

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin

(Department) Tübingen

Abteilung I

(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Die Proteinexpression des Wilms-Tumor-Gens 1 (WT1)
in akuten myeloischen Leukämiezelllinien
und akuten Leukämien des Kindesalters**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Nina Joanna Bergold

aus

Ludwigsburg

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H.-G. Rammensee

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungen und Synonyme	6
1 Einleitung	8
1.1 Proteinstruktur und -funktion von WT1	8
1.2 Expression und Rolle von WT1 bei Leukämien.....	11
1.3 WT1 als MRD-Marker und als prognostischer Marker	12
2 Zielsetzung und Aufgaben	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Geräte	17
3.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits	18
3.3 Antikörper und Farbstoffe.....	20
3.4 Verbrauchsmaterialien	20
3.5 Software.....	21
3.6 Patientenmaterial	22
3.7 Zelllinien und Zellkultur	22
3.7.1 Wachstumsbedingungen und Medien	23
3.7.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
3.8 PBMNC-Aufreinigung durch Dichtegradientenzentrifugation	24
3.9 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	24
3.10 Durchflusszytometrie	26
3.10.1 Intrazelluläre Färbung mit Mouse-anti-Human WT1 PE.....	27
3.10.2 Zellzyklusanalyse	28
3.10.3 Beurteilung der Lebensfähigkeit kultivierter Zelllinien mit Annexin V und Propidiumiodid	29
3.10.4 Analyse am FACS-Calibur	30
3.11 Western Blot	30
4 Ergebnisse	33
4.1 Bestimmung des intrazellulären WT1-Expressionsmusters der Leukämiezelllinien HL-60 und K562 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie.....	33
4.2 Durchflusszytometrische Untersuchung des WT1- Proteinexpressionsniveaus etablierter Leukämiezelllinien	35

Inhaltsverzeichnis

4.3	Durchflusszytometrische Untersuchung der WT1-Proteinexpression akuter kindlicher Leukämien.....	36
4.4	Bestimmung der Proteingröße mittels Western Blot	38
4.5	WT1-Proteinexpression in Leukämiezelllinien mit reduzierter Proliferationsrate.....	39
4.6	WT1-Proteinexpression von Leukämiezelllinien in Abhängigkeit vom Zellzyklus.....	41
5	Diskussion.....	44
5.1	Teil A: Niedriges WT1-Proteinexpressionsniveau bei kindlichen akuten Leukämien.....	44
5.1.1	Niedrigeres WT1-Proteinexpressionsniveau bei jüngeren Patienten.....	44
5.1.2	Gegenüberstellung von WT1-Proteinexpression und WT1-RNA-Expression bei kindlichen akuten Leukämien.....	45
5.1.3	Einfluss von WT1s auf die Bedeutung der mit dem WT1-Antikörper 6F-H2 ermittelten Ergebnisse	46
5.2	Teil B: Zellzyklusabhängige und -unabhängige WT1-Proteinexpression in den Zelllinien HL-60 und K562	47
5.2.1	Zellzyklusabhängige WT1-Proteinexpression	48
5.2.2	Zellzyklusunabhängige WT1-Proteinexpression	48
5.2.3	Relevanz der Ergebnisse dieser Arbeit für die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) und für die Rolle des WT1-Proteins als Target für eine Immuntherapie	49
6	Zusammenfassung	50
	Literaturverzeichnis	51
	Veröffentlichungen.....	59
	Danksagung.....	60

Abkürzungen und Synonyme

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AML FAB	Französisch-Amerikanisch-Britische Einteilung der akuten myeloischen Leukämie
APC	Allophycocyanin
BCG-CWS	Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton, Mykobakterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Zellwandgerüst
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCRF-CEM	Zelllinie einer akuten lymphoblastischen Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CTL	Tumorspezifischer CD8-positiver zytotoxischer T-Lymphozyt
Da	Dalton
dH2O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGR-1	Early Growth Response-1 protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting / Scanning
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter (Zellgröße in der Durchflusszytometrie)
HL-60	Zelllinie einer akuten Promyelozytenleukämie
HOS	Humane Osteosarkomzelllinie
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
K562	Zelllinie einer chronisch myeloblastischen Leukämie
KG-1a	Zelllinie einer promyeloblastischen Leukämie
KMT	Knochenmarktransplantation

Abkürzungen und Synonyme

MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MNC	Mononukleäre Zellen
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MRD	Minimal Residual Disease, Minimale Resterkrankung
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MWM	Molecular Weight Marker
PBMNC	Mononukleäre periphere Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBSA	Phosphate Buffered Saline, Albumin zugesetzt
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	(R)-Phycoerythrin
PFDF	Polyvinylidenfluorid-Transfer
PLB-985	Zelllinie einer akuten myeloischen Leukämie
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	am "Roswell Park Memorial Institute" entwickeltes Medium
RQ-PCR	quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE	Natriumdodecylamidelektrophorese
SSC	Side Scatter (Granuladichte in der Durchflusszytometrie)
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline mit Tween
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WAGR	Fehlbildungssyndrom mit Wilms Tumor, Aniridie, Anomalien im Genitalbereich, Retardierung
WT1	Wilms-Tumor-Gen 1

1 Einleitung

Das Wilms-Tumor-Gen 1 (WT1) liegt auf Chromosom 11 p13. Es wurde im Jahre 1989 zum ersten Mal kloniert und im Jahre 1990 sequenziert (6).

Bei Kindern mit erblichem Wilms Tumor, mit WAGR-Syndrom (Wilms' Tumor, Aniridie, Anomalien im Genitalbereich und geistige Behinderung) sowie mit Denys-Drash Syndrom sind Mutationen des WT1-Gens zu finden (31,70).

1.1 Proteinstruktur und -funktion von WT1

Das WT1-Gen besteht aus 10 Exons (siehe Abbildung 1). Durch zwei Splice-Stellen, die das gesamte Exon 5 und das 3'-Ende des Exon 9 beinhalten, entstehen vier unterschiedlich lange Transkripte (32).

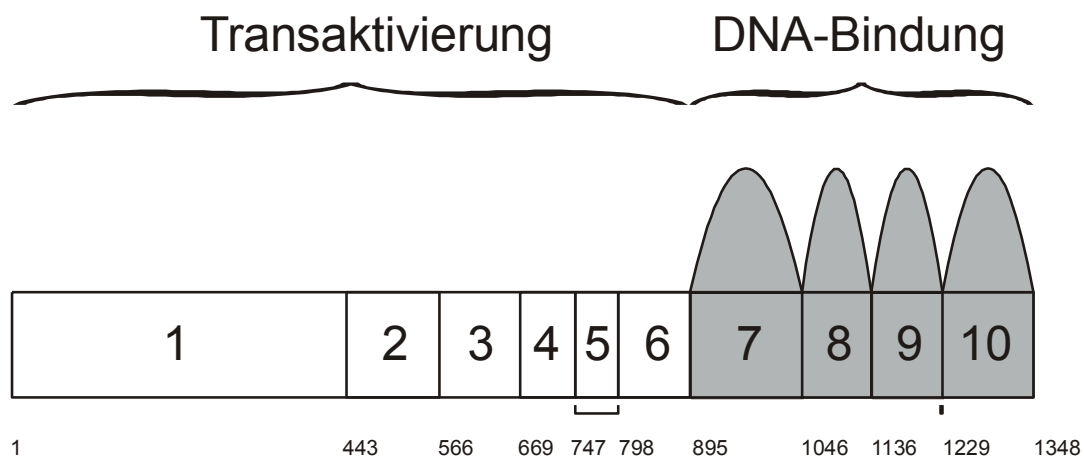


Abbildung 1

Schematische Struktur der kodierenden Sequenz der "full-length"-Isoform von WT1. Die großen Zahlen bezeichnen die 10 Exons des WT1-Gens, die kleinen Zahlen geben jeweils die Position der ersten Base des Exons an. Die Breite des Exons ist proportional zur Basenzahl. Die N-terminalen Aminosäuren, die durch die Exons 1-6 kodiert werden, sind an der Transaktivierung beteiligt, während die durch die Exons 7-10 kodierten Aminosäuren die vier Zink-Finger-Domänen bilden, die an der DNA-Bindung beteiligt sind. Die beiden Stellen für das RNA-Splicing, die sich auf genomischer Ebene in den Exons 5 und 9 befinden, sind durch Klammern gekennzeichnet.

Je nach Vorhandensein der zwei vom Splicing betroffenen Stellen haben die vier Hauptisoformen des WT1-Proteins ein Molekulargewicht von 52 bis 54 kDa (58,67,75). Insgesamt können durch weitere translationale Modifikationen wie mRNA-Editierung des Nukleotids an Position 839 und alternative Startcodons für die Transkription über 24 verschiedene Isoformen entstehen (72). Kürzlich wurde eine neue Isoform des WT1-Proteins gefunden, die an der N-terminalen Seite des Proteins verkürzt und nur 35-37 kDa groß ist (35).

Funktionell ist das WT1-Protein aus drei verschiedenen Hauptstrukturen aufgebaut; einer Zinkfingerdomäne am C-Terminus des Proteins, einer prolin- und glutaminreichen Domäne am N-Terminus, sowie einer »Leucinzipper«-Domäne im mittleren Bereich.

Die Zinkfingerdomäne besteht aus 4 Zinkfingern und ist aus antiparallelen β -Faltblättern, α -Helices und je zwei Cystin- und Histidinresten aufgebaut, welche ein Zinkkation umschließen (32). Abbildung 2 a) zeigt ein Beispiel für einen Zinkfinger. Mit Hilfe der Zinkfingerdomäne erkennt das WT1-Protein beispielsweise die DNA Sequenz 5'-GCGGGGCG-3' und bindet so an EGR-1 (»Early Growth Response-1« (68)), das in den Promotorregionen verschiedener Wachstumsfaktoren zu finden ist. Wird die Zinkfingerdomäne etwa durch eine Mutation zerstört, verliert das WT1-Protein seine Fähigkeit, dort zu binden (47). Außerdem bindet das WT1-Protein an die Promotorregion des eigenen Gens, was eine Herabregulierung der Expression zur Folge hat.

Die zweite bedeutende Domäne des WT1-Proteins ist die prolin- und glutaminreiche Region. Sie besteht aus vielen Wiederholungen von Prolin- und Glutaminresten, die am N-Terminus in den Exons 1, 2 und 3 kodiert sind. Es ist nicht genau bekannt, woran diese Domäne bindet, nur dass sie bei der Unterdrückung und Aktivierung von Promotoren eine wichtige Rolle spielt.

Die dritte zu erwähnende Domäne des WT1-Proteins ist der »Leucinzipper«. Es wird vermutet, dass diese auf Exon 4 bis 6 kodiert ist und bei Interaktionen mit

Proteinen eine Rolle spielen könnte (39). Abbildung 2 b) zeigt die Struktur einer »Leucinzipper«-Domäne.

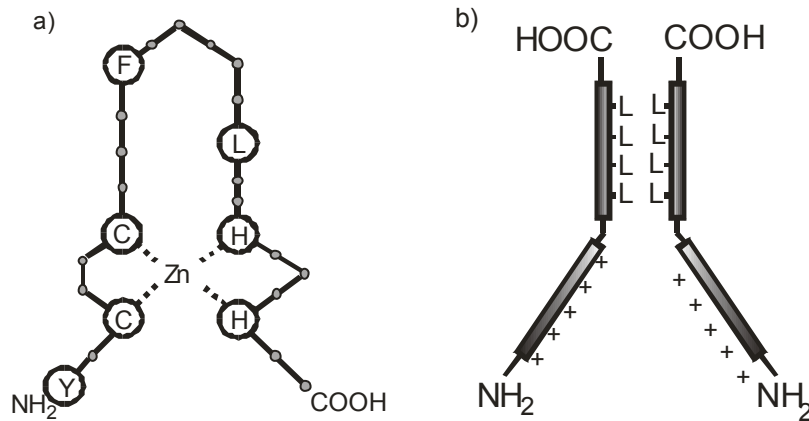


Abbildung 2

a) C₂H₂ Zinkfinger

b) »Leucinzipper«

(beides modifiziert nach Watson, J.D., *Recombinant DNA*, 2nd Edition. p.164)

Die Aufgabe des Proteins in der Zelle ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt.

Anfänglich wurde das WT1-Gen als Wilms-Tumor-Suppressor-Gen bezeichnet, da bei Patienten, die mit dem Wilms-Tumor erkrankt waren, eine Inaktivierung beider WT1-Allele nachgewiesen werden konnte. Zudem supprimiert WT1 die Transkription verschiedener Promotoren von Wachstumsfaktoren, unter anderem die Promotoren der »Insulin-like Growth Factors« I und II (IGF I und II) (22,82), des »Early Growth Response« (EGR-1) (68), des »Colony Stimulating Factor 1« (CSF-1) (33), des »Platelet Derived Factor-A« (PDGF-A) (30) oder des »Transforming Growth Factor-β1« (TGF-β1) (20). Dies ist auch davon abhängig, ob andere Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel p53, zugegen sind (22,33,50,81). Mittlerweile gibt es zahlreiche Hinweise, dass WT1 auch als Transkriptionsaktivator verschiedener Gene fungiert. Dies ist während der Embryogenese der Nieren und des Urogenitaltrakts der Fall (13,46,59). In der Entwicklung wird das Wilms-Tumor-Gen WT1 physiologisch unter anderem im Urogenitaltrakt, Nieren, Gonaden, Uterus, Gehirn und Milz exprimiert (1,6,66).

Darüber hinaus wird die Überexpression von WT1 mit einer malignen Transformation in Zusammenhang gebracht. Über 80% aller soliden Malignome zeigen eine Überexpression des WT1-Gens (darunter Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Melanom, Glioblastom, Medulloblastom und das Neuroblastom) (19,55,61-63). Anfang der 90er Jahre wurde erstmals die Überexpression des Gens in Leukämien beschrieben (56).

Da dem WT1-Genprodukt somit repressive als auch aktivierende Eigenschaften zugeschrieben werden, gilt es mittlerweile als bifunktionaler transkriptionsregulierender Faktor. Vermutlich übt hierbei jede der vier Hauptisoformen eine spezifische Funktion aus, was die Komplexität der Wirkungen von WT1 erklären könnte (19,32,72).

1.2 Expression und Rolle von WT1 bei Leukämien

Bei hämatologischen Neoplasien wurde eine Überexpression von WT1-RNA bei akuten lymphatischen wie myeloischen Leukämien und der chronisch myeloischen Leukämie in der akzelerierten Phase bzw. in der Blastenkrise (38,56,57) sowie dem myelodysplastischen Syndrom (10-12,80) beschrieben. Bei den akuten lymphatischen Leukämien waren in etwa 20-80% der Fälle, bei den akuten myeloischen Leukämien in etwa 40-90% der Fälle WT1-Transkripte mit Hilfe der RT-PCR nachweisbar (36,38,53,56,57).

Welche onkogenetische Relevanz WT1 bei Leukämien im Gegensatz zu der früheren These des Tumorsuppressorgens besitzt, ist derzeit ungeklärt. Für eine onkogene Wirkung sprechen die bei soliden Tumoren und Leukämien vorkommende Überexpression des WT1-Gens, die auch im Falle des Wilms-Tumors selbst beschrieben ist (48), sowie Experimente mit WT1-Antisense-Oligonucleotiden, die zu einer Wachstumshemmung führten (85). Auch die Beobachtung, dass die Transfektion der leukämischen Zelllinie U937 mit WT1 Differenzierungsprozesse beeinträchtigte (74), wohingegen eine gesteigerte WT1-Expression durch den »Leukemia Inhibitory Factor« in M1-Zellen eine

Differenzierung induzierte (73), legt eine Rolle des WT1-Gens bei der Entstehung von Leukämien nahe.

Die Überexpression des WT1-Gens in malignen Zellen kann aber auch durch den unreifen Zustand dieser Zellen erklärt werden (48). Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass WT1-RNA auch in CD34⁺-Vorläuferzellen des gesunden Knochenmarks exprimiert wird (2), in einzelnen Zellen sogar ebenso stark wie in der leukämischen Zelllinie K562 (34). Unter in vitro-Bedingungen wird die WT1-RNA bereits in einem frühen Stadium der Differenzierung herunterreguliert (52).

Die begrenzte Anzahl von Geweben, in denen das WT1-Gen nach der Embryonalzeit physiologischerweise exprimiert wird, macht es für die Diagnostik und die Therapie von Tumoren besonders interessant. Allerdings ist der Stellenwert von WT1 bei der Tumordiagnostik und -therapie derzeit noch nicht vollständig geklärt.

1.3 WT1 als MRD-Marker und als prognostischer Marker

Die komplette hämatologische Remission war traditionell durch weniger als 5% Blasten im Knochenmark im lichtmikroskopischen Bild definiert. Ein Blastenanteil im Knochenmark unterhalb dieser lichtmikroskopischen Nachweisgrenze wird als MRD (»Minimal Residual Disease«; minimale Resterkrankung) bezeichnet. Die frühzeitige Entdeckung einer solchen minimalen Resterkrankung kann die Prognose des Patienten positiv beeinflussen, da man so die Möglichkeit hat, früher therapeutisch einzugreifen.

Die bisherige Detektion der MRD mittels PCR bei Leukämien basiert auf der Amplifikation von bestimmten tumor- oder patientenspezifischen DNA-Markern, beispielsweise rekombinanten Immunglobulin-, T-Zellrezeptor- oder Fusionsgenen wie bcr-abl, PML/RAR- α und AML1/-ETO. Mit diesen Markern ist ein MRD-Nachweis bei etwa 80% der Patienten mit einer akuten lymphatischen

Leukämie, jedoch nur bei 20 - 30% der Patienten mit einer AML oder einer CML möglich.

WT1 erscheint aufgrund der häufigen Überexpression bei verschiedenen Leukämieformen (ALL, AML, CML) und dem MDS als ein interessanter Marker zur Detektion der MRD (55). Die Verwendung von WT1 als MRD-Marker könnte den Anteil der Patienten weiter erhöhen, bei dem ein MRD-Nachweis möglich ist.

Einige Arbeitsgruppen untersuchten die WT1-RNA-Expression verschiedener Leukämieformen mittels »real-time« (RT)-PCR auf ihre Eignung als MRD-Marker und prognostischer Marker (4,12,25,26,36,38,43,54,57,76).

In einigen Studien wurde eine Korrelation der WT1-RNA-Expression mit dem klinischen Verlauf der Erkrankungen bzw. mit der Expression von weiteren MRD-Markern beschrieben (10,43,60,76). Besonders nach KMT bzw. Stammzelltransplantation wurden bereits vor Auftreten eines klinisch manifesten Rezidivs hohe WT1-RNA-Expressionen festgestellt (43,60). Die Höhe der WT1-Expression zum Zeitpunkt der Diagnosestellung scheint zudem eine prognostische Relevanz bei der kindlichen AML zu haben (76). In einer Studie wurde bei Kindern mit ALL gezeigt, dass sowohl sehr hohe als auch sehr niedrige WT1-RNA-Expressionen ein Zeichen für ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv sein können (3). Die Eignung von WT1 zur MRD-Bestimmung per RT-PCR wird allerdings kontrovers beurteilt: Einige Studien sprechen für eine Eignung (43,65), andere dagegen (3,79).

Zurzeit wird an prospektiven klinischen Studien gearbeitet, die den Verlauf der WT1-RNA-Expression sowie den Effekt einer nach der WT1-RNA-Expression gerichteten Therapie untersuchen.

Problematisch ist, dass vor allem in früheren Studien kein einheitliches Protokoll der quantitativen RT-PCR zur Anwendung in klinischen Studien existierte. Die

PCR-basierten Methoden zur Detektion von Blasten auf DNA-Ebene detektierten je nach Protokoll eine Blastenzelle in 10^{-3} bis 10^{-6} gesunden Zellen, zudem wurden oftmals verschiedene Positivkontrollen verwendet. Somit könnten für die teils widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Studien die methodischen Unterschiede verantwortlich sein.

Ein Problem bei der Verwendung von WT1-RNA zur MRD-Diagnostik entsteht aus der Tatsache, dass Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen zwischen einer und über hundert mRNA-Kopien eines Gens produzieren können. Dies macht die Bestimmung der eigentlichen Blastenzahl aus dem mRNA-Gehalt einer aus mehreren Zellen bestehenden Probe unmöglich.

Ein weiterer Störfaktor für die MRD-Diagnostik auf RNA-Ebene sind die physiologisch vorkommenden, WT1-exprimierenden Vorläuferzellen im Knochenmark, da sie bei Verwendung der RT-PCR nicht von Blastenzellen zu unterscheiden sind und daher die Sensitivität erniedrigen (34,52).

Aufgrund von Letzterem wurde postuliert, dass sich peripheres Blut besser zur Detektion der WT1-RNA-Expression und somit von Tumorzellen eignet, da hier die physiologische Expression von WT1 niedriger ist (37). Da jedoch bei B-Zell-Leukämien die MRD-Last im Knochenmark um bis zu 10mal höher ist als im Peripherblut, erscheint es als wahrscheinlich, dass dies auch bei myeloischen Leukämien zu einer Unterschätzung der Tumorlast führt (5,17,51).

Bisher wurde der Nachweis der WT1-Expression ausschließlich auf RNA-Ebene oder mittels Immunhistochemie auf Proteinebene geführt (53).

Die Mehrfarbendurchflusszytometrie wurde bisher nicht zum Nachweis einer WT1-Proteinexpression verwendet, obwohl diese Methode bereits in mehreren großen Studien zur MRD-Bestimmung bei akuten lymphatischen und myeloischen Leukämien eingesetzt und validiert worden ist. Die Sensitivität lag

in diesen Studien bei 10^{-4} bei akuten lymphatischen Leukämien, bei 10^{-3} bis 10^{-4} bei akuten myeloischen Leukämien (7,8,14-17,23,71).

Aufgrund der vorliegenden Daten wurde postuliert, dass eine durchflusszytometrische Bestimmung der WT1-Expression möglich ist und dass mit dieser Methodik das WT1-Protein in akuten Leukämien des Kindesalters nachzuweisen ist. Da per Mehrfarbendurchflusszytometrie zwischen ALL- bzw. AML-Blasten und normalen Knochenmarkzellen in einem sehr hohen Patientenanteil unterschieden werden kann, sollte die Verwendung von WT1 als neuer durchflusszytometrischer Marker zu einer weiteren Verbesserung dieser Methodik bei der MRD-Bestimmung führen.

2 Zielsetzung und Aufgaben

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob das WT1-Protein durchflusszytometrisch detektiert werden kann und ob der WT1-Nachweis für die MRD-Bestimmung per Durchflusszytometrie bei akuten Leukämien des Kindesalters genutzt werden kann. Da WT1 eine Rolle bei der Zellhomöostase spielt und daher selbst Regulationsmechanismen unterworfen sein könnte, sollte außerdem untersucht werden, ob das WT1-Protein stabil exprimiert wird und gegebenenfalls welche Einflussfaktoren die variable WT1-Proteinexpression bestimmen.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Produkt/Typ	Bezugsquelle
Classic E.O.S. Filmentwicklungsmaschine	MDS Nordion, Fleurus, Belgien
Begasungsbrutschrank Heraeus Hera cell	Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart
Durchflusszytometer FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX60	Olympus Co. GmbH, Hamburg
Milli-Q biocel, Wasserdestillationssystem zur Herstellung von Aqua bidest.	Millipore, Schwalbach
Mikroskop Olympus IX50	Olympus Co. GmbH, Hamburg
Pinzette	Braun, Tuttlingen
Pipetting Aid	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipetman® 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson, Middleton, WI, USA
pH-Meter MultiCal© mit Sen Tix Plus Messkette	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Schere	Braun, Tuttlingen
Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel
Schüttler Heidolph Polymax1040	Heidolph, Schwabach
Semi Dry Transfer Cell, Trans-Blot	Bio-RAD, München
Sterile Werkbank, HERAsafe	Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart
Vario MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Vortexer, Reax top	Heidolph, Nürnberg
Waage Sartorius BP 121 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad, beheizbar	Memmet, Schwabach
X-cell Surelock II Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zellzählgerät COBAS MICROS	Roche Diagnostics, Mannheim
Zellzählgerät ADVIA 120	Bayer AG, Leverkusen

Produkt/Typ	Bezugsquelle
Zentrifuge Mikro 22R (Eppendorf-Gefäße)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zytospin Zentrifuge	Shandon, Pittsburgh, PA, USA

3.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Produkt/Typ	Bezugsquelle
10% Bis-Tris-Gel	Invitrogen, Carlsbad, CA
10 x DPBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Gibco, BRL, Paisley, Großbritannien
8E (Permeabilisierungslösung)	Von der Arbeitsgruppe Coustan-Smith, USA freundlicherweise zur Verfügung gestellt; Publikation in Arbeit
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche, Penzberg
Biocoll Separating Solution Dichte 1,077 g/ml	Biochrom, Berlin
BSA, Fraktion V, mind. 98%, proteasefrei	Sigma-Aldrich, München
CAPS	Sigma-Aldrich, München
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA, Dinatriumsalz, Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Essigsäure p. a.	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
FACS Flow®	Becton Dickinson, Heidelberg
FCS (Fetal Calf Serum)	Biochrom, Berlin
Formaldehyd Lösung 37%	Universitätsapotheke, Tübingen
Glycerol Molecular Biology Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin, Canusal	CP Pharmaceuticals LTD, England
Hepes (1 M)	Biochrom, Berlin
Humanes Serum Albumin	Canteon Pharma GmbH, Marburg; jetzt Aventis Behring
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Loading Buffer (4 x)	Invitrogen, Carlsbad, CA

Material und Methoden

Produkt/Typ	Bezugsquelle
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA
Moviol® 4-88	Calbiochem, Bad Soden
NaOH (1 M)	Merck, Darmstadt
Natriumazidlösung 10% in 10 x DPBS	Apotheke Uniklinik Tübingen
Na-SDS, Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
N-Propyl-Gallate	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien oder Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10 000 IE /10 000 µg/ml)	Biochrom, Berlin
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	BD Pharmingen, San Jose, CA
PI/RNase Staining Buffer	BD Pharmingen, San Jose, CA
Rainbow Colored Molecular Weight Marker (Rainbow marker)	Amersham, Freiburg
RPMI 1640 (VLE) mit Phenolrot	Biochrom, Berlin
Salzsäure 1 M	Merck, Darmstadt
Super Signal West Pico Luminol Enhancer Solution	Pierce, Rockford, IL, USA
Super Signal West Pico Stable Peroxidase Solution	Pierce, Rockford, IL, USA
Tris-Base	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Roth, Karlsruhe

3.3 Antikörper und Farbstoffe

Produkt/Typ	Bezugsquelle
Alexa Fluor® 488 Goat-anti-Mouse IgG	Molecular Probes, Eugene, OR
Anti-Mouse IgG1 FITC Klon: DAK-GO1	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Mouse-anti-Human WT1 Klon: 6F-H2	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Mouse-anti-Human WT1 PE	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Rat-anti-Mouse IgG1 PE Klon: X56	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA

Die Antikörper Mouse-anti-Human WT1; Mouse-anti-Human WT1 PE und Alexa Fluor 488 Goat-anti-Mouse IgG werden der Einfachheit halber im Folgenden anti-WT1; anti-WT1 PE und Alexa Fluor® 488 genannt.

3.4 Verbrauchsmaterialien

Produkt/Typ	Bezugsquelle
Blottingpapiere MN 827B	Machery-Nagel, Düren
Deckgläschen, rund, 20 mm	Roth, Karlsruhe
Einfrierröhrchen (Cryogenic vials) 1,2 ml	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Eppendorfröhrchen Safe-Lock; 0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Röhrchen; 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Kanüle 21G (Sterican)	Braun, Melsungen
Kodak X-omat AR Film	Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA
Objektträger 76 x 26 cm	Roth, Karlsruhe
Parafilm®	Alcan Packaging, Neenah, WI; USA
Petrischalen, verschiedene Größen	Roth, Karlsruhe

Produkt/Typ	Bezugsquelle
Pipetten (Costar) 1, 5, 10, 25 ml	Corning Incorporated, Wiesbaden
Pipettenspitzen 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Polyvinylidenfluorid-Transfermembran (Hybond-P), PVDF-Membran	Amersham, Freiburg
Rundbodenröhrchen für FACS 5 ml, Polystyrol	BD Bioscience, Discovery Labware, Bedford, MA, USA
Shandon „filter cards“, Filterpapiere	Shandon, Pittsburgh, USA
Zellkulturflaschen; 162 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ²	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

3.5 Software

Es wurden folgende Textverarbeitungs- und Grafikprogramme verwendet:

Produkt	Bezugsquelle
Microsoft Word	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Excel	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Origin 6.1	OriginLab; Northampton; MA, USA
Corel Draw Version 8	Corel; Ottawa, Ontario, Canada
CELLQuest 3.3 (MAC)	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
ModFit 2.0 (MAC)	BD Biosciences; San Jose, CA, USA
Reference Manager Professional edition Version 10	Thompson ResearchSoft; Carlsbad, CA, USA

3.6 Patientenmaterial

Nach Genehmigung der Studie von der lokalen Ethikkommission und Zustimmung der Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten entsprechend der Deklaration von Helsinki wurden kryokonservierte leukämische Blasten aus Peripherblut und aus dem Knochenmark von 40 Patienten der Universitätskinderklinik Tübingen verwendet.

3.7 Zelllinien und Zellkultur

Es wurden folgende humane myeloische Leukämiezelllinien untersucht:

K562, Zellen einer chronisch myeloischen Leukämie (42,49)

HL-60, Zellen einer akuten Promyelozytenleukämie (27)

KG1a, Zellen einer promyeloblastischen Leukämie (44)

PLB-985, Zellen einer akuten myeloischen Leukämie (77)

Die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gernot Bruchelt (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen) stellte diese Zelllinien freundlicherweise zur Verfügung.

Es wurde folgende humane lymphatische Leukämie-Zelllinie untersucht:

CCRF-CEM Zellen einer akuten lymphoblastischen Leukämie (24)

Diese Zelllinie wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Ingo Müller (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.7.1 Wachstumsbedingungen und Medien

Die K562 Zellen und die HL-60 Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% (0,5%; 0,1%; 0%) hitzeinaktiviertem FCS nach Zugabe von 2 mM Glutamin und 100 g/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Zellkulturprotokoll 1: »Optimale« Nährstoffbedingungen

Unter »optimalen« Nährstoffbedingungen wurden die Zellen bei 0,2 bis 0,5 x 10³ µl⁻¹ (K562) und 0,5 bis 0,8 x 10³ µl⁻¹ (HL-60) in Medium mit 10 % FCS ausgesät. Die Kulturen wurden abhängig von der Proliferationsrate jeden Tag bzw. jeden zweiten Tag gesplittet und erhielten frisches Medium, um die Zelldichte der Kulturen und das Nährstoffangebot in einem für das Wachstum der Zellen optimalen Bereich zu halten.

Zellkulturprotokoll 2: »Herabgesetzte« Nährstoffbedingungen durch Vorenthaltung frischen Mediums

Die Zellen wurden bei 0,2 x 10³ µl⁻¹ (K562) und bei 0,5 x 10³ µl⁻¹ (HL-60) ausgesät und bis zu 5 Tage in Medium mit 10% FCS inkubiert. Es wurde kein neues Medium hinzugefügt und die Kulturen wurden nicht geteilt, um durch den entstehenden Nährstoffmangel einen Wachstumsrückgang zu erzielen.

Zellkulturprotokoll 3: »Herabgesetzte« Nährstoffbedingungen durch FCS-Reduktion

Der FCS-Gehalt des Mediums wurde bei 0,5 bzw. 0,1 bzw. 0% FCS angesetzt. Die Zellen wurden zunächst in dem jeweiligen FCS-reduzierten Medium gewaschen und ausgesät bei 0,2 x 10³ µl⁻¹ (K562) und bei 0,5 x 10³ µl⁻¹ (HL-60). Es wurde im Verlauf je nach Proliferationsrate jeden Tag bzw. jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt, um den pH-Wert in der Kultur konstant zu halten und so eine Beeinflussung des Ergebnisses durch den pH-Wert zu vermeiden.

3.7.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen bei 450 g für 10 min abzentrifugiert und anschließend in 1 ml Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Sie wurden bei -80°C eingefroren und für ca. 5 Tage bei -80°C aufbewahrt, bis sie in den Stickstofftank eingelagert wurden.

Die Zellen wurden aufgetaut, indem sie bei 37°C im Wasserbad geschwenkt und danach sofort in 10 ml auf 37°C erwärmtes Medium in einem Falcon-Röhrchen gegeben wurden. Sie wurden anschließend mit 450 g für 5 min abzentrifugiert, nochmals mit Medium gewaschen und danach, wie unter 3.7.1 beschrieben, kultiviert.

3.8 PBMNC-Aufreinigung durch Dichtegradientenzentrifugation

Es wurden 4 ml Ficoll in 15 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt und mit 6 ml einer Verdünnung aus heparinisierem Vollblut von gesunden freiwilligen Spendern und PBS zu gleichen Teilen überschichtet. Die Röhrchen wurden danach für 30 min bei 400 g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Aus der Interphase wurden anschließend die PBMNC mittels Einwegpipette vorsichtig abgesaugt und in neue Falcon-Röhrchen überführt. Diese wurden mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und bei 450 g für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Pellets wurden danach vereinigt und nochmals mit 15 ml PBS gewaschen.

3.9 Immunfluoreszenzmikroskopie

Es wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder von mit WT1 und Propidiumiodid gefärbten Leukämiezelllinien HL-60, K562, CCRF-CEM, KG-1a sowie PLB 985 aufgenommen. Als Negativkontrolle dienten PBMNCs, die mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation (siehe 3.8) aus peripherem Blut von gesunden

freiwilligen Spendern gewonnen wurden, sowie allein mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor[®] 488) gefärbte Präparate.

Vorbereiten und Färben der Zellen:

Pro Präparat wurden ca. 50.000 Zellen benötigt. Diese wurden aus dem Medium genommen bzw. mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, in einem 15 ml Falcon-Röhrchen einmal mit PBS gewaschen, gezählt und so resuspendiert, dass eine Suspension von 500.000 Zellen pro ml PBS entstand. Daraufhin wurden je 100 µl der Suspension mittels Zytospin (800 g, 10 min bei Raumtemperatur) auf Deckgläschen verbracht. Die Präparate wurden nun in Petrischalen überführt, einmal mit PBS gespült und anschließend mit je ca. 20 µl 3%iger Formaldehydlösung (37%ige Lösung, mit PBS verdünnt) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Mittels einer modifizierten Absaugpipette wurde nach Ablauf der Fixationszeit das Formaldehyd abgesaugt und danach zweimal mit PBS gewaschen, wobei die Präparate stets feucht gehalten wurden.

Um die Zellmembran für die intrazelluläre Färbung mit dem Antikörper zu perforieren, wurden die Präparate sodann in insgesamt ca. 25 µl 1% Triton X in PBS für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen des Triton X folgten erneut drei Waschschrte mit PBS.

Zur Inkubation mit dem Primärantikörper *Mouse-anti-Human* WT1, Klon 6F-H2 wurde Parafilm auf der Arbeitsfläche befestigt und anschließend 30 µl der Antikörperlösung darauf pipettiert. Der Primärantikörper wurde hierbei in einer Verdünnung von 1:100 bei Einfachfärbung und 1:50 bei Zweifachfärbung vorbereitet und je nachdem wurden 30 µl (Einfachfärbung) bzw. 15 µl (Zweifachfärbung) pro Deckgläschen auf den Parafilm aufgetragen. Die benötigten Verdünnungen waren zuvor durch Titrationsversuche festgelegt worden. Die Präparate wurden nun mit einer Pinzette aus dem PBS entnommen und mit der zellenbesetzten Seite nach unten in die Antikörperlösung gelegt, wo sie für 30 min bei Raumtemperatur verblieben.

Mittels einer Pasteurpipette und PBS wurden die Präparate nach Ablauf der Inkubationszeit vom Parafilm gelöst und in einzelne Petrischalen überführt. Es folgte ein Waschgang eines jeden Präparats mit je zehn mal ca. 8 ml PBS. Bei Verwendung eines Sekundärantikörpers wurde der Parafilm nun dreimal mit PBS gesäubert und diente danach erneut als Auftragsfläche.

Als Sekundärantikörper wurden Alexa Fluor[®] 488 Ziege-anti-Maus-IgG sowie Propidiumiodid zur DNA-Färbung in einer Verdünnung von üblicherweise 1:300 (bei Zweifachfärbung je 1:150) und einem Volumen von 30 µl (bei Zweifachfärbung je 15 µl) verwendet. Die benötigten Verdünnungen waren zuvor durch Titrationsversuche festgelegt worden. Die Inkubationszeit betrug hier 10 min bei Raumtemperatur.

Wieder wurden die Präparate 10mal in ca. 8 ml PBS gewaschen, bevor sie mit der zellenbesetzten Seite nach unten auf mit 10 bis 15 µl Moviollösung betroffene Objektträger aufgebracht wurden. Die Präparate trockneten nun für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln, dann wurden sie zum endgültigen Austrocknen für mindestens eine Nacht bei 4°C gelagert.

Fotografieren der Präparate mit dem Fluoreszenzmikroskop:

Es wurde das Olympus BX60 Fluoreszenzmikroskop verwendet. Von jedem Fluoreszenzkanal wurden digitale Fotografien erstellt. Je nach Intensität der Fluoreszenz wurden Belichtungszeiten von 100 Millisekunden bis zu ca. 20 Sekunden benötigt.

3.10 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse ist eine Methode zur Klassifizierung einzelner Zellen, mittels derer man Zellgröße (FSC), Granuladichte (SSC) und die Intensität der Fluoreszenz markierter Antikörper messen kann.

Es wurden Blasten akuter lymphatischer und akuter myeloischer Leukämien, sowie die Leukämiezelllinien HL-60, K562, CCRF-CEM, KG-1a und PLB 985 auf ihre WT1-Proteinexpression hin untersucht. Gegebenenfalls wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt, je nach Versuchsaufbau im gleichen oder einem parallelen Ansatz. Eine typische Zellzyklusanalyse ist in Abbildung 3 auf Seite 29 dargestellt. In Versuchen mit Annexin V und Propidiumiodid wurde die Vitalität der Zelllinien untersucht.

Zur Bestimmung der optimalen Färbebedingungen wurde die benötigte Antikörperkonzentration in vorgeschalteten Versuchen anhand von PBMNCs als Negativkontrolle titriert.

3.10.1 Intrazelluläre Färbung mit Mouse-anti-Human WT1 PE

Hierzu wurden die Blasten aus dem Stickstoff genommen, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und einmal in 15 ml Medium gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen gezählt, in FACS-Röhrchen überführt und zweimal mit je 3 ml PBSA gewaschen.

Aus den Zellkulturen wurden üblicherweise eine Million Zellen pro Röhrchen entnommen, zweimal mit je drei ml PBSA gewaschen und bei 450 g 3 min abzentrifugiert.

Es folgte eine 40-minütige Inkubation in 1 ml 8E bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und in je 1 ml Waschpuffer aufgenommen, wo sie für 10 min verblieben. Nach einem zweiten Waschgang in 1 ml Waschpuffer wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 1 µl des an PE gekoppelten Mouse-anti-Human WT1 PE bzw. mit 1 µl der Isotypkontrolle Rat-anti-Mouse IgG1 PE auf je 100 µl Waschpuffer inkubiert.

Im Anschluss daran wurde wieder zweimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen, anschließend 250 µl PFA zur Fixierung zu den Zellen gegeben und die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

3.10.2 Zellzyklusanalyse

Ethanolfixierung:

Hierzu wurden ca. 10^7 Zellen aus dem Medium genommen, abzentrifugiert und in FACS-Röhrchen zweimal in 3 ml PBS gewaschen. Danach wurden sie in 1 ml PBS aufgenommen, mit 3 ml eiskaltem 99,9%igem Ethanol versetzt, und für mindestens eine Stunde bei 4°C fixiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen.

Färbung der DNA mit Propidiumiodid:

Nach dem letzten Abzentrifugieren der Zellen wurden diese in 0,5 ml PI/RNase-Lösung aufgenommen und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden sie direkt durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 3 zeigt eine typische Zellzyklusanalyse von HL-60-Zellen.

Detektion von WT1 und Zellzyklusanalyse in einem Ansatz

Bei Detektion von WT1 und Zellzyklusanalyse in einem Ansatz wurde analog des unter 3.10.1 stehenden Protokolls zunächst die Färbung der Zellen mit anti-WT1 als Primärantikörper und nach zweimaligem Waschen mit Alexa Fluor[®] 488 als Sekundärantikörper durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit Alexa Fluor[®] 488 gefärbt wurden. Die hierbei benötigte Antikörpermenge des WT1 Antikörpers (600 µg/ml) wurde durch Titrationsversuche auf 10 µl festgelegt, die benötigte Menge an Alexa Fluor[®] 488 auf 2 µl einer 1:10 Verdünnung. Die Ethanolfixierung wurde je nach Versuchsaufbau vor oder nach der Antikörperzugabe durchgeführt.

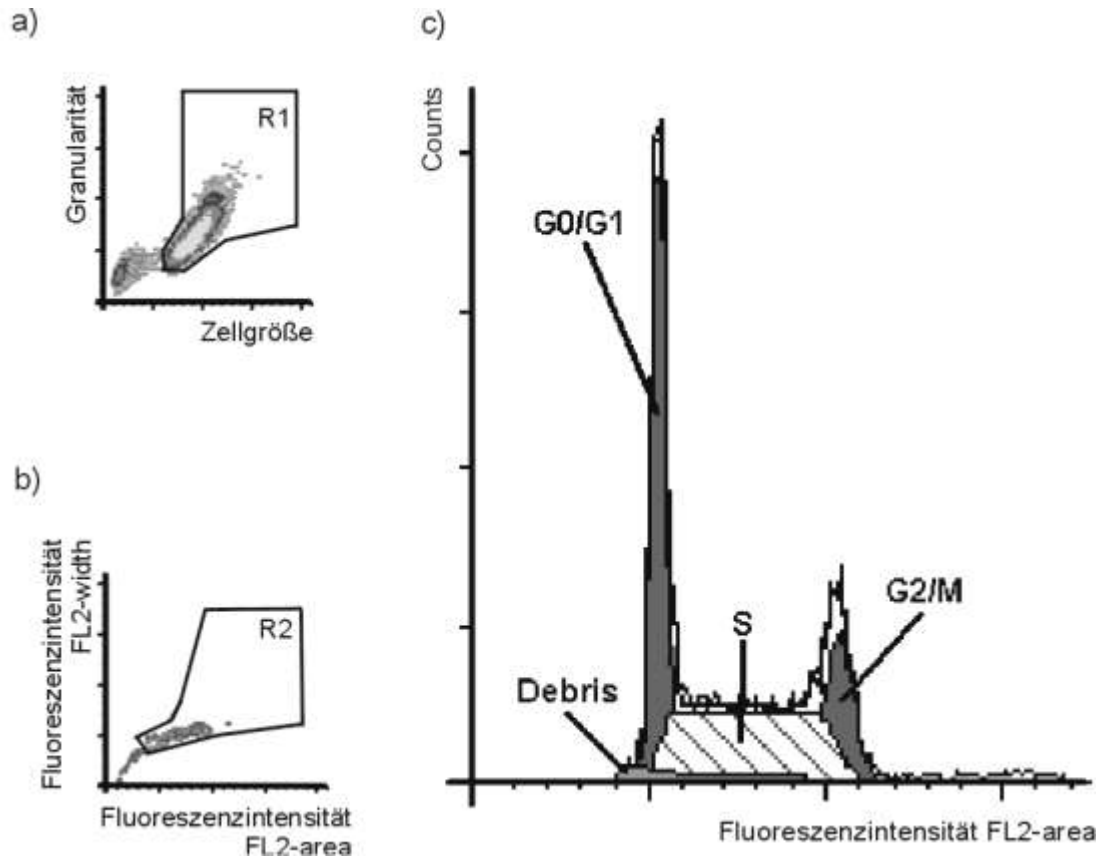


Abbildung 3

Beispiel für eine Zellzyklusanalyse von HL-60-Zellen (ModFit Software). Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen wurden alle Zellen analysiert.

a) Dot plot: Forward Scatter vs. Side Scatter

b) Dot plot: FL 2 area vs. FL 2 width

c) Histogramm: FL2 area

3.10.3 Beurteilung der Lebensfähigkeit kultivierter Zelllinien mit Annexin V und Propidiumiodid

Versuche zum Ausschluss eines hohen Anteils apoptotischer Zellen und früher Apoptosezeichen bei K562 und HL-60-Zellen wurden mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid nach Anleitung des Herstellers (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche, Penzberg, Germany) durchgeführt.

3.10.4 Analyse am FACS-Calibur

Die Fluoreszenz der mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten Zellen wurde im FACS-Calibur-Gerät im FL1-Kanal gemessen, die Phycoerythrin- (PE) und die Propidiumiodid-(PI)-Fluoreszenz im FL2-Kanal. Die Daten wurden mit Hilfe der CELLQuest Software (Version 3.3) und der ModFit Software (Version 2.0) ausgewertet.

3.11 Western Blot

Zur Analyse der Größe des von dem WT1-Antikörper detektierten Proteins wurden Western Blots aus Zelllysaten der Zelllinien HL-60, K562, KG-1a sowie PLB 985 durchgeführt.

Lyse der Zellen:

Aus der Zellkulturflasche wurden ca. 20 Millionen Zellen entnommen und in 50 ml Falcon-Röhrchen für 10 min bei 400 g zentrifugiert. Sie wurden anschließend mit PBS resuspendiert und zweimal mit je 50 ml PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert, abzentrifugiert und auf 10 Millionen Zellen pro ml gebracht. Davon wurde ein Milliliter in ein Eppendorfröhrchen überführt und für 6 min bei 5000 Umdrehungen abzentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstands mit einer 1 ml-Spritze wurden die jetzt stets auf Eis gehaltenen Zellen in 500 µl Loading buffer lysiert, indem sie zunächst in einem Gemisch aus zwei Dritteln Loading buffer und einem Drittel DTT resuspendiert und anschließend mit der 1 ml-Spritze und einer gelben Kanüle geschert wurden.

Das Zelllysate wurde nun für 3 min bei 95°C aufgeköcht, in Aliquots zu je 40 µl in PCR-Tubes aufgeteilt und bei -20°C eingefroren.

Laden des Gels und Elektrophorese:

Um die DNA des Ganzzelllysates zu denaturieren wurden die Aliquots zunächst noch einmal für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Je nach Ansatz wurden bis zu 25 µl der vorbereiteten Proben vorsichtig in die dafür vorgesehenen Taschen des 10% Bis-Tris-Gels pipettiert. Der hierbei verwendete Marker war Rainbow coloured molecular weight marker (je 2 µl).

Die Elektrophorese lief je nach gewünschter Laufweite zwischen 60 und 120 min bei konstanten 150 Volt.

Western Blot:

Die PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Transfermembran) wurde zunächst für 15 Sekunden in Methanol vorbehandelt, danach mit dem Gel und den Blottingpapieren für 5 min in CAPS-Puffer äquilibriert, bevor in einer Semi Dry Transfer Cell geblottet wurde. Eine Membran von 60 cm² erforderte eine Stromstärke von 0,06 A (konstant) für 60 min. Die Fixierung der Membran erfolgte im Anschluss daran für 15 Sekunden in Methanol, anschließend wurde die Membran für 5 min in TBS äquilibriert.

Zur Blockierung wurde die Membran für 60 min in 2% boviner Albuminlösung in TBS inkubiert. Auf die Blockierung folgten zwei jeweils 5-minütige Waschschrirte in TBST, anschließend wurde die Membran zusammen der WT1-Antikörperlösung (Konzentration 1: 4000 in 10 ml TBST) eingeschweiß. Die Membran verblieb über Nacht schüttelnd bei 4°C in der Antikörperlösung.

Am folgenden Tag wurde die Membran aus der Folie entnommen und dreimal für je 10 min in TBST gewaschen. Zur Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-HRP wurde die Membran gegebenenfalls an einer mit Rainbowmarker gekennzeichneten Stelle zerteilt und wiederum mit 10 ml der Antikörperlösung (Konzentration 1: 2500 in 0,3% Tween-TBST) eingeschweiß. Sie verblieb für 60 min schüttelnd in der Lösung.

Nach wiederum drei fünfminütigen Waschsritten in TBST wurde die Membran in ca. 6 ml der zu gleichen Teilen aus 0,02%iger Peroxidlösung (Super Signal West Pico Stable Peroxidase Solution) und Illuminationslösung (Super Signal West Pico Luminol Enhancer Solution) bestehenden Detektionslösung für eine Reaktionszeit von 5 min inkubiert.

Daraufhin folgte das Einschweißen der Membran und die Belichtung eines X-omat AR Films je nach Signalstärke 15 s bis 60 min. Die Entwicklung des Filmes erfolgte automatisch in der Classic E.O.S. Filmentwicklungsmaschine.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung des intrazellulären WT1-Expressionsmusters der Leukämiezelllinien HL-60 und K562 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei Leukämien Erwachsener war die Bestimmung der WT1-Proteinexpression bisher per indirekter Immunfluoreszenz erfolgt. Diese Methodik wurde in dieser Arbeit bei WT1-exprimierenden Leukämiezelllinien verwendet, um für die spätere Etablierung der durchflusszytometrischen Bestimmung der WT1-Proteinexpression eine Kontrollmethodik zur Verfügung zu haben.

Die Färbungen wurden nach dem unter 3.9 aufgeführten Protokoll vorgenommen. Vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihe wurden die optimalen Färbebedingungen anhand von PBMNC-Färbungen als Negativkontrolle ermittelt. Außerdem wurde bei jedem Experiment eine Negativkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Färbungen ausschließlich unter Verwendung des mit Alexa Fluor® 488 markierten Kontrollantikörpers durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass sich die Zellen vor allem im Zellkern anfärbten, und gelegentlich zusätzlich eine schwache Färbung des Zytosols zeigten (siehe Abbildung 4). Es fiel auf, dass die Stärke der Fluoreszenz in den Zellkernen beider Zelllinien trotz maximal standardisierter Vorgehensweise von sehr schwach fluoreszierend zu stark fluoreszierend variierte. Letzteres konnte sowohl im Vergleich von Zelle zu Zelle innerhalb der einzelnen Proben als auch im Vergleich von zu verschiedenen Zeitpunkten aus der Kultur entnommenen Proben beobachtet werden.

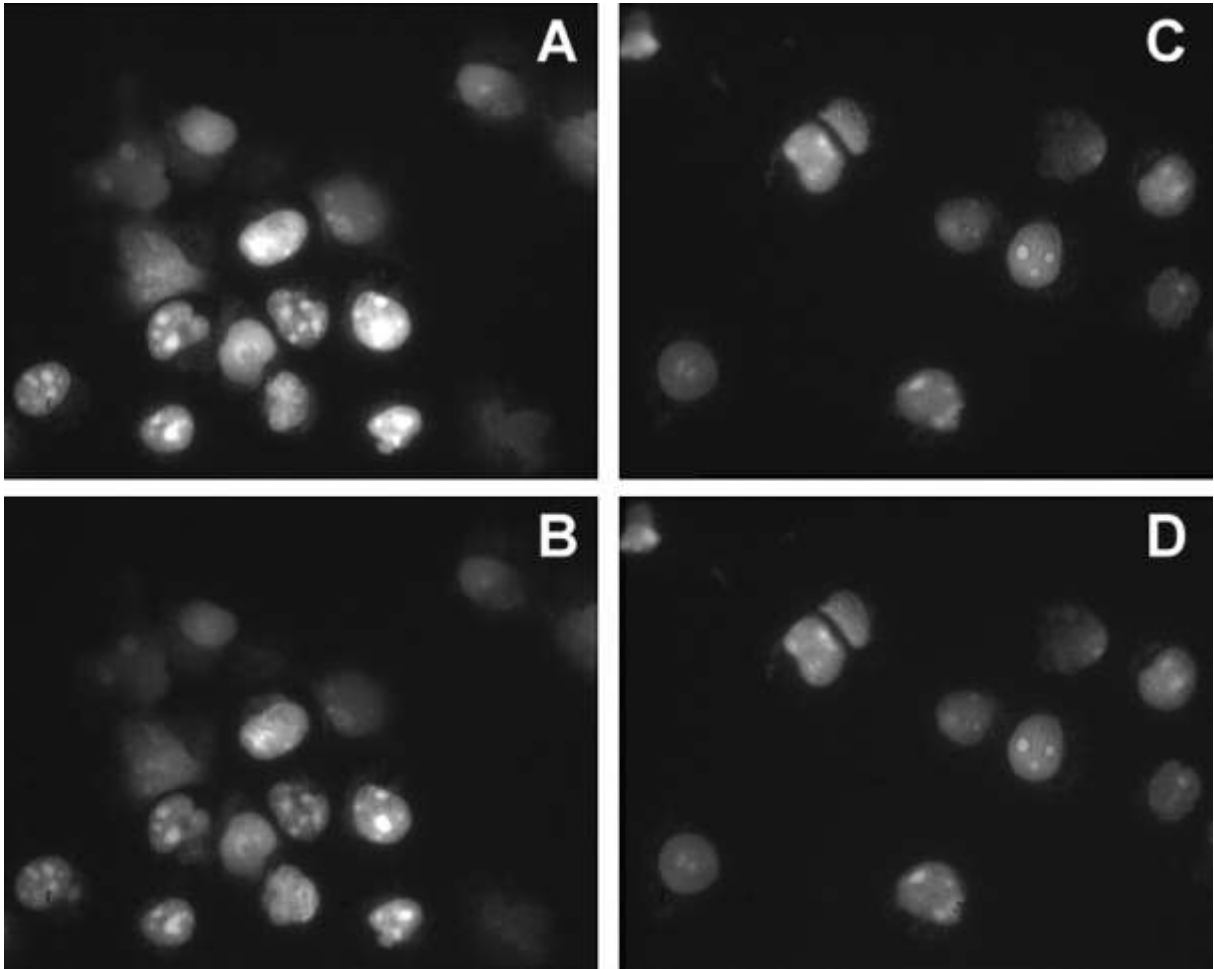


Abbildung 4

Variable Immunfluoreszenz von WT1 (obere Reihe) in den Zelllinien K562 (A) und HL-60 (C) unter optimalen Wachstumsbedingungen (Zellkulturprotokoll 1; siehe 3.7.1) Die Anfärbung der Nuklei und der Nukleolen der Zellen (untere Reihe) im gleichen Bildausschnitt (K562 in Bildteil B, HL-60 in Bildteil D) durch eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid nach Behandlung mit RNase zeigt, dass die WT1-Proteinexpression fast vollständig auf die Zellkerne und die Nukleolen beschränkt ist.

Die Befunde deuteten darauf hin, dass die WT1-Proteinexpression möglicherweise zellzyklusabhängig reguliert sein könnte. Dies sollte zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden. Zunächst erfolgte die Etablierung der durchflusszytometrischen Bestimmung der WT1-Proteinexpression.

4.2 Durchflusszytometrische Untersuchung des WT1-Proteinexpressionsniveaus etablierter Leukämiezelllinien

Es wurden Messungen mit dem Antikörper Mouse-anti-Human WT1 PE, Klon 6F-H2 und der Isotypkontrolle Rat-anti-Mouse IgG1 PE, Klon X56 durchgeführt.

Zunächst wurde die WT1-Proteinexpression in den Zelllinien K562 und HL-60 bestimmt, bei welchen in verschiedenen Studien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie eine hohe WT1-Proteinexpression festgestellt worden war. Beide Zelllinien zeigten auch durchflusszytometrisch ein hohes WT1-Proteinexpressionsniveau. Auch bei den AML-Zelllinien PLB 985 und KG-1a sowie der T-ALL Zelllinie CCRF-CEM wurden hohe WT1-Proteinexpressionsniveaus detektiert. PBMNCs wiesen dagegen keine wesentliche WT1-Proteinexpression auf (siehe Abbildung 5).

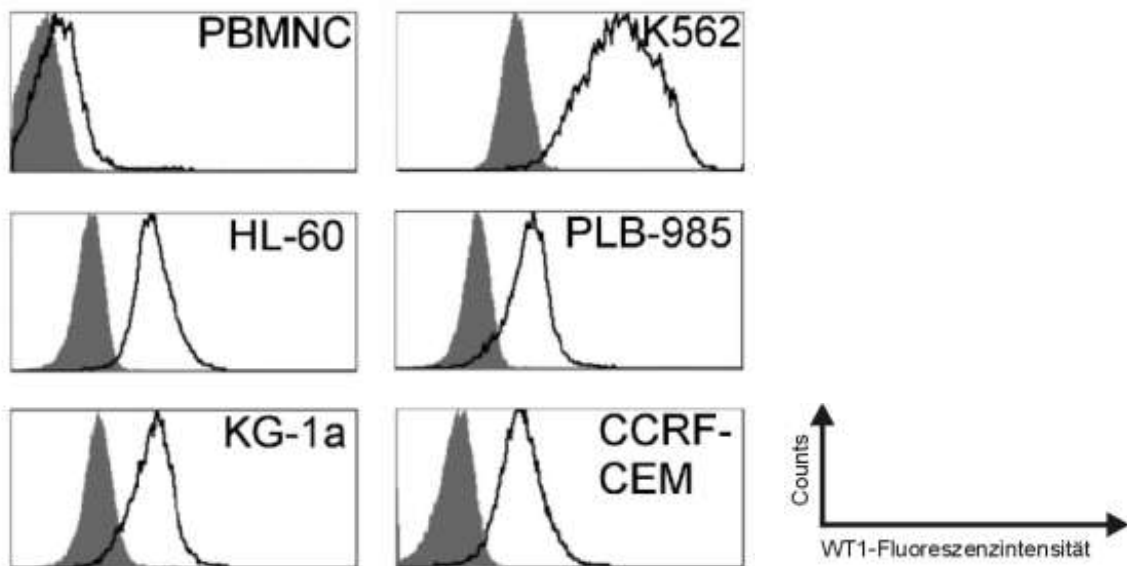


Abbildung 5

Facs-Analyse der WT1-Proteinexpression von PBMNCs als Negativkontrolle sowie der Leukämiezelllinien K562, PLB 985, CCRF-CEM, HL-60 und KG-1a.

Die Histogramme zeigen die WT1-Expression (durchgezogene Linie; Mouse-anti-Human WT1 PE, Klon 6F-H2) und die entsprechenden Kontrollen (Schattierung; Rat-anti-Mouse IgG1 PE, Klon X56)

Diese Ergebnisse zeigten, dass das WT1-Protein durchflusszytometrisch bestimmt werden kann. Allerdings fiel auch in diesen Experimenten auf, dass die WT1-Proteinexpression in den einzelnen Zellkulturen schwankte, wobei die Durchflusszytometrie im Vergleich zur indirekten Immunfluoreszenz eine variable Proteinexpression sicherlich objektiver und außerdem auch semi-quantitativ erfasst.

4.3 Durchflusszytometrische Untersuchung der WT1-Proteinexpression akuter kindlicher Leukämien

Es wurden 40 Patientenproben (15 B-Linien ALL, 10 T-Linien ALL und 15 AML Patienten) mit dem Antikörper Mouse-anti-Human WT1 PE, Klon 6F-H2 und der Isotypkontrolle Rat-anti-Mouse IgG1 PE durchflusszytometrisch untersucht. Mit einer Ausnahme wurden in allen Proben nur niedrige WT1-Proteinexpressionsniveaus gefunden. In den Proben eines AML-Patienten (Probennummer 24) exprimierte ein kleiner Teil der leukämischen Blasten eine größere Menge an WT1-Protein (siehe Abbildung 6). Insgesamt ergaben sich geometrische Mittel der Immunfluoreszenzintensität von -1,6 bis 3,8 (Median 0,34) bei der B-Linien-ALL, von 0,4 bis 2,9 (Median 0,9) bei der T-Linien-ALL und -0,9 bis 8,3 (Median 2,0) in den AML-Proben.

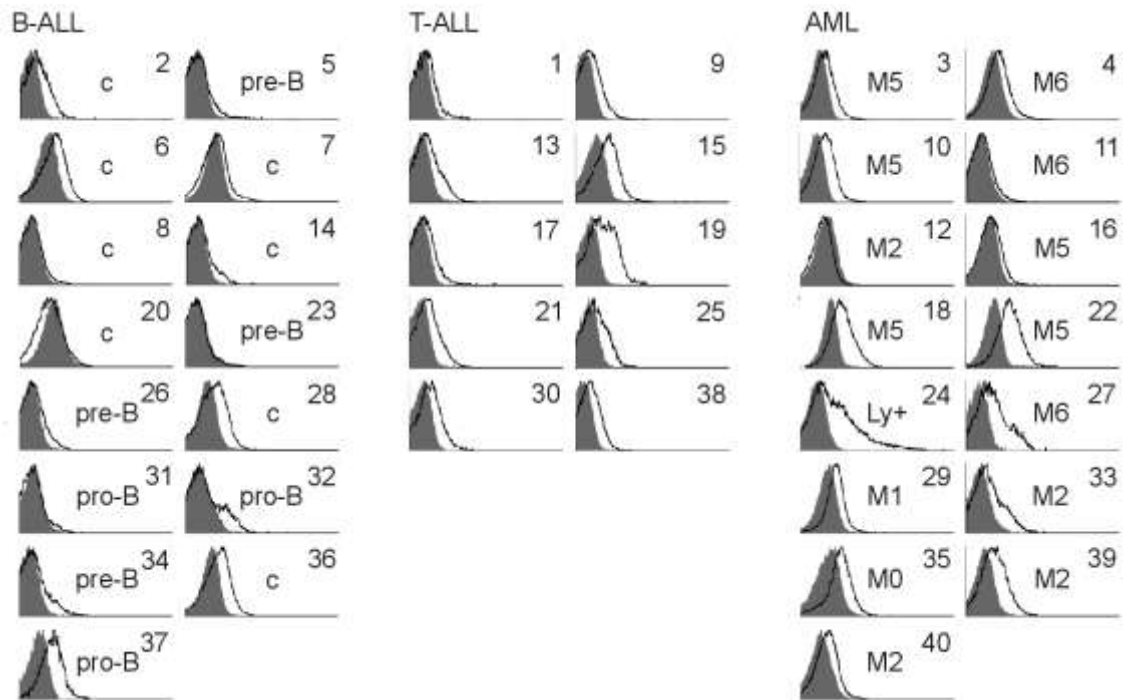


Abbildung 6

Mit anti-WT1 PE durchflusszytometrisch detektierte WT1-Proteinexpression in Leukämiezellen von Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie (B-Linien-ALL, T-Linien ALL) und akuter myeloischer Leukämie (AML). Die Entwicklungsstufe der B-ALL, die FAB-Klassifikation der AML und die Patienten-ID sind in jedem Histogramm angegeben. „pro-B“ bezieht sich auf CD10-negative, „c“ auf CD10-positive, „pre-B“ auf zytoplasmatisch positive B-Linien-ALL. „Ly+“ bezieht sich auf eine AML-Probe mit lymphozytischer Koexpression, die nicht durch den FAB-Subtyp zu erklären war. Die Patienten-ID zeigt die Höhe der WT1-RNA-Expression an, die parallel zu dieser Arbeit erfasst wurde (40). Durchgezogene Linie der Histogramme: Mouse-anti-Human WT1 PE, Klon 6F-H2; Schattierung: Kontrolle Rat-anti-Mouse IgG1 PE, Klon X56

Da davon auszugehen war, dass die geringe WT1-Proteinexpression nicht sicher per indirekter Immunfluoreszenz zu detektieren ist, sollten diese Ergebnisse mit Western Blots von Zelllinien sowie von Patientenproben überprüft werden.

4.4 Bestimmung der Proteingröße mittels Western Blot

Nach dem unter 3.11 aufgeführten Protokoll wurde das von anti-WT1 detektierte Protein im Zelllysate der Zelllinien PLB 985, KG1a, HL-60 und K562 und im Vergleich dazu in den Patientenproben 39, 40, 18 und 22 bestimmt (siehe Abbildung 7 A und B). Es wurden die beiden Patientenproben mit der höchsten WT1-RNA-Expression in der RT-PCR (39, 40 (40)) sowie die Proben mit der höchsten WT1-Proteinexpression in der durchflusszytometrischen Analyse (18, 22) untersucht.

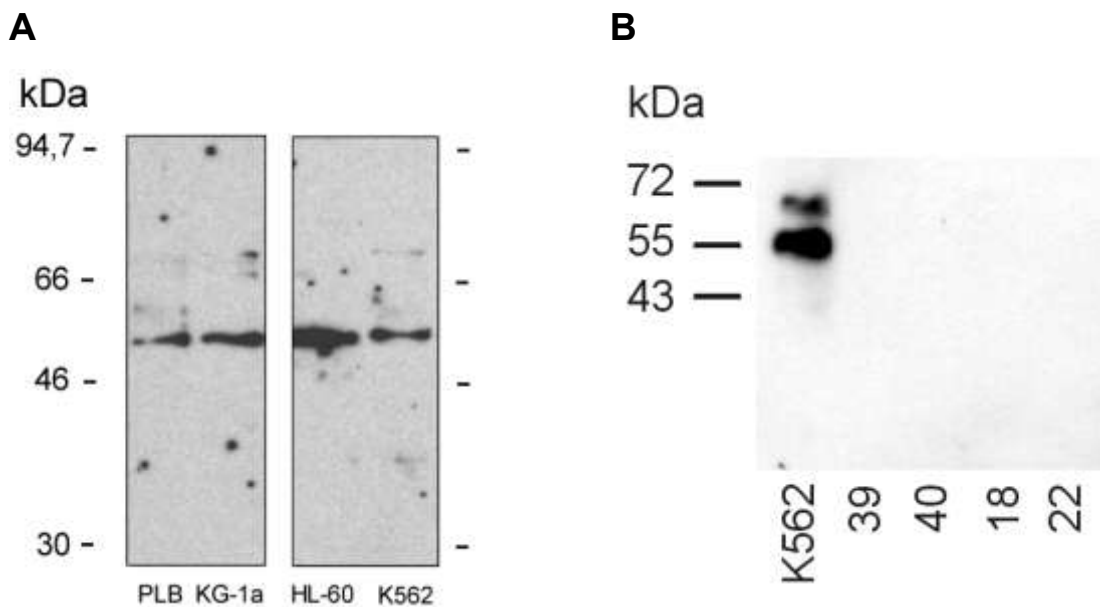


Abbildung 7

Western Blot (10% Gel). Expression des WT1-Proteins von K562, HL-60, PLB und KG-1a (A) und der 4 Patientenproben mit der höchsten WT1-Proteinexpression in FACS und PCR (B). Es wurden Ganzzelllysate verwendet. Die Detektion erfolgte mit anti-WT1 und anti-Mouse-HRP-Konjugat.

Es stellte sich in Übereinstimmung mit den bisher publizierten Daten (58,67,75) eine Bande im Bereich zwischen 52 und 54 kDa dar. Im Zelllysate der Patientenproben wurde keine entsprechende Bande detektiert. Diese Ergebnisse bestätigten die zuvor durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen.

Die in den Leukämiezelllinien beobachtete Variabilität der WT1-Proteinexpression wurde im Folgenden näher untersucht.

4.5 WT1-Proteinexpression in Leukämiezelllinien mit reduzierter Proliferationsrate

Es wurde beobachtet, dass die Proliferationsrate der K562 und HL-60-Zellen, die nach Zellkulturprotokoll 2 behandelt wurden (siehe 3.7.1) einige Tage nach Mediumwechsel vermindert war. Der kontinuierliche Rückgang der Proliferationsrate dieser Zellkulturen wurde von einem Rückgang der WT1-Proteinexpression der Zellen begleitet (siehe Abbildung 8 A und B; dargestellt sind die Untersuchungsergebnisse der HL-60-Zellen).

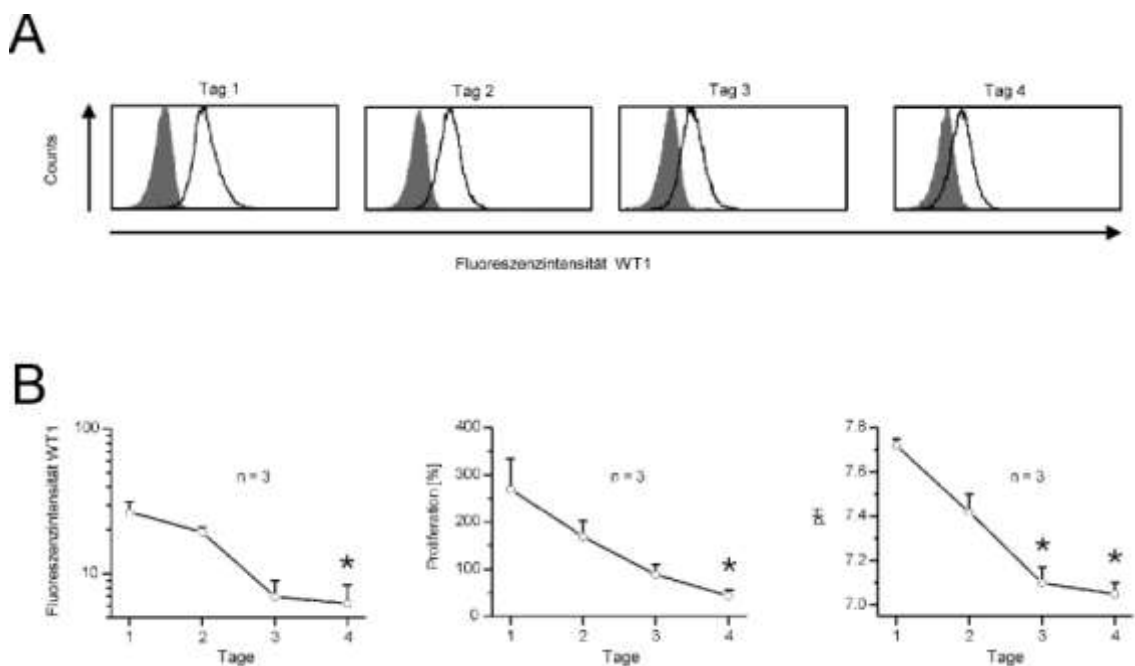


Abbildung 8

WT1-Proteinexpression von HL-60-Zellen, die nach Splitten der Zellkultur und Erneuerung des Mediums für 4 Tage lang im selben Medium (10% FCS) verblieben sind. (Zellkulturprotokoll 2).

(A) Histogramme einer repräsentativen Zellkultur

(B) Zeitlicher Verlauf der WT1-Fluoreszenzintensität, der Proliferationsrate und des pH-Werts innerhalb des Zellkulturmediums bei drei voneinander unabhängigen Experimenten

Um auszuschließen, dass eine reduzierte Vitalität der lange ohne frisches Medium inkubierten Zellen für die herabgesetzte WT1-Expression verantwortlich ist, wurde eine durchflusszytometrische Bestimmung der

Lebensfähigkeit der Zellen durchgeführt (siehe 3.10.3). Annexin V wurde hierbei verwendet, um freistehende Phosphatidylserinreste auf der Zellmembran als frühe Apoptosezeichen zu detektieren. Propidiumiodid wurde zur Darstellung eventuell vorhandener bereits nekrotischer Zellen in den untersuchten Populationen genutzt. Im Falle der HL-60-Zellen mit herabgesetzter Proliferationsrate und WT1-Expression waren 98,5% der Zellen innerhalb des gesetzten Gates vital, verglichen mit 98,7% der Zellen mit höherer Proliferationsrate und WT1-Expression. Um außerdem einen möglichen Einfluss des pH-Werts des Zellkulturmediums auszuschließen, wurde die WT1-Proteinexpression unter Entzug von Wachstumsfaktoren bei Erneuerung des Mediums jeden Tag oder jeden zweiten Tag untersucht. (siehe Zellkulturprotokoll 3, 3.7.1) In beiden Zelllinien konnte sowohl ein Abfall der Proliferationsrate aufgrund der niedrigen Mengen an FCS im Kulturmedium (0%, 0,1% oder 0,5%) als auch ein Abfall der WT1-Proteinexpression beobachtet werden (Abbildung 9 A und B).

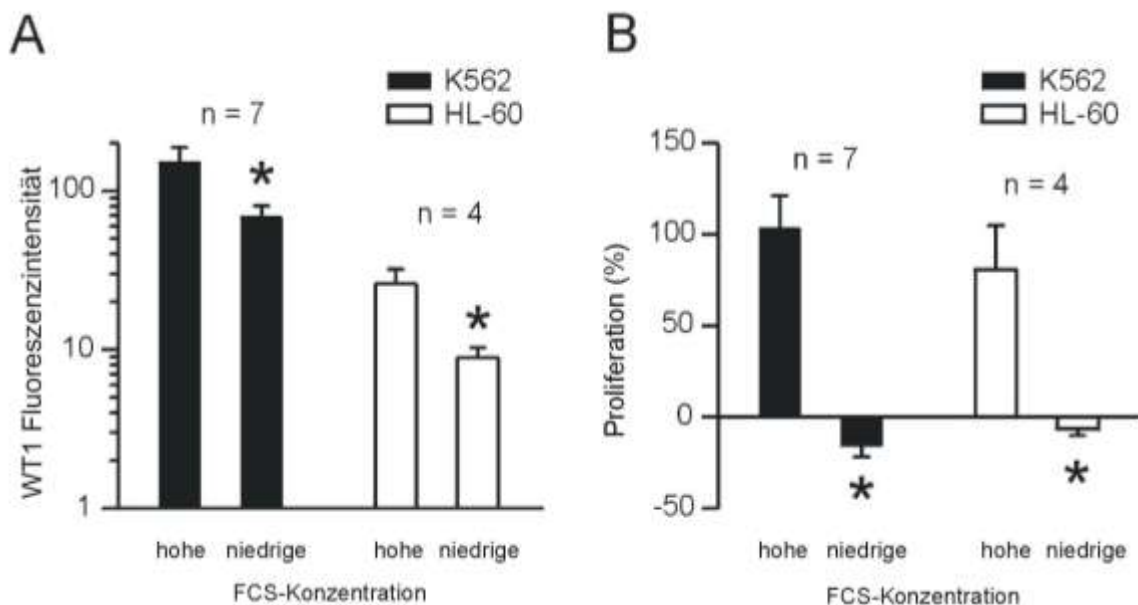


Abbildung 9

WT1-Proteinexpression (A) und Proliferationsrate (B) von K562 und HL-60-Zellen, die in Zellkulturmedium mit einem hohen (10%) bzw. einem niedrigen (<0,5%) Anteil an FCS gewachsen waren (siehe entsprechende Zellkulturprotokolle 1 und 3)

Da das Absinken der Proliferationsrate zeitlich variierte (zwischen 2 und 5 Tagen nach Wechsel zu FCS-armem Medium) wurde die WT1-Proteinexpression zu dem Zeitpunkt gemessen, an dem die Proliferationsrate auf 5% oder niedriger gefallen war. Dass die hypoploiden Zellen innerhalb des gesetzten Gates in der Durchflusszytometrie unter 3% blieben, macht die Apoptose als Grund für das Absinken des WT1-Proteinexpressionsniveaus unwahrscheinlich.

4.6 WT1-Proteinexpression von Leukämiezelllinien in Abhängigkeit vom Zellzyklus

Um die Veränderungen der proportionalen Verteilung von Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen zu untersuchen, wurde bei K562 und HL-60-Zellkulturen, die bei Verbleiben im selben Medium einen kontinuierlichen Abfall der WT1-Proteinexpression zeigten (3.7.1; Zellkulturprotokoll 2), eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Nach einigen Tagen zeigte sich ein verhältnismäßiger Anstieg der HL-60 Zellen in der G₀/G₁-Phase und ein verhältnismäßiger Abfall sowohl der Zellen in der S-Phase als auch der Zellen in der G₂/M Phase (siehe Abbildung 10). Bei den K562 Zellen ergab sich ein verhältnismäßiger Anstieg der Zellen in der G₀/G₁-Phase und ein verhältnismäßiger Abfall der Zellen in der G₂/M Phase, während die Zellen in der S-Phase keine größere Veränderung zeigten.

Ergebnisse

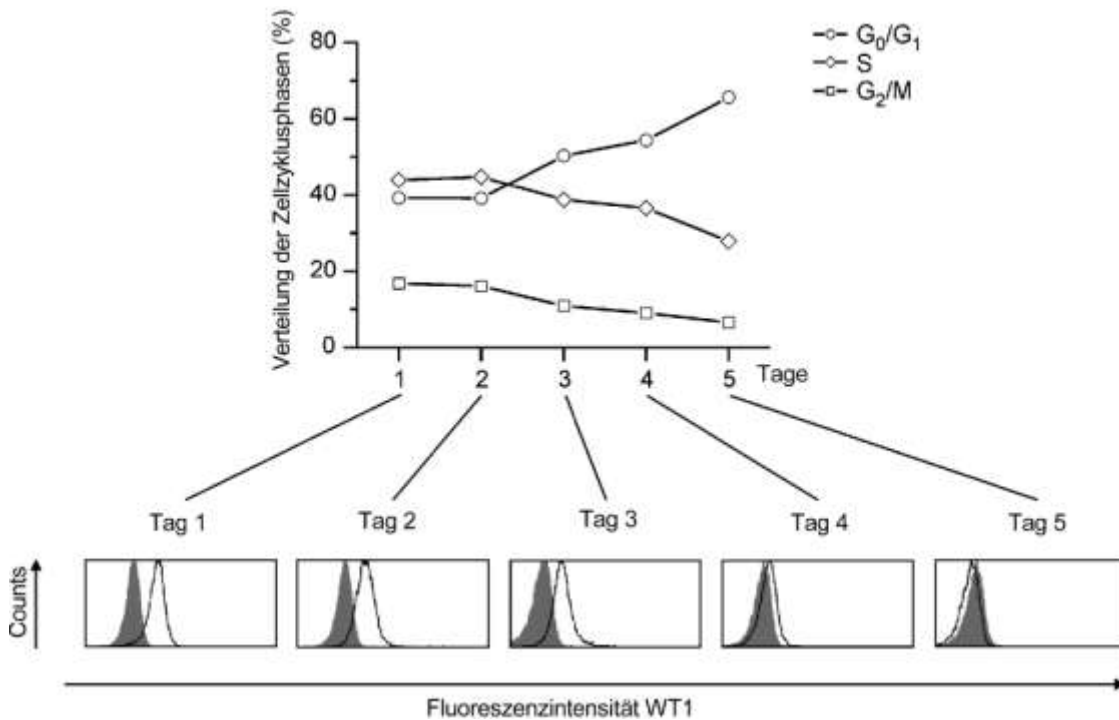


Abbildung 10

Proportionale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der HL-60-Zellen (oben), die nach Splitten der Kultur und Erneuerung des Mediums für 5 Tage lang im selben Medium (10% FCS) geblieben waren (Zellkulturprotokoll 2, siehe 3.7.1; repräsentatives Experiment). Die zugehörige WT1-Proteinexpression ist im unteren Teil der Abbildung zu sehen.

Da diese Ergebnisse vermuten ließen, dass WT1 zellzyklusabhängig exprimiert wird, wurde die WT1-Proteinexpression mittels Zweifarbandurchflusszytometrie für jede einzelne Zellzyklusphase ermittelt. HL-60 und K562-Zellen, die unter optimalen Bedingungen in einem Medium mit 10% FCS und regelmäßigem Mediumwechsel gehalten wurden (siehe 3.7.1; Zellkulturprotokoll 1), zeigten eine WT1-Proteinexpression, die am niedrigsten war in G₀/G₁-Phase, mittelhoch in S-Phase und am höchsten in G₂/M-Phase. Ein Zellkulturmedium ohne den Zusatz von FCS (3.7.1; Zellkulturprotokoll 3) führte zu einer herabgesetzten Proliferationsrate und einer herabgesetzten WT1-Expression in *jeder* Zellzyklusphase bei beiden Zelllinien (für die HL-60-Zellen siehe Abbildung 11).

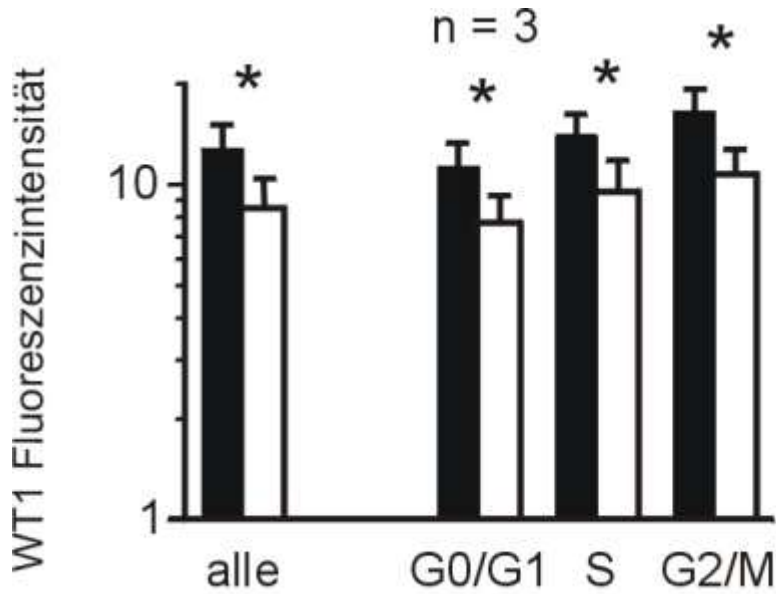


Abbildung 11

Abhängigkeit der WT1-Proteinexpression von HL-60-Zellen vom Zellzyklus und von der Proliferation.

Schwarze Säulen: Medium mit 10% FCS (Zellkulturprotokoll 1; siehe 3.7.1)

Weißer Säulen: Medium mit 0% FCS (Zellkulturprotokoll 3; siehe 3.7.1)

Sternchen: signifikant reduzierte WT1-Fluoreszenzintensität aller Zellen und in jeder einzelnen Zellzyklusphase

Im Unterschied zu den Ergebnissen, die in Abbildung 9 gezeigt werden, wurde hier die Analyse bereits bei einer Proliferationsrate von 40% oder niedriger durchgeführt, was eine Erklärung für den geringeren Abfall der WT1-Proteinexpression in diesen Experimenten sein könnte.

5 Diskussion

5.1 Teil A: Niedriges WT1-Proteinexpressionsniveau bei kindlichen akuten Leukämien

5.1.1 Niedrigeres WT1-Proteinexpressionsniveau bei jüngeren Patienten

In dieser Arbeit wurden sowohl durchflusszytometrisch als auch mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot in mehreren etablierten Leukämiezelllinien hohe WT1-Proteinexpressionen detektiert. Im Gegensatz dazu zeigten 40 Proben pädiatrischer Patienten mit akuter Leukämie in der durchflusszytometrischen Analyse sehr niedrige WT1-Proteinexpressionen, die im Western Blot bestätigt wurden. In parallel durchgeführten Untersuchungen des WT1-mRNA-Gehalts dieser Proben mittels RT-PCR (40) zeigte sich, dass die Anzahl der Transkripte in den Blasten der kindlichen Leukämien vergleichbar war mit derjenigen kürzlich zuvor durchgeführter Studien, die ähnliche RQ-PCR-Techniken verwendet hatten (3,9).

In zwei früheren Studien wurde das WT1-Protein bereits immunfluoreszenzmikroskopisch in Leukämiezellen erwachsener Patienten detektiert (53,54). Verwendet wurde der gleiche monoklonale Antikörper wie auch in dieser Arbeit. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit war jedoch in über 50% der Proben, die zuvor eine positive WT1-mRNA-Expression in der RT-PCR gezeigt hatten, eine starke Anfärbung des Zellkerns beobachtet worden.

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte die niedrigere WT1-mRNA-Expression bei jüngeren Patienten sein. Die WT1 mRNA-Expression war bei AML-Patienten zwischen einem Jahr und 10 Jahren mehr als 10mal niedriger als bei Kindern mit derselben Erkrankung im Alter von 10 Jahren und älter (3). Verglichen mit der WT1-mRNA-Expression

erwachsener Patienten könnten diese bei der kindlichen akuten lymphatischen Leukämie (ALL) sogar mehr als 100mal niedriger sein (3,9).

Es wäre zudem möglich, dass bei der kindlichen akuten Leukämie durch unterschiedliche Regulation der Translation der WT1-mRNA weniger Protein entsteht als bei Erwachsenen oder bei Leukämiezelllinien.

5.1.2 Gegenüberstellung von WT1-Proteinexpression und WT1-RNA-Expression bei kindlichen akuten Leukämien

Die durchflusszytometrisch ermittelte WT1-Proteinexpression zeigte erhebliche Abweichungen von der Anzahl der in der jeweiligen Probe durch RT-PCR detektierten Transkripte (40).

In den Proben der beiden Patienten mit dem höchsten WT1-mRNA-Expression (Patienten 39 und 40) wurden niedrigere WT1-Proteinexpressionsniveaus gefunden als bei den Proben der Patienten 18 und 22, die eine mittlere WT1-mRNA-Expression aufwiesen. Diese Beobachtung lässt auf eine bedeutende posttranslationale Regulation schließen.

In vier Patientenproben (ID 1, 2, 3, 4) wurde WT1 zunächst zwar durch die Durchflusszytometrie detektiert, jedoch nicht mit dem verwendeten Standard-RQ-PCR-Assay. Bei einer Patientenprobe (ID 1) konnten auch in drei weiteren PCR-Ansätzen, die auf andere Regionen der WT1-RNA zielten, keine WT1-RNA detektiert werden. Dass diese Probe die einzige mit einer gerade noch akzeptablen cDNA-Qualität war (40), könnte hierfür ein Grund sein. Bei zwei Patienten (Patienten 2 und 4) konnten in den zusätzlich durchgeführten PCR-Ansätzen höhere WT1-RNA-Levels festgestellt werden (40). In diesen Fällen könnten Mutationen des WT1-Gens für das niedrige WT1-Proteinexpressionsniveau und die niedrige WT1-RNA-Expression im Standard-Ansatz verantwortlich sein. Bei akuten Leukämien, besonders bei der AML, sind Mutationen des WT1-Gens beschrieben (41). Bei dem vierten Patienten (ID 3)

zeigte nur einer der drei Ansätze ein schwach positives Signal in einer von zwei Proben.

Bei vier Patientenproben (ID 12, 20, 23, 31) wurden zwar WT1-Transkripte detektiert, jedoch durchflusszytometrisch keine WT1-Proteinexpression gefunden. Hier könnte die Expression der kürzlich entdeckten WT1-Isoform WT1s eine Rolle spielen ((35); siehe 5.1.3).

5.1.3 Einfluss von WT1s auf die Bedeutung der mit dem WT1-Antikörper 6F-H2 ermittelten Ergebnisse

In den Blasten erwachsener Patienten mit akuter Leukämie wurde vor kurzem die WT1-Isoform WT1s gefunden (35). Das Transkript dieser Isoform ist an der N-terminalen Seite durch einen internen Promotor im ersten Intron des WT1-Gens abgeschnitten. Die korrespondierenden Peptide sind in fetalen Nierenextrakten und Hoden mittels Western Blot mit einem C-terminalen Antikörper detektiert worden und haben ein Gewicht von ungefähr 35 bis 37 kDa. Sie sind um 147 Aminosäuren kürzer als das ursprüngliche WT1-Protein. Der WT1-Antikörper 6F-H2 bindet an ein Epitop innerhalb der 80 letzten Aminosäuren der N-terminalen Seite des Proteins (53,67). Obwohl WT1s demnach nicht durch den in dieser Arbeit verwendeten Antikörper detektiert wird, erklärt es nicht die niedrige WT1-Proteinexpression in den Patientenproben kindlicher Leukämien. Zum Einen wurde in der Mehrzahl der Proben ein WT1s-mRNA-Expressionsniveau gefunden, welches vergleichbar war mit der mRNA der WT1-Hauptform (35). Eine 1:1 Translation der mRNA hätte demnach eine (im Vergleich zur der durch 6F-H2 detektierten) verdoppelte WT1-Proteinexpression zur Folge. Die Fluoreszenzintensität würde hierdurch jedoch nur wenig beeinflusst, da sie logarithmisch skaliert ist. Zudem detektierte der polyklonale, C-terminal bindende C-19 Antikörper WTC19, der in früheren immunzytochemischen Untersuchungen von Leukämieproben verwendet wurde, das Protein analog zu den Ergebnissen der N-terminal bindenden Mabs in nur 51% der RNA-positiven Leukämien (53,53). Auch die Verwendung dieses, für die Detektion von WT1s

geeigneten Antikörpers verbesserte folglich nicht die Sensitivität der immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion des WT1-Proteins in akuten Leukämien Erwachsener.

5.2 Teil B: Zellzyklusabhängige und -unabhängige WT1-Proteinexpression in den Zelllinien HL-60 und K562

Im Rahmen der Untersuchungen der WT1-Proteinexpression kindlicher Leukämien war sowohl bei immunfluoreszenzmikroskopischen als auch bei durchflusszytometrischen Untersuchungen von Leukämiezelllinien aufgefallen, dass die Fluoreszenzintensität nicht konstant blieb, sondern variierte. Dies führte zu der Annahme, dass das WT1-Proteinexpressionsniveau abhängig sein könnte von Proliferation oder Zellzyklus.

Diese Arbeit zeigt, dass schnell proliferierende HL-60 und K562-Zellen eine hohe WT1-Proteinexpression aufweisen, während bei beiden Zelllinien eine niedrigere Proliferationsrate mit einer geringeren Proteinexpression verbunden ist. Mit Hilfe der Zweifarbendurchflusszytometrie konnte die WT1-Proteinexpression in Abhängigkeit vom Zellzyklus untersucht werden, ohne das artefaktanfällige Verfahren der Synchronisierung der Zellen anzuwenden (18).

Die herabgesetzte WT1-Proteinexpression in Leukämiezelllinien mit niedriger Proliferationsrate resultiert danach einerseits aus einem verhältnismäßigen Anstieg der Zellen in G_0/G_1 Phase, die ein niedrigeres WT1-Proteinexpressionsniveau aufwiesen als die Zellen in S oder G_2/M Phase. Auf der anderen Seite kann die herabgesetzte WT1-Proteinexpression dieser Zelllinien aber auch auf eine in allen Zellzyklusphasen niedrigere WT1-Proteinexpression zurückgeführt werden. Diese Ergebnisse legen eine zellzyklusabhängige und -unabhängige WT1-Proteinexpression nahe.

5.2.1 Zellzyklusabhängige WT1-Proteinexpression

Die zellzyklusabhängige WT1-Proteinexpression von WT1, beispielsweise die höhere WT1-Proteinexpression in der G₂/M-Phase, lässt auf eine wichtige Rolle des WT1-Proteins in den verschiedenen Zellzyklusphasen schließen. Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die Suppression der WT1-Expression bei leukämischen Zellen eine Zellzyklusunterbrechung in der G₂/M Phase induziert (84). Cyclin/CDK-Komplexe wurden im Einklang mit dieser Beobachtung als mögliche Targets des WT1-Proteins beschrieben (45). Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen wurde in Fraktionierungsanalysen eine im Laufe des Zellzyklus konstante WT1-Proteinexpression beobachtet (21). Es ist jedoch davon auszugehen, dass die hier dargestellten Unterschiede zwischen den Zellzyklusphasen mit Proteinisolierungsmethoden, die auf einer Synchronisation der Zellkulturen beruhen, kaum zu detektieren sind.

5.2.2 Zellzyklusunabhängige WT1-Proteinexpression

Die zellzyklusunabhängige Komponente der WT1-Proteinexpression in Leukämiezelllinien zeigt sich durch eine in allen Zellzyklusphasen herabgesetzte WT1-Proteinexpression bei Zellen mit herabgesetzter Proliferationsrate. Die vom Zellzyklus abhängige und eine vom Zellwachstum abhängige WT1-Proteinexpression sind somit übereinandergelagert. Über Hinweise für eine Abhängigkeit der WT1-Expression von der Proliferation wurde bereits in früheren Studien berichtet. So wurde gezeigt, dass in HER2/neu transfizierten Brustkrebszellen die aktivierte Proteinkinase B (auch Akt genannt), die bei der Vermittlung von Wachstumshormonrezeptorsignalen eine entscheidende Rolle spielt, die WT1-Proteinexpression erhöht. (21,78) In proliferierenden, kultivierten Zellen aus Peripherblut und Nabelschnurblut sowie in GCSF-behandelten Peripherblutzellen wurde eine höhere Anzahl von WT1-Transkripten detektiert (64).

5.2.3 Relevanz der Ergebnisse dieser Arbeit für die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) und für die Rolle des WT1-Proteins als Target für eine Immuntherapie

Die Erkenntnis, dass die WT1-Proteinexpression von Leukämiezelllinien in schnell proliferierenden Zellen erhöht ist, lässt darauf schließen, dass in MRD-Studien in vivo die höhere WT1-Proteinexpression in den Zellen rezidivierender Leukämien nicht nur durch eine steigende Anzahl an Krebszellen bedingt sein könnte, sondern auch von einer höheren WT1-Expression schnell proliferierender Zellen herrührt. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass eine MRD und spätere Rezidive durch eine sich langsam teilende, chemotherapie-resistente Stammzelle verursacht sein könnten (69). Davon ausgehend ist es sehr wichtig, dass Immuntherapien alle Leukämiezellen erfassen, die langsam teilenden Stammzellen mitinbegriffen. Trotz kürzlich veröffentlichter Berichte über eine selektive Eliminierung leukämischer CD34-positiver Zellen durch WT1-spezifische zytotoxische Zellen (CTLs) (28,29) ist das WT1-Proteinexpressionsniveau leukämischer Randpopulationen, die CD34 wenig oder gar nicht exprimieren (83), sowie deren Erfassbarkeit durch WT1-spezifische CTLs zum heutigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Das Ergebnis dieser Arbeit, dass die WT1-Proteinexpression in langsam proliferierenden Zellen gering und in der G₀/G₁ Phase am niedrigsten ist, legt die Vermutung nahe, dass die WT1-Proteinexpression in ruhenden leukämischen (Stamm-) Zellen ebenso niedrig ausfallen könnte. Da WT1 nicht nur in hämatologischen Neoplasien zu finden ist, sondern auch in Rhabdomyosarkom-, Ovarialkarzinom- und Mammakarzinomzellen sowie in Zellen des metastasierenden Melanoms exprimiert wird, könnte dieses Ergebnis auch für diese Tumoren relevant sein.

6 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass das WT1-Protein durchflusszytometrisch detektiert werden kann. In kindlichen akuten Leukämien unterscheidet sich die WT1-Proteinexpression erheblich von der Zahl der WT1-Transkripte und ist zu niedrig, um in durchflusszytometrischen MRD-Studien verwendet werden zu können. In den Leukämiezelllinien HL-60 und K562 wird das WT1-Protein stark exprimiert. In langsam proliferierenden HL-60 und K562 Zellen jedoch ist das WT1-Proteinexpressionsniveau in allen Zellzyklusphasen erniedrigt. Zusätzlich ist die WT1-Proteinexpression in der G₀/G₁-Phase im Vergleich zur S- und G₂/M-Phase am niedrigsten. Langsam proliferierende Tumor-Stammzellen, die für eine MRD und spätere Rezidive verantwortlich sein könnten, könnten daher eine vergleichbar geringe WT1-Proteinexpression aufweisen und von gegen WT1 gerichteten Immuntherapien nicht erreicht werden.

Literaturverzeichnis

- (1) Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA et al. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev.* 1993;40(1-2):85-97.
- (2) Baird PN, Simmons PJ. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol.* 1997;25(4):312-320.
- (3) Boublikova L, Kalinova M, Ryan J et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia.* 2006;20(2):254-263.
- (4) Brieger J, Weidmann E, Fenchel K et al. The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia.* 1994;8(12):2138-2143.
- (5) Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E et al. Molecular relapse can be detected in blood in a sensitive and timely fashion in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2001;15(11):1801-1802.
- (6) Call KM, Glaser T, Ito CY et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell.* 1990;60(3):509-520.
- (7) Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry.* 1999;38(4):139-152.
- (8) Campana D, Coustan-Smith E. Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia. *Acta Haematol.* 2004;112(1-2):8-15.
- (9) Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia.* 2002;16(10):2115-2121.
- (10) Cilloni D, Gottardi E, Fava M et al. Usefulness of quantitative assessment of the WT1 gene transcript as a marker for minimal residual disease detection. *Blood.* 2003;102(2):773-774.
- (11) Cilloni D, Gottardi E, Saglio G. WT1 overexpression in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Methods Mol Med.* 2006;125:199-211.

- (12) Cilloni D, Saglio G. WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol.* 2004;112(1-2):79-84.
- (13) Cook DM, Hinkes MT, Bernfield M, Rauscher FJ, III. Transcriptional activation of the syndecan-1 promoter by the Wilms' tumor protein WT1. *Oncogene.* 1996;13(8):1789-1799.
- (14) Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 1998;351(9102):550-554.
- (15) Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE et al. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;123(2):243-252.
- (16) Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2000;96(8):2691-2696.
- (17) Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2002;100(7):2399-2402.
- (18) Darzynkiewicz Z, Gong J, Juan G et al. Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry.* 1996;25(1):1-13.
- (19) Dennis SL, Manji SS, Carrington DP et al. Expression and mutation analysis of the Wilms' tumor 1 gene in human neural tumors. *Int J Cancer.* 2002;97(5):713-715.
- (20) Dey BR, Sukhatme VP, Roberts AB et al. Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol Endocrinol.* 1994;8(5):595-602.
- (21) Dobashi Y, Kudoh T, Ishidate T et al. The Wilms tumor protein is persistently associated with the nuclear matrix throughout the cell cycle. *Mol Cell Biochem.* 1997;171(1-2):121-126.
- (22) Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P et al. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science.* 1992;257(5070):674-678.
- (23) Dworzak MN, Fritsch G, Panzer-Grumayer ER et al. Detection of residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia by comparative phenotype mapping: method and significance. *Leuk Lymphoma.* 2000;38(3-4):295-308.

- (24) Foley GE, Lazarus H, Farber S et al. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer*. 1965;18:522-9.:522-529.
- (25) Gaiger A, Linnerth B, Mann G et al. Wilms' tumour gene (wt1) expression at diagnosis has no prognostic relevance in childhood acute lymphoblastic leukaemia treated by an intensive chemotherapy protocol. *Eur J Haematol*. 1999;63(2):86-93.
- (26) Gaiger A, Schmid D, Heinze G et al. Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1998;12(12):1886-1894.
- (27) Gallagher R, Collins S, Trujillo J et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1979;54(3):713-733.
- (28) Gao L, Bellantuono I, Elsasser A et al. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood*. 2000;95(7):2198-2203.
- (29) Gao L, Xue SA, Hasserjian R et al. Human cytotoxic T lymphocytes specific for Wilms' tumor antigen-1 inhibit engraftment of leukemia-initiating stem cells in non-obese diabetic-severe combined immunodeficient recipients. *Transplantation*. 2003;75(9):1429-1436.
- (30) Gashler AL, Bonthron DT, Madden SL et al. Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms tumor suppressor WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(22):10984-10988.
- (31) Haber DA, Buckler AJ, Glaser T et al. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell*. 1990;61(7):1257-1269.
- (32) Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ et al. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(21):9618-9622.
- (33) Harrington MA, Konicek B, Song A et al. Inhibition of colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus. *J Biol Chem*. 1993;268(28):21271-21275.
- (34) Hosen N, Sonoda Y, Oji Y et al. Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2002;116(2):409-420.

- (35) Hossain A, Nixon M, Kuo MT, Saunders GF. N-terminally truncated WT1 protein with oncogenic properties overexpressed in leukemia. *J Biol Chem*. 2006.
- (36) Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood*. 1997;89(4):1405-1412.
- (37) Inoue K, Ogawa H, Yamagami T et al. Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood*. 1996;88(6):2267-2278.
- (38) Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. 1994;84(9):3071-3079.
- (39) Kent J, Coriat AM, Sharpe PT et al. The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene*. 1995;11(9):1781-1792.
- (40) Kerst G, Bergold N, Gieseke F et al. WT1 protein expression in childhood acute leukemia. *Am J Hematol*. 2008;83(5):382-386.
- (41) King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood*. 1998;91(8):2961-2968.
- (42) Klein E, Ben Bassat H, Neumann H et al. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 1976;18(4):421-431.
- (43) Kletzel M, Olzewski M, Huang W, Chou PM. Utility of WT1 as a reliable tool for the detection of minimal residual disease in children with leukemia. *Pediatr Dev Pathol*. 2002;5(3):269-275.
- (44) Koefler HP, Billing R, Lusic AJ et al. An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Blood*. 1980;56(2):265-273.
- (45) Kudoh T, Ishidate T, Moriyama M et al. G1 phase arrest induced by Wilms tumor protein WT1 is abrogated by cyclin/CDK complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(10):4517-4521.
- (46) Lee SB, Huang K, Palmer R et al. The Wilms tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell*. 1999;98(5):663-673.
- (47) Little MH, Prosser J, Condie A et al. Zinc finger point mutations within the WT1 gene in Wilms tumor patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(11):4791-4795.
-

- (48) Loeb DM, Sukumar S. The role of WT1 in oncogenesis: tumor suppressor or oncogene? *Int J Hematol.* 2002;76(2):117-126.
- (49) Lozzio BB, Lozzio CB. Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 1977;19(1):136.
- (50) Maheswaran S, Park S, Bernard A et al. Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(11):5100-5104.
- (51) Martin H, Atta J, Bruecher J et al. In patients with BCR-ABL-positive ALL in CR peripheral blood contains less residual disease than bone marrow: implications for autologous BMT. *Ann Hematol.* 1994;68(2):85-87.
- (52) Maurer U, Brieger J, Weidmann E et al. The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro. *Exp Hematol.* 1997;25(9):945-950.
- (53) Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U et al. Detection by monoclonal antibodies of the Wilms' tumor (WT1) nuclear protein in patients with acute leukemia. *Int J Cancer.* 1997;70(5):518-523.
- (54) Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U et al. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia.* 1995;9(6):1060-1067.
- (55) Menssen HD, Siehl JM, Thiel E. Wilms tumor gene (WT1) expression as a panleukemic marker. *Int J Hematol.* 2002;76(2):103-109.
- (56) Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia.* 1992;6(5):405-409.
- (57) Miyagi T, Ahuja H, Kubota T et al. Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells. *Leukemia.* 1993;7(7):970-977.
- (58) Morris JF, Madden SL, Tournay OE et al. Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT1 Wilms' tumor locus. *Oncogene.* 1991;6(12):2339-2348.
- (59) Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL et al. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell.* 1998;93(3):445-454.
- (60) Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood.* 2003;101(5):1698-1704.

- (61) Oji Y, Miyoshi S, Maeda H et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer*. 2002;100(3):297-303.
- (62) Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 2004;95(7):583-587.
- (63) Oji Y, Ogawa H, Tamaki H et al. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res*. 1999;90(2):194-204.
- (64) Olszewski M, Huang W, Chou PM et al. Wilms' tumor 1 (WT1) gene in hematopoiesis: a surrogate marker of cell proliferation as a possible mechanism of action? *Cytotherapy*. 2005;7(1):57-61.
- (65) Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H et al. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br J Haematol*. 2004;125(5):590-600.
- (66) Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*. 1990;346(6280):194-197.
- (67) Rauscher FJ, III, Morris JF, Fredericks WJ et al. Characterization of monoclonal antibodies directed to the amino-terminus of the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. *Hybridoma*. 1998;17(2):191-198.
- (68) Rauscher FJ, III, Morris JF, Tournay OE et al. Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science*. 1990;250:1259-1262.
- (69) Ravandi F, Estrov Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;12(2):340-344.
- (70) Rose EA, Glaser T, Jones C et al. Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell*. 1990;60(3):495-508.
- (71) San Miguel JF, Martinez A, Macedo A et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 1997;90(6):2465-2470.
- (72) Scharnhorst V, Van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*. 2001;273(2):141-161.

- (73) Smith SI, Weil D, Johnson GR et al. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, is upregulated by leukemia inhibitory factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells. *Blood*. 1998;91(3):764-773.
- (74) Svedberg H, Chylicki K, Baldetorp B et al. Constitutive expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in the leukemic cell line U937 blocks parts of the differentiation program. *Oncogene*. 1998;16(7):925-932.
- (75) Telerman A, Dodemont H, Degraef C et al. Identification of the cellular protein encoded by the human Wilms' tumor (WT1) gene. *Oncogene*. 1992;7(12):2545-2548.
- (76) Trka J, Kalinova M, Hrusak O et al. Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia*. 2002;16(7):1381-1389.
- (77) Tucker KA, Lilly MB, Heck L, Jr., Rado TA. Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood*. 1987;70(2):372-378.
- (78) Tuna M, Chavez-Reyes A, Tari AM. HER2/neu increases the expression of Wilms' Tumor 1 (WT1) protein to stimulate S-phase proliferation and inhibit apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. 2005;24(9):1648-1652.
- (79) Uzunel M, Ringden O. Poor correlation of kinetics between BCR-ABL and WT1 transcript levels after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33(1):47-52.
- (80) Van Dijk JP, Knops GH, Van De Locht LT et al. Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow. *Br J Haematol*. 2002;118(4):1027-1033.
- (81) Wang ZY, Qiu QQ, Deuel TF. The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J Biol Chem*. 1993;268(13):9172-9175.
- (82) Werner H, Rauscher FJ, III, Sukhatme VP et al. Transcriptional repression of the insulin-like growth factor I receptor (IGF-I-R) gene by the tumor suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF-I-R gene transcription start site. *J Biol Chem*. 1994;269(17):12577-12582.
- (83) Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I et al. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;98(4):1166-1173.
-

- (84) Yamagami T, Ogawa H, Tamaki H et al. Suppression of Wilms' tumor gene (WT1) expression induces G2/M arrest in leukemic cells. *Leuk Res.* 1998;22(4):383-384.
- (85) Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K et al. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood.* 1996;87(7):2878-2884.

Veröffentlichungen

Kerst G, Bergold N, Gieseke F et al. WT1 protein expression in childhood acute leukemia. *Am J Hematol.* 2008;83(5):382-386.

Kerst G, Bergold N, Viebahn S. et al. WT1 protein expression in slowly proliferating myeloid leukemic cell lines is scarce throughout the cell cycle with a minimum in G0/G1 phase. *Leuk Res.* 2008;32(9): 1393- 1399.

Danksagung

Bei allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanke ich mich sehr herzlich. Mein ganz besonderer Dank gilt:

Dr. med. Gunter Kerst für die Überlassung des Themas und die ausnehmend engagierte und ausführliche Betreuung dieser Arbeit. Er stand mir in allen Problemen mit Rat und Tat zur Seite, betreute mich mit Offenheit und Freundlichkeit und beriet mich in allen fachlichen Fragen auf sehr kompetente und motivierende Art.

Herrn Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger für das in mich gesetzte Vertrauen und seine Bereitschaft, das Gutachten zu dieser Doktorarbeit zu erstellen.

Herrn Prof. Dr. med. Dietrich Niethammer dafür, dass ich bereits während seiner Zeit im Labor der Kinderklinik arbeiten durfte.

Dr. med. Ingo Müller und seiner Arbeitsgruppe für das zur Verfügung stellen der Zelllinie CCRF-CEM und für die großartige Unterstützung, besonders beim Erlernen von Zellkultur, Immunfluoreszenz und Western Blot.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gernot Bruchelt und seiner Arbeitsgruppe für das zur Verfügung stellen der Zelllinien HL-60, K562, PLB 985 und KG1a und für die fachliche Unterstützung beim Erlernen von Zellkultur.

Elaine Coustan-Smith und ihrer Arbeitsgruppe für das zur Verfügung stellen der in dieser Arbeit verwendeten Permeabilisierungslösung.

Allen Mitarbeitern des Labors der Kinderklinik Tübingen, die mich auf dem Weg begleitet haben und mir mit vielen Ratschlägen zur Seite gestanden sind. Ein spezielles Dankeschön in dieser Hinsicht geht an Dr. rer. nat. Jutta Zwicker, Dr. rer. nat. Susanne Viebahn, Dr. rer. nat. Friederike Gieseke, Alexandra Staiber, Nadine Kemmler, Dr. med. vet. Iris Schwantzer, und Henrik Grabner, für die wunderschöne gemeinsame Zeit im Labor, im Casino und bei diversen Spieleabenden.

Dr. rer. nat. Susanne Viebahn für die Vorab-Durchsicht dieser Arbeit.

Kerstin und Albrecht Bergold für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Philipp Benzenhöfer, der meine 1000 Fragen beim Formatieren geduldig beantwortete und auch sonst immer für mich da war.