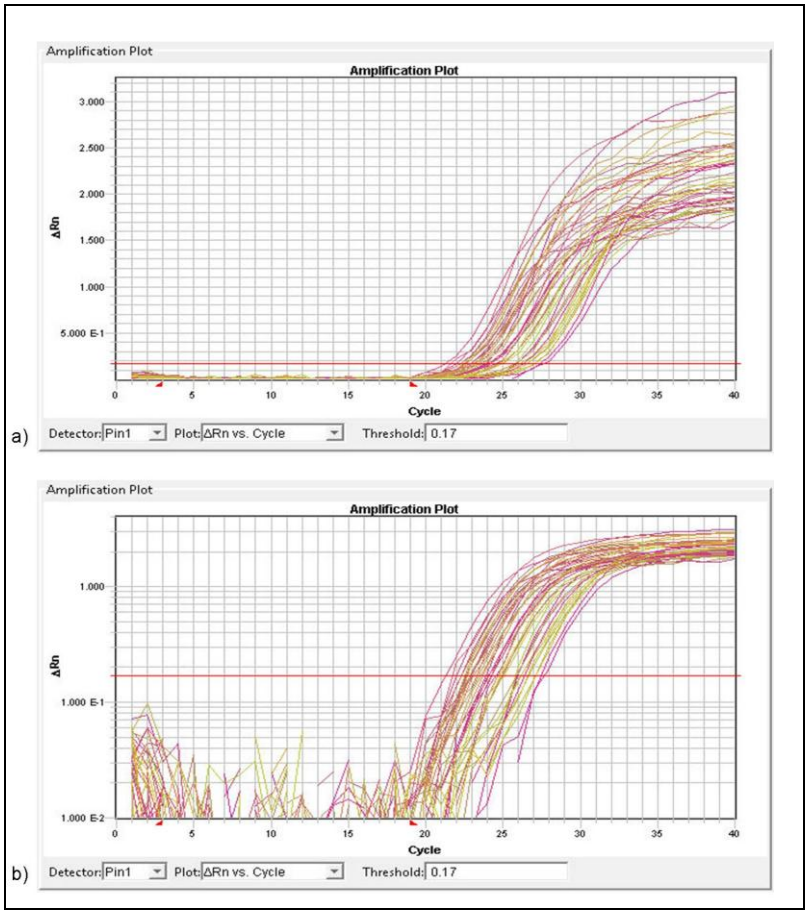

Abbildung 15: Threshold Pin1, a) linear, b) logarithmisch

Anschließend erfolgte die Auswertung der Verdünnungsreihen (siehe beispielhaft aus einem qPCR-Lauf Abbildung 16 und Abbildung 17), welche wie gefordert eine lineare Beziehung der Ct-Werte in Abhängigkeit von den eingesetzten relativen Ausgangskonzentrationen zeigten. In den genannten Abbildungen der Verdünnungsreihen sind auch die Ct-Werte der eingesetzten Patienten-Proben als rote Kreuze mit dargestellt. Sie lagen sämtlich innerhalb des linearen Bereichs der Verdünnungskurven und in der Regel überschritten die Ct-Werte die Zykluszahl 30 nicht. Außerdem stimmten die Effizienzen von Pin1 und Beta-Actin in den jeweils parallel durchgeführten Untersuchungen mit geringen Abweichungen überein.

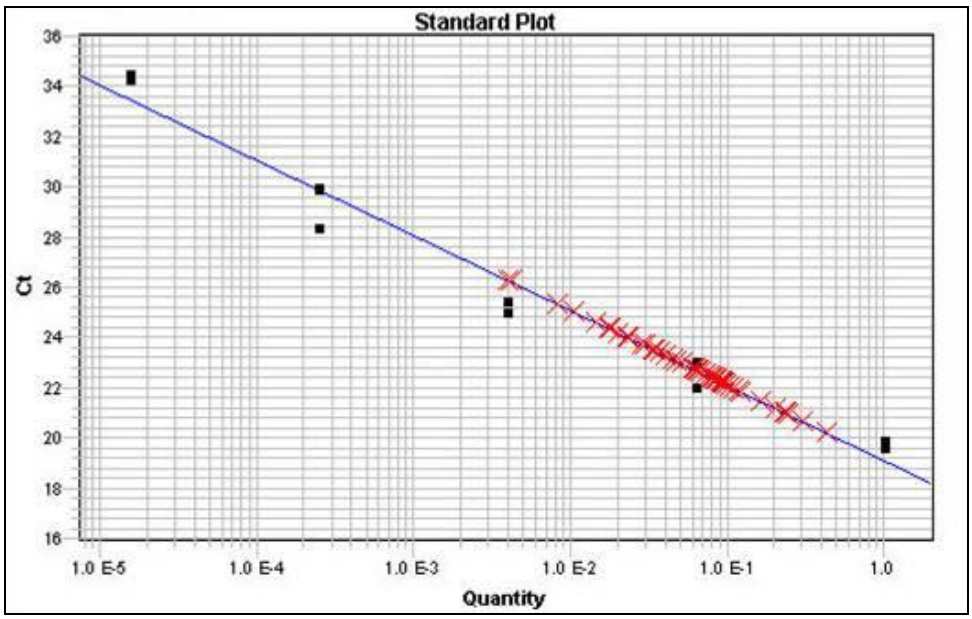

Abbildung 16: Standardverdünnungskurve von Beta-Actin, schwarze Quadrate: Ct-Werte der einzelnen HL60-Verdünnungen, rote Kreuze: Ct-Werte der Patienten-Proben

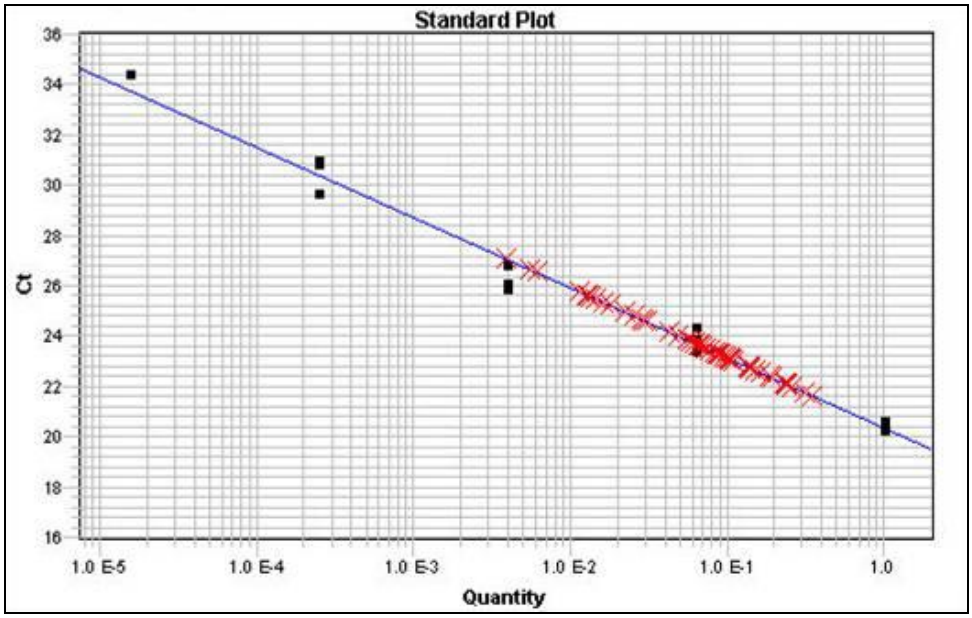

Abbildung 17: Standardverdünnungskurve von Pin1, schwarze Quadrate: Ct-Werte der einzelnen HL60-Verdünnungen, rote Kreuze: Ct-Werte der Patienten-Proben

Die Schmelzkurvenanalyse sämtlicher Proben (beispielhaft dargestellt in Abbildung 18) zeigte singuläre, distinkte Peaks für Pin1 und Beta-Actin. Übereinstimmend mit den theoretischen Berechnungen lag der experimentell ermittelte Schmelzpunkt (Tm = 50% des dsTemplates dissoziiert in Einzelstränge) von Pin1 bei 82°C und für Beta-Actin etwas höher bei 84°C (errechneter Wert 83°C ohne Einbeziehung von Salz-/Primerkonzentrationen etc). Des Weiteren war nachzuweisen, dass die Negativkontrollen keine über die Grundfluoreszenz hinausgehende Fluoreszenz zeigten.

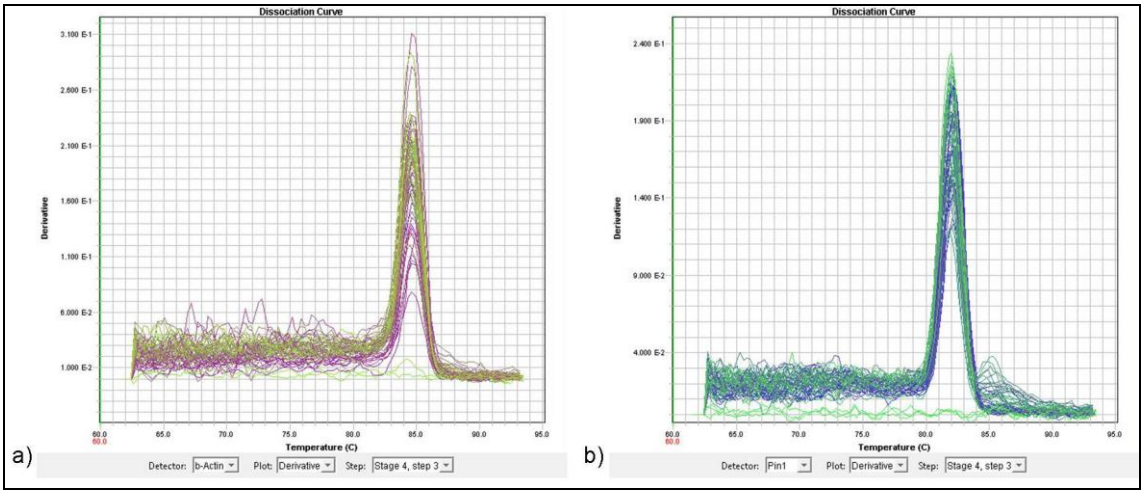

Abbildung 18: Schmelzkurven (Patientenproben), a) beta-Actin, b) Pin1

Erläuterung zu Abbildung 18: In Abhängigkeit von der Temperatur (Abszisse) wurden sowohl für den Housekeeper als auch für Pin1 die negativen Änderungsraten der Fluoreszenzaktivitäten aufgetragen (dies entspricht der 1. Ableitung des Fluoreszenzaktivitätsverlaufs – in SDS2.1 mit Derivative beschriftet). Zum Zeitpunkt des maximalen Abfalls der Fluoreszenzaktivität – hier als Peak dargestellt – findet die Dissoziation der doppelsträngig vorliegenden Templates statt. Anhand eines distinkten Maximums, welches der aus der Sequenz errechneten Schmelztemperatur entsprechen muss, lässt sich sicherstellen, dass nahezu ausschließlich das erwartete Zielprodukt für die während der qPCR-Zyklen gemessene Fluoreszenz verantwortlich ist. Würden weitere Peaks auftreten, wäre dies ein Hinweis auf eine Verunreinigung der Probe und auf die Amplifikation eines unspezifischen oder alternativen Templates (z.B. Primer-Dimere). Physikalische Grundlage des Phänomens: Bei Dissoziation von doppelsträngig vorliegender cDNA in zwei Einzelstränge wird SybrGreen aus der Interkalation herausgelöst und fluoresziert fortan nur noch schwach. Der starke Flureszenzabfall stellt sich in einer maximal negativen 1. Ableitung dar, deren Kurvenverlauf somit (bei Auftragung mit negativem Vorzeichen) einen entsprechenden Peak zeigt.

3.2.2.2 Zusammenfassung der qPCR-Daten

Bei allen mittels quantitativer PCR untersuchten Patientenproben (n=63) konnte eine Pin1-Expression nachgewiesen werden. Beispielhaft sei hier eine Einzelanalyse von Patientin S.F. (Abbildung 19) aufgeführt. In diesem Fall zeigt sich eine nur geringe Pin1-Expression im Vergleich zum Referenzgen beta-Actin. Mittels SDS wurden in die Analyse der relativen Expressionen auch die geringen Schwankungen der Effizienzen

von Pin1 zu beta-Actin in die Berechnung der Ausgangskonzentration einbezogen und auf die positiv-Kontrolle HL60 normiert. Aus den so ermittelten Konzentrationen wurde der Quotient errechnet, welcher die relative Expression von Pin1 zu beta-Actin in der jeweiligen Probe widerspiegelte.

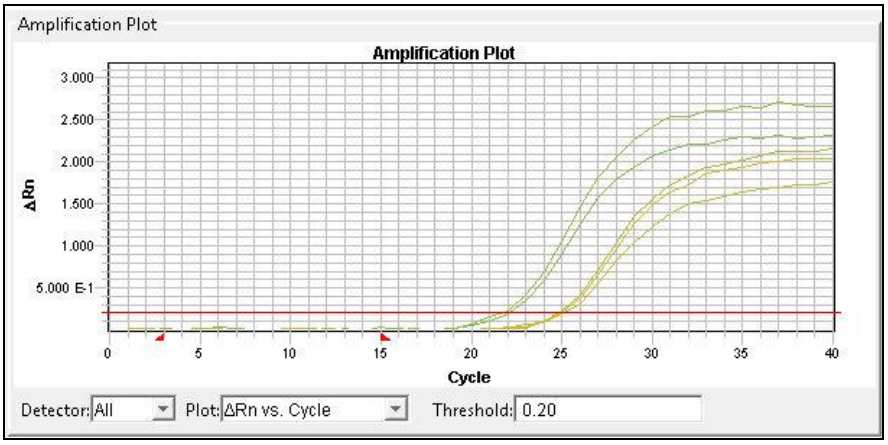

Abbildung 19: Quantitative PCR-Analyse von Patientin S.F. (hellgrün=Pin1, dunkelgrün=beta-Actin)

Anhand eines Grenzwertes für die Pin1-Expression, welcher dem der Pin1-positiven AML-Zelllinie HL60 entsprach (normierter Quotient Pin1/Beta-Actin 1,0), erfolgte die Unterscheidung der AML-Patienten in Pin1 niedrig und hochexprimierende. In die Gruppe der niedrig Pin1-exprimierenden fielen 45 Patienten, in die Gruppe der hoch Pin1-exprimierenden 18 Patienten. Die Abhängigkeit des Gesamtüberlebens und des Ereignisfreien Überlebens von der Pin1-Expression wurde mittels Kaplan-Meier-Kurven visuell und mittels des Zwei-Stichprobentests Log-Rang-Test rechnerisch analysiert. Für das Gesamtüberleben aller Patienten in Abhängigkeit von der Pin1-Expression zeigte sich ein signifikant schlechteres Überleben für die Patienten mit hoher Pin1-Expression (Abbildung 20). Der robuste Zweistichprobentest Log-Rang-Test zum Vergleich zweier Stichproben (p=0,009) ergab einen statistisch signifikanten Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner <0,5%.

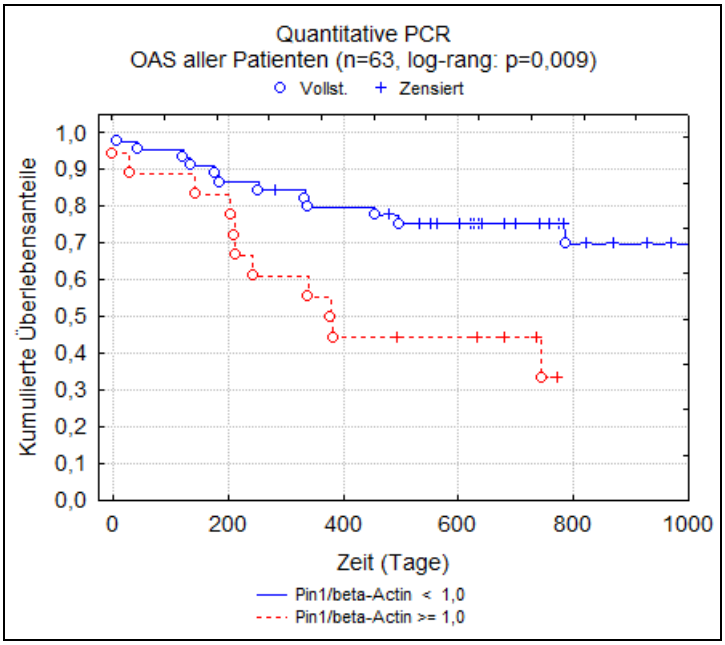

Abbildung 20: Gesamtüberleben aller Patienten in Abhängigkeit von der Pin1-Expression, statistische Signifikanz im log-rang-test (p=0,009)

Die Unterschiede im Ereignisfreien Überleben aller Patienten (Abbildung 21) und den Survivalanalysen der Subgruppen erwachsener und kindlicher AML-Patienten (Abbildung 22) zeigten einen gleichgerichteten Trend, waren jedoch nicht signifikant.

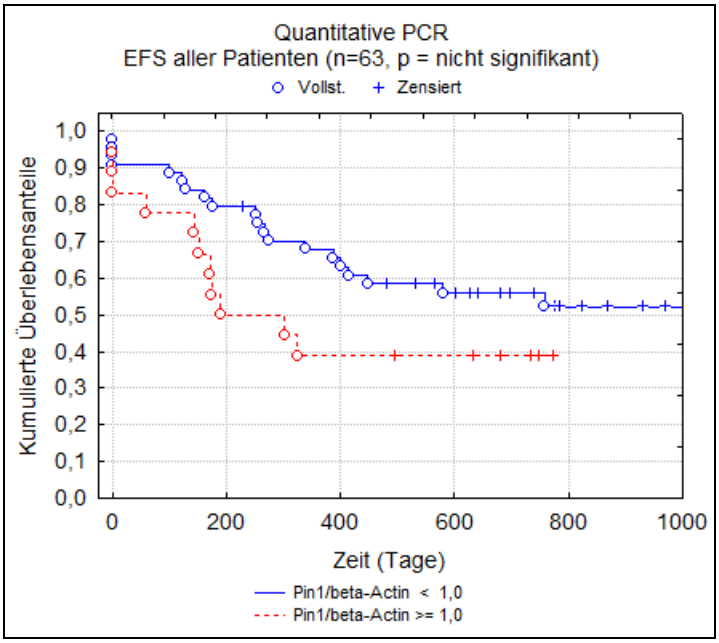

Abbildung 21: Ereignisfreies Überleben aller Patienten in Abhängigkeit von der Pin1-Expression

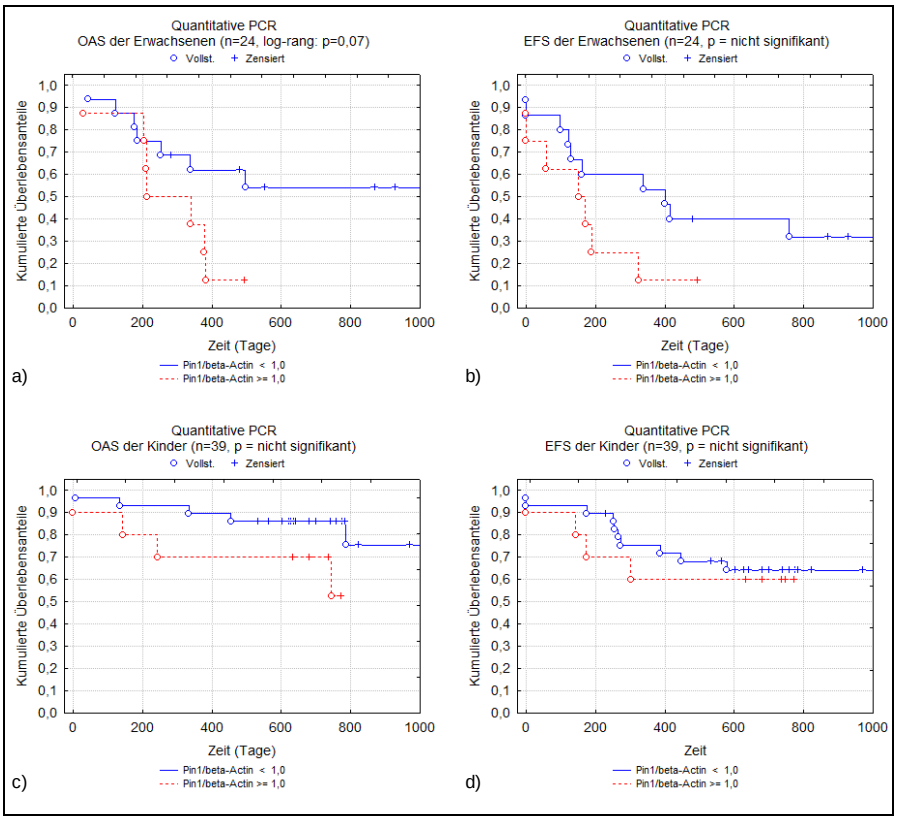

Abbildung 22: Überlebenskurven der Erwachsenen und der Kinder
a) OAS-Erw, b) EFS-Erw, c) OAS-Kinder, d) EFS-Kinder

Die Gesamt-CR-Rate betrug 87%, wobei die Pin1-hochexprimierenden Patienten mit 83% eine etwas schlechtere Rate erzielten als die Pin1-niedrigexprimierenden mit 89%. Die statistische Analyse unter Verwendung des Yates-korrigierten Chi-Quadrat-Tests zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (siehe hierzu auch die Vierfeldertafel mit absoluten Zahlen: Tabelle 5). Auch in der Aufschlüsselung der CR-Raten nach Erwachsenen und Kindern unterschieden sich diese nicht signifikant in Abhängigkeit von der Pin1-Expression, allerdings zeigten auch hier die Gruppen mit hoher Pin1-Expression eine Tendenz zu niedrigeren Remissionsraten.

Tabelle 5: 2x2-Feldertafel für Analyse der CR-Rate in Abhängigkeit von Pin1-Werten

alle Patienten (n=63)	CR	keine CR
Pin1 < 1,0	40 (89%)	5 (11%)
Pin1 ≥ 1,0	15 (83%)	3 (17%)

3.3 Pin1-Expression auf Proteinebene

3.3.1 Immunzytochemische Färbungen

Die nachgewiesene RNA-Expression von Pin1 wurde auch auf Proteinebene mittels zytochemischer Färbung von Zytospinpräparaten überprüft. Die in der PCR stark positiven Zelllinien HL60 (AML M2), NB4 (AML M3) und U937 (AML M4) zeigten eine Färbung von Kern und Zytoplasma (Abbildung 23).

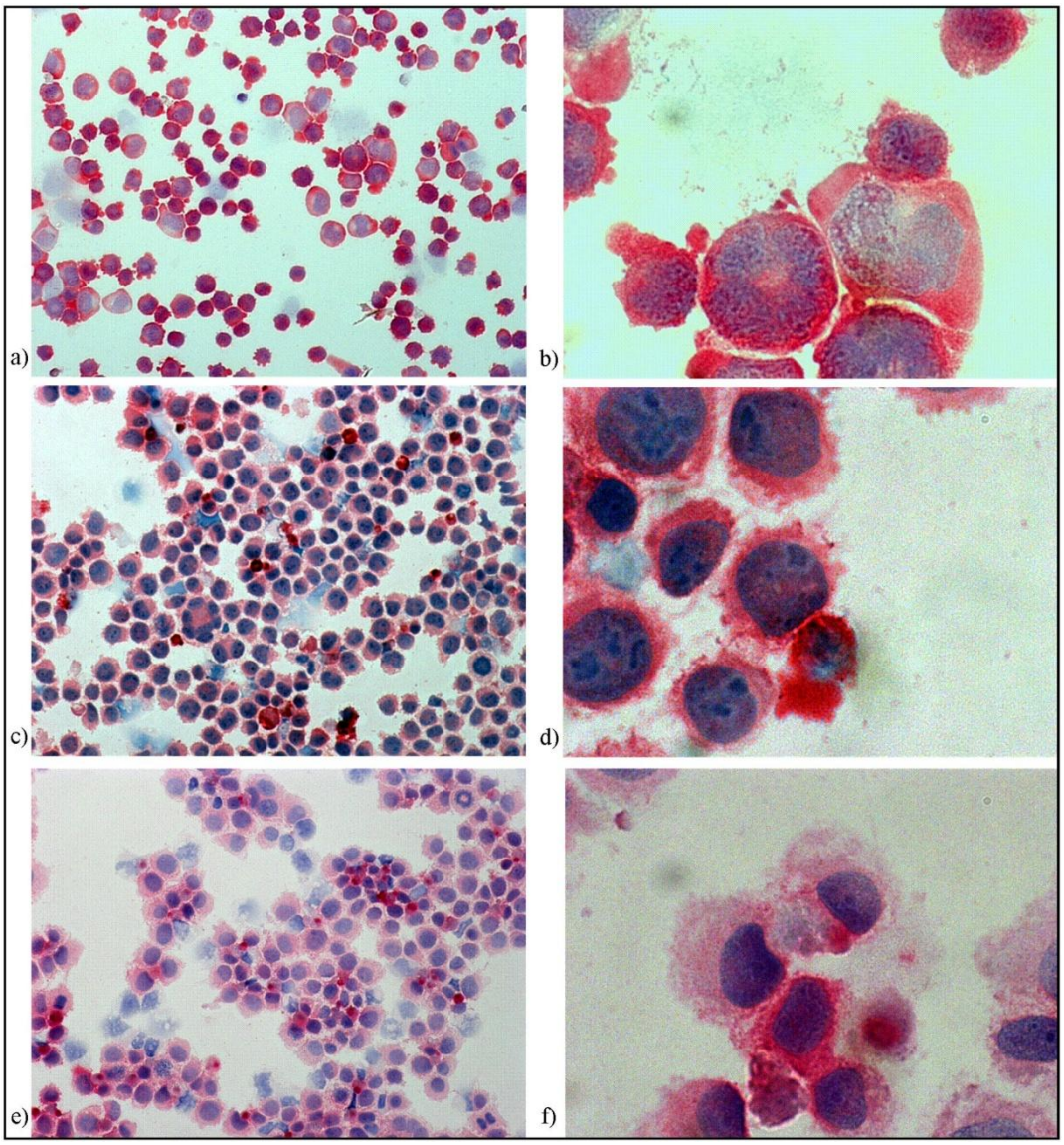

Abbildung 23: Immunzytochemische Färbung verschiedener AML-Zelllinien mit Pin1-AK
HL60 (a=200x, b=1000x), NB4 (c=200x, d=1000x), U937 (e=200x, f=1000x)

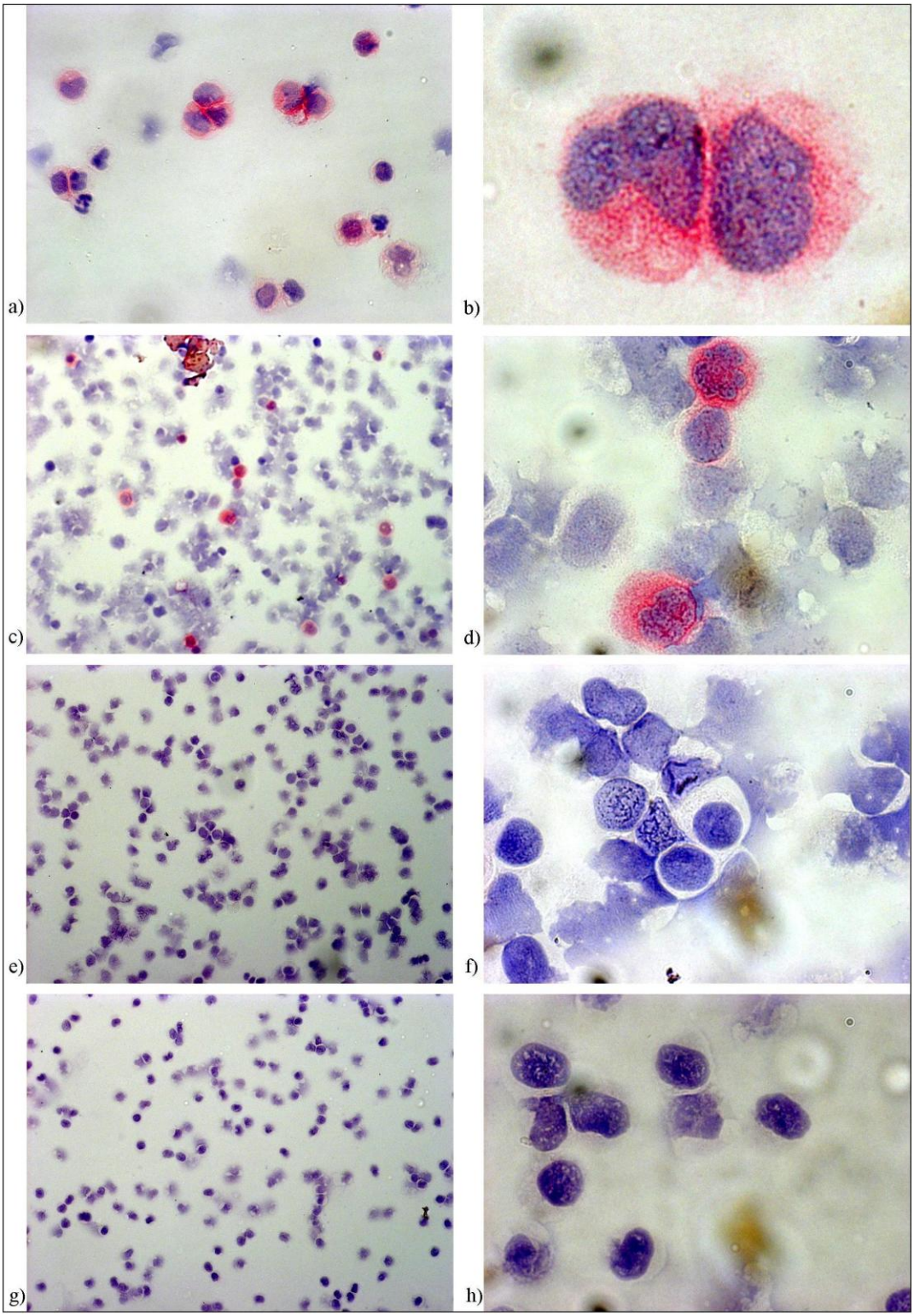

Abbildung 24: Immunzytochemische Färbung von AML-Patientenproben mit Pin1-AK
Pat.1 (a=400x, b=1000x), Pat.2 (c=200x, d=1000x), Pat.3 (e=200x, f=1000x), Pat.5 (g=200x, h=1000x)

Auch im Probenmaterial von 3 AML-Patienten ließ sich die Pin1-Expression auf Proteinebene durch immunzytochemische Färbung nachweisen. Insgesamt erfolgte die orientierende Färbung und Auswertung von 6 Patientenproben. In Abbildung 24 sind beispielhaft zwei Pin1-positive und zwei Pin1-negative Patientenproben aufgeführt. Die

Pin1-exprimierenden Patienten-Proben zeigen eine Anfärbung von blastären Zellen (deutliche Nukleoli und Mitoseformen erkennbar), wobei sowohl im Karyo- als auch im Zytoplasma der Pin1-Nachweis gelingt. Die Ergebnisse entsprechen denen der PCR und/oder FACS-Analyse.

3.3.2 Durchflusszytophotometrie (FACS)

Mittels FACS wurden die AML-M2-Zelllinie HL60 sowie insgesamt neun Patientenproben analysiert.

Die Zelllinie HL60 zeichnet sich durch folgenden Antigen-Besatz aus: CD3-, CD4+, CD13+, CD14-, CD15+, CD19-, CD33+, CD34-, HLA-DR- (Drexler 2005). Bei dieser in PCR und Immunzytochemie Pin1-positiven Zelllinie ließ sich wie erwartet die Koexpression von Pin1 mit CD13/33 nachweisen. Die vitalen Zellen im Blastengate (siehe Gate „R1“ im FSC/SSC-Feld) ließen sich alle mittels der intrazellulären Fluoreszenz-Antikörper-Färbung für Pin1 anfärben (siehe Abbildung 25).

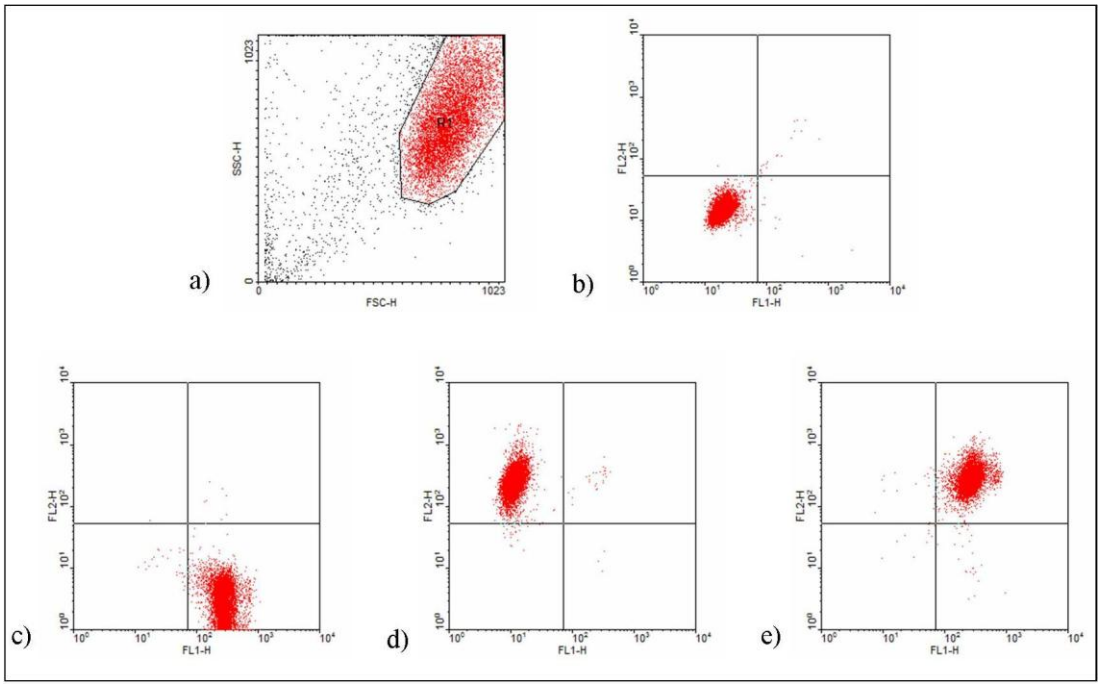

Abbildung 25: FACS-Analyse von HL60 (AML M2-Zelllinie) - Koexpression von Pin1 & CD13/33:
a) FSC vs SSC, b) keine AK, c) Pin1-FITC (X-Achse), d) CD13/33-PE (Y-Achse),
e) Pin1-FITC (X-Achse) & CD13/33-PE (Y-Achse); R1 = „Blastengate“

Im Weiteren folgt die exemplarische Demonstration einer per FACS-Färbung analysierten AML-Patienten-Probe von Pat. A.S. bei Erstdiagnose einer AML M7 (Abbildung 26). Die Blasten im Gate R1 sind Pin1-Positiv, es findet sich eine Koexpression von Pin1 mit CD13/33 sowie in einzelnen Fällen eine Koexpression von Pin1 mit CD34.

Eine Koexpression von CD3 als Marker der lymphatischen Zellreihe findet sich wie erwartet nicht. Hier nicht zur Darstellung kommt die generelle Analyse der Koexpression von CD3 mit Pin1, welche ohne Blastengating möglich war: CD3-positive lymphozytäre Zellen waren generell negativ für Pin1.

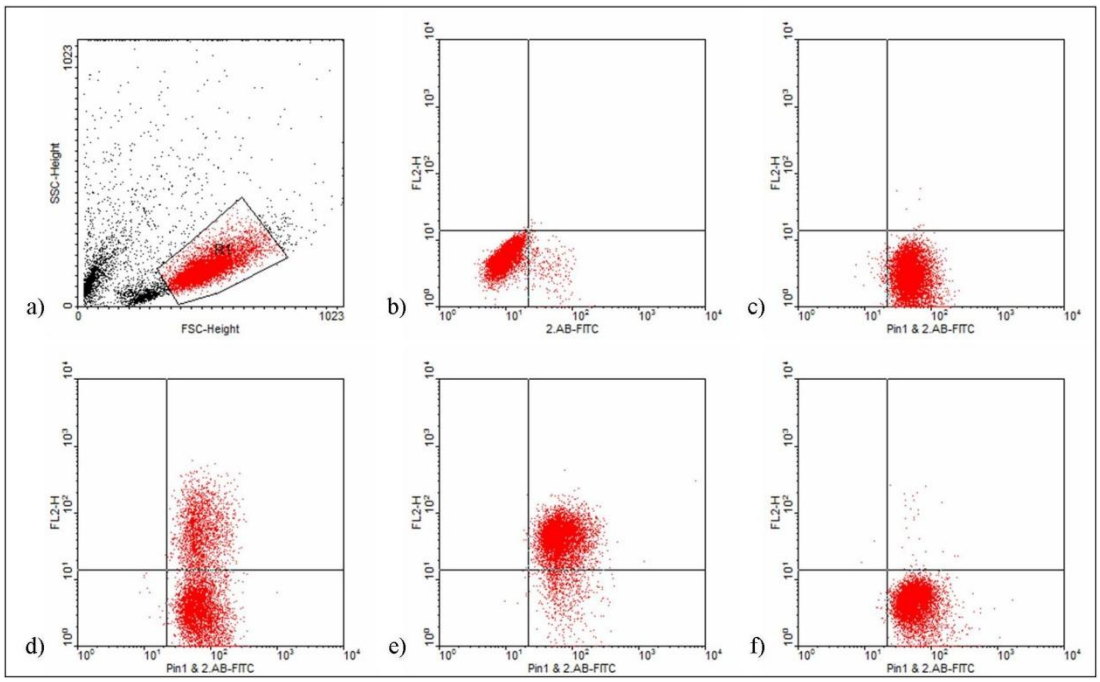

Abbildung 26: FACS-Analyse von Pat. A.S. (AML M7)
a) FSC vs SSC, b) keine AK, c) Pin1-FITC, d) Pin1-FITC & CD34-PE, e) Pin1-FITC & CD13/33-PE, f) Pin1-FITC & CD3-PE; R1 = „Blastengate“;

Insgesamt wurden neben der HL60-Zelllinie die Zellen von neun AML-Patienten untersucht. Sieben Patienten zeigten eine Expression von Pin1, und jeweils auch die Koexpression von CD13/33, wobei bei zwei Patienten nur eine schwache Pin1-Expression nachweisbar war. Bei zwei Patienten war kein Pin1-Nachweis per FACS möglich. Diese zwei Patienten zeigten auch in der immunzytochemischen Färbung keinen Nachweis von Pin1.

3.4 Zusammenschau der Pin1-Expression

Bei Verwendung aller drei Untersuchungstechniken zeigte sich eine Übereinstimmung von positiver oder fehlender bzw niedriger (qPCR) Expression von Pin1 (siehe Abbildung 27). Aufgrund des in der Regel nur in geringem Umfang zu Verfügung stehenden Patientenmaterials waren diese Vergleichsuntersuchungen auf Einzelfälle beschränkt. Eine statistische Auswertung der Korrelation erfolgte daher nicht. Die in der Abbildung nicht dargestellte Expression von Pin1 in der quantitativen PCR ergab für HL60 als normierte Probe 1, bei Pat. 1 zeigte sich eine hohe Expression von 1,6 im Verhältnis zu HL60, bei Pat. 5 zeigte sich eine niedrige Expression von nur 0,18.

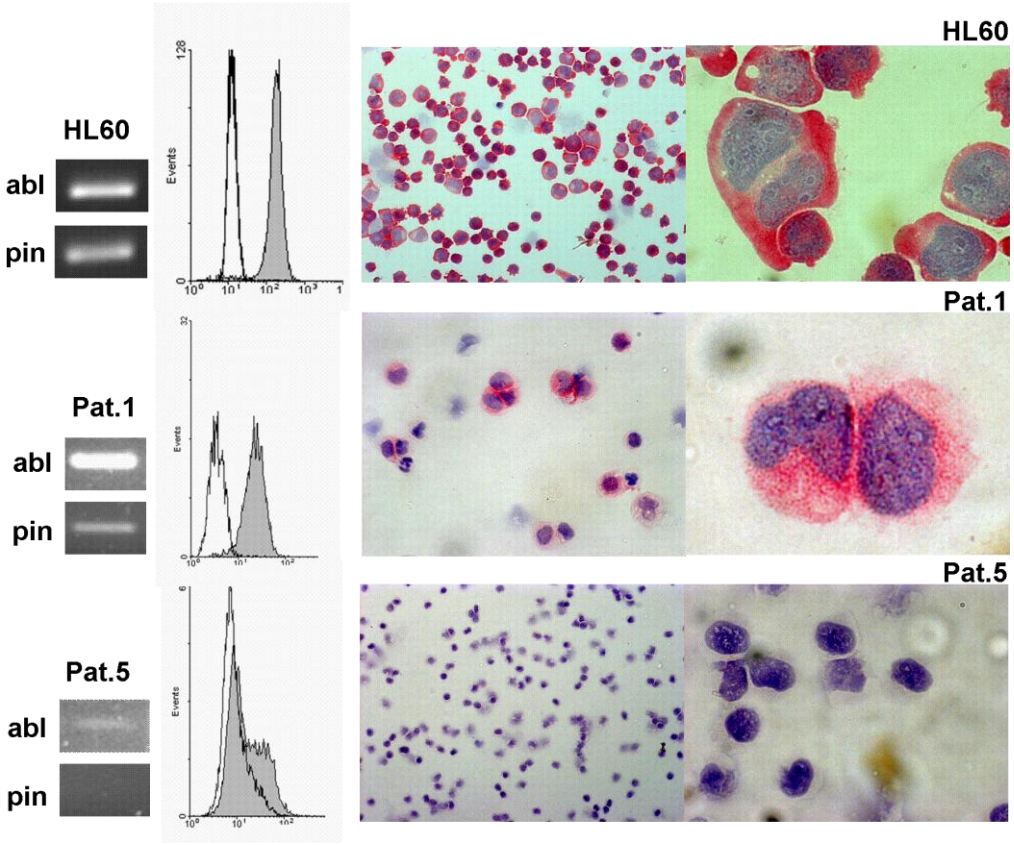

Abbildung 27: Vergleichsuntersuchungen PCR, FACS und Immunzytochemie an 3 Proben

FACS-Erläuterung: Darstellung FITC-Fluoreszenz ohne (weißer Peak) und mit Pin1-FITC (grauer Peak), distinkte Peaks für Pin1-positive Proben HL60 und Pat.1, nahezu deckungsgleiche Verteilung der mit einem Antikörper gegen Pin1 bzw. dem Isotyp gefärbten Zellen in der für Pin1-negativen Probe Pat.5.

4 Diskussion

4.1 Kritik der Methoden

4.1.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion nach Chomczynski (Chomczynski und Sacchi 1987) stellt eine auch heute noch akzeptierte, einfache Methode als ersten Schritt zu einer Expressionsanalyse von Genen auf RNA-Ebene mittels PCR dar. Hierbei besteht allerdings die Gefahr einer Verunreinigung durch unzureichende Elimination von genomischer DNA aus den Proben. Die Folge wäre ein fälschlicher Nachweis der RNA-Expression eines Gens durch Amplifikation von nukleärer DNA statt der vermeintlich nachgewiesenen RNA nach cDNA-Synthese. Um diesen experimentell bedingten Fehler zu erkennen, wurden für das Referenzgen-Gen ABL Primer gewählt, welche genomische DNA aufgrund einer weiteren Bande detektierten (siehe 2.2.1.4, Seite 28). In Fällen des Nachweises multipler Banden in der ABL-PCR erfolgte die Behandlung der mittels RNA-Extraktion erhaltenen Proben mit DNAse (Deoxyribonuclease I , Invitrogen), wodurch die kontaminierende genomische DNA entfernt wurde, erkennbar an einer singulären ABL-Bande in der erneuten PCR und Gelelektrophorese.

4.1.2 Konventionelle PCR

Im Gegensatz zur Realtime-PCR erhält der Untersucher bei der semiquantitativen Analyse von PCR-Ergebnissen mittels Densitometrie nach gelelektrophoretischer Auftrennung keine Kurven gemäß der Kopienentwicklung in Abhängigkeit vom Zyklusdurchlauf, sondern ist nach vorangegangener Abschätzung des Reaktionsverlaufs auf die Analyse der Ergebnisse nach einer definierten Zykluszahl angewiesen. Wählt man die Zykluszahl im exponentiellen Teil der PCR-Reaktion, so ist prinzipiell eine quantitative Auswertung mit Rückschlüssen auf die Ausgangskonzentration möglich, allerdings ist der exponentielle Bereich der Amplifikation abhängig von der vorhandenen Konzentration des Templates, so dass sich die exponentielle Phase der Amplifikation in Abhängigkeit von der Ausgangs-Konzentration des Zielgens über unterschiedliche Zyklen erstreckt. Des Weiteren liegt die untere Nachweisgrenze der konventionellen PCR deutlich über derjenigen der quantitativen Realtime-PCR. Einen weiteren Unsicher-

heitsfaktor stellt die klassischerweise verwendete Anfärbung von doppelsträngiger cDNA mittels Ethidiumbromid dar. Ethidiumbromid ist ein starker Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenz sich nicht streng linear zur vorliegenden cDNA-Konzentration verhält, so dass sich bereits hierdurch eine Limitierung auf semiquantitative Auswertungen der zugrunde liegenden cDNA-Konzentrationen empfiehlt. Auch die semiquantitative Auswertung der Gele durch ein Graphik-Programm beinhaltet Untersucher- und methodenabhängige Unsicherheitsfaktoren. Beispielsweise bestimmen Grafikprogramme Intensitäten über die Messung der Intensität an mehreren singulären Punkten, bei Inhomogenitäten ergeben sich hieraus schnell Abweichungen in der ermittelten Intensität. Auch bei identischem Untersucher ergeben sich leichte Differenzen bei Wiederholungsmessungen. All diese Unsicherheiten fallen insbesondere bei einem generell exprimierten Gene of interest wie Pin1 ins Gewicht, wodurch nur im Falle großer Unterschiede in den Expressionsraten aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden können.

4.1.3 Quantitative Realtime-PCR (qPCR)

Die qPCR stellt eine sehr sensitive und spezifische Methode zum Nachweis von cDNA dar. Durch Ausschluss von Verunreinigung der Proben durch genomische DNA (hier durch die konventionelle Abl-PCR erfolgt) und/oder durch Wahl von Exon-Exon-übergreifenden Primerkombinationen (hier ebenfalls erfolgt) wird eine spezifische Amplifikation der cDNA-Zielsequenzen gesichert. Anhand der im Ergebnisteil beschriebenen Überprüfungen wurde die qPCR-Qualität überprüft, bevor die eigentliche Auswertung der Proben erfolgte. Pipettierfehler bei Einsatz minimaler cDNA-Mengen (0,5µl pro Ansatz) wurden durch die zusätzliche Erstellung von Untermastermixes so gering wie möglich gehalten.

4.1.4 Immunzytochemische Färbungen

Die Gefahr bei immunzytochemischen Färbungen besteht in unspezifischen Anfärbungen, obwohl das Zielantigen in den Zellen nicht exprimiert wird. Um diese Problematik zu vermeiden, wurden im Vorfeld der eigentlichen Färbungen Färbeversuche mit der Pin1-positiven Mamma-Carcinom-Zelllinie MCF-7 (Wulf et al. 2001), der ebenfalls positiven AML-Zellline HL60 sowie mit der auf Transkriptionsebene negativ getesteten Zelllinie K562 (Drexler 2005) durchgeführt. Es wurden des Weiteren unspezifische Antikörper gegen Fc-Fragmente von humanen Immunglobulinen der Klasse G eingesetzt, um eine alleinige Hintergrundfärbung auszuschließen. Während der Färbungen wurden jeweils negative und positive Kontrollen für Antigen und Antikörper mitgeführt, um eine mögliche Alteration zu erkennen. Nennenswerte Hintergrundfärbungen oder unspezifische Färbungen traten während der Versuche nicht auf.

4.1.5 Durchflusszytophotometrie

Die Verlässlichkeit der durchflusszytophotometrisch erhobenen Befunde hängt von einer Reihe von Faktoren ab. Da es sich um eine Untersuchung von vitalen Zellen handelt, ist zunächst die schnelle und vor allem einheitliche präanalytische Aufbereitung der Proben von großer Bedeutung, welche durch das hämato-onkologische Routine-Labor des Universitätsklinikums Göttingen gewährleistet wurde; es erfolgte generell die Abtrennung der mononukleären Zellfraktion des Knochenmarksblutes mittels Dichtezentrifugation und die sofortige Asservierung der vitalen Zellen durch Einfrieren und Lagerung bei -150 Grad Celsius bis zur Färbung. Beim Färbeverfahren selbst wurde auf ein bereits in unserem Routinelabor etabliertes Protokoll zur intrazellulären Fluoreszenz-Färbung vitaler Zellen zurückgegriffen. Das Protokoll war bis auf den Austausch der jeweiligen Antikörper und eine Anpassung der eingesetzten Konzentration des Pin1-Primär-Antikörpers ohne Modifikation von Färbezeiten und Pufferkonzentrationen einsetzbar, so dass die zuvor bereits in der Etablierungsphase des Protokolls gesicherten Erfordernisse (niedriger Anfall von apoptotischen Zellen oder Zelldetritus) an eine durchflusszytophotometrisch zu analysierende Probe weiterhin erfüllt wurden. Die Untersuchungsergebnisse am Durchflusszytophotometer sind neben den vorgenannten präanalytischen Einflüssen des Weiteren abhängig von den Parametereinstellungen des Gerätes. Eine wichtige Einflussgröße stellt die Autofluoreszenz und Größe der zu untersuchenden Zellen dar, welche durch die jeweils neu zu ermittelnde korrekte Einstellung der PMT(=photomultiplier tube)-Spannung, also der am Photomultiplier angelegten Verstärkungsspannung, ausgeglichen wird. Um die vorgenannten Einflüsse zu minimieren, wurde bei allen untersuchten Patienten- und Zelllinienproben jeweils ein Röhrchen ohne Zusatz von Fluoreszenzantikörpern durch den gesamten Färbeprozess mitgeführt und an diesem die Optimierung der Geräteeinstellungen vor den eigentlichen Messungen vorgenommen. Als weitere potentielle Fehlerquelle bei der Mehrfarbenanalyse im Durchflusszytophotometer findet sich eine Überlappung der Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe, welche bei PE (gelb) und FITC (grün) nicht unwesentlich ist. Sie kann zu falsch positiven Populationen in der Dot-Plot Analyse der erhobenen Daten führen, wenn Zellen, die mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, nicht nur von dem für diesen Farbstoff bestimmten Detektor gemessen werden, sondern auch von einem zweiten Detektor, der nicht für diesen Farbstoff bestimmt ist. Die spektrale Überlappung muss durch elektronische Subtraktion des unerwünschten Signals kompensiert werden. Die Einstellungen hierfür wurden am Gerät mit Hilfe von einfach und doppelt gefärbten Kontrollproben durchgeführt. Eine Vergrößerung der Messwertungenauigkeiten aufgrund von Kompensationseffekten lässt sich hierbei nicht vollständig vermeiden, durch sorgfältige Einstellung von Kompensation und aufgrund einer hohen Genauigkeit der heutigen Durchflusszytophotometer ist jedoch eine nahezu fehlerfreie Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellen möglich.

Neben diesen verfahrenensspezifischen Fehlerquellen wurden bei dem Vergleich von Durchflusszytophotometriedaten mit den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Untersuchung von Knochenmarksausstrichen noch zwei weitere Punkte berücksichtigt:

Bei der lichtmikroskopischen Beurteilung von Knochenmarksausstrichen erfolgt die Zuordnung von Zellen zur Fraktion der Blasten aufgrund von morphologischen Kriterien, teilweise wird diese in unklaren Fällen durch spezifische zytochemische Färbungen einzelner Ausstriche unterstützt. In der Durchflusszytophotometrie muss die Identifizierung der Blastenfraktion aufgrund von typischer Lage im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht-Dot-Blot und durch Färbungen mit Markern der unreifen Vorstufen erfolgen. Beide Methoden bergen die Gefahr, atypische Blastenpopulationen zu übersehen. Bei der Lichtmikroskopie sind dies atypisch aussehende kleine Blastenpopulationen, welche in der Vielzahl von Vorläuferzellen untergehen können. In der Durchflusszytometrie sind es Populationen, welche nicht die klassischerweise gewählte Expression von CD34+ als Marker für unreife Vorläuferzellen tragen und somit gar nicht erst als die eigentlich abnorme Population identifiziert werden können. Um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden, erfolgte die mikroskopische Beurteilung der Knochenmarksausstriche durch langjährig erfahrene Befunder der Knochenmarksmorphologie sowie in unklaren Fällen die zusätzliche Färbung mit unspezifischer Esterase und Peroxidase zur Erkennung atypischer myeloischer Populationen. In der Duchflusszytophotometrie wurde neben der Einsetzung des Markers CD34+ immer eine Analyse der Verteilung im Vorwärts- zu Seitwärtsstreulicht ohne vorheriges Gating durchgeführt um hier mögliche, mit der CD34-Färbung nicht erfasste Populationen zu identifizieren. Des Weiteren wurden zwei Marker der frühen myeloischen Differenzierung in allen Fällen mit eingesetzt (CD13 + CD33), so dass auch Zellen, welche nahezu kein CD34 mehr auf der Zelloberfläche trugen, dafür aber eine Expression von CD13/CD33 aufwiesen, durch die Durchflusszytophotometrie identifiziert werden konnten. Von einer alternativen Identifizierung von Blasten durch Färbung mit CD45-AK und der Auftragung gegenüber dem Seitwärtsstreulicht, wurde aufgrund aussagekräftiger Ergebnisse der wie zuvor beschrieben durchgeführten Analysen abgesehen.

4.1.6 Vergleichbarkeit der Ergebnisse von PCR, immunzytochemischen Färbungen und Durchflusszytophotometrie

Beim Vergleich der Ergebnisse von Knochenmarksausstrichen und der Durchflusszytophotometrie von Knochenmarksblut muss darauf hingewiesen werden, dass durch die beiden Methoden erhaltene Prozentanteile von Blastenpopulationen nicht unmittelbar vergleichbar sind, da die in Knochenmarksausstrichen teils mit beurteilten, recht fest in den Markbröckelchen verankerten Zellen durch die Durchflusszytophotometrie nicht immer vollständig erfasst werden können. Die Anteile an abnormer Markerexpression von myeloischen Blasten, wie beispielsweise die Pin1-Expression, dürften sich

innerhalb der Blastenpopulation selbst jedoch wenig unterscheiden, vorausgesetzt es tritt nicht der seltene Fall einer selektiv in den Bröckelchen enthaltenen Sub-Population mit additiver Mutation des Gene of interest oder eine besondere Vulnerabilität ausgewählter pathologischer Zellfraktionen unter der Aufbereitung zur FACS-Analyse auf. Für die PCR-Untersuchungen, die immunzytochemische Färbung von Pin1 an Zytospin-Präparaten und auch die Durchflusszytophotometrie wurden zur Ausschaltung präanalytischer Fehler jeweils ausschließlich durch Dichtegradiendentenzentrifugation abgetrennte Fraktionen mononukleärer Zellen verwendet, so dass die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich des eingesetzten Materials direkt miteinander vergleichbar sind.

4.2 Kritik der Ergebnisse

4.2.1 Patientencharakteristika

Das Erkrankungsalter der adulten AML-Patienten lag deutlich unter den in der Literatur veröffentlichten Werten. Dies ist am ehesten auf eine Selektion von Patienten an einem Haus der Maximalversorgung zurückzuführen. Die Altersverteilung entsprach dabei jedoch in etwa der für die AML in der Literatur beschriebenen, mit einem leichten generellen Shift zu jüngeren Patienten. Die Überlebenskurve der Erwachsenen entsprach der aktuellsten Kurve des MD-Anderson Cancer Centers (2000-2005), so dass ein vergleichbares Patientenkollektiv vorliegen dürfte. Auch die Überlebenskurven der Erwachsenen in Abhängigkeit von der Zytogenetik entsprachen den Erwartungen. Aufgrund der Tatsache, dass neuere Daten und Forschungsergebnisse in der Regel hauptsächlich durch Studien an großen Krankenhäusern/Universitätskliniken erhoben werden, ist von einem repräsentativen Vergleichskollektiv auszugehen. Eine generelle Übertragung der in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen, vor allem auf ältere AML-Patienten, wird jedoch erst nach bisher nicht in ausreichender Zahl erfolgter, eingehender Analysen dieser Patientengruppe möglich sein.

Für die Überlebenskurven der Kinder erfolgte ebenfalls die Analyse anhand des zytogenetischen Risikoscores, eine eindeutige Auftrennung der Überlebenskurven entsprechend des zytogenetischen Risikos war hier nicht nachzuweisen. Eine Erklärung hierfür ist in den insgesamt deutlich besseren Überlebensdaten von pädiatrischen AML-Patienten zu sehen, welche eine größere Stichprobenmenge und längere Verlaufsbeobachtungen zur Erlangung aussagekräftiger Überlebenskurven erfordern würden. Die hier beschriebenen Abweichungen/Auffälligkeiten sind für die in dieser Arbeit erfolgte Untersuchung einer prognostischen Bedeutung von Pin1 zunächst von untergeordneter Bedeutung, da die Analyse innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs erfolgte. Vor Übertragung der Ergebnisse zur Pin1-Expression auf die Gesamtheit aller kindlichen AML-Patienten sollte eine Überprüfung der hier dargestellten Ergebnisse anhand eines größeren Kollektivs erfolgen.

4.2.2 Pin1-Expression bei Gesunden

Bei insgesamt 6 Proben gesunder Probanden erfolgte die Untersuchung einer Pin1-Expression auf transkriptioneller Ebene mittels konventioneller RT-PCR im Vergleich

zu der Pin1-positiven AML-Zelllinie HL60 und der Pin1-negativen CML-Zelllinie in Blastenkrise K562. Es zeigte sich eine heterogene Expression von Pin1 mit insbesondere im peripheren Blut nachweisbarer Pin1-Expression. Im Knochenmark von 2 Probanden hingegen war lediglich eine schwache Pin1-Expression nachzuweisen.

Eine generelle Expression von Pin1 bei Gesunden verwundert nicht, diese wird in der Literatur wiederholt beschrieben (Ayala et al. 2003; Bao et al. 2004). Durch Zhu et al konnte 2004 in hämatopoetischen Zellen Gesunder eine generelle Pin1-Expression nachgewiesen werden, welche sich jedoch signifikant in der Höhe der Expression von jener in AML-Zelllinien (10fach höhere Expression in AML-Zelllinien) unterschied. Eine Pin1-Expression in Höhe der AML-Zelllinie HL60 wurde im Weiteren aufgrund der vorgenannten Publikation als Überexpression gewertet.

4.2.3 Analyse der Pin1-Expression auf RNA-Ebene

Bereits durch die weniger sensitive Nachweismethode der konventionellen PCR konnte sowohl in allen 3 untersuchten AML-Zelllinien HL60, NB4 und U937 eine hohe Pin1-Expresion als auch zu einem hohen Prozentsatz von 87% eine qualitative Pin1-Expression in hämatopoetischen Zellen von an AML erkrankten Patienten nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich kein signifikanter prozentualer Unterschied bezüglich einer Pin1-Positivität bei Kindern und Erwachsenen.

Aufgrund der vielfältigen Funktionen von Pin1 im Rahmen des Zellzyklus, wie beispielsweise der Regulation des Übergangs von der G0/1- in die S-Phase (Lu et al. 1996) oder der Centrosomen-Verdopplung während der S-Phase (Suizu et al. 2006) sowie des Nachweises eines mitotischen Arrests mit nachfolgendem Zelluntergang bei Pin1-Deletion oder Inhibition (REFs), ist eine basale Expressionsrate von Pin1 in allen menschlichen Zellen eine elementare Voraussetzung für deren regelhafte Proliferation.

Die zu einem hohen Prozentsatz beobachtete Pin1-Expression in der konventionellen PCR sowie in der qPCR in nahezu allen untersuchten Proben stellte somit per se noch keinen hinreichenden Nachweis einer aberranten Aktivität dar. Wie bereits durch Zhu et al. 2004 gezeigt werden konnte, findet sich jedoch bei AML-Zelllinien, unter anderen auch bei der im Rahmen dieser Dissertation als Positiv- bzw Vergleichskontrolle verwendeten Zelllinie HL60, eine mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR nachweisbare, circa 10fache Überexpression von Pin1 im Vergleich zu normalen Zellen der Hämatopoese.

Die zunächst erhobenen Ergebnisse der konventionellen PCR erbrachten ein unerwartetes und den bisherigen Publikationen zur prognostischen Bedeutung von Pin1 bei anderen Tumorerkrankungen widersprechendes Ergebnis, i.e. ein günstigeres Gesamtüberleben der erwachsenen AML-Patienten mit hoher Pin1-Expression in den leukämischen Blasten (siehe 3.2.1, Signifikanzniveau p=0,00489). Aufgrund der unter

4.1.2 angeführten Einschränkungen in der Auswertbarkeit quantitativer Expressionsanalysen per konventioneller PCR erfolgte die Untersuchung von einem noch verfügbaren Teil der Patientenproben (n=63) mittels quantitativer Realtime-PCR. Die so ermittelten Expressionsraten wurden in Beziehung zu der Pin1-positiven Kontrolle HL60 gesetzt. Patientenproben, welche eine höhere Expression als HL60 aufwiesen, wurden einer Pin1-hochexprimierenden Gruppe (n=18) zugeordnet, die restlichen fielen in die Gruppe der niedrig Pin1-Exprimierenden (n=45).

4.2.4 Prognostische Relevanz der Pin1-Expression bei AML-Patienten

Vorangegangene Publikationen, welche die negative prognostische Relevanz von Pin1-Überexpression bei Tumorerkrankungen nachwiesen oder zumindest eine mit Tumoren assoziierte Überexpression von Pin1 aufzeigten, führten zu der präanalytischen Hypothese einer negativen Assoziation von Pin1-Expressionshöhe und Verlaufsprognose von AML-Patienten. Die in dieser Arbeit eingesetzten Methoden der PCR-basierten Quantifizierung der Pin1-Expression erbrachten in der Analyse der prognostischen Bedeutung gegensätzliche Ergebnisse. Während die an 123 Proben gewonnen Daten mittels Quantifizierung konventioneller RT/PCR Hinweise auf eine günstigere Prognose der Patienten mit hoher Pin1-Expression ergaben, wies die Analyse an 63 Proben mit qRT/PCR auf eine eher günstige Bedeutung niedriger Pin1-Level hin. Als Erklärungen für diesen Wiederspruch sind anzuführen, dass die zu Anfang eingesetzte konventionelle PCR nicht den aktuellen Ansprüchen an eine adäquate Quantifizierung genügt. Die Ergebnisse und die Methodik der qRT/PCR können allerdings als Ausgangspunkt für weitere Analysen dienen. Aufgrund des begrenzten Probenumfangs muß der in dieser Auswertung dargestellte Hinweis auf eine günstige Prognose der Patienten mit niedriger Pin1-Expression noch als präliminär eingestuft werden. Um Verfälschungen durch eine zufällige Zusammensetzung der Untergruppen mit hohem bzw. niedrigem Pin1-Niveau durch andere biologische Parameter zu vermeiden, wird in weiterführenden Arbeiten eine deutlich umfangreichere Untersuchung, dann mit multifaktorieller Analyse auf Unabhängigkeit von schon etablierten Prognosefaktoren der AML durchzuführen sein.

In der hier vorliegenden Auswertung der qRT/PCR-Daten der beiden zuvor definierten Patientengruppen bestätigte sich in Bezug auf das Gesamtüberleben aller Patienten (n=63) der erwartete signifikant schlechtere Verlauf von Pin1-hochexprimierenden Patienten. Für das Ereignisfreie Überleben und die Subgruppenanalysen der Überlebenskurven nach Auftrennung in erwachsene und kindliche AML-Patienten konnte ein gleichsinniger Trend anhand des Kurvenverlaufs aufgezeigt werden, ein signifikantes Ergebnis wurde hierbei jedoch nicht gefunden. Erklärt wird dies durch eine verhältnismäßig kleine Stichprobenzahl, welche bei einem generell exprimierten Gen wie Pin1

und etwa zehnfach zu erwartender Überexpression (Zhu et al. 2004) für das Erreichen eines statistischen Signifikanzniveaus, insbesondere in den kleineren Untergruppen der Erwachsenen und Kinder, nicht ausreichte. Umso mehr Beachtung ist trotz der angeführten Einschränkungen der Bedeutung der negativen Prognose einer Pin1-Überexpression in Bezug auf das Gesamtüberleben zu schenken.

4.2.5 Pin1-Expression und andere prognostische Marker bei AML

Die Pin1-Expression des Patientenkollektivs korrelierte nicht mit der Zugehörigkeit zu einer zytogenetischen Risikogruppe, auch fand sich keine Assoziation mit anderen prognostischen Parametern (siehe Einleitung Punkt AML) bei AML. Das schlechtere Gesamtüberleben bei hoher Pin1-Expression scheint somit nicht nur ein Epiphänomen anderer prognostisch relevanter Parameter zu sein. Die zuvor genannten Einschränkungen aufgrund der Stichprobengröße lassen jedoch formal keine mathematisch verlässliche multivariate Analyse bezüglich einer Korrelation mit anderen prognostischen Markern zu, so dass auch hinsichtlich der vorgenannten Annahme die Bestätigung der Vermutung anhand einer größeren Stichprobenzahl mit anschließender multivariater Analyse zu fordern ist.

4.2.6 Nachweis von Pin1 auf Proteinebene

Sowohl mittels immunzytochemischer Färbung als auch mittels intrazytoplasmatischer Immunfluoreszenz-Färbung und Analyse per Durchflusszytophotometrie gelang der Nachweis von Pin1 auf Proteinebene. Aufgrund des nur vereinzelt ausreichenden kryokonservierten Patienten-Materials blieben direkte Vergleichsanalysen auf Einzelfälle beschränkt.

Eine hohe Expression von Pin1 auf transkriptioneller Ebene korrelierte mit einem hohen Protein-Gehalt von Pin1 in den leukämischen Blasten. Die Lokalisation von Pin1 beschränkte sich hierbei nicht auf den Nukleus als seine physiologische Lokalisation (Lu KP et al. 1996), sondern umfasste auch das Zytoplasma. Durch Wulf et al. (2001) und Ayala et al. (2003) wurde diese aberrante Lokalisation bei Mamma- respektive Prostata-Carcinomen beschrieben und mit einer Pin1-Überexpression assoziiert, welche direkt oder indirekt mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang gebracht werden konnte. Auch Bao et al. (2004) beschreiben eine auffallende, aberrante zytoplasmatische Lokalisation von Pin1 im Rahmen ihrer Vergleichsuntersuchungen von Tumoren und deren nicht-transformierten Ursprungsgeweben.

Die Ergebnisse der ergänzend durchgeführten Durchflusszytometrie stimmten mit denen der Immunzytochemie überein. Da sich unter den Proben keine mit ausschließli-

cher Lokalisation von Pin1 im Kern befand, bleibt die Frage der möglichen Diskrepanz der Ergebnisse (immunzytochemischer Nachweis von Pin1 im Karyoplasma, FACS-Analyse möglicherweise negativ, da doppelte Membranpermeabilität durch Fix&Perm unter Umständen nicht gewährleistet ist) in einem solchen Fall offen. In allen qPCR-Proben konnte eine Expression von Pin1 nachgewiesen werden. Somit besteht auch der Hinweis auf eine nukleären Expression von Pin1 unterhalb der Nachweisgrenze von konventioneller PCR, Immunzytochemie und FACS-Analyse.

Zur Etablierung der Durchflusszytofotometrie als Nachweismethode von Pin1 auf Proteinebene ist die bisher offene Frage nach der Sensitivität bezüglich einer nukleären Pin1-Expression zu klären. Diese könnte beispielsweise durch Western blot-Analysen des Proteins Pin1 nach vorangegangener subzellulärer Fraktionierung untersucht werden. Auch die simultane Untersuchung einer größeren Fallzahl von Proben mittels Zytochemie/Western blot und Durchlusszytofotometrie mit anschließender statistischer Korrelation der Ergebnisse ist zur Etablierung der Durchflusszytofotometrie im Verlauf erforderlich.

Die funktionelle Bedeutung der beschriebenen zytoplasmatischen Lokalisation von Pin1 in Tumorgeweben ist bisher ungeklärt. Möglicherweise könnte die teils stabilisierende Funktion von Pin1 auf seine Substrate bei dem Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau von Substraten von Bedeutung sein. Beschrieben wurden beispielsweise Stabilisierung und Schutz vor proteasomalem Abbau von Erb2 durch Interaktion mit Pin1 (Lam et al. 2008). Der reguläre Abbau von Erb2 konnte durch Pin1-Suppression wiederhergestellt und durch Hinzugabe eines Proteasomen-Inhibitors wieder aufgehoben werden, als Nachweis einer spezifisch durch Pin1-vermittelten Stabilisierung von Erb2.

4.3 Schlussfolgerungen

Bei AML-Zelllinien und im Knochenmark von AML-Patienten konnte eine hohe Pin1-Expression auf transkriptioneller und translationeller Ebene nachgewiesen werden. Für die Gesamtanalyse aller Patienten anhand der mittels quantitativer RT/PCR erhobenen Pin1-Expressionsraten konnte eine negative prognostische Bedeutung der Überexpression von Pin1 bezüglich des Gesamtüberlebens gezeigt werden. Nicht signifikante, aber auf eine schlechtere Prognose hindeutende Überlebenskurven zeigten auch das Ereignisfreie Überleben aller Patienten sowie die Subgruppenanalysen von OAS und EFS aufgetrennt nach Erwachsenen und Kindern. Diese Ergebnisse werden durch die Publikation von Zhu et al (2004) gestützt. Ein Pin1-Target bei AML ist bisher nicht identifiziert. Im Zusammenhang mit Pin1 wurden diverse Signalwege beschrieben, eine direkte Assoziation dieser Signalwege mit der Pathogenese oder der Progression der AML sind bis auf die FLT3-Mutation bisher nicht nachgewiesen worden. Pin1 könnte in diesen Signalweg eingreifen, aber ebenso über seine Funktion als Isomerase mit den Konsequenzen Aktivierung/Deaktivierung/Regulation der Degradation/Regulation der intrazellulären Lokalisation von Zielstrukturen über bisher nicht untersuchte Signalwege Einfluss nehmen. Die aberrante Expression von Pin1 im Zytoplasma der Leukämiezllen rückt zunächst zytoplasmatische Signalwege sowie eine Rolle von Pin1 bei der Ubiquitinierung von Zielstrukturen in den Vordergrund.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit ersten deskriptiven Beobachtungen erfordern im Verlauf zur Bestätigung simultane Analysen einer größeren Patienten-Fallzahl unter Hinzunahme multivariater statistischer Verfahren. Gleichermaßen sind funktionelle Untersuchungen zur Ermittlung der genauen Wirkmechanismen einer Pin1-Überexpression anzustreben, welche die beobachtete negative prognostische Bedeutung erklären.

5 Zusammenfassung

Die Peptidyl-Prolyl-Isomerase Pin1 hat durch ihre Funktion als Katalysator von Konformationsänderungen in Proteinen mit Aminosäuresequenzen des Typs phosphoSerin-Prolin oder phosphoThreonin-Prolin Einfluss auf Regulatoren des Zellzyklus, die für die Signaltransduktion in maligne transformierten Zellen von Bedeutung sein können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Pin1 in den blastären Zellen von erwachsenen und kindlichen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie auf Ebene der mRNA und des Proteins untersucht. Nach methodischem Vergleich der quantitativen RT/PCR-Analysen war in Bezug auf den klinischen Verlauf an einer Kohorte von 63 Patienten eine hohe Pin1-Expression signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. In der Subgruppenanalyse war die prognostisch ungünstige Bedeutung einer hohen Pin1-Expression jeweils auch als Tendenz in den Gruppen der erwachsenen und kindlichen Proben festzustellen. Die Expression auf mRNA-Ebene korrelierte mit dem Nachweis des Pin1-Proteins mittels Durchflusszytofotometrie und Immunzytologie. Während Pin1 in nicht maligne transformierten Zellen nukleär lokalisiert ist, befindet es sich in den myeloischen Blasten mit starker Expression im Zytoplasma. Die präliminären Daten zu einer Assoziation einer vermehrten Expression von Pin1 mit einer ungünstigen Prognose legen eine Untersuchung an einem größeren Patientenkollektiv nahe. Darüberhinaus sollten sich weitere funktionelle Analysen zu Signalwegen und Zielstrukturen von Pin1 anschließen, ferner eine Inhibition von Pin1 in probatorischen Laborversuchen mit dem Ziel der Wachstumshemmung der leukämischen Blasten erreicht werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abl	*Abelson*, Haushaltsgen
AML	Akute myeloische Leukämie
AML-BFM	AML-Berlin-Frankfurt-Münster Study Group
AMLCG	German AML Cooperative Group
AMLSG	AML Study Group
AP-1	*Activating protein 1* (Transkriptionsfaktor)
Aqua dest.	*Aqua destillata* (destilliertes Wasser)
AS	Aminosäure
ATRA	*All-trans retinoic acid* (All-Trans-Retinol-Säure)
Bcl-2	*B-cell lymphoma 2* (Eigenname), Apoptose-Regulator
BFU	*Burst forming unit*
Bp	Basenpaar
C	Kohlenstoff
C	Cytosin
CBFα	*Core binding factor alpha* (Eigenname), Transkriptionsfaktor
CD	*Cluster of Differentiation*
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CFU	*Colony forming unit* (koloniebildende Einheit)
c-Jun	*cellular ju-nana* (Eigenname), Protoonkogen
cm	Zentimeter
CR	*Complete remission* (komplette Remission)
Del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol

E	Extinktion
E2F	E2-Promotor Binding Factor (Transkriptionsfaktor)
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	*Event-free survival* (Ereignisfreies Überleben)
ETO	*Eight-twenty-one* (Transkriptioneller Korepessor)
FAB	French-American-British
FACS	*Fluorescence-activated cell sorter* (Durchflusszytometer)
FCS	*Fetal calf serum* (fetales Kälberserum)
FLT3	*FMS-like tyrosin kinase 3* (Eigenname)
FLT3-ITD	*FLT3-Internal Tandem Duplication* (FLT3-Tyrosinkinase-Mutation)
FSC	*Forward scatter*
g	Gramm
G	Guanin
G	Mittlere Erdschwerebeschleunigung
HL60	AML M2-Zelllinie (Eigenname)
IARC	International Agency for Research on Cancer
Inv	Inversion
JÜR	Jahresüberlebensrate
K	Kelvin
kB	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Knochenmark
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
µ	Mikro
m	Meter
M	Mol/Liter
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid

ml	Milliliter
MLL	*Mixed-lineage-Leukemia* (Gen)
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MRD	*Minimal residual disease* (Minimale Resterkrankung)
mRNA	Messenger-RNA
N.A.	*Not available* (nicht verfügbar)
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NB4	AML M3-Zelllinie, gewonnen aus Blut von Pat. N.B.
NF-kappaB	*Nuclear factor kappa B* (Transkriptionsfaktor)
NIH	National Institutes of Health
NIMA	*Never in mitosis gene* A
Nm	Nanometer
OAS	*Overall survival* (Gesamtüberleben)
PBS	*Phosphate buffered saline* (salzhaltiger Phosphatpuffer)
PCR	*Polymerase chain reaction* (Polymerasekettenreaktion)
Pin1	*Peptidyl-prolyl-isomerase NIMA-interacting 1* (Eigenname)
PML/RARα	*Promyelocytic Leukemia/Retinoic Acid Receptor alpha* (Fusionsgen)
PPIase	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
Pro	Prolin
qPCR	quantitative Realtime-PCR
Ras	*Rat Sarcoma* (Proto-Onkogen)
RNA	*Ribonucleic acid* (Ribonucleinsäure)
ROX	5-Carboxy-X-rhodamine (passiver Fluoreszenzmarker)
rpm	*Rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
Ser	Serin
SSC	*Side Scatter*
SWOG	South Western Oncology Group
SYBR Green	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1*H*-chinolin-4-ylidenmethyl}- 3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation (Fluoreszenzfarbstoff)

t(n;m)	Translokation (n;m)
T	Thymin
Taq	*Thermophilus aquaticus* (Eigenname)
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Thr	Threonin
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	*Units* (Einheiten)
U937	AML M4-Zelllinie (Eigenname)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs	versus
W	Tryptophan (Einbuchstabencode der Aminosäuren)
w/v	Gewicht/Volumen
WHO	World Health Organisation
Wnt	Wingless int-1 (Proto-Onkogen)
α-	Anti- (Kennzeichnung eines Antikörpers vor Nennung des Antigens)

7 Anhang: Tab. 6-8, Abb. 28

Tabelle 6: Zytogenetische Klassifikation der AML (Heilmeier et al. 2007, Seite 302)

Studiengruppe	Prognose günstig	Prognose intermediär	Prognose ungünstig
AMLCG	t(8;21), t(15;17), inv(16), t(16;16)	Normal, andere Aberration	-5/5q-, -7/7q-, inv(3), 11q23-Aberration, 12p-Aberration, 17p-Aberration, komplexe Aberrationen
CALGB	t(8;21), inv(16), t(16;16), del(16)	Normal	Andere Aberration
HD	t(8;21), t(15;17)	inv(16), 11q23-Aberration, andere Aberration	-5/5q-, -7/7q-, inv(3), 12p-Aberration, 17p-Aberration
Gale et al.	t(8;21), inv(16), t(16;16), del(16), t(15;17)	+8, +21, t(6;9), andere Aberration	t(9;22), -5, -7, del(11)
SWOG	t(8;21), inv(16), t(16;16), +14	Normal, andere Aberration	-5/5q-, -7/7q-, +13, inv(3), 11q23-Aberration, 17p-Aberration, 20q-, +13, dm, HSR, komplexe Aberrationen
EORTC	t(8;21), inv(16)		-5/5q-, -7/7q-, 11q23-Aberration, komplexe Aberrationen
MRC	t(8;21), t(15;17), inv(16)	Normal, 7q-, +8, 9q-, +21, +22, 11q23-Aberration, andere Aberration	-5/5q-, -7/7q-, 3q-Aberration, komplexe Aberrationen

Tabelle 7: FAB-Klassifikation der AML (Bennett et al. 1976; Bennett et al. 1985b; Krause 2000)

Klassifikation	Subtyp	Häufigkeit (%)	P	E	PAS	Zytogenetik
M0	undifferenziert	3	-	-	-	-
M1	AML ohne Ausreifung	20	+/-	+/-	-	-
M2	AML mit Ausreifung	25	+++	+	-	t(8;21)
M3	promyelozytär	10	+++	+	-	t(15;17)
M4	myelomonozytär	20	++	+++	+/-	t(16;16)
M5	monozytär	20	+/-	+++	+/-	t(9;11)
M6	Erythroleukämie	5	-	-	+/-	-
M7	megakaryoblastär	5	-	+/-	-	-

P = Peroxidase, E = unspezifische Esterase

Tabelle 8: WHO-Klassifikation der AML (Vardiman et al. 2002; Vardiman et al. 2009)

1. AML mit rekurrenten zytogenetischen Aberrationen
AML mit t(8;21)(q22;q22), AML1(CBFα)/ETO
Akute Promyelozytenleukämie [AML mit t(15;17)(q22;q11-12)/Varianten, PML/RARα]
AML mit abnormen KM-Eosinophilen [inv(16)(p13q22), t(16;16)(p13;q11), CBFβ/MYH11]
AML mit 11q23(MLL)-Aberrationen
2. AML mit multilineärer Dysplasie (Dysplasiezeichen in 50% der Zellen mindestens zweier myeloischer Zellreihen)
AML mit vorangegangenem MDS oder MPS
AML ohne vorangegangenes MDS oder MPS
3. AML und myelodysplastisches Syndrom, therapieassoziiert
Alkylanzienassoziiert / Radiotherapieassoziiert
Epipodophyllotoxinassoziiert (einige mögen lymphoid sein)
Andere Typen
4. AML ohne weitere Spezifizierung
Minimal differenzierte AML
AML ohne Reifung
AML mit Reifung
Akute myelomonozytäre Leukämie
Akute monozytäre Leukämie
Akute erythroide Leukämie
Akute megakaryozytäre Leukämie
Akute basophile Leukämie
Akute Panmyelose mit Myelofibrose

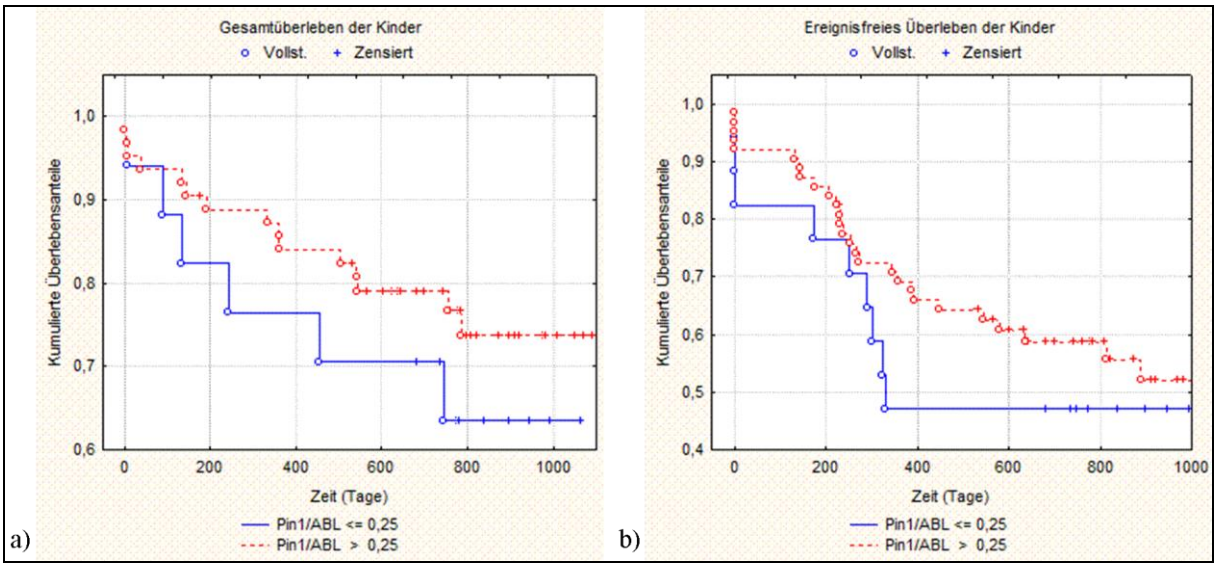

Abbildung 28: Konventionelle PCR: Überlebenskurven der Kinder in Abhängigkeit von Pin1-Expression, a) OAS, b) EFS

8 Literaturverzeichnis

1. ABI PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR System and SDS Enterprise Database User Guide, o.Verf., Applied Biosystems, Foster City 2004

2. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlader N, Tatalovich Z, Cho H et al.: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007; National Cancer Institute, Bethesda 2010, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/

3. Alvarez S, Cigudosa JC (2005): Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. Hematol Oncol 23, 18-25

4. Arber DA, Stein AS, Carter NH, Ikle D, Forman SJ, Slovak ML (2003): Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. Am J Clin Pathol 119, 672-680

5. Auerbach AD, Allen RG (1991): Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. Cancer Genet Cytogenet 51, 1-12

6. Austin H, Delzell E, Cole P (1988): Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. Am J Epidemiol 127, 419-439

7. Ayala G, Wang D, Wulf G, Frolov A, Li R, Sowadski J, Wheeler TM, Lu KP, Bao L (2003): The prolyl isomerase Pin1 is a novel prognostic marker in human prostate cancer. Cancer Res 63, 6244-6251

8. Baldus CD, Bullinger L (2008): Gene expression with prognostic implications in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. Semin Oncol 35, 356-364

9. Bao L, Kimzey A, Sauter G, Sowadski JM, Lu KP, Wang DG (2004): Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. Am J Pathol 164, 1727-1737

10. Basu A, Das M, Qanungo S, Fan XJ, DuBois G, Haldar S (2002): Proteasomal degradation of human peptidyl prolyl isomerase pin1-pointing phospho Bcl2 toward dephosphorylation. Neoplasia 4, 218-227

11. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 33, 451-458

12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1985a): Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med 103, 460-462

13. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1985b): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med 103, 620-625

14. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1991): Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). Br J Haematol 78, 325-329

15. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Biochemistry. 6.Auflage; W.H. Freeman and Company, New York 2007

16. Bland JM, Altman DG (1998): Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). BMJ 317, 1572

17. Blume-Jensen P, Hunter T (2001): Oncogenic kinase signalling. Nature 411, 355-365

18. Bonnet D, Dick JE (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 3, 730-737

19. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL et al. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 55, 611-622

20. Campbell HD, Webb GC, Fountain S, Young IG (1997): The human PIN1 peptidyl-prolyl cis/trans isomerase gene maps to human chromosome 19p13 and the closely related PIN1L gene to 1p31. Genomics 44, 157-162

21. Castoldi GL, Liso V, Fenu S, Vegna ML, Mandelli F (1993): Reproducibility of the morphological diagnostic criteria for acute myeloid leukemia: the GIMEMA group experience. Ann Hematol 66, 171-174

22. Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD, Brunning R, Gale RP, Grever MR, Keating MJ et al. (1990): Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 8, 813-819

23. Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162, 156-159

24. Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977): Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. Nature 270, 347-349

25. Cozzio A, Passegue E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL (2003): Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. Genes Dev 17, 3029-3035

26. Creutzig U, Reinhardt D: Akute myeloische Leukämien; in: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, 1.Auflage; hrsg. v. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J; Springer Verlag, Berlin 2006, 690-714

27. Daenen S, Vellenga E, van Dobbenburgh OA, Halie MR (1986): Retinoic acid as antileukemic therapy in a patient with acute promyelocytic leukemia and Aspergillus pneumonia. Blood 67, 559-561

28. Dalton WT, Jr., Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM (1988): HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. Blood 71, 242-247

29. de Lima M, Strom SS, Keating M, Kantarjian H, Pierce S, O'Brien S, Freireich E, Estey E (1997): Implications of potential cure in acute myelogenous leukemia: development of subsequent cancer and return to work. Blood 90, 4719-4724

30. Dimberg A, Nilsson K, Oberg F (2000): Phosphorylation-deficient Stat1 inhibits retinoic acid-induced differentiation and cell cycle arrest in U-937 monoblasts. Blood 96, 2870-2878

31. Doenecke D: Proteine und Peptide; in: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie; hrsg. v. Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2005, 23-47

32. Drexler HG (2005): Guide to Leukemia-Lymphoma Cell Lines. eBook CD

33. Duprez E, Ruchaud S, Houge G, Martin-Thouvenin V, Valensi F, Kastner P, Berger R, Lanotte M (1992): A retinoid acid 'resistant' t(15;17) acute promyelocytic leukemia cell line: isolation, morphological, immunological, and molecular features. Leukemia 6, 1281-1287

34. Dürig J, Nückel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J, Möröy T, Klein-Hitpass L, Dührsen U (2003): ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 17, 2426-2434

35. Eckerdt F, Yuan J, Saxena K, Martin B, Kappel S, Lindenau C, Kramer A, Naumann S, Daum S, Fischer G et al. (2005): Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation stabilizes Pin1 by inhibiting its ubiquitination in human cells. J Biol Chem 280, 36575-36583

36. Evans DI, Steward JK (1972): Down's syndrome and leukaemia. Lancet 1972, 2, 1322

37. Fey MF, Greil R, Jost LM (2005): ESMO Minimum Clinical Recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of acute myeloblastic leukemia (AML) in adult patients. Ann Oncol 16 Suppl 1, i48-i49

38. Fischer G, Bang H, Mech C (1984): [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. Biomed Biochim Acta 43, 1101-1111

39. Frassoni F: Acute Leukaemia; in: The EBMT Handbook 2004 Revised Edition. Haematopoietic Stem Cell Transplantation.; hrsg. v. Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T; European School of Haematology, Paris 2004, 238-249

40. Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL (2005): Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. J Clin Oncol 23, 6285-6295

41. Fuchs R: Akute myeloische Leukämie. Therapie - Forschung - Perspektiven. 1. Auflage; Uni-med Verlag, Bremen 2002

42. Fujimori F, Takahashi K, Uchida C, Uchida T (1999): Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. Biochem Biophys Res Commun 265, 658-663

43. Gaidzik V, Dohner K (2008): Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. Semin Oncol 35, 346-355

44. Grimwade D (2001): The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol 14, 497-529

45. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A et al. (1998): The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood 92, 2322-2333

46. Grimwade D, Moorman A, Hills R, Wheatley K, Walker H, Harrison G, Harrison C, Goldstone A, Burnett A (2004): Impact of karyotype on treatment outcome in acute myeloid leukemia. Ann Hematol 83 Suppl 1, S45-S48

47. Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. Cell 100, 57-70

48. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK (2007): Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. Oncologist 12, 20-37

49. Heilmeier B, Buske C, Spiekermann K, Bohlander S, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Braess J (2007): Diagnostics, classification and prognostic criteria of acute myeloid leukemia. Med Klin (Munich) 102, 296-308

50. Hiddemann W, Spiekermann K, Braess J, Feuring-Buske M, Buske C, Buchner T (2006): Risk-adapted therapy of acute myeloid leukemia. Internist (Berl) 47 Suppl 1, S33-S39

51. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Bio/Technology (NY) 11, 1026-1030

52. Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhoa L, Gu LJ, Wang ZY (1988): Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Blood 72, 567-572

53. Jabbour EJ, Estey E, Kantarjian HM (2006): Adult acute myeloid leukemia. Mayo Clin Proc 81, 247-260

54. Krause JR (2000): Morphology and classification of acute myeloid leukemias. Clin Lab Med 20, 1-16

55. Krivit W, Good RA (1957): Simultaneous occurrence of mongolism and leukemia; report of a nationwide survey. AMA J Dis Child 94, 289-293

56. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L et al. (2006): The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med 27, 95-125

57. Kuramochi J, Arai T, Ikeda S, Kumagai J, Uetake H, Sugihara K (2006): High Pin1 expression is associated with tumor progression in colorectal cancer. J Surg Oncol 94, 155-160

58. Lam PB, Burga LN, Wu BP, Hofstatter EW, Lu KP, Wulf GM (2008): Prolyl isomerase Pin1 is highly expressed in Her2-positive breast cancer and regulates erbB2 protein stability. Mol Cancer 7, 91

59. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R (1991): NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). Blood 77, 1080-1086

60. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994): A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature 367, 645-648

61. Levine EG, Bloomfield CD (1992): Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. Semin Oncol 19, 47-84

62. Liou YC, Ryo A, Huang HK, Lu PJ, Bronson R, Fujimori F, Uchida T, Hunter T, Lu KP (2002): Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 1335-1340

63. Lo CF, Diverio D, Pandolfi PP, Biondi A, Rossi V, Avvisati G, Rambaldi A, Arcese W, Petti MC, Meloni G (1992): Molecular evaluation of residual disease as a predictor of relapse in acute promyelocytic leukaemia. Lancet 340, 1437-1438

64. Löwenberg B, Zittoun R, Kerkhofs H, Jehn U, Abels J, Debusscher L, Cauchie C, Peetermans M, Solbu G, Suciu S (1989): On the value of intensive remission-induction chemotherapy in elderly patients of 65+ years with acute myeloid leukemia: a randomized phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group. J Clin Oncol 7, 1268-1274

65. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A (1999): Acute myeloid leukemia. N Engl J Med 341, 1051-1062

66. Lu KP, Hanes SD, Hunter T (1996): A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. Nature 380, 544-547

67. Lu KP, Liou YC, Zhou XZ (2002): Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. Trends Cell Biol 12, 164-172

68. Lu PJ, Zhou XZ, Liou YC, Noel JP, Lu KP (2002): Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. J Biol Chem 277, 2381-2384

69. Melchert M (2006): Managing acute myeloid leukemia in the elderly. Oncology (Williston Park) 20, 1674-1682

70. Miyashita H, Mori S, Motegi K, Fukumoto M, Uchida T (2003): Pin1 is overexpressed in oral squamous cell carcinoma and its levels correlate with cyclin D1 overexpression. Oncol Rep 10, 455-461

71. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD (2007): Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? Blood 109, 431-448

72. Mullis KB (1990): The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am 262, 56-5

73. Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51, I, 263-273

74. Naegeli O (1900): Über rothes Knochenmark und Myeloblasten. Dtsch Med Wochenschr 26, 287-290

75. Nakashima M, Meirmanov S, Naruke Y, Kondo H, Saenko V, Rogounovitch T, Shimizu-Yoshida Y, Takamura N, Namba H, Ito M et al. (2004): Cyclin D1 overexpression in thyroid tumours from a radio-contaminated area and its correlation with Pin1 and aberrant beta-catenin expression. J Pathol 202, 446-455

76. Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL (2003): Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci U S A 100 Suppl 1, 11842-11849

77. Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Larsen SO, Andersson M, Daugaard G, Ersboll J, Hansen SW, Hou-Jensen K, Nielsen D, Sigsgaard TC (1993): Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Cytogenetic characteristics of 115 consecutive cases and risk in seven cohorts of patients treated intensively for malignant diseases in the Copenhagen series. Leukemia 7, 1975-1986

78. Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29, e45

79. Rahfeld JU, Rucknagel KP, Schelbert B, Ludwig B, Hacker J, Mann K, Fischer G (1994): Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. FEBS Lett 352, 180-184

80. Ranganathan R, Lu KP, Hunter T, Noel JP (1997): Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. Cell 89, 875-886

81. Ryo A, Liou YC, Wulf G, Nakamura M, Lee SW, Lu KP (2002): PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells. Mol Cell Biol 22, 5281-5295

82. Ryo A, Nakamura M, Wulf G, Liou YC, Lu KP (2001): Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. Nat Cell Biol 3, 793-801

83. Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G, Rottapel R, Yamaoka S, Lu KP (2003): Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. Mol Cell 12, 1413-1426

84. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230, 1350-1354

85. San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Gonzalez M, Caballero D, Garcia-Marcos MA, Ramos F, Fernandez-Calvo J et al. (1997): Immunophenotyping investigation of minimal residual dis-

ease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. Blood 90, 2465-2470

86. Schmid FX (1993): Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. Annu Rev Biophys Biomol Struct 22, 123-142

87. Schmid FX, Mayr LM, Mucke M, Schonbrunner ER (1993): Prolyl isomerases: role in protein folding. Adv Protein Chem 44, 25-66

88. Schoch C, Haferlach T (2002): Cytogenetics in acute myeloid leukemia. Curr Oncol Rep 4, 390-397

89. Spandidos DA (2007): Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. J BUON 12 Suppl 1, S9-12

90. Stone RM (2002): The difficult problem of acute myeloid leukemia in the older adult. CA Cancer J Clin 52, 363-371

91. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA (2004): Acute myeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 1, 98-117

92. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF et al. (2002): Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 16899-16903

93. Suizu F, Ryo A, Wulf G, Lim J, Lu KP (2006): Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. Mol Cell Biol 26, 1463-1479

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

95. Taylor JM, Illmensee R, Summers J (1976): Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase. Biochim Biophys Acta 442, 324-330

96. Temin HM, Mizutani S (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 226, 1211-1213

97. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G (2006): Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). Blood 107, 4011-4020

98. Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR (2008): Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. Plant Cell 20, 1736-1737

99. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008): Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotechniques 44, 619-626

100. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002): The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood 100, 2292-2302

101. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A et al. (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 114, 937-951

102. Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Tamburini A, Cox C, Battaglia A, Catalano G, Del Moro B, Cudillo L et al. (2000): Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. Blood 96, 3948-3952

103. Verdecia MA, Bowman ME, Lu KP, Hunter T, Noel JP (2000): Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. Nat Struct Biol 7, 639-643

104. Vidriales MB, Orfao A, Lopez-Berges MC, Gonzalez M, Lopez-Macedo A, Garcia MA, Galende J, San Miguel JF (1995): Light scatter characteristics of blast cells in acute myeloid leukaemia: association with morphology and immunophenotype. J Clin Pathol 48, 456-462

105. Virchow R (1847): Weißes Blut (Leukämie). Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin 1, 563-572

106. Webb DK, Harrison G, Stevens RF, Gibson BG, Hann IM, Wheatley K (2001): Relationships between age at diagnosis, clinical features, and outcome of therapy in children treated in the Medical Research Council AML 10 and 12 trials for acute myeloid leukemia. Blood 98, 1714-1720

107. Willman CL, Fenoglio-Preiser CM (1987): Oncogenes, suppressor genes, and carcinogenesis. Hum Pathol 18, 895-902

108. Winkler KE, Swenson KI, Kornbluth S, Means AR (2000): Requirement of the prolyl isomerase Pin1 for the replication checkpoint. Science 287, 1644-1647

109. Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Petkova V, Lu KP (2001): Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. EMBO J 20, 3459-3472

110. Wulf GM, Garg P, Liou YC, Iglehart D, Lu KP (2004): Modeling breast cancer in vivo and ex vivo reveals an essential role of Pin1 in tumorigenesis. EMBO J 23, 3397-3407

111. Zhou XZ, Lu PJ, Wulf G, Lu KP (1999): Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism. Cell Mol Life Sci 56, 788-806

112. Zhu YY, Shi JM, Sun J, Lan JP, Lai XY, Li JY, Yu J, Tan YM, Lin MF, Huang H (2004): Expression of Pin1 in malignant hematopoietic cells and its relation with cell cycle. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 33, 500-3, 514

113. Ziegler A, Lange S, Bender R (2007a): Survival analysis: log rank test. Dtsch Med Wochenschr 132 Suppl 1, e39-e41

114. Ziegler A, Lange S, Bender R (2007b): Survival analysis: properties and Kaplan-Meier method. Dtsch Med Wochenschr 132 Suppl 1, e36-e38

Lebenslauf

Am 04. Februar 1978 wurde ich als Tochter von Charlotte Hangen, geb. Fichtner, und Jan Hangen in Mainz geboren. Die Schulausbildung schloss ich im Juni des Jahres 1997 am Staatlichen Gymnasium Mainz-Gonsenheim mit der Allgemeinen Hochschulreife ab.

Im Wintersemester 1997/1998 nahm ich an der Medizinischen Universität zu Lübeck das Studium der Humanmedizin auf. Nach Absolvierung der ärztlichen Vorprüfung im September 1999 wechselte ich an den Studienort Göttingen zur Fortsetzung des Medizinstudiums und paralleler Aufnahme des Mathematikstudiums (Diplom), welches ich bis einschließlich Sommersemster 2001 fortführte. Aufgrund zeitlich nicht zu koordinierender paralleler Studiengänge beendete ich das Mathematikstudium im Sommer 2001.

Ab 2004 beschäftigte ich mich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Wulf mit der Expression von Pin1 bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie.

Nach dem 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung absolvierte ich mein Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Göttingen in den Fächern Pädiatrie, Chirurgie und Innere Medizin. Am 21.11.2005 legte ich den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut, Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: gut) ab und erhielt daraufhin am 30.11.2005 die Approbation als Ärztin.

Seit dem 01.02.2006 arbeite ich als Assistenzärztin in der Abteilung Hämatologie und Onkologie des Zentrums Innere Medizin am Universitätsklinikum Göttingen.