

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Hämatologie und Onkologie  
Direktor: Univ.-Prof. W. E. Berdel

# **Die klinische Bedeutung des humanen amino-enhancer-of-split-Proteins in der akuten myeloischen Leukämie**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Stahlhoff, Christoph  
aus Arnsberg

2010

**Gedruckt mit Genehmigung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ-Prof. Dr. med. C. Müller-Tidow

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. R. Sindermann

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Hämatologie und Onkologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. C. Müller-Tidow  
Koreferent: Prof. Dr. J. R. Sindermann

## ZUSAMMENFASSUNG

### **Die klinische Bedeutung des humanen amino-enhancer-of-split-Proteins in der akuten myeloischen Leukämie**

Christoph Stahlhoff

Das humane amino-enhancer-of-split-Protein (hAES) spielt eine Rolle in der Ausdifferenzierung verschiedenster Zellreihen in der Embryogenese sowie im erwachsenen Organismus. Es gehört zu einer Familie von Korepressoren, die an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind. Hierzu gehören ebenso die Proteine TLE 1-4 (transducin-like-enhancer-of-split). Dem hAES-Protein wird eine hemmende Wirkung auf die TLE-Proteine zugeschrieben. Dadurch kommt es im Wnt/Wingless-Signalweg zu einer erhöhten Expression von Proteinen der Zellzyklusregulierung. Es wurde nachgewiesen, dass die Fusionsproteine der AML wie AML1-ETO, PML-RAR $\alpha$  und PLZF-RAR $\alpha$  zu einer Verstärkung im Wnt-Signalweg führen.

Ziel dieser Arbeit war es, die klinische Bedeutung der Expression von hAES herauszustellen. Hierzu wurden relevante klinische Parameter wie die Blastenzahl im Knochenmark bei Erstdiagnose, die Therapie usw. einbezogen. Weiterhin wurde untersucht, ob im Krankheitsverlauf eine Remission bestand, ein Rezidiv eingetreten ist oder ob der Patient verstorben ist.

Die Expression des hAES-Proteins wurde an Knochenmarkproben auf einem Tissue-Microarray analysiert. Die Proben wurden auf dem Schnitt mittels Immunhistochemie angefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Proben von gesundem Knochenmark dienten als Vergleich.

Bei AML-Patienten kommt es zu einer höheren Expression von hAES als bei Gesunden. Des Weiteren war festzustellen, dass Patienten mit einer höheren Expression in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ein signifikant besseres Überleben zeigen. Eine weitere Relation zwischen hoher hAES-Expression und einem besseren Überleben fand sich bei Patienten unter sechzig Jahren und bei Patientinnen. Dies war auch der Fall bei Patienten, die an Tag 16 der Chemotherapie weniger als fünf Prozent Blasten im Knochenmark aufwiesen, und bei Patienten in Remission. Patienten, die aus verschiedenen Gründen keine Therapie erhalten haben, zeigten eine niedrigere Expression von hAES.

Es ist also festzustellen, dass die vermehrte hAES-Expression bei AML-Patienten einen prognostischen Wert für den Krankheitsverlauf hat.

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1. Akute myeloische Leukämie (AML)	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Ätiologie	1
1.1.3. Hämatopoese	2
1.1.4. Pathogenese	5
1.1.5. Klassifikation	5
1.1.6. Klinik und Diagnostik	10
1.1.6.1. Symptome	10
1.1.6.2. Diagnostik	11
1.1.6.3. Prognosefaktoren	11
1.1.6.4. Therapie	12
1.2. humanes amino-terminal-enhancer-of-split-Protein (hAES)	16
1.2.1. Ontologie	16
1.2.2. Aufbau	16
1.2.3. Wirkmechanismus	17
1.2.4. Zusammenhang von hAES und AML	20
<b>2. Ziel der Arbeit</b>	24
<b>3. Material und Methoden</b>	25
3.1. Aufbau der Tabelle	25
3.1.1. Alter	25
3.1.2. Geschlecht	25
3.1.3. Diagnose	25
3.1.4. Primär/sekundär	25
3.1.5. Zytogenetik	25
3.1.6. Leukozyten	26
3.1.7. Thrombozyten	26
3.1.8. Hämoglobinwert	26
3.1.9. Laktatdehydrogenase	27
3.1.10. Blasten im peripheren Blut	27
3.1.11. Blasten im Knochenmark	27
3.1.12. Therapie	27
3.1.13. Blasten im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie	28
3.1.14. Remission	28
3.1.15. Rezidiv	28

3.1.16. Tod	28
3.1.17. Überlebenszeit	29
3.1.18. Herkunft der Daten	29
3.2. Tissue-Microarray	30
3.2.1. Anwendungsbereiche	30
3.2.2. Herstellung	30
3.2.3. Färbung	32
3.2.4. Auswertungskriterien	34
3.3. Computersoftware	35
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>36</b>
4.1. Darstellung der einzelnen Parameter	37
4.1.1. Alter und Geschlecht	37
4.1.2. Diagnose	38
4.1.3. Zytogenetik	38
4.1.4. Blutbildbefunde	40
4.1.4.1. Leukozyten	40
4.1.4.2. Thrombozyten	40
4.1.4.3. Hämoglobinwert	41
4.1.5. Laktatdehydrogenase	41
4.1.6. Blasten im peripheren Blut	42
4.1.7. Blasten im Knochenmark	43
4.1.8. Therapie und Therapieergebnisse	44
4.1.8.1. Blasten im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie	44
4.1.8.2. Remission	46
4.1.8.3. Rezidiv	47
4.1.8.4. Tod	48
4.2. hAES-Expression bei AML und normalem Knochenmark	49
4.2.1. hAES-Expression aller Proben	49
4.3. hAES-Expression in Bezug zu den einzelnen Parametern bei Patienten mit AML	52
4.3.1. Alter und Geschlecht	52
4.3.2. Diagnose	53
4.3.3. Zytogenetik	54
4.3.4. Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobinwert	54
4.3.5. Laktatdehydrogenase	54
4.3.6. Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark	54
4.3.7. Therapie und Therapieergebnisse	55
4.3.7.1. Blasten im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie	56
4.3.7.2. Remission	57
4.3.7.3. Rezidiv	57
4.3.7.4. Tod	58

4.4. Überlebensanalysen	59
4.4.1. signifikante Ergebnisse	59
4.4.1.1. Alter	59
4.4.1.2. Geschlecht	59
4.4.1.3. Diagnose	59
4.4.1.4. Therapie	60
4.4.1.5. Blasten im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie	61
4.4.1.6. Remission	61
4.4.1.7. Rezidiv	61
4.4.1.8. hAES-Expression „low“ und „high“	61
4.4.2. nicht signifikante Ergebnisse	62
<b>5. Diskussion</b>	<b>63</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>68</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>69</b>
<b>9. Literatur</b>	<b>70</b>
<b>10. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>11. Erklärung über selbständige Arbeit</b>	<b>77</b>





## **1. Einleitung**

Leukämien sind maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems, bei denen es zur Vermehrung von klonalen Zellen im Knochenmark und in den Organen des lymphatischen Systems kommt. Man unterscheidet die akuten von den chronischen Blutkrebserkrankungen. Es handelt sich hierbei um die Gruppen akute lymphatische Leukämie (ALL), chronische lymphatische Leukämie (CLL), akute myeloische Leukämie (AML) und chronische myeloische Leukämie (CML).

Des Weiteren unterscheidet man bei den Erkrankungen des Knochenmarks noch die myelodysplastischen Syndrome (MDS), bei denen es zu einer zunehmenden Insuffizienz des Knochenmarks kommt, sowie die myeloproliferativen Erkrankungen. Bei letzteren steht die Vermehrung z.B. der Thrombopoese bei der Essentiellen Thrombozytämie im Vordergrund (1).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der akuten myeloischen Leukämie.

### **1.1. Akute myeloische Leukämie (AML)**

#### **1.1.1 Epidemiologie:**

Die Erkrankung kann in jedem Lebensalter auftreten (14). Die Erkrankungsrate lag in den Jahren 2001-2005 in den USA bei 3,6 Fällen pro 100.000 Menschen pro Jahr. Die Inzidenz nimmt mit dem Lebensalter zu. Das mittlere Erkrankungsalter lag im oben genannten Zeitraum in den USA bei 67 Jahren (13;14).

Die Mortalität betrug in den USA im Zeitraum 2001-2005 2,8 Patienten pro 100.000 Menschen pro Jahr (13).

#### **1.1.2. Ätiologie:**

Etablierte Faktoren, die zur Entstehung der Erkrankung beitragen, werden im Folgenden erläutert. Es sind genetische, physikalische und chemische Ursachen zu nennen.

Eine familiäre Häufung ist bekannt. Das Down-Syndrom (Trisomie 21), das Klinefelter-Syndrom (XXY und Varianten) sowie das Patau-Syndrom (Trisomie 13) gelten als genetisches Risiko (14).

Ionisierende Strahlung gilt als auslösender Faktor für die Entwicklung einer AML. Eine Häufung von AML-Erkrankten zeigt sich bei den Überlebenden der Atombombenabwürfe von Hiroshima und Nagasaki im Jahre 1945 (11). Durch Radiotherapie und durch das früher verwendete Röntgenkontrastmittel Thorotrast kann ebenfalls eine AML auftreten. Des Weiteren gilt Benzol als Auslöser. In neuerer Zeit stellt sich heraus, dass das Rauchen von Zigaretten das Risiko zu erhöhen scheint, an AML zu erkranken. Früher waren außerdem Arbeiter in der Leder- und Gummiindustrie sowie in Autowerkstätten und Raffinerien betroffen. Antineoplastische Substanzen wie Alkylanzien, Anthrazykline und Podophyllotoxine, die zur Behandlung von anderen Krebsarten eingesetzt werden, sind ebenfalls als Ursachen zu betrachten (4).

Der Übergang von einem myelodysplastischen Syndrom oder einer myeloproliferativen Erkrankung in eine akute Leukämie ist möglich (1).

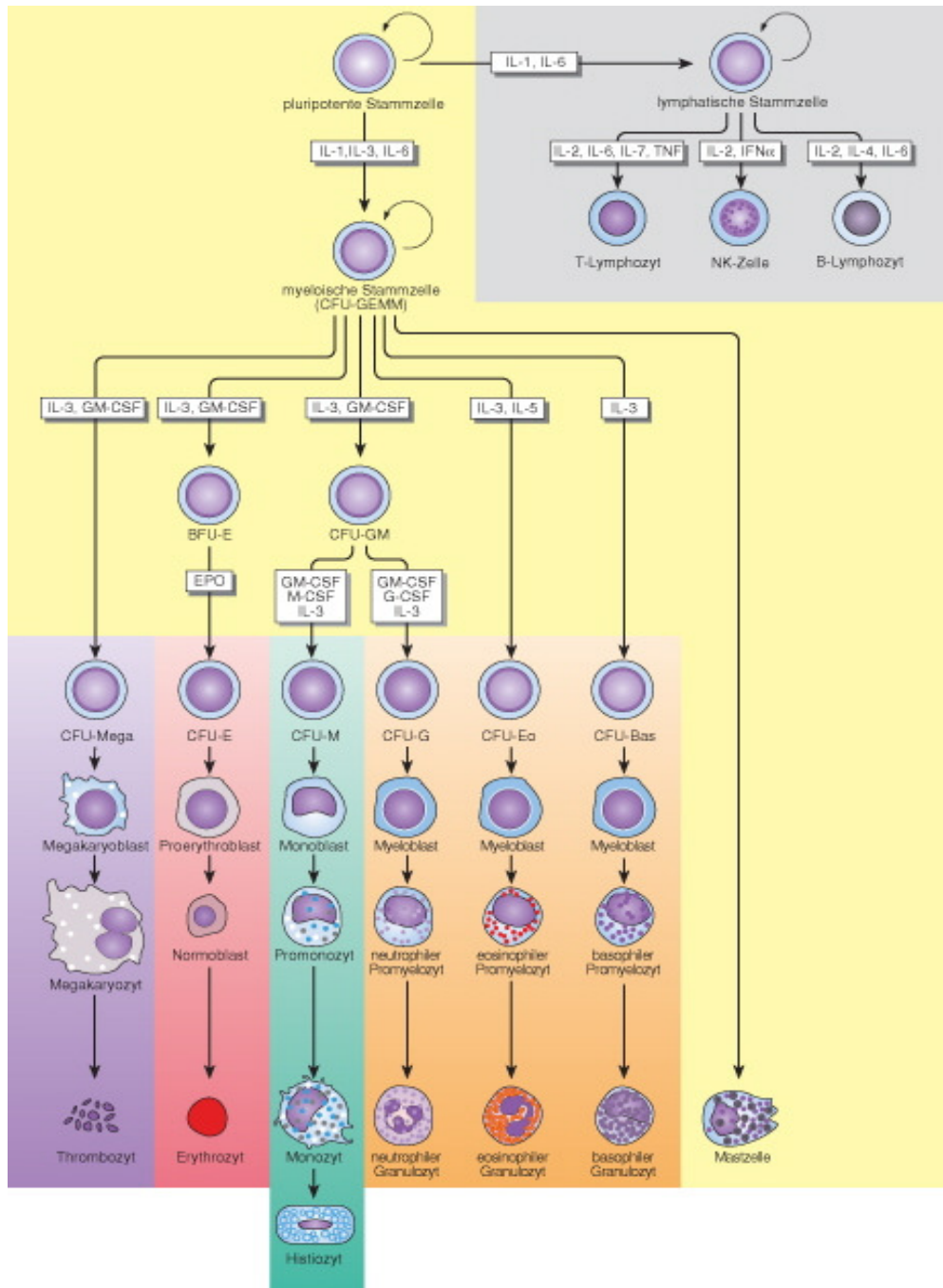
### **1.1.3. Hämatopoese**

Die Blutbildung (Hämatopoese) findet im ab dem 5./6. Fetalmonat im Knochenmark statt. Das Knochenmark besteht aus den hämatopoetischen Zellen und dem Stroma (Fettzellen, Endothelzellen, Osteoblasten, Osteoklasten). Die Fibroblasten bilden die Matrix, die hämatopoetische Wachstumsfaktoren (Interleukine (IL); Kolonie-stimulierende Faktoren für Granulozyten (G-CSF) und Makrophagen (M-CSF) sowie für beide Zellarten (GM-CSF)) bindet und sie in biologisch aktiver Form den hämatopoetischen Zellen präsentiert. Diese Faktoren werden überwiegend von T-Lymphozyten, Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet. Das in der Niere gebildete Erythropoetin (EPO) gehört ebenfalls zu den Faktoren, die die Blutbildung stimulieren.

Aus einer pluripotenten Stammzelle entwickeln sich die Blutzellen in den einzelnen Zellreihen. Man unterscheidet die myeloische von der lymphatischen Reihe, die jeweils die

verschiedenen Untergruppen, colony forming units (CFU), bilden. Aus diesen beiden Reihen entwickeln sich in der Granulozytopoese, Thrombozytopoese, Monozytopoese und Lymphopoese die einzelnen Blutzellen (1).

Abbildung 1 zeigt ein Schema der normalen Blutbildung.



**Abbildung 1:** Schema zur normalen Blutbildung (aus 1, S. 507) (IL, Interleukin; TNF, Tumornekrosefaktor; INF, Interferon; CFU-FEM, colony-forming unit granulocyte-erythroid-makrophage-megakaryocyte; BFU-E, burst forming unit erythroid; CFU-GM, colony-forming unit granulocyte-monocyte; EPO, Erythropoetin; M-CSF, Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor; G-CSF, Granulozyten-stimulierender Faktor; CFU, colony forming unit; NK-Zelle, natürliche Killerzelle)

#### **1.1.4. Pathogenese:**

Eine sich im Knochenmark befindliche hämatopoetische Stammzelle verändert sich derart, dass sie autonom proliferiert und Blasten in die Blutbahn ausschwemmt. Die Transformation der gesunden Zelle in eine maligne entartete Zelle kann auf unterschiedlichen Reifungsniveaus stattfinden. Bei Kindern und jüngeren Erwachsenen scheint dieser Vorgang im Stadium einer linienspezifischen Zelle zu passieren. Bei älteren Patienten oder insbesondere bei sekundären Leukämien findet diese Entartung früher, also auf der Ebene der pluripotenten Stammzelle, statt (19).

Bei der Entwicklung der AML spielen so genannte Fusionsproteine eine Rolle. Durch Chromosomenaberrationen können diese Proteine entstehen. Bei der AML sind mehrere Translokationen bekannt, die an der Pathogenese in der Weise beteiligt sind, dass sie die Differenzierung der Zellen stören (14).

Das AML1/ETO-Fusionprotein (Akutes myeloisches Leukämie Gen 1/englisch für eighty-two-one in Anlehnung an die Chromosomen 8 und 21) ist assoziiert mit der Translokation der Chromosomen 8 und 21 (t(8;21)). Die Translokation der Chromosomen 15 und 17 (t(15;17)) führt zur Bildung des PML-RAR $\alpha$ -Proteins (promyelocytic-leukemia-retenoic-receptor  $\alpha$ ). Bei der Inversion 16 (inv(16)) entsteht das CBF $\beta$ /MYH11-Protein (core-binding factor  $\beta$ /myosin heavy chain 11). Die Translokation t(11;17) geht mit der Bildung des PLZF-RAR $\alpha$ -Proteins (promyelocytic leukemia-zinc-finger-protein) einher.

Des Weiteren ist bei Translokationen im Bereich 11q23 (q, langer Chromosomenarm) eine Veränderung des MLL-Gens zu beobachten (14, 20).

Diese jeweiligen Fusionsproteine finden sich bei den einzelnen Subklassen der AML, die nun weiter beschrieben werden.

#### **1.1.5. Klassifikation:**

Es existieren zur Zeit zwei verschiedene Klassifikationssysteme der akuten myeloischen Leukämie.

Die Klassifikation der French-American-British-Group (FAB-Klassifikation) aus dem Jahre 1976 (Revision 1985) unterteilt 8 verschiedene Untergruppen. Zur Diagnose ist ein Blastenanteil im Knochenmark von 30% (Prozent) nachzuweisen. Nur ausnahmsweise darf der Anteil der Blasten an allen kernhaltigen Zellen im Knochenmark weniger als 30% betragen. 3% der Blasten müssen Myeloperoxidase-positiv sein (12). Dies ist ein Enzym, welches physiologisch in Granulozyten vorkommt und bei der Abwehr von Bakterien benutzt wird (1). HLA (human leukocyte antigen) sowie CD (clusters of differentiation) beschreiben Oberflächenproteine der Zellen, die zur Differenzierung genutzt werden. Es werden also die zytochemischen und zytologischen Unterschiede als Grundlage genutzt.

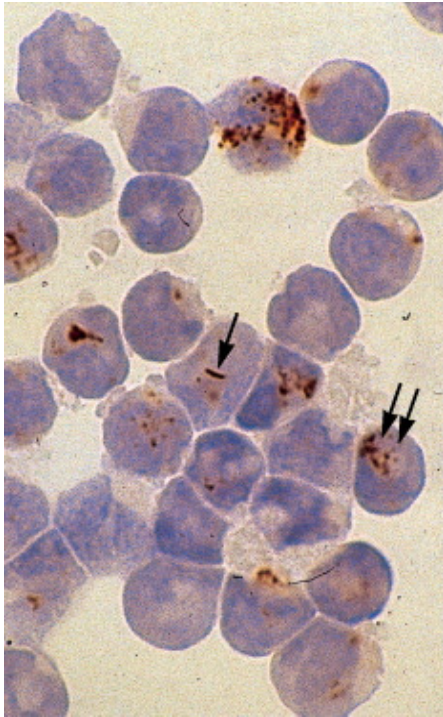
Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, welcher FAB-Subtyp mit welchen zytogenetischen und molekularen Aberrationen assoziiert ist. Die letzte Spalte gibt die Häufigkeit dafür an. Das AML1/ETO-Protein bzw. die t(8;21) findet sich bei der M1 und M2. Die t(15;17) mit dem PML-RAR $\alpha$ -Protein sind typisch für die M3. Bei der inv(16), die mit der M4eo einhergeht, kommt es zur Bildung des CBF $\beta$ /MYH11-Proteins.

Bei Aberrationen im Bereich 11q23 bei der M5a und M5b ist eine Veränderung des MLL-Gens (myeloid/lymphoid leukemia- oder mixed-lineage leukemia-Gen) zu beobachten.

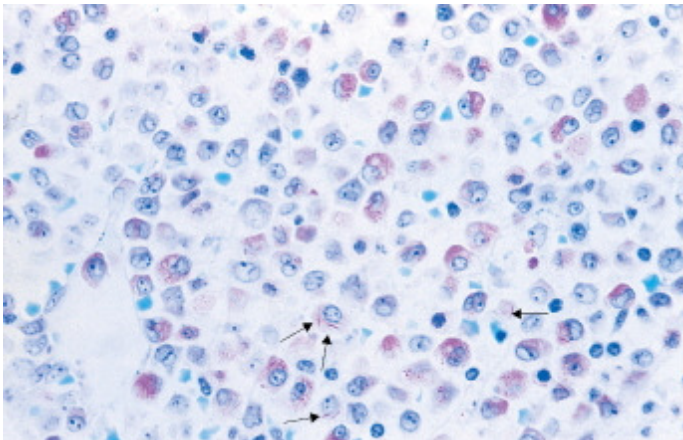
Man erkennt in der ersten Spalte außerdem, dass die M1, M2 und M4 häufiger vorkommen als die M5, M6 und M7.

**Tabelle 1:** Klassifikation der AML nach FAB (1976; Revision 1985) (1, 12) (POX, Myeloperoxidase; NEZ, nichterythrozytäre Zellen; CD, clusters of differentiation; HLA, human leukocyte antigen; MLL, myeloid/lymphoid leukemia- oder mixed-lineage leukemia-Gen; PML-RAR $\alpha$ , promyelocytic-leukemia-retenoic-receptor  $\alpha$ ; AML1/ETO, Akutes myeloisches Leukämie Gen 1/englisch für eight-twenty-one in Anlehnung an die Chromosomen 8 und 21; CBF $\beta$ , core-binding factor  $\beta$ ; MYH11, myosin heavy chain 11; inv(16), Inversion 16; t(15;17), Translokation der Chromosomen 15 und 17; t(8;21), Translokation der Chromosomen 8 und 21)

FAB-Subtyp und Häufigkeit in %	FAB-Kriterien			Assoziation mit			
	Granulozytopenese	Monozytopenese	Erythropoese	Immunologische Marker	Zytogenetik	Molekulargenetik	Häufigkeit
M0/minimale Differenzierung 5-10%	<10% POX <3%	<20%	<50%	Myeloisch positiv Lymphatisch negativ			
M1/Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung 10-20%	<10% POX >3%	<20%	<50%		t(8;21)	AML1/ETO	1,7%
M2/Myeloblastenleukämie mit Ausreifung 30-45%	>10%	<20%	<50%		t(8;21)	AML1/ETO	12,5%
M3/Promyelozytenleukämie 5-10%	Hypergranulär Auer-Stäbchen	<20%	<50%	HLA-DR negativ	t(15;17)	PML/RAR $\alpha$	98%
M4/myelomonozytäre Leukämie 20%	>20%	>20%	<50%				
M4eo mit Eosinophilen	>20% abnorme Eosinophile	>20%	<50%		Inv(16)/ t(16;16)	CBF $\beta$ /MYH11	100%
M5a/Monoblastenleukämie 5%	<20%	>80% unreif	<50%		11q23- Aberration	MLL-Aberration	31%
M5b/Monozytenleukämie 5%	<20%	>80% reif	<50%		11q23- Aberration	MLL-Aberration	17%
M6/Erythroleukämie 5%	>30% der NEZ sind Blasten	Variabel	>50%				
M7/Megakaryoblastenleukämie 5%	>30% Megakaryoblasten	Variabel	<50%	CD41 positiv/CD61 positiv			



**Abbildung 2:** FAB-Typ M1 (aus 1, S. 531). In den Blasten erkennt man einzelne Peroxidase-positive Granula (Doppelpfeil) und Auer-Stäbchen (Pfeil). Färbung: Myeloperoxidase, 1000-fache Vergrößerung



**Abbildung 3:** FAB-Typ M3 (aus 1, S. 531). Im hyperzellulären Knochenmark sind dicht gepackt die granulierten Promyelozyten zu erkennen mit den Auer-Stäbchen. Färbung: Giemsa, 400-fache Vergrößerung

Die Abbildungen 2 und 3 zeigen als Beispiele die FAB-Typen M1 und M3 in der Myeloperoxidase-Färbung und der Giemsa-Färbung. Die für die AML typischen Auer-



Stäbchen sind gut zu erkennen. Hierbei handelt es sich um Myeloperoxidase-haltige, azurophile kristalline Lysosomenbestandteile im Zytoplasma (1).

Die Klassifikation der WHO (World Health Organisation) kombiniert die Methoden der Zytomorphologie, Zytochemie und Immunphänotypisierung mit der Zyto- und Molekulargenetik sowie weiteren klinischen Faktoren. Daraus ergeben sich fünf Gruppen.

**Tabelle 2:** WHO-Klassifikation der AML (12) (MLL, myeloid/lymphoid leukemia- oder mixed-lineage leukemia-Gen; PML-RAR $\alpha$ , promyelocytic-leukemia-retenoic-receptor  $\alpha$ ; AML1/ETO, Akutes myeloisches Leukämie Gen 1/englisch für eight-twenty-one in Anlehnung an die Chromosomen 8 und 21; CBF $\beta$ , core-binding factor  $\beta$ ; MYH11, myosin heavy chain 11; inv(16), Inversion 16; t(15;17), Translokation der Chromosomen 15 und 17; t(8;21), Translokation der Chromosomen 8 und 21)

Hauptgruppe	Jeweilige Untergruppen
1. AML mit rekurrenten zytogenetischen Aberrationen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AML mit t(8;21)(q22;q22), AML1/ETO</li> <li>• Akute Promyelozytenleukämie (AML mit t(15;17)(q22;q11-12) und Varianten, PML/RAR<math>\alpha</math>)</li> <li>• AML mit abnormen Knochenmarkeosinophilen (inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q11), CBF<math>\beta</math>/MYH11)</li> <li>• AML mit 11q23 (MLL)-Aberrationen</li> </ul>
2. AML mit Multiliniendysplasie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AML mit vorangegangenem myelodysplastischem Syndrom</li> <li>• AML ohne vorangegangenes myelodysplastisches Syndrom</li> </ul>
3. AML und myelodysplastisches Syndrom, therapieassoziiert	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alkylanzienassoziiert</li> <li>• Epidophyllotoxinassoziiert (einige mögen lymphoid sein)</li> <li>• Andere Typen</li> </ul>
4. AML ohne weitere Spezifizierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Minimal differenzierte AML</li> <li>• AML ohne Reifung</li> <li>• AML mit Reifung</li> <li>• Akute myelomonozytäre Leukämie</li> <li>• Akute erythrozytäre Leukämie</li> <li>• Akute megakaryozytäre Leukämie</li> <li>• Akute basophile Leukämie</li> <li>• Akute Panmyelose mit Myelofibrose</li> </ul>
5. Leukämie ohne eindeutige Differenzierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Undifferenzierte akute Leukämie</li> <li>• bilineare akute Leukämie</li> <li>• biphänotypische akute Leukämie</li> </ul>

## **1.1.6. Klinik und Diagnostik:**

### **1.1.6.1. Symptome**

AML-Erkrankte stellen sich häufig mit unspezifischen Symptomen vor, die entweder langsam oder rasch beginnen können. Sie sind die Folgen der Anämie, der Leukozytose, der Leukopenie, einer Fehlfunktion der weißen Blutkörperchen sowie einer Thrombopenie. Bei einem großen Anteil der Patienten bestehen diese Symptome seit mehr als drei Monaten.

Schwäche und Müdigkeit sind bei Diagnosestellung am häufigsten zu nennen. Man findet sie bei der Hälfte der Patienten. Gehäuft ist auch eine Gewichtsabnahme bemerkbar. In bis zu 10% der Fälle ist Fieber nachweisbar mit und ohne Bezug zu einer Infektion. Blutgerinnungsstörungen zeigen sich in 5% der Fälle. Gelegentlich klagen die Patienten über Knochenschmerzen, Lymphadenopathie, Husten und Kopfschmerzen.

Selten sind es solide Tumoren, die der Patient bemerkt. Diese können sich in der Brust, im Uterus, im Ovar, in der Dura mater, im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge, im Mediastinum, in der Prostata, im Knochen oder in anderen Organen befinden. Solche Tumoren bezeichnet man dann als granulozytäre Sarkome. Bei einer t(8;21) ist dieses Symptom häufiger.

Im Rahmen der körperlichen Untersuchung lassen sich Fieber, eine Splenomegalie, Hepatomegalie oder Lymphadenopathie feststellen. Hinweise auf Infektionen und Hämorrhagien sind ebenfalls zu erheben. Die promyelozytäre Leukämie ist häufiger mit gastrointestinale Blutungen sowie intrapulmonalen oder intrakraniellen Hämorrhagien assoziiert. Bei der monozytären AML, bei hohen Leukozytenzahlen oder bei Thrombozytopenie sind Blutungen aufgrund einer Koagulopathie nachzuweisen. Bei 15% der Patienten finden sich retinale Hämorrhagien. Die M4 und die M5 zeigen häufiger Infiltrationen der Gingiva, der Haut, des Weichgewebes oder der Hirnhäute mit leukämischen Blasten (14).

#### **1.1.6.2. Diagnostik**

In den Laboruntersuchungen findet sich meist eine normochrome und normozytäre Anämie. Im Mittel findet sich ein Wert der Leukozyten von 15000 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  ( $\mu\text{l}$ , Mikroliter). Werte unter 5000 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  lassen sich bei 25-40% nachweisen, Werte über 100000/ $\mu\text{l}$  bei 20%. Bei weniger als 5% lassen sich keine leukämischen Zellen im Blut nachweisen. In 75% der Fälle findet man weniger als 100000 Thrombozyten/ $\mu\text{l}$ , bei 25% weniger als 25000 Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  (14).

Zusätzlich zur Bestimmung der Subtyps der AML durch eine Knochenmarkpunktion ist der allgemeine körperliche Status zu erheben, der die Untersuchung der Organsysteme umfasst (14). Des Weiteren ist die Erhebung von prognostischen Faktoren wie z.B. die Zytogenetik nötig (18). Zum Nachweis des Organbefalls stehen die Sonographie, die CT-/ MRT-Untersuchung sowie die Liquorpunktion zur Verfügung. Eine Untersuchung des Patienten auf Infektionen ist obligat. Im Labor wird die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) gemessen, die einen Marker für den Zellzerfall im Körper darstellt.

#### **1.1.6.4. Prognosefaktoren**

Das Erreichen einer kompletten Remission (CR) nach Chemotherapie ist von verschiedenen Faktoren abhängig und ist ein Maß für ein gutes Ansprechen auf die Therapie. Nach Untersuchung des Blutes und des Knochenmarks ist der Status der kompletten Remission wie folgt definiert: Im Blut befinden sich mehr als 1000 neutrophile Granulozyten/ $\mu\text{l}$  und die Thrombozytenzahl beträgt mehr als 100000 Thrombozyten/ $\mu\text{l}$ . Es liegt keine transfusionsbedürftige Anämie vor. Periphere Blasten im Blut sind nicht nachweisbar. Es sind weniger als 5% Blasten im Knochenmark zu finden und keine Auer-Stäbchen (myeloperoxidase-haltige Granula) nachzuweisen. Herde außerhalb des Knochenmarks fehlen. Der Status der kompletten Remission ist der wichtigste prognostische Faktor (1, 10, 14).

An Tag 16 der Chemotherapie wird im Allgemeinen eine erneute Knochenmarkpunktion durchgeführt. Liegt der Blastenanteil dabei unter 5%, so ist dies als ein gutes Ansprechen auf die Chemotherapeutika zu werten (12).

Weiterhin sind genetische Veränderungen wichtige Prognosefaktoren. Patienten, bei denen sich eine t(8;21), eine inv(16) oder eine t(15;17) nachweisen lassen, haben eine gute Prognose. Eine mittlere Prognose haben solche Patienten mit einem normalen Karyotyp. Ein komplexer Karyotyp (3 oder mehr Aberrationen in Abwesenheit einer t(8;21), inv(16)/t(16;16), t(15;17)) geht mit einer schlechten Prognose einher (10).

Molekulare Marker wie z.B. die interne Tandemduplikation (ITD) von FLT3 (Fms-like-tyrosine kinase 3) sprechen ebenfalls für eine schlechte Prognose (14).

Eine niedrige Leukozytenzahl sowie eine niedrige LDH-Aktivität sprechen für eine günstige Prognose (4).

Mit höherem Lebensalter (>60 Jahre) bei Erstdiagnose nimmt die Wahrscheinlichkeit ab, eine komplette Remission zu erreichen. Dies ist zum einen in der unterschiedlichen Biologie der Erkrankung bei diesen Patienten zu begründen. Das MDR1-Protein (Multidrug-Resistance-Pumpe 1) ist häufiger exprimiert. Dieses Protein befördert Medikamente aus dem Zytosol über die Plasmamembran in das Interstitium. Dadurch bedingt können die Chemotherapeutika nicht so gut wirken. Die Toleranz für eine radikale Therapie ist zusätzlich durch chronische oder interkurrierende Erkrankungen limitiert (19). Für diese Patientengruppe ist noch keine Risikoeinteilung entwickelt worden (10).

#### **1.1.6.5. Therapie:**

Man unterscheidet in der Behandlung der AML die supportive von der antileukämischen Therapie.

Die supportive Therapie versucht, die Komplikationen der Erkrankung selbst sowie die der im nächsten Absatz näher erläuterten Chemotherapie zu behandeln. Die supportive Therapie umfasst unter anderem die Behandlung von opportunistischen Infektionen durch Bakterien, Viren und Pilze. Bei Blutungskomplikationen werden Erythrozyten,

Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren substituiert (4). Der Einsatz von G-CSF oder GM-CSF zur Verkürzung der Zeit der Leukopenie hat nicht immer zu einer Verminderung der Infektionsrate geführt. In vielen Studien konnte kein Effekt auf die Rate der kompletten Remission, des krankheitsfreien Überlebens oder des Gesamtüberlebens festgestellt werden (14).

Die antileukämische Behandlung, bzw. Chemotherapie hat zum Ziel, die Krankheitsfreiheit zu erreichen und möglichst lange zu erhalten. Man unterscheidet drei Phasen der Behandlung.

Zunächst wird eine Induktionstherapie durchgeführt. Hierbei kommt es neben der Knochenmarkaplasie auch zur Zerstörung der leukämischen Blasten. Es werden verschiedene Substanzen eingesetzt in unterschiedlichen Reihenfolgen. Die Dosis pro Tag (d) wird auf Quadratmeter der Körperoberfläche ( $m^2KOF$ ) bezogen berechnet. Es gibt das TAD-Schema, bestehend aus den Substanzen 6-Thioguanin, Cytosin-Arabinosid und Daunorubicin für neun Tage. Auch die Therapie aus Hochdosis Cytosin-Arabinosid und Mitoxantron über 5 Tage ist üblich (HAM-Schema). Bis 2004 wurden Patienten in Münster vorwiegend nach diesen Schemata behandelt. Dabei sollte bei Patienten unter 60 Jahren nach Möglichkeit eine Doppelinduktionstherapie nach dem TAD-HAM-Schema oder dem HAM-HAM-Schema durchgeführt werden. Bei Patienten über 60 Jahren wurden das HAM- oder TAD-Schema eher allein angewendet (4).

Beim 7+3-Schema handelt es sich um die Kombination von Daunorubicin mit Cytosin-Arabinosid über 7 Tage. Dies ist zur Zeit die Standardtherapie des Kompetenznetzes akute und chronische Leukämie. Sie ist für Patienten im Alter von 18-60 Jahren definiert. Ältere Patienten sollten nach genauer internistischer Untersuchung nach Möglichkeit ebenfalls mit einer intensiven Therapie behandelt werden, da die Überlebenszeit dadurch deutlich länger ist als mit einer palliativen Behandlung (10).

Bei der M3 führt die zusätzliche Anwendung der all-trans-Retinolsäure (ATRA) zur Ausdifferenzierung der Blasten und erbringt so eine Remissionsrate von über 90%.

Lässt sich durch die Induktionstherapie eine CR erreichen, folgt die Konsolidierungstherapie. Diese besteht z.B. im Standardarm des Kompetenznetzes akute und chronische Leukämien aus drei Zyklen hochdosiertem Cytosin-Arabinosid im Abstand von mindestens vier Wochen (10).

In der daran anschließenden Erhaltungstherapie werden die Therapiekurse im Abstand von vier bis sechs Wochen mit geringerer Intensität durchgeführt (4).

Eine zusätzliche Behandlungsmöglichkeit bietet die allogene oder autologe Knochenmarktransplantation. Die allogene Transplantation wird vorwiegend bei Patienten unter 55 Jahre in CR und vorhandenem Geschwisterspender angewendet. Sie ist der alleinigen Chemotherapie überlegen. Zur vorherigen Myeloablation wird eine Hochdosischemotherapie mit oder ohne Ganzkörperbestrahlung notwendig. Die autologe Transplantation zeigte bei Patienten in erster Remission keine Überlegenheit (4).

Zur Evaluation des Therapieergebnisses werden folgenden Begriffe benutzt. Wie oben schon erwähnt, hat die Chemotherapie zum Ziel, eine komplette Remission (CR) zu erreichen. Unter kompletter Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration (CRi) versteht man, dass die Anforderung an eine CR weitgehend erfüllt sind. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten liegt aber unter  $1000/\mu\text{l}$  bzw. die Zahl der Thrombozyten unter  $100000/\mu\text{l}$ . Bei der partiellen Remission (PR) kommt es zur Regeneration der Hämatopoese ( $>1000$  neutrophile Granulozyten/ $\mu\text{l}$ , Thrombozyten  $>100000/\mu\text{l}$ ). Es erfolgt eine Reduktion der Blasten im Knochenmark auf Werte zwischen 25-50% des Ausgangswertes oder bei initialen Werten zwischen 20 und 49% auf mindestens 50%. Eine extramedulläre Manifestation bildet sich ebenfalls zurück. Refraktäre AML (RD, refractory disease) bedeutet, dass sich keine CR, CRi oder PR erzielen ließen. Man spricht von einem Früh Tod bzw. early death (ed), wenn der Patient während oder spätestens 7 Tage nach Abschluss der Chemotherapie verstorben ist. Ein hypoplastischer Todesfall liegt vor, wenn der Todesfall später als 7 Tage nach Abschluss der Chemotherapie ohne Regeneration der Hämatopoese auftritt. Ein Rezidiv ist durch ein Wiederauftreten der AML nach CR definiert. Es lassen

sich Blasten im peripheren Blut oder mehr als 5% Blasten im Knochenmark nachweisen. Des Weiteren kann es zum Auftreten einer extramedullären Manifestation kommen. Die Therapie des Rezidivs erfordert meist eine allogene Knochenmarktransplantation. Der Erfolg einer erneuten Induktionstherapie kann abhängig von Risikofaktoren abgeschätzt werden, so dass man daran die Notwendigkeit einer Transplantation anpasst (10).

## **1.2. Das humane aminoterminal-enhancer-of-split-Protein**

### **1.2.1. Ontologie**

Das Groucho-Protein in der Fliege, *Drosophila*, ist der Begründer einer konservierten Familie von Korepressoren in der Transkription (2). Korepressoren sind Proteine, die die Transkription verschiedener Gene der Desoxyribonukleinsäure (DNS) abschwächen oder unterdrücken. Dabei binden sie aber nicht selbst an der DNS, sondern benötigen hierzu andere Transkriptionsfaktoren oder Mechanismen (9). Mitglieder der Groucho-Familie werden in vielen Organismen gefunden; so auch z.B. im Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) sowie in Wirbeltieren (2).

In der Maus und im Menschen werden vier lange homologe Proteine und ein homologes kurzes Protein kodiert. In der Maus sind dies die groucho-ähnlichen Proteine Grg-1, Grg-2, Grg-3, Grg-4 (Grg, Groucho-Protein) bzw. beim Menschen TLE-1, TLE-2, TLE-3, TLE-4 (TLE, transducin-like-enhancer-of-split) für die langen Homologen sowie Grg-5 bzw. hAES (humanes amino-terminal-enhancer-of-split Protein) für das kurze Homologe (2).

### **1.2.2. Aufbau**

Die Grg-/TLE-Proteine sind dem Groucho-Protein von *Drosophila* in den funktionellen Domänen ähnlich. Man unterscheidet fünf Domänen (2). Carboxyterminal befindet sich eine konservierte WD-Domäne für die Protein-Protein-Interaktion. Dieser Abschnitt besteht aus mehreren WD-Wiederholungen (W steht für Tryptophan, D für Aspartat) (6). Aminoterminal befindet sich die so genannte Q-Domäne, bestehend aus vermutlich zwei alpha-helikalen Abschnitten. Die Q-Domäne ist für die Homo- oder Heterotetramerisation der Groucho-/TLE-Proteine untereinander nötig. Dies ist Voraussetzung für die Repression. Außerdem ist es an dieser Stelle möglich, dass die kurzen Proteine in Interaktion mit den langen treten und sie so in einem Komplex inaktivieren oder abschwächen (6).

Zwischen der WD- und der Q-Domäne gibt es weniger konservierte Regionen. Neben der Q-Region befindet sich die GP-Region, die für die Assoziation mit Transkriptionsfaktoren



von Bedeutung ist (2). Darauf folgt die CcN-Region, der eine Aufgabe für die Kernlokalisierung der sich im Zellkern befindlichen Groucho-/TLE-Proteine zugeschrieben wird. Die folgende SP-Region ist auch an der Repression beteiligt (6).

Die langen Proteine (TLE-1 bis TLE-4 bzw. Grg-1 bis Grg-4) bestehen aus allen oben genannten Regionen. Das hAES-Protein hingegen sowie das Grg-5-Protein bestehen nur aus den oben erwähnten aminoterminalen Q- und GP-Domänen. Ihnen fehlen große Teile der variablen Region sowie die WD-Domäne. Inwieweit sich die kurzen Proteine im Kern und im Zytoplasma befinden, bleibt strittig, da ihnen die CcN-Region mit der Kernlokalisationssequenz fehlt (6).



Abbildung 4: Schema des Aufbaus von TLE 1-4



Abbildung 5: Schema des Aufbaus von hAES

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen den Aufbau der Proteine von carboxy- nach aminoterminal. Anhand der Farbdarstellung ist gut erkennbar, welche Domänen die kurzen und langen Mitglieder der Familie gemeinsam haben.

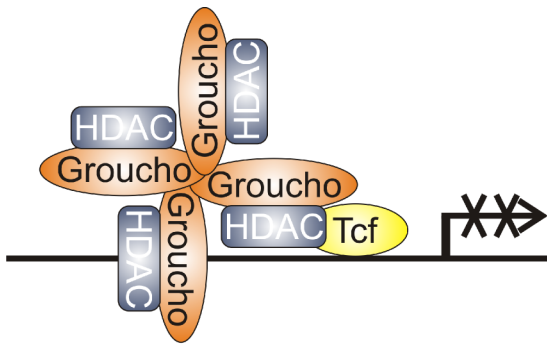
### **1.2.3. Wirkmechanismus**

Es gibt zwei Wege, auf denen die Grg-Proteine die Transkription reprimieren können.

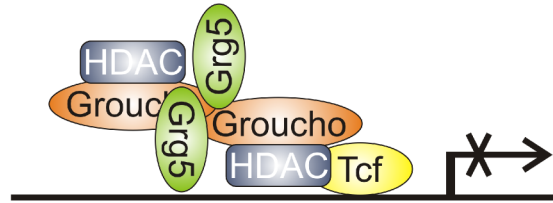
Zum einen kann eine Histondeacetylase (HDAC) gebunden werden. Durch dieses Enzym wird die Chromatinstruktur verdichtet und eine Transkription kann nicht mehr stattfinden (2). Die Groucho-/TLE-Proteine können zum anderen direkt mit Transkriptionsfaktoren in Verbindung treten und deren Aktivität beeinflussen (6). Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören zum Beispiel die basischen Helix-Loop-Helix-Proteine verschiedener Organismen.

Diese binden teils über ihr C-terminales WRPW-Motiv die Grg-/TLE-Proteine an der SP-Domäne und unterdrücken so die Transkription im Notch-Signalweg (7; 2). Dieser wird für die Zell-Zell-Kommunikation benötigt bei der Zelldifferenzierung während des embryonalen und adulten Lebens (6).

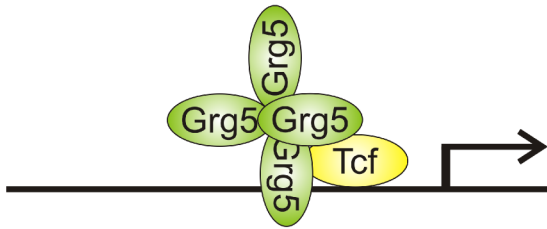
In Abbildung 6 A-C wird gezeigt, wie Grg-5 die Aktivität der anderen Grg-Proteine im sogenannten Wingless-/Wnt-Signalweg unterdrücken kann. Diese Signaltransduktionskaskade wird in der Embryogenese, bei der Krebsentstehung, aber auch bei den normalen physiologischen Prozessen im erwachsenen Organismus gebraucht. Hierbei spielen die Transkriptionsfaktoren der Tcf- und LEF-Familie eine Rolle (Tcf, T-cell-factor, LEF, lymphocyte-enhancer-binding-factor) (15). Durch Anlagerung von Grg-5 an die langen Proteine Grg-1-4 kann sich die Histondeacetylase (HDAC) nicht mehr so gut an die langen Grg-Proteine anlagern. Dadurch werden weniger Acetylreste von den Histonen entfernt und es kann mehr Transkription stattfinden. Der Grad der Derepression durch Grg-5 ist von der Anzahl an gebundenem Grg-5 an die langen Grg-Proteine und von der Aktivität im Wnt-Signalweg abhängig (2, 15). Wenn  $\beta$ -Catenin an Tcf (Abbildung 4 D) bindet kommt es zur Transkription (2).  $\beta$ -Catenin ist das letzte Protein im Wnt-Signalweg. Diese Kaskade wird in Abschnitt 1.2.4. erläutert (15).



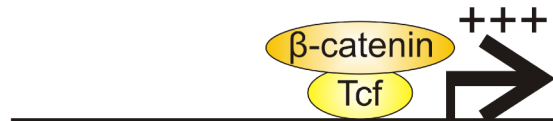
A) **starke** Repression



B) **moderate** Repression



C) **keine** Repression



D) Transkription



*Long corepressor Grg binding to HDAC*



*Short de-repressor Grg-5*



*DNA binding transcription factor Tcf*



*Transcriptional co-activator beta-Catenin*

### Legende

**Abbildung 6:** Schema zum Mechanismus der TLE-Transkriptionshemmung sowie zur hemmenden Wirkung von hAES auf TLE 1-4 (A-C); Transkription durch Bindung von  $\beta$ -Catenin an Tcf (D) ( nach 2)

#### **1.2.4. Zusammenhang von hAES und AML**

Wie oben erwähnt spielt der Wnt-Signalweg eine Rolle bei der Pathogenese der AML. In hämatopoetischen Stammzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen sorgt der Wnt-Signalweg für die Selbsterneuerung und Proliferation der Zellen. Eine Inhibition dieses Signalwegs führt zu einem verminderten Wachstum dieser Zellen. Die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in Mäusen wird durch die Wnt-Proteine geblockt.

Insgesamt gibt es drei verschiedene intrazelluläre Wege der Signaltransduktion für Wnt. Dies sind der kanonische Weg, der Weg mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und der planar-cell-polarity-Signalweg.

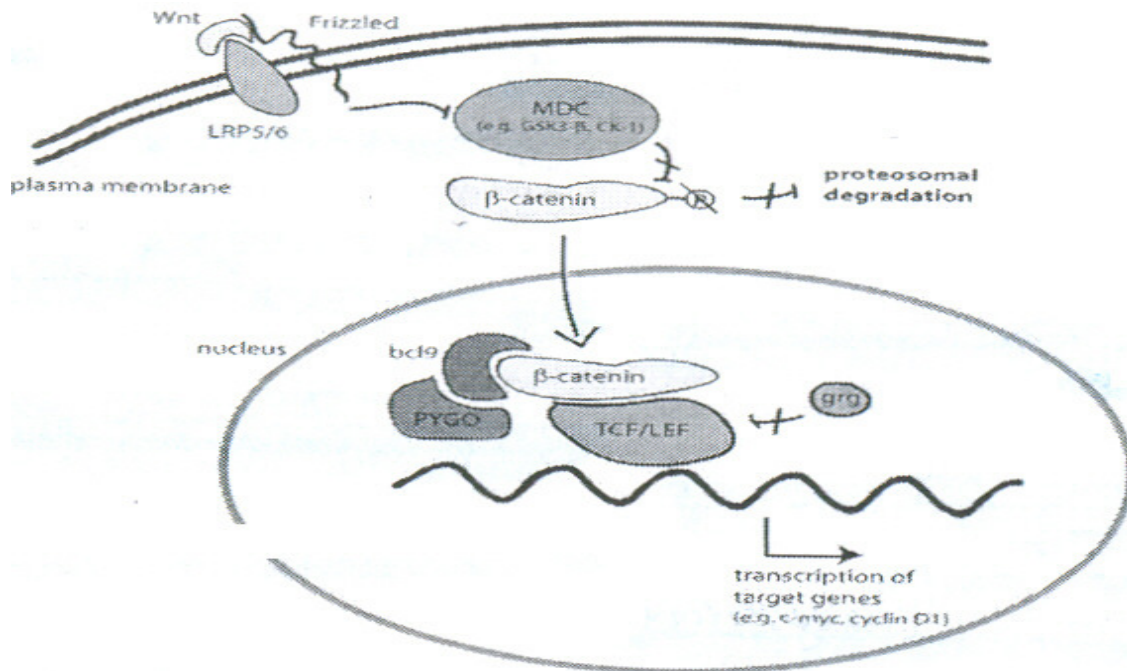
Die Selbsterneuerung geschieht über den kanonischen Signalweg. Dieser wird nun im Folgenden genauer erläutert.

Das Schlüsselprotein in dieser Signaltransduktionskaskade ist das oben schon einmal erwähnte  $\beta$ -Catenin. Es handelt sich hierbei um ein Protein, welches durch einen Multienzymkomplex (multiprotein destruction complex, MDC) bestehend aus den Proteinen Axin, APC (adenomatous polyposis coli), GSK3 $\beta$  (glykogen-synthase kinase 3 $\beta$ ) und CK1 (casein-kinase 1) ständig zersetzt wird. Dadurch besitzt es eine geringe Halbwertszeit.

In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird das  $\beta$ -Catenin, nachdem es durch Axin und APC gebunden wurde, phosphoryliert mittels GSK3 $\beta$ . Das führt zur Erkennung durch das  $\beta$ -TRCP ( $\beta$ -transducin-repeat-containing-protein), zur Bindung an Ubiquitin und zur anschließenden Destruktion im Proteasom. Aus diesem Grunde bleiben die Mitglieder der Tcf-/LEF-Proteinfamilie im Nukleus inaktiviert, weil sie weiterhin durch die Grg-Proteine gehemmt werden.

Kommt es zur Bindung eines Wnt-Liganden an den Frizzled- und LRP5/6-Rezeptor (LDL-receptor related protein) an der Plasmamembran, wird der Multienzymkomplex auf einem noch unverständlichen Wege destabilisiert und  $\beta$ -Catenin kann nicht phosphoryliert werden. Der intrazytoplasmatische Spiegel an unphosphoryliertem  $\beta$ -Catenin steigt an und  $\beta$ -Catenin transloziert in den Zellkern, wo es die Grg-Repressoren verdrängt und so als Co-Aktivator für Tcf-/LEF-Gene wirkt. Die Aktivität für die Transkription von  $\beta$ -Catenin

hängt außerdem noch von zwei weiteren Kernproteinen ab. Dies sind PYGO und Bcl9, welche als Protoonkogene gelten. Die Aktivität dieses Signalwegs wird auf mehreren Ebenen reguliert (12). Abbildung 7 zeigt den Wnt-Signalweg.



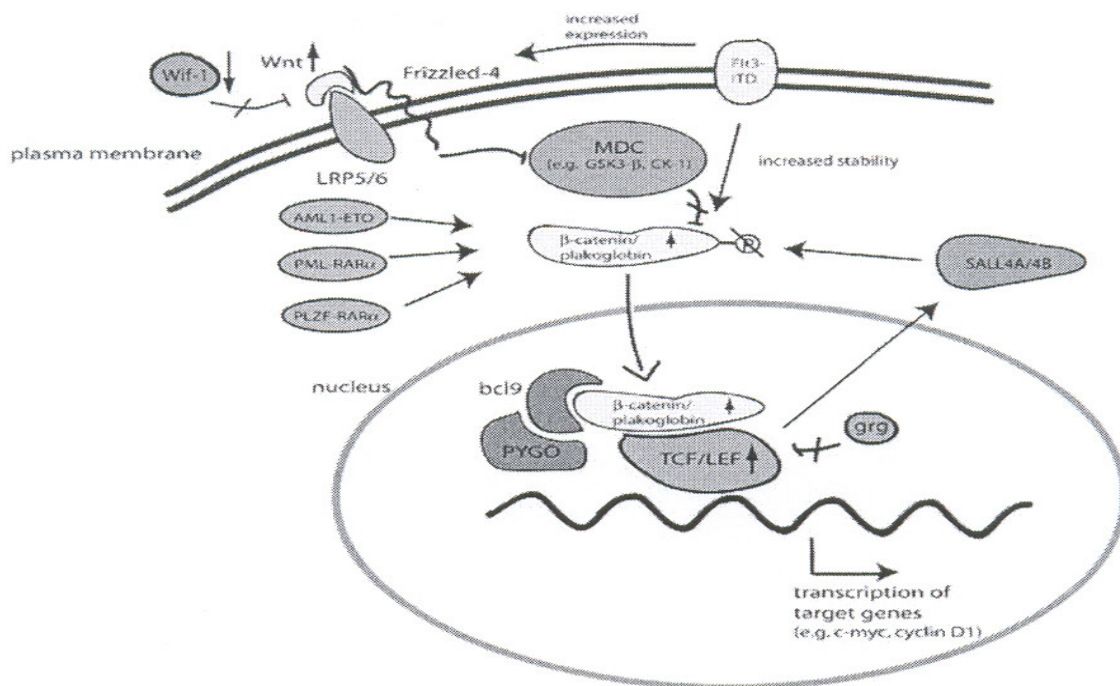
**Abbildung 7:** Der Wnt-Signalweg (12) (CK1, Casein Kinase 1; grg, Groucho-Proteine; GSK3 $\beta$ , glykogensynthase kinase 3 $\beta$ ; LRP5/6, LDL-receptor related protein; LEF, lymphocyte-enhancer-binding factor; MDC, multiprotein destruction complex; PYGO, pygopus, Tcf, T-cell factor)

Ein dysregulierter Wnt-Signalweg wird in Verbindung mit Karzinogenese gebracht, da mehrere Transkriptionsziele von Wnt bekannte Onkogene (z.B. cyclin D1, c-myc) für epitheliale Tumoren sind (15).

Durch Fusionproteine in der AML wie AML1-ETO, PML-RAR $\alpha$  und PLZF-RAR $\alpha$  werden Gene aktiviert, die im Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg stehen (12).

Abbildung 8 zeigt den Wnt-Signalweg in der AML. Bei verminderter Aktivität von Wif 1 (Wnt inhibitory factor 1) durch Promotormethylierung kommt es zu vermehrter Aktivität im Wnt-Signalweg. Des Weiteren kann die interne Tandemduplikation der Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3-ITD) die Anzahl an Frizzled4-Rezeptoren an der Plasmamembran

sowie den intrazytoplasmatischen Spiegel an Plakoglobin erhöhen. Plakoglobin ist ein Konservatorium für die Tcf-/LEF-Transkriptionsfaktoren und erhöht so die Transkriptionsrate an Genen wie cyclin D1 und c-myc, welche als Onkogenen gelten. Die in der AML bekannten Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR $\alpha$  und PLZF-RAR $\alpha$  erhöhen ebenfalls den Spiegel an Plakoglobin. Schließlich ist in der AML gezeigt worden, dass zwei Isoformen des Onkogens SALL (SALL 4A/4B) vermehrt vorliegen. SALL 4A/4B binden an  $\beta$ -Catenin führen so zu einer erhöhten Wnt-Aktivität. Ebenso wird SALL4 direkt durch Tcf/LEF im Wnt-Signalweg aktiviert (15).



**Abbildung 8:** Wnt-Signalweg in der AML (12) (CK1, Casein Kinase 1; grg, Groucho-Proteine; GSK3 $\beta$ , glykogen-synthase kinase 3 $\beta$ ; LRP5/6, LDL-receptor related protein; LEF, lymphocyte-enhancer-binding factor; MDC, multiprotein destruction complex; PYGO, pygopus, Tcf, T-cell factor; Wif-1, Wnt inhibitory factor 1; Flt3-ITD, interne Tandemduplikation der Fms-like tyrosine kinase 3)

Aus den obigen Ausführungen erkennt man, dass es in der Entstehung von malignen Erkrankungen zu einer unkontrollierten Zellproliferation und einem unkontrolliertem Zellzyklus kommt. Daran sind oft mehrere Signalwege beteiligt. Einer von ihnen ist der Wnt-Signalweg, der in Zusammenhang mit hämatologischen Tumoren gesehen wird. Es ist

aus den Abbildungen 5 und 6 ersichtlich, dass hier Beziehungen zu den Proteinen TLE-1-4 sowie zu hAES bestehen. Weitergehende Untersuchungen zu den Gründen der Entstehung einer AML bei verändertem Wnt-Signalweg sind Gegenstand der derzeitigen Forschungen.

## **2. Ziel der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich die Expression des humanen amino-enhancer-of-split-Proteins auf die klinischen Parameter wie z.B. das Überleben auswirkt. Die Parameter wurden in einer Tabelle zusammengefasst.

Mittels Immunhistochemie wurde die Proteinexpression von hAES auf einem Tissue-Microarray gemessen. Ein Vergleich mit gesunden Knochenmarkproben wurde durchgeführt, um einen möglichen Unterschied zu analysieren.

Die klinischen Parameter wurden in Beziehung zur Expression gesetzt, um die Bedeutung von hAES abzuschätzen.



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Aufbau der Tabelle**

Um die klinische Bedeutung des hAES-Proteins zu erforschen, ist die Sammlung der medizinischen Befunde der einzelnen Patienten zwingend erforderlich. Hierzu wurde eine Tabelle mit den wichtigsten relevanten Daten erstellt. Die Parameter werden nun im Folgenden dargestellt.

##### **3.1.1. Alter**

Es wurde das Alter der Patienten bei Erstdiagnose aufgenommen. Eine Unterteilung in die Gruppen mit Patienten über und unter 60 Jahren wurde vorgenommen..

##### **3.1.2. Geschlecht:**

Männliche und weibliche Patienten wurden unterschiedlich kodiert.

##### **3.1.3. Diagnose**

Unter diesem Punkt wurde die Einteilung der FAB-Klassifikation von M0 bis M7 übernommen.

##### **3.1.4. Primär/sekundär**

Diese Einteilung berücksichtigt die Entstehung der AML. Sekundär bedeutet hier, dass die AML auf dem Boden eines myelodysplastischen Syndroms oder durch die Chemo- oder Strahlentherapie einer anderen bösartigen Erkrankung entstanden ist.

##### **3.1.5. Zytogenetik**

Die Karyotypanalyse ist eine wichtige Untersuchung, um den Patienten in eine Prognoseklasse einordnen zu können (10, 14). Es wurden die Gruppen „normaler

Karyotyp“, „chromosomale Aberrationen“ und „komplexer Karyotyp“ unterschieden. Außerdem gibt es noch die Untergruppen mit „inv(16)“, „t(15;17)“ und „t(8;21)“, die die chromosomalen Aberrationen darstellen, bei denen es zur Bildung von Fusionsproteinen kommt.

### **3.1.6. Leukozyten**

Die Einteilung wurde anhand der Normalwerte im peripheren Blut laut dem Labor der Universitätsklinik Münster vorgenommen. Der Normwert liegt bei 4000-10000 Leukozyten/ $\mu$ l. Zahlen unter 4000 Leukozyten/ $\mu$ l werden als Leukopenie, Werte über 10000 Leukozyten/ $\mu$ l als Leukozytose bezeichnet.

Die Befunde stammen vom Tag der Erstdiagnose.

### **3.1.7. Thrombozyten**

Die Schweregradeinteilung der Thrombozytopenie stützt sich auf die Veröffentlichung des Netzwerks für angeborene Störungen der Blutbildung (22.08.2007). Eine milde Thrombozytopenie liegt bei Werten von 50000-100000 Thrombozyten/ $\mu$ l, eine mittelschwere bei 20000-50000 Thrombozyten/ $\mu$ l und eine schwere bei Werten unter 20000 Thrombozyten/ $\mu$ l vor. Der Normwert von 150000-350000 Thrombozyten/ $\mu$ l stammt aus dem Labor der Universitätsklinik Münster.

Die Befunde stammen vom Tag der Erstdiagnose.

### **3.1.8. Hämoglobinwert (Hb)**

Der Normwert für Hämoglobin von 14-16 g/dl für Männer bzw. 12-16 g/dl bei Frauen orientiert sich ebenfalls an den Werten der Universitätsklinik Münster. Die Einteilung erfolgt in Hb > 8 g/dl unter Hb < 8g/dl. Diese Einteilung wurde in Anlehnung an die Arbeit von Chen et al. (2005) vorgenommen, in der verschiedene prognostische Faktoren bei der AML untersucht wurden.

Die Befunde stammen vom Tag der Erstdiagnose.

### **3.1.9. Laktatdehydrogenase**

Die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) gibt Aufschluss über einen Zellzerfall im Körper. Der Normwert von 240 U/l (Unit/Liter) stammt aus dem Labor des Universitätsklinikums Münster. Die Unterteilung erfolgt in die Gruppen „Normwert“, „240-480 U/ml“ und >480 U/ml. 480 U/ml entspricht somit dem doppeltem Normwert.

Die Befunde stammen vom Tag der Erstdiagnose.

### **3.1.10. Blasten im peripheren Blut**

Diese Werte werden in Zehnerschritten dargestellt. Laut Renz-Polster et al.(2004) finden sich im peripheren Blut normalerweise keine Blasten.

Die Befunde stammen vom Tag der Erstdiagnose.

### **3.1.11. Blasten im Knochenmark**

Zur Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie muss der Blastenanteil aller kernhaltigen Zellen im Knochenmark über 30% liegen. Nur in Ausnahmefällen darf dieser Wert unterschritten werden (10). Die Unterteilung erfolgt in Zehnerschritten von 0-100%.

### **3.1.12. Therapie**

Um eine Systematik in die verschiedenen Therapieregime zu erhalten, wurde eine Unterteilung in die Gruppen „keine Therapie“, „TAD/HAM“, „HAM“, „TAD“, „ATRA“ sowie „sonstige Therapie, unbekannt“ vorgenommen. TAD, HAM und ATRA bezeichnen die verschiedenen Chemotherapieschemata, wie sie in dem Abschnitt zur Therapie der AML oben zu finden sind. Diese Schemata wurden am häufigsten gefunden. Unter „sonstige Therapien, unbekannt“ sind z.B. das 7+3-Schema und die Therapie mit Gemtuzumab-Ozogamicin enthalten. Bei diesen Behandlungsformen war insgesamt eine zu geringe Fallzahl zu finden, sodass eine jeweils einzelne Darstellung nicht repräsentativ ist.

### **3.1.13. Blasten im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie**

An diesem Tag wird im Allgemeinen eine erneute Knochenmarkpunktion durchgeführt, um das Ansprechen auf die Chemotherapie anhand der Blastenanzahl zu bewerten.

### **3.1.14. Remission**

Der Status der kompletten Remission (CR) ist folgendermaßen definiert: Im Blut befinden sich mehr als 1000 neutrophile Granulozyten/ $\mu$ l und die Thrombozytenzahl beträgt mehr als 100000/ Thrombozyten/ $\mu$ l. Es liegt keine transfusionsbedürftige Anämie vor. Periphere Blasten im Blut sind nicht nachweisbar. Es sind weniger als 5% Blasten im Knochenmark zu finden und keine Auer-Stäbchen (myeloperoxidase--haltige Granula) nachzuweisen. Herde außerhalb des Knochenmarks fehlen (1, 10, 14).

Die Einteilung unterscheidet die Gruppen „komplette Remission“, „refraktäre AML“, „early death“ sowie „unbekannt“. Im Abschnitt 1.1.6.5 sind die jeweiligen Definitionen zu finden.

### **3.1.15. Rezidiv**

Kommt es nach dem Erreichen einer kompletten Remission zu einem Wiederauftreten der Erkrankung, so spricht man von einem Rezidiv. Es wurden die Gruppen „Rezidiv ja“, „Rezidiv nein“, „early death, keine Therapie, keine komplette Remission, Hypoplasie“ sowie „unbekannt“ gebildet. Hypoplasie ist die unvollständige Regeneration des Knochenmarks nach Chemotherapie, gleichbedeutend mit oben genannter CRi. Eine weitere Aufteilung unterscheidet die zwei Gruppen „Remission“ und „Rezidiv/refraktär“. In der letzten Gruppe werden nur die Patienten berücksichtigt, die in Remission geblieben sind, ein Rezidiv erhalten haben oder deren AML refraktär verlaufen ist.

### **3.1.16. Tod**

Es wurde untersucht, ob der Patient zum Abschluss des Beobachtungszeitraums verstorben war oder nicht.

### **3.1.17. Überlebenszeit**

Es wurde die Überlebenszeit in Monaten vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Todeszeitpunkt bzw. zum Datum des letzten Kontakts mit dem Patienten berechnet. Der Beobachtungszeitraum endet im Frühjahr 2007.

### **3.1.18. Herkunft der Daten**

Die erforderlichen Informationen für das Erstellen der Tabelle stammen aus schon vorhandenen anderen Tabellen im Institut für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Münster, aus den Patientenakten des Universitätsklinikums Münster oder aus dessen internem Krankenhausinformationssystem Orbis. Die Todesdaten wurden weiterhin bei den Standesämtern schriftlich erfragt. Grundlage zur Erfassung der Daten bilden das Gesundheitsdatenschutzgesetz NRW (§6, Abs. 2) vom 22. Februar 1994 sowie das Meldegesetz NRW (§31) vom 16. September 1997.

## **3.2. Tissue-Microarray**

Ein Tissue-Microarray erlaubt die Untersuchung von Gewebeproben unterschiedlicher Herkunft oder von unterschiedlichen Patienten auf einem histologischen Schnitt. Dabei wird Wert auf die DNS-, RNS oder Proteinexpression gelegt (3).

### **3.2.1. Anwendungsbereiche**

Zur Untersuchung von prognostischen Markern und Geweben wird ein Tissue-Microarray ebenso benötigt wie zur Analyse der Progression eines Tumors von einer Vorstufe zur endgültigen Form (z.B. Carcinoma-in-situ-Tumor zu T4-Tumor in der TNM-Klassifikation) oder zur Untersuchung von Signalwegen und Immunprofilen (8).

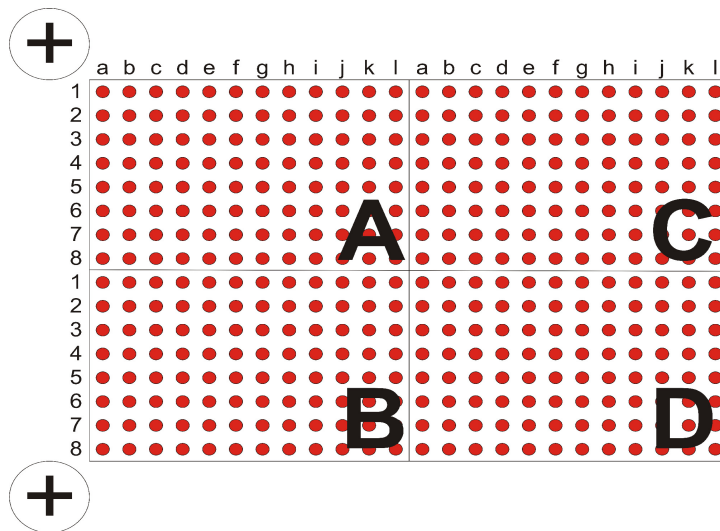
Die Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass man aus den vorhandenen Gewebeproben mehr Schnitte anfertigen kann als bei üblichen histologischen Methoden, denn es wird weniger Gewebe pro Schnitt benötigt. Dennoch konnte gezeigt werden, dass es bei Analysen zur Bestimmung von Prognosefaktoren bei Brustkrebs keine Nachteile in der Entdeckung gab (22). Weiterhin ist festzuhalten, dass es zu einer besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kommt, denn es werden alle Proben zur gleichen Zeit angefärbt. So wird die Invariabilität zwischen den Proben reduziert, die bei den üblichen Methoden auftritt. Dadurch wird außerdem der Verbrauch an Reagenzien gemindert (8).

### **3.2.2. Herstellung eines Tissue-Microarrays**

Zuallererst werden die zu untersuchenden Fälle bzw. deren fixierte und in Paraffin gebettete Proben gesammelt. Mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) eines histologischen Schnitts markiert man die für eine Stanze aus dem Paraffinblock interessante Region. Die Stanze erfolgt im Anschluss daran. Sie hat einen Durchmesser von 0,6 mm und eine Höhe von 3-5 mm. Die Stanze aus diesem als Donorblock bezeichneten Paraffinblock wird nun auf einen Empfängerparaffinblock gegeben. Im Abstand von 1,0 mm vom Kern bzw. 0,2-0,4 mm vom Rand der jeweiligen Stanze werden nun nacheinander die Proben auf

den Empfängerblock aufgetragen. Maximal 800 Stanzen finde auf einem solchen Block Platz (8). Um die Proben nicht zu verwechseln, werden sie anhand einer Systematik aufgetragen. Es eignet sich dafür z.B. die Unterteilung in 4 Sektoren A, B, C, D mit einem eigenen X-Y-Koordinatensystem. So bekommt eine Probe ein dreistellige Zahlen- und Buchstabenkombination zugeordnet wie z.B. Bk1 (3).

In der Abbildung 9 wird ein Aufbauschema des in dieser Arbeit verwendeten Tissue-Arrays gezeigt.



**Abbildung 9:** Schematischer Aufbau des verwendeten Tissue-Microarrays für die AML-Proben

Man erkennt, dass sich der Tissue-Microarray in die vier Sektoren A, B, C und D gliedert. Eine Kombination aus den Buchstaben a-l in der Horizontalen und aus den Zahlen 1-8 in der Vertikalen bilden ein Koordinatensystem. Die Pluszeichen dienen als Orientierungshilfe auf dem Objektträger; die roten Punkte skizzieren die einzelnen Proben. Es wurden immer zwei Stanzen aus den Proben eines Patienten verwendet, die untereinander angeordnet sind. So gehören z.B. die Proben Bc3 und Bc4 zu einem Patienten.

Es werden nun Schnitte von dem Empfängerblock gefertigt. Dazu wird ein Klebeband den Block gelegt. Anschließend erfolgt das Abschneiden mittels eines Mikrotoms. Es entsteht ein Schnitt von 3-5 µm Dicke, der an dem Klebeband haftet. Daraufhin wird der Schnitt an

dem Klebeband auf ein positiv geladenes Glasscheibchen gelegt, das mit einem Adhäsiv überzogen ist, welches seine Funktion unter ultraviolettem Licht aufnimmt. Nach Einschalten von ultraviolettem Licht verbindet sich so der Schnitt mit dem Glasscheibchen. Das anfänglich angebrachte Klebeband wird mit einem Lösungsmittel entfernt (8).

Um das Ergebnis des ersten Schnitts zu beobachten oder die Morphologie bei späteren Schnitten zu beobachten, ist der erste und z.B. jeder zehnte weitere Schnitt eine HE-Färbung. Auf diese Weise kann auch die Erschöpfung des Empfängerblocks erkannt werden. Man kann 100-150 Schnitte von einem Block erstellen (8).

### **3.2.3. Färbung**

Mittels der Immunhistochemie werden die in dieser Arbeit untersuchten Proteine TLE 1-4 und hAES angefärbt.

Zunächst werden die mit dem Mikrotom angefertigten 3-5 µm dicken Paraffinschnitte über Nacht bei 56 °C getrocknet. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur beginnt man mit der Entparaffinisierung mit Xylol über 2 mal 10 min (Minute). Durch eine absteigende Ethanolreihe von 99%, 96%, 80%, 70% und schließlich durch destilliertes Wasser (je 2 min) werden das Xylol und das jeweilig höher konzentrierte Ethanol wieder entfernt.

Zur Antigendemaskierung werden die Schnitte zur Färbung von TLE 1-4 und für hAES bei pH=6,0 für 30 min bei knapp unter 100 °C in einem Steamer behandelt. Anschließend wird für 10 min im Wasserbad gekühlt.

Mittels der indirekten Methode der Immunhistochemie wird die Färbung vorgenommen. Bei dieser Vorgehensweise werden zwei Antikörper verwendet. Der Primärantikörper bindet an das interessierende Antigen. Der Sekundärantikörper erkennt den Primärantikörper und ist zusätzlich mit einer Farbreaktion gekoppelt. In diesem Fall handelt es sich um einen biotinylierten Brückenantikörper mit einem Enzymkonjugat aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase (LSAB-/AP-Methode) (17). Abbildung 10 zeigt das Schema dieser indirekten Methode.





**Abbildung10:** Schema zur indirekte Methode der Immunhistochemie (17)

Als Primärantikörper wurden für TLE 1-4 Antikörper der Firma Biomol verwendet. (Biomol GmbH, Waidmannstraße 35, 22769 Hamburg, Katalognummern; TLE-1: G8985; TLE-2: G8985-05; TLE-3: G8985-10; TLE-4: G8985-15). Als Primärantikörper für hAES wurde der Antikörper der Firma Imgenex verwendet (Imgenex, 11175 Flintkote Ave., Suite E, San Diego, CA 92121; Katalognummer: IMG-5408). Die Antikörper entstammen der Spezies „Kaninchen“.

Nun werden die Schnitte im Dako Autostainer vollautomatisch gefärbt (DAKO Cytomation Denmark, Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup; Katalognummer: S-3800). Der Primärantikörper wird bei TLE 1-4 1:200 und bei hAES 1:250 mittels Dako REAL® Antibody Diluent (Katalognummer: S-2022) verdünnt. Es folgt die Inkubation mit dem Schnitt für 25 min. Anschließend werden die Sekundärantikörper für 20 min hinzugegeben, die an die Antikörper der Spezies „Kaninchen“ binden (Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies). Dann folgt die Inkubation mit dem Enzymkonjugat (Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase) für 20 min. Zuletzt werden für 20 min ein Substratpuffer, die Farbstoffe und Levamisole (zur Blockierung der endogenen Alkalischen Phosphatase) hinzugegeben (Dako REAL™ Substrate Buffer, Dako REAL™ Chromogen Red 1, Dako REAL™ Chromogen Red 2, Dako REAL™ Chromogen Red 3, Dako REAL™ Levamisole). Dadurch färben sich die Proteine TLE 1-4 und hAES rot an. Die verwendeten Materialien sind von der Firma Dako und haben die Katalognummer K-5005.

Im vorletzten Schritt erfolgt eine Entwässerung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe von 70%, 80%, 96% und 99% (je 2 min) sowie mit Xylol (2 mal 10 min).

Zuletzt folgt nun eine Kontrastfärbung mit Hämatoxylin nach Meier für 30 Sekunden, damit sich die Zellen besser voneinander abgrenzen lassen.

Bei der Färbung der Schnitte dienen als Positivkontrolle bei TLE 1-4 eine HL60-Zelllinie und bei hAES ein 32D-Zelllinie.

Zusätzlich zu den angefertigten Schnitten mit den Patientenproben wurden Tissue-Microarrays mit gesunden Knochenmarkproben (NBM, normal bone marrow) erstellt. Diese dienen als Vergleich zur Expression von hAES bei myeloischen Blasten und bei gesunden Zellen.

#### **3.2.4. Auswertungskriterien**

In der vorliegenden Arbeit werden nur die Ergebnisse der Mikroskopie der hAES-Proteinexpression in AML-Proben und in normalem Knochenmark gezeigt. Die Einteilung der Expression des Proteins orientiert sich an den üblichen Kriterien für die Auswertung einer Immunhistochemie. Es werden die vier Expressionstärken „0= keine Expression“, „1= geringe Expression“, „2= mittlere Expression“ und „3= hohe Expression“ unterschieden. Daraus ergaben sich die drei Gruppen  $\leq 1$ , 1-2 und  $\geq 2-3$ . Daraufhin wurden die Gruppen  $\leq 1$  und 1-2 in „low“ und die Gruppe  $\geq 2-3$  als „high“ bezeichnet. „Low“ bezeichnet eine niedrige hAES-Expression und „high“ demzufolge eine hohe Expression dieses Proteins.

Die Analyse zeigt die verschiedenen Prozentzahlen, den Mittelwert und die Standardabweichung. Zeilenprozent (Zeilen%) bedeutet die Verteilung in „low“ und „high“ bei dem jeweiligen Einzelwert wie z.B. M2. Spaltenprozent (Spalten%) bedeutet die Expression von hAES in allen unterschiedlichen Untergruppen wie z.B. M0 bis M7. Da der zweite Wert aber abhängig ist von der Anzahl der einzelnen Untergruppe, ist dieser nicht ohne weiteres als beweisend für die unterschiedliche Verteilung zu nehmen. Deshalb ist der Blick in die jeweilige Untergruppe mit der Angabe Zeilen% wichtig.

Zur Analyse der Überlebenszeiten wurde die Methode „Kaplan-Meier-Plot“ verwendet. Als Überlebenszeit wurde das Überleben in Monaten gewählt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der Log-Rank-Test verwendet. Ein p-Wert unter 0,05 bedeutet ein signifikantes Ergebnis.

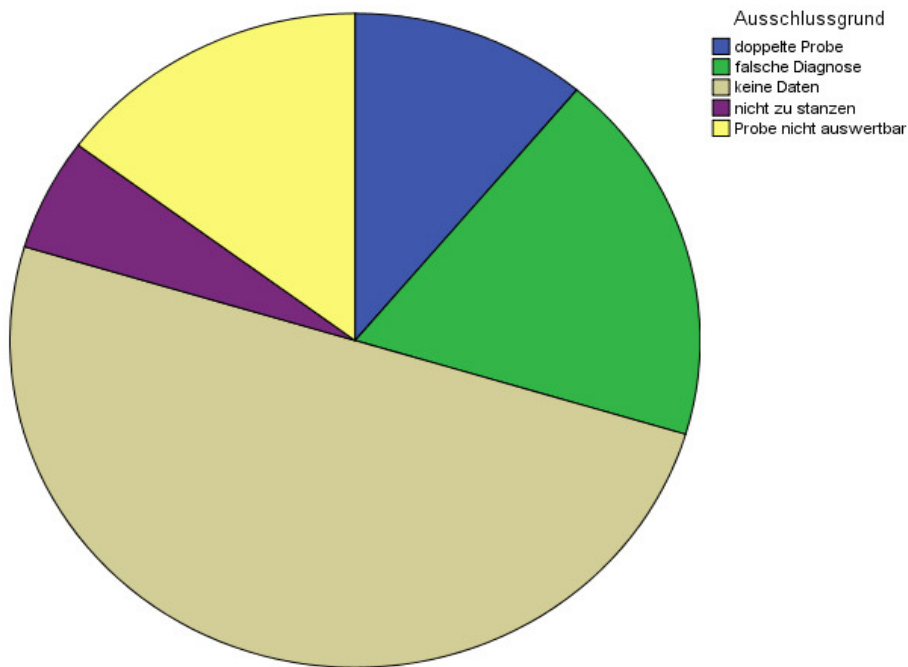
### **3.3. Computersoftware**

Um die Expression des hAES-Proteins der Patientenproben mit den klinischen Daten zusammenzuführen wurde das Statistikprogramm SPSS 15.0 für windows® verwendet (SPSS Inc., Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11<sup>th</sup> floor, Chicago, Illinois 60606; Seriennummer 9892120).

#### **4. Ergebnisse**

Zuerst werden die auf dem Schnitt auswertbaren Patienten in einer Gesamtzusammenschau dargestellt und im zweiten Teil der Auswertung wird auf die Unterschiede in der Expression des hAES-Proteins in den einzelnen untersuchten Bereichen eingegangen. Der dritte Teil zeigt die Überlebensraten bei einigen der untersuchten Parametern.

Von den 172 Probepaaren, die für die Erstellung des Tissue-Arrays ausgewählt wurden und sich auf dem Schnitt befinden, müssen für die Auswertung aus verschiedenen Gründen noch einige ausgeschlossen werden. Abbildung 11 enthält die Ausschlussgründe. Aus den doppelten Proben wurde aus der Gesamtzahl ein Mittelwert für die hAES-Expression gebildet. 8 Proben waren nicht auswertbar und 3 Proben waren nicht zu stanzen. Bei 10 Patienten wurde eine andere Diagnose als AML gestellt; in 6 Fällen lagen doppelte Proben vor. Den größten Anteil mit einer Anzahl von 27 machen Fälle aus, bei denen sich die Daten des Patienten nicht ermitteln ließen.



**Abbildung 11:** Gründe für den Ausschluss von der Auswertung

Insgesamt bleiben somit 128 Patientenproben übrig, da es bei einigen Proben mehrere Gründe für den Ausschluss von der Auswertung gab.

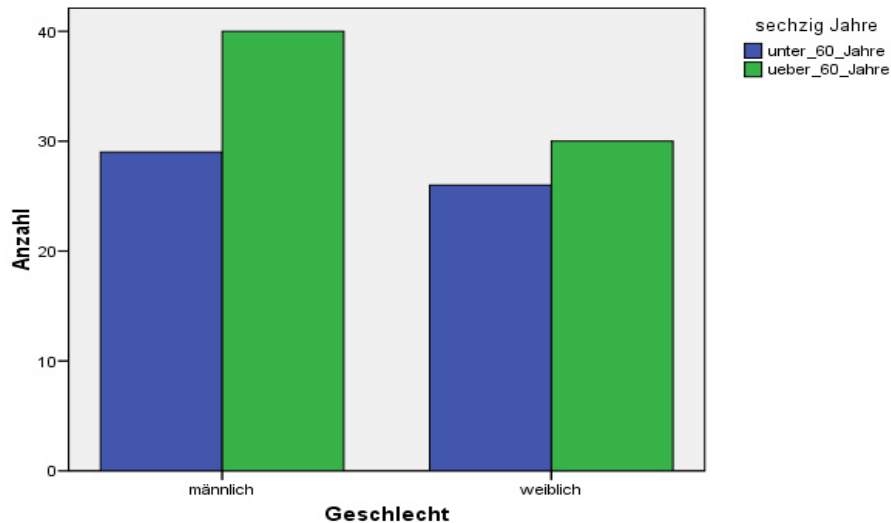
#### **4.1. Darstellung der einzelnen Parameter**

##### **4.1.1. Alter und Geschlecht**

Der Parameter „Alter“ gliedert sich in die Gruppen jünger und älter als sechzig Jahre. Es wird das Alter bei Erstdiagnose gezeigt.

Insgesamt gibt es 55 Patienten, die jünger als sechzig Jahre sind, und 70, die älter als sechzig Jahre sind. In 3 Fällen konnte das Alter nicht ermittelt werden. Der Mittelwert des Alters liegt bei 57,79 Jahren mit einer Spannweite von 18 bis 85 Jahren. Die Standardabweichung beträgt 15,308. Es werden somit Patienten aus den Jahrgängen von 1916 bis 1986 (1 fehlende Angabe) untersucht. Das Datum der Erstdiagnose reicht vom Jahre 1994 bis zum Jahre 2006 (1 fehlende Angabe).

Auf dem Schnitt sind 69 Proben von Patienten und 56 von Patientinnen aufgetragen.



**Abbildung 12:** Verteilung der Altersgruppen und des Geschlechts

#### **4.1.2. Diagnose**

Die Subtypen der AML werden anhand der FAB-Klassifikation vorgenommen. Ebenso wird gezeigt, ob die AML primär oder sekundär entstanden ist.

**Tabelle 3:** Anzahl der FAB-Subklassen und der primär und sekundär entstandenen Leukämien

Charakteristikum	Anzahl	Prozent
<b>FAB-Klassifikation</b>		
➤ M0	1	0,8
➤ M1	18	14,1
➤ M2	28	21,9
➤ M3	2	1,6
➤ M4/M4eo	28	21,8
➤ M5	42	32,8
➤ M6	8	6,3
➤ M7	1	0,8
<b>Primäre bzw. sekundäre Leukämie</b>		
➤ Primär	91	71,1
➤ Sekundär	33	25,8
➤ fehlend	4	3,1

Am häufigsten kommt die M5 vor, dann die M2 sowie die M4/M4eo, danach die M1 und die M6. Selten sind die M0 und die M7, die jeweils nur bei einem Patienten als Diagnose gestellt wurden.

Ca. drei Viertel der Patienten haben eine primäre AML und ein Viertel ein sekundär entstandene AML. Dies unterscheidet sich nicht in den einzelnen Subgruppen. In 4 Fällen fehlen die Angaben zur Entstehung.

#### **4.1.3. Zytogenetik**

Die einzelnen Befunde der Zytogenetik (normal, komplex, inv(16), t(15;17), t(8;21)) werden dargestellt. Des Weiteren wird eine Unterschied gemacht, ob Aberrationen vorliegen oder nicht.

**Tabelle 4:** Verteilung des Parameters „Zytogenetik“

Charakteristikum	Anzahl nein/ja	Prozent nein/ja
<b>Zytogenetik</b>		
➤ normaler Karyotyp	50/53	39,1/41,4
➤ chromosomale Aberrationen	53/50 90/13	41,4/39,1 70,3/10,2
➤ komplexer Karyotyp	100/3	78,1/2,32
➤ inv(16)	101/2	78,9/1,6
➤ t(15;17)	101/2	78,9/1,6
➤ t(8;21)	25	19,5
➤ fehlend		

Je ungefähr zur Hälfte liegt ein normaler Karyotyp oder ein veränderter Karyotyp vor. Der komplexe Karyotyp wurde in 10,2% der Patienten diagnostiziert. Man findet eine inv(16) bei drei Patienten sowie eine t(15;17) bzw. eine t(8;21) bei zwei Patienten. 25 Angaben fehlen.

#### **4.1.4. Blutbildbefunde**

Die nachfolgenden Tabellen 5 bis 7 lassen die Blutbildbefunde am Tag der Erstdiagnose erkennen.

##### **4.1.4.1. Leukozyten**

Die Mehrheit der Patienten weist erhöhte Werte an weißen Blutkörperchen im peripheren Blut auf (52,3%). Bei 14,8% der untersuchten Patienten findet sich eine Leukopenie (<4000 Leukozyten/ $\mu$ l). Normale Werte (4000-10000 Leukozyten/ $\mu$ l) lassen sich in 11,7% nachweisen. In 21,1% konnte der Leukozytenwert nicht ermittelt werden..

Die Werte reichen von 1100 bis 300000 Leukozyten/ $\mu$ l mit einem Mittelwert von 56171,4 Leukozyten/ $\mu$ l. Die Standardabweichung beträgt 65292,5. Es fehlen 25 Werte.

**Tabelle 5:** Verteilung der Leukozytenzahlen

Charakteristikum	Anzahl	Prozent
<b>Leukozyten/<math>\mu</math>l</b> <b>Normwert: 4000-10000</b> <b>Leukozyten/<math>\mu</math>l</b>		
➤ unter 4000	19	14,8
➤ 4000-10000	15	11,7
➤ >10000	67	52,3
➤ fehlend	25	21,1

##### **4.1.4.2. Thrombozyten**

21,1% der Patienten weisen keine erniedrigten Thrombozytenwerte (>100000 Thrombozyten/ $\mu$ l) auf. Bei ca. der Hälfte liegt eine Thrombozytopenie unterschiedlichen Schweregrades vor.

Die Werte reichen von 3000 bis 656000 Thrombozyten/ $\mu$ l mit einem Mittelwert von 79622,5 Thrombozyten/ $\mu$ l und einer Standardabweichung von 85449,1. 30 Angaben konnten nicht ermittelt werden.



**Tabelle 6:** Verteilung der Thrombozytenzahlen

Charakteristikum	Anzahl	Prozent
<b>Thrombozyten/<math>\mu</math>l</b> <b>Normwert: 150000-350000</b>		
<b>Thrombozyten/<math>\mu</math>l</b>		
➤ > 100000	27	21,1
➤ 50000-100000	28	21,9
➤ 20000-50000	30	23,4
➤ < 20000	13	10,2
➤ fehlend	30	23,4

#### **4.1.4.3. Hämoglobinwert**

Bei mehr als der Hälfte der Patienten liegt ein Hämoglobinwert von unter 8 g/dl vor. Eine Anämie (Hb < 12 g/dl) liegt insgesamt bei 93,9% vor.

Die Werte reichen von 4,8 bis 15,6g/dl mit einem Mittelwert von 9,0g/dl. Die Standardabweichung beträgt 1,9. 29 Werte fehlen.

**Tabelle 7:** Verteilung des Hämoglobinwerts

Charakteristikum	Anzahl	Prozent
<b>Hämoglobin in g/dl</b> <b>Normwert: 12-16 g/dl</b>		
➤ über 8	25	19,5
➤ unter 8	74	57,8
➤ fehlend	29	22,7

#### **4.1.5. Laktatdehydrogenase**

Die Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase wird in U/l dargestellt. Es wird geschaut, ob die Aktivität im Normbereich oder darüber liegt.

**Tabelle 8:** Aktivitätsunterschiede der Laktatdehydrogenase

Charakteristikum	Anzahl	Prozent
<b>Laktatdehydrogenase</b>		
<b>Normwert: 240 U/l</b>		
➤ Normwert	17	1,3
➤ 240-480	34	26,6
➤ >480	52	40,6
➤ fehlend	25	19,5

Erhöhte Werte für das Enzym Laktatdehydrogenase fallen bei 68,8% der Patienten auf. Werte unter der Norm sind bei 11,7 % zu finden.

Die Werte reichen bis 6470 U/ml mit einem Mittelwert von 738,5 U/ml. Die Standardabweichung beträgt 839,3. 25 Daten konnten nicht erhoben werden.

#### **4.1.6. Blasten im peripheren Blut**

Im peripheren Blut wird die Anzahl der myeloischen Blasten angegeben.

Bei nahezu allen Patienten lassen sich leukämische Blasten im Differentialblutbild nachweisen.

Die Werte reichen von 0 bis 99% mit einem Mittelwert von 54,6 %. Die Standardabweichung beträgt 32,4. In 48 Fällen konnte die Blastenzahl nicht ermittelt werden.

**Tabelle 9:** Anzahl der Blasten im peripheren Blut

Charakteristikum	Anzahl	Prozent
<b>Blasten im peripheren Blut</b>		
<b>Normwert: 0%</b>		
➤ 0-9%	11	8,6
➤ 10-19%	4	3,1
➤ 20-29%	7	5,5
➤ 30-39%	8	6,3
➤ 40-49%	2	1,6
➤ 50-59%	7	5,5
➤ 60-69%	6	4,7
➤ 70-79%	10	7,8
➤ 80-89%	13	10,2
➤ 90-100%	12	9,4
➤ fehlend	48	37,5

#### **4.1.7. Blasten im Knochenmark**

Die Diagnose einer AML wird anhand der Blastenanzahl im Knochenmark gestellt. Die Darstellung erfolgt in Zehnerschritten von 0% bis 100%.

**Tabelle 10:** Anzahl der Blasten im Knochenmark

Charakteristikum	Anzahl	Prozent
<b>Blasten im Knochenmark</b>		
➤ 0-9%	1	0,8
➤ 10-19%	2	1,6
➤ 20-29%	6	4,7
➤ 30-39%	4	3,1
➤ 40-49%	1	0,8
➤ 50-59%	5	3,9
➤ 60-69%	8	6,3
➤ 70-79%	15	11,7
➤ 80-89%	26	20,3
➤ 90-100%	32	25,0
➤ fehlend	28	21,9

Zur Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie muss der Blastenanteil in der Regel im Knochenmark bei über 30% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark liegen (12). Dies ist

bei 75,8% der Fall. Über 50% der Knochenmarkproben weisen einen Blastenanteil von über 70% auf.

Bei einem Patienten liegt der Anteil bei 0-9% und bei zwei Patienten bei 10-19%.

Die Werte reichen von 5 bis 100% mit einem Mittelwert von 72,3%. Die Standardabweichung beträgt 23,1. 28 Angaben fehlen.

#### **4.1.8. Therapie und Therapieergebnisse**

Die verschiedenen Häufigkeiten der durchgeführten Therapien wird gezeigt. Die Gruppen beinhalten dabei auch solche Patienten, die keine Therapie erhalten oder eine seltene Therapie bekommen haben.

**Tabelle 11:** Verteilung der verschiedenen Therapieschemata

Charakteristikum	Anzahl	Prozent
<b>Therapie</b>		
➤ keine Therapie	10	7,8
➤ TAD/HAM	37	28,9
➤ HAM	44	34,4
➤ TAD	22	17,2
➤ ATRA	2	1,6
➤ sonstige Therapie	13	10,2

Man erkennt, dass 92,2% der Patienten eine Therapie erhalten haben. 7,8% bekamen keine Therapie auf Grund von Multimorbidität des Patienten oder Ablehnung durch den Patienten. Am häufigsten wurde das HAM-Schema angewendet.

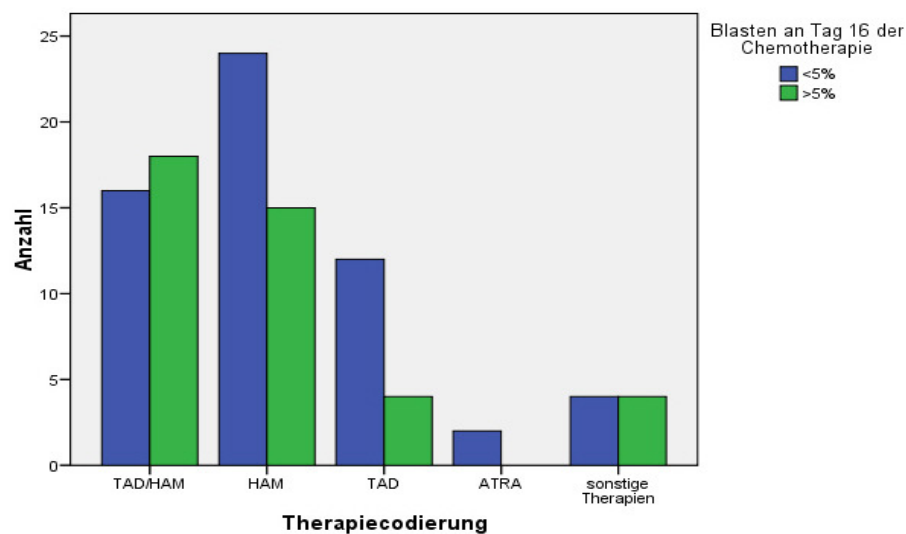
Das TAD/HAM- bzw. HAM-Schema fand sich in 62,2% bzw. 57,1% bei Patienten unter 60 Jahren. Die Therapie nach dem TAD-Schema fand in 81,8% Anwendung bei Patienten über 60 Jahren.

##### **4.1.8.1. Blasten im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie**

Die Unterteilung wird vorgenommen in die Gruppen, die mehr oder weniger als 5% Blasten am Tag 16 aufweisen.

Nahezu in der Hälfte der Fälle zeigte die Knochenmarkpunktion an Tag 16 der Chemotherapie eine Reduktion des Blastenteils auf unter 5%. 41,4% der Patienten haben mehr als 5% Blasten. 68,2% der Patienten unter 60 Jahren hatten weniger als 5% Blasten. Bei den älteren Patienten war die Verteilung 49,1% (<5% Blasten) und 50,9% (>5% Blasten).

Abbildung 13 zeigt, in welchem Maße die Therapien eine Reduktion der Blastenzahl erreichen konnten.



**Abbildung 13:** Darstellung der Reduktion an Blasten im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie durch die verschiedenen Therapien

Man erkennt, dass es durch das HAM- und TAD-Schema (61,5% bzw. 75,0%) relativ gesehen häufiger zu einer Reduktion der Blasten unter 5% gekommen ist als beim TAD/HAM-Schema (47,1%). Das letztere Schema hat demnach mehr Fälle, die mehr als 5% Blasten vorweisen. Bei der Therapie mit ATRA wurde bei allen Patienten eine Reduktion unter 5% erreicht. In der Gruppe „sonstige Therapie“ ist kein Unterschied festzustellen. Es fehlen die Daten zu 19 Fällen.

#### **4.1.8.2. Remission**

Die Remission, die refraktäre AML und Patienten, die an einem frühen Tod verstorben sind, lassen sich anhand von Tabelle 12 unterscheiden.

**Tabelle 12:** Aufteilung der Fälle in Bezug zur Remission

Charakteristikum	Anzahl	Prozent
<b>Remission</b>		
➤ CR	81	63,3
➤ refraktäre AML	15	11,7
➤ early death	21	16,4
➤ keine Therapie	8	6,3
➤ fehlend	3	2,3

Bei 81 Patienten konnte durch die Chemotherapie eine komplette Remission erreicht werden. Insgesamt konnte dieser Status bei 45 Patienten nicht erreicht werden. Entweder war die Erkrankung refraktär, der Patient ist sehr früh verstorben oder der Patient erhielt keine Therapie.

76, 4% und 55,2% der Patienten unter bzw. über 60 Jahren konnten den Status der kompletten Remission erreichen. 80% der Fälle mit refraktärer AML finden sich bei der Gruppe über 60 Jahren.

Bei dem TAD/HAM-Schema sowie dem HAM-Schema wurde in 73,0% bzw. in 79,5% eine CR erreicht. Bei dem TAD-Schema sind dies 59,1%. Im Falle der Therapie mit ATRA trat in 100% eine CR auf. Sind andere Therapien angewendet worden, so beträgt der Anteil an Patienten in CR 33,3%.

### 4.1.8.3. Rezidiv

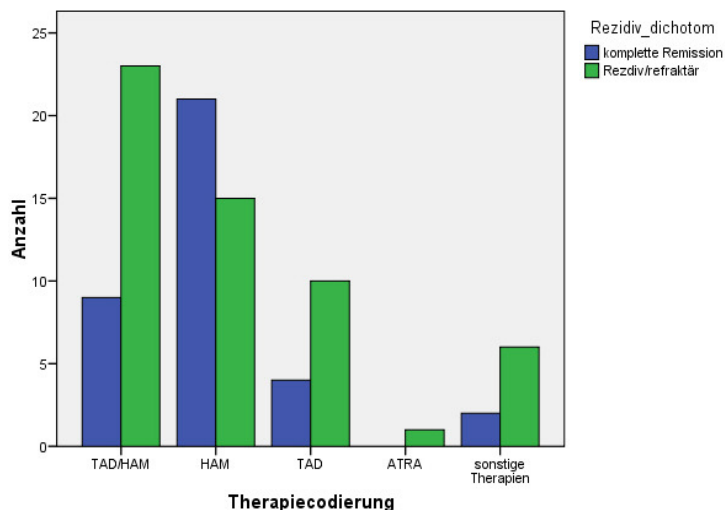
In Tabelle 13 ist gezeigt, wie viele Patienten ein Rezidiv bekommen haben.

**Tabelle 13:** Darstellung der Untergruppen des Parameters Rezidiv

Charakteristikum	Anzahl	Prozent
<b>Rezidiv</b>		
➤ nein	36	28,1
➤ ja	43	33,6
➤ early death, keine Therapie, keine Remission, Hypoplasie	42	32,8
➤ unbekannt	3	2,3
➤ fehlend	4	3,1

Im weiteren Verlauf der Erkrankung ist es bei einem Drittel der Patienten zu einem Rezidiv gekommen. Ein Drittel befindet sich in kompletter Remission. Bei einem weiteren Drittel kann man nicht von einem Rezidiv sprechen. In diesen Fällen ist der Patient entweder früh verstorben, hat keine Therapie erhalten oder hat keine Remission erreicht.

Die Aufteilung in Rezidiv „Ja“ und „Nein“ erlaubt eine übersichtlichere Darstellung. Diese wird in Bezug zur angewendeten Therapie in Abbildung 14 gezeigt.



**Abbildung 14:** Auftreten eines Rezidivs in Abhängigkeit von der angewendeten Therapie

Bei der Therapie mit HAM überwiegt die Anzahl der Patienten in CR diejenige mit einem Rezidiv oder einer refraktären AML (58,3% zu 41,7%). Bei allen anderen Therapien ist dies umgekehrt. Es liegen hier mehr Fälle mit Rezidiv vor. Bei der Therapie mit ATRA bleibt zu berücksichtigen, dass eine Angabe zum Rezidiv hier fehlt und so nur zu einem Fall eine Angabe gemacht wird.

59,3% der Rezidive traten bei Patienten über 60 Jahren auf. 68,1% dieser Patienten und 52,4% der Patienten unter 60 Jahren erlitten ein Rezidiv.

#### **4.1.8.4. Tod**

Tabelle 14 gibt die Anzahl der noch lebenden Patienten und der verstorbenen Patienten an.

**Tabelle 14:** Anteil der lebenden und verstorbenen Patienten

Charakteristikum	Anzahl	Prozent
<b>Tod</b>		
➤ lebend	46	35,9
➤ verstorben	79	61,7
➤ fehlend	3	2,3

Nach Ende der follow-up-Zeit leben noch 35,9% der Patienten. 20 Patienten fallen unter die Kategorie des frühen Todes (early death).

Die follow-up-Zeit reicht von 8 Tagen bis 7,78 Jahren mit einem Mittelwert von 634,54 Tagen. Die Standardabweichung beträgt 694,514.



## **4.2. hAES-Expression bei AML und normalem Knochenmark**

Im folgenden Abschnitt wird die Expression des humanen amino-enhancer-of-split-Proteins (hAES) zum einen isoliert und ab 4.3. in Verbindung zu den einzelnen Daten der Tabelle, wie sie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurden, dargestellt.

### **4.2.1. hAES-Expression aller Proben**

Zunächst erfolgt eine Übersichtstabelle, die die Expression des hAES-Proteins bei den gesamten Proben der AML-Patienten sowie bei den Proben aus gesundem Knochenmark zeigt. Diese Tabelle zeigt die Expressionsstärke der auf dem Tissue-Microarray befindlichen Proben als Mittelwerte der Doppelproben. Die Unterscheidung in der Auszählung beinhaltet die Bereiche 0 (keine Expression), 1 (wenig Expression), 2 (mittlere Expression) und 3 (hohe Expression). Diese 4 Gruppen werden nun zusammengefasst in die Bereiche  $\leq 1$ , 1-2,  $\geq 2-3$ . Der zweite Teil der Tabelle nimmt eine gröbere Einteilung vor, indem die Gruppen  $\leq 1$  und 1-2 zu einer Gruppe mit der Expressionsstärke „low“ zusammengelegt werden. Die Gruppe „high“ besteht demnach aus den Stärken  $>2-3$ .

**Tabelle 15:** hAES-Expression bei AML-Proben und normalem Knochenmark (NBM, normal bone marrow)

Expressionsstärke	Anzahl (AML)	Prozent (AML)	Anzahl (NBM)	Prozent (NBM)
<b>hAES</b>				
➤ $\leq 1$	29	22,7	30	75
➤ 1-2	59	46,1	8	20
➤ $\geq 2-3$	36	28,1	2	5
➤ fehlend	4	3,1	0	0
➤ low	88	68,8	38	95
➤ high	36	28,1	2	5
fehlend	4	3,1	0	0

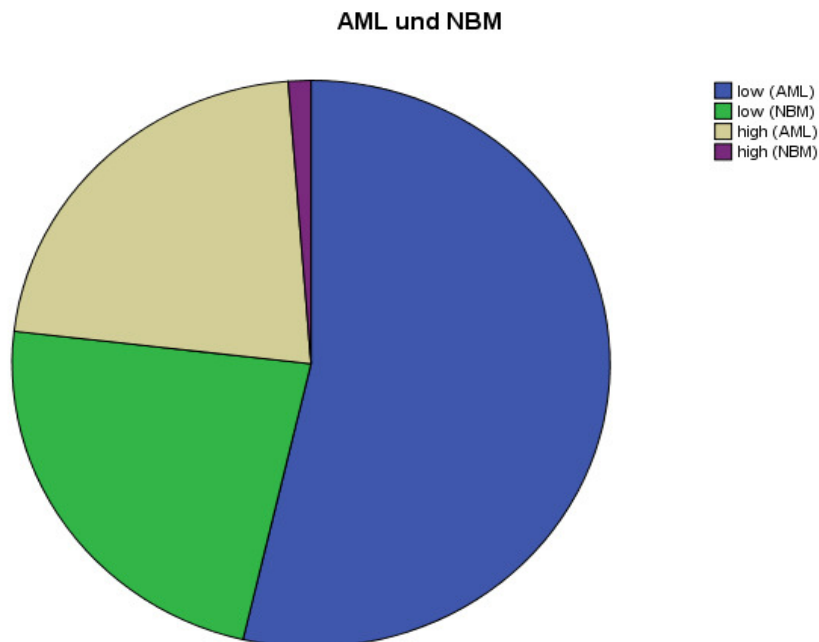
Insgesamt sind 4 Probepaare bei den AML-Patienten nicht auswertbar, d.h. dass auf dem Schnitt keine hämatopoetischen Zellen erkennbar waren. Dies ergibt die Anzahl der fehlenden Werte.

Man erkennt, dass sich 22,7% der Proben der Gruppe mit der niedrigen Expression, 46,1% der mittleren Expression sowie 28,1% der hohen Expression zuordnen lassen.

Die Aufteilung in „low“ und „high“ ergibt 68,8% bzw. 28,1%.

Bei den Zellen des normalen Knochenmarks zeigt sich, dass zu 95% eine niedrige Expression vorliegt und in 5% eine hohe.

Fasst man nun alle Proben zusammen, so errechnet sich eine Gesamtzahl von 168 Proben. Die Abbildung 15 zeigt ein Kreisdiagramm. Hier wird noch einmal deutlich, dass es bei den AML-Proben häufiger zu einer „high“-Expression des hAES-Proteins kommt. Die vier fehlenden Werte bleiben in dieser Graphik unberücksichtigt.

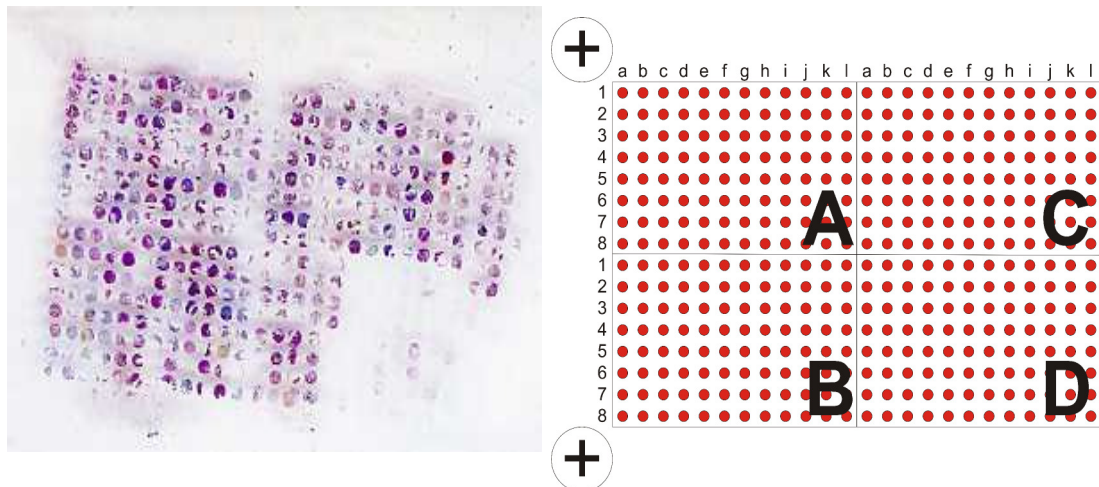


**Abbildung 15:** Kreisdiagramm zur hAES-Expression bei AML und NBM

In Abbildung 16 ist ein Bild des Tissue-Microarray der AML-Proben gezeigt. Die Proben sind entsprechend der rechten Abbildung aufgetragen. Man erkennt die unterschiedlich

starke Rotfärbung der Knochenmarkproben. Ein starkes Rotsignal zeigt eine hohe hAES-Expression an.

Zum Vergleich zeigt Abbildung 17 den Tissue-Microarray der gesunden Knochenmarkproben. Hier fällt der geringere Anteil an stark rot gefärbten Proben auf.



**Abbildung 16:** Tissue-Microarray der AML-Proben und Schema der Probenauftragung



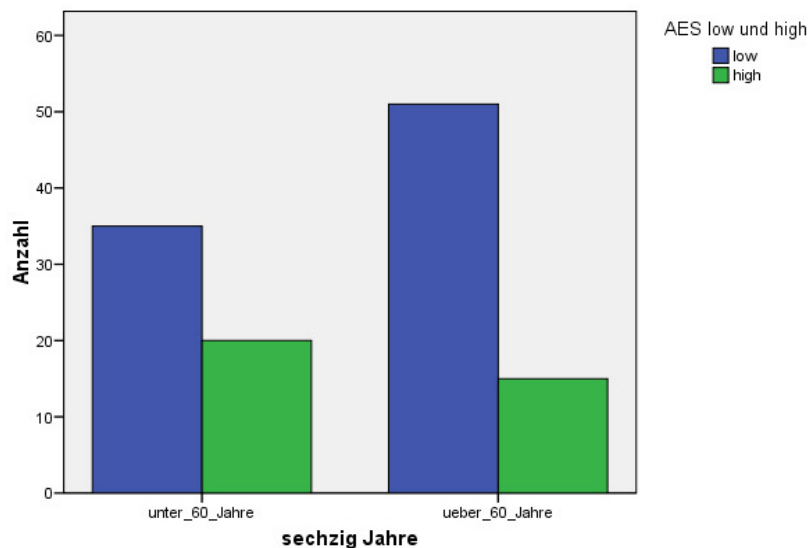
**Abbildung 17:** Tissue-Microarray des normalen Knochenmarks

### 4.3. hAES-Expression in Bezug zu den einzelnen Parametern bei Patienten mit AML

Im Folgenden wurde die Expression des hAES-Proteins in den einzelnen Untergruppen der Patiententabelle analysiert. Hier beschränkt sich die Darstellung auf die Gruppen „low“ und „high“.

#### 4.3.1. Alter und Geschlecht

Bei Patienten, die jünger als sechzig Jahre alt sind, ist zu 63,6% eine niedrige Expression zu finden. Bei Patienten über sechzig Jahre ist das bei 77,3% der Fall. Relativ gesehen sind also bei jüngeren Patienten mehr Patienten, die eine hohe Expression aufweisen. Absolut gesehen zeigt sich, dass 57,1% der Proben mit einer hohen Expression zur Gruppe der unter 60-Jährigen gehört. Dies verdeutlicht Abbildung 18.



**Abbildung 18:** hAES-Expression bei Patienten unter und über 60 Jahren

Bei Proben von Patientinnen findet sich in 65,5% eine niedrige und in 34,5% eine hohe Expression. Bei Männern ist die Verteilung 75,4% und 24,6%. Bei beiden Geschlechtern

überwiegen demnach Proben mit niedriger Expression. In 52,8% der Fälle mit hoher Expression stammen diese von Patientinnen.

### **4.3.2 Diagnose**

Die Expression von hAES in den FAB-Subtypen zeigt Tabelle 16. Es ist auch die Verteilung der Proteinexpression bei den primär und sekundär entstandenen Leukämien zu finden.

**Tabelle 16:** hAES-Expression in den FAB-Subklassen und den primär/sekundär entstandenen Leukämien

Charakteristikum	low	high
	Zeilen%; Spalten%	Zeilen%; Spalten%
<b>FAB-Klassifikation</b>		
➤ M0	100; 1,1	0; 0
➤ M1	94,4; 19,3	5,6; 2,8
➤ M2	80,8; 23,9	19,2; 13,9
➤ M3	100; 2,3	0; 0
➤ M4/M4eo	66,7; 14,8	33,3; 41,7
➤ M5	70,7; 33,0	29,3; 33,3
➤ M6	57,1; 4,5	42,9; 8,3
➤ M7	100; 1,1	0; 0
<b>Primäre bzw. sekundäre Leukämie</b>		
➤ primär	76,4; 80,0	23,6; 60,0
➤ sekundär	54,8; 20,0	45,2; 40,0

Bei der M1, M2, M4, M5 und M6 liegen vorwiegend niedrige Expressionen des Proteins vor. Die M1 und M2 zeigen mehr Anteil in der niedrigen Expression als die M4 und M5. Für die M0, M3 und M7 ist die Auswertung auf Grund der niedrigen Fallzahl nicht aussagekräftig.

Bei der primären AML-Erkrankung finden sich dreimal mehr Fälle mit niedriger als mit hoher Expression. Bei den sekundären Formen lässt sich nur ein geringer Unterschied zwischen „low“ und „high“ feststellen.

#### **4.3.3. Zytogenetik**

Aus der Analyse der hAES-Expression bei den untersuchten zytogenetischen Befunden geht hervor, dass in mehr als zwei Drittel der Fälle die niedrige Expression vorherrscht. Eine Aussage bei der inv(16), der t(15;17) und der t(8;21) ist schwierig, weil nur drei bzw. je zwei Proben vorlagen mit den entsprechenden Befunden.

#### **4.3.4. Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobinwert**

Bei der Analyse der Blutbilder in Bezug zu der Leukozyten- und Thrombozytenzahl sowie zum Hämoglobinwert ist eine sehr heterogene Verteilung in den Untergruppen zu finden.

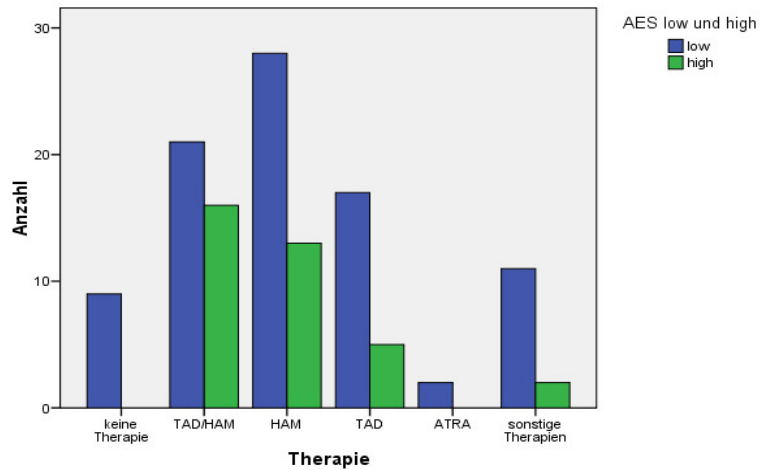
#### **4.3.5. Laktatdehydrogenase**

Die hAES-Expression in Bezug zur LDH-Aktivität liegt bei 75,0% (Normwert), 73,5% (240-480 U/ml) und 70,0% (>480 U/l) für die niedrige Expression.

#### **4.3.6. Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark**

Die Untersuchung der Expression bei den verschiedenen Blastenanzahlen im peripheren Blut und im Knochenmark lässt eine Tendenz dahingehend erkennen, dass es mit höherer Anzahl an Blasten zu einer niedrigeren Expression des hAES-Proteins kommt.

### 4.3.7. Therapie und Therapieergebnisse

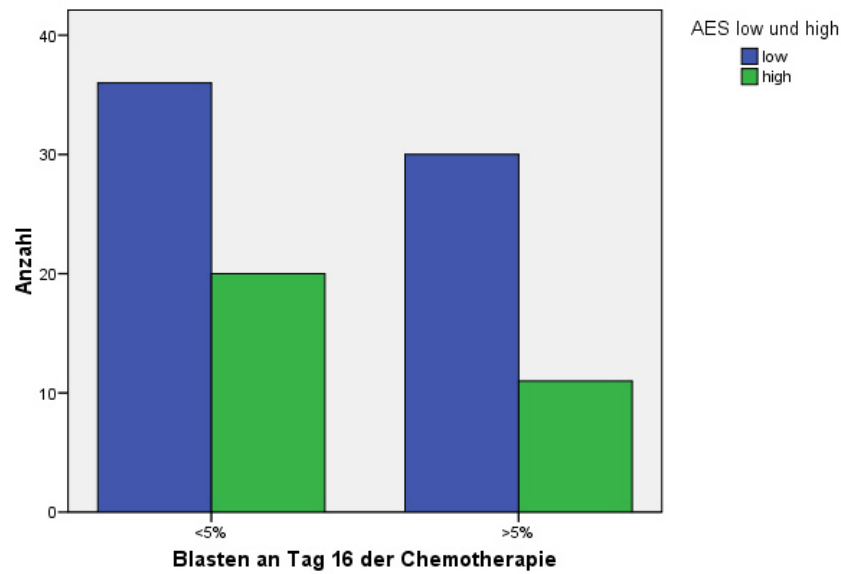


**Abbildung 19: Patientenanteile mit hoher und niedriger Expression in den Therapiegruppen**

Abbildung 19 veranschaulicht die Verteilung der Proteinexpression in den unterschiedlichen Gruppen der Therapien. Ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern existiert nicht. Die Graphik soll demnach veranschaulichen, in welcher Therapieform der Anteil der Patienten mit einer hohen oder niedrigen hAES-Expression jeweils war. Das Überleben nach Therapie wird in Abschnitt 4.4.1.4. gezeigt.

#### 4.3.7.1. Blasten im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie

Unterschiede in den Gruppen, die mehr oder weniger als fünf Prozent Blasten im Knochenmark aufweisen an Tag 16 der Chemotherapie, zeigt Abbildung 20.



**Abbildung 20:** Blasten an Tag 16 der Chemotherapie und hAES-Expression

Man erkennt, dass in beiden Gruppen die niedrige Expression vorherrscht. Es sind 63,% bei Blasten unter 5% und 73,2% bei Blasten über 5% an Tag 16 der Chemotherapie. 64,5% aller Fälle mit hoher Expression fallen unter die Kategorie mit weniger als 5% Blasten.



#### **4.3.7.2. Remission**

Nachfolgend ist die Anzahl der „low“ und „high“-Expression bei den Patienten beim Parameter „Remission“ gezeigt.

**Tabelle 17:** hAES-Expression bei Remission

Charakteristikum	low	high
	Zeilen%; Spalten%	Zeilen%; Spalten%
<b>Remission</b>		
➤ CR	64,1; 58,8	35,9; 80,0
➤ refraktäre AML	81,3; 15,3	18,8; 8,6
➤ early death	81,8; 21,2	18,2; 11,4
➤ keine Therapie	100; 4,7	0; 0

In den jeweiligen Subgruppen ist drei- bis viermal häufiger eine niedrigere Expression nachzuweisen. Im Vergleich der Gruppen untereinander fällt auf, dass Patienten, die sich in Remission befinden, den größten Anteil mit einer hohen Expression aufweisen. Bei Patienten, die keine Therapie erhalten haben, ist ausschließlich eine niedrige Expression zu finden.

#### **4.3.7.3. Rezidiv**

In der Aufteilung des Parameters Rezidiv in „Remission“ und „Rezidiv/refraktär“ wird nach der hAES-Expression geschaut.

**Tabelle 18:** hAES-Expression bei Rezidiv

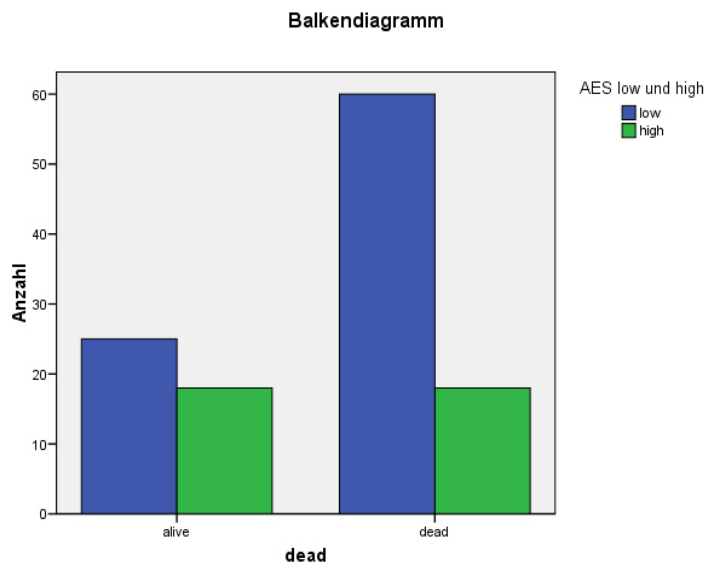
Charakteristikum	low	high
	Zeilen%; Spalten%	Zeilen%; Spalten%
<b>Rezidiv</b>		
➤ Remission		
➤ Rezidiv/refraktäre AML	60,6; 34,5 67,9; 65,5	39,4; 41,9 32,1; 58,1

Beide Untergruppen zeigen ein Überwiegen der niedrigeren Expression in ähnlicher Höhe. Insgesamt sind mehr Fälle der hohen Expression bei Patienten mit Rezidiv oder refraktärer AML zu finden.

#### **4.3.7.4. Tod**

Bei den lebenden Patienten ist in 58,1% die niedrige Expression und in 41,9% die hohe Expression zu finden. Bei verstorbenen Patienten ist in 76,9% der Proben die hohe Expression nachzuweisen, in 23,1% die niedrige.

In zwei Drittel der Proben von Patienten, die verstorben sind, findet man also die niedrige Expression, wohingegen der Anteil von „low“ und „high“ bei lebenden Patienten eher ausgeglichen ist.



**Abbildung 21:** Anteil lebender und verstorbener Patienten in Bezug zur Expression von hAES

## **4.4. Überlebensanalysen**

### **4.4.1. signifikante Ergebnisse**

Die einzelnen gesammelten Parameter werden im Folgenden in ihrer Bedeutung auf die Überlebenszeit der Patienten gezeigt. Die Darstellung in Abschnitt 4.4.1.1. beschränkt sich auf die Parameter, bei denen im Log-Rank-Test (Mantel-Cox) ein signifikantes Ergebnis errechnet wird ( $p < 0,05$ ). In Abschnitt 4.4.1.2. werden kurz die p-Werte der Parameter dargestellt, bei denen dieser über 0,05 lag.

#### **4.4.1.1. Alter**

Patienten, die älter als sechzig Jahre sind, überleben kürzer als jüngere Patienten ( $p = 0,01$ ). Von den Patienten unter sechzig Jahren leben nach Abschluss der Beobachtung 47,2%, von den älteren Patienten 29,0%.

#### **4.4.1.2. Geschlecht**

Patientinnen zeigen ein längeres Überleben als Patienten ( $p = 0,002$ ).

51,8% der Frauen bzw. 25,0% der Männer leben nach Ende der Beobachtungszeit.

#### **4.4.1.3. Diagnose**

Einen p-Wert von 0.006 ergibt die Analyse der Überlebenszeit bei den FAB-Typen.

Tabelle 19 zeigt den Anteil der Überlebenden in den unterschiedlichen FAB-Gruppen.

**Tabelle 19:** Anteil der Überlebenden in der Klassifikation nach FAB

<i>FAB-Typ</i>	<i>Anteil der Überlebenden (%)</i>
M0	100
M1	16,7
M2	44,0
M3	100
M4/M4eo	35,7
M5	36,6
M6	50
M7	0

Bei der M0, M3, M6 und M7 ist zu berücksichtigen, dass diese Diagnosen bei wenigen Patienten gestellt wurden. So ist eine Aussage bezüglich des Überlebens schwierig. Festzuhalten ist, dass die M2, M4/M4eo sowie die M5 ähnliche Überlebenswahrscheinlichkeiten um die 40% zeigen. Das Überleben bei der M1 liegt bei 16,7%.

#### **4.4.1.4. Therapie**

Die Analyse der verschiedenen Therapien ergibt einen p-Wert von  $p < 0,001$ . Je nach erhaltener Therapie kommt es zu einer unterschiedlichen Überlebenswahrscheinlichkeit. Dies ist in Tabelle 20 gezeigt.

**Tabelle 20:** Anteil der Überlebenden in den unterschiedlichen Therapiegruppen

<i>Therapie</i>	<i>Anteil der Überlebenden (%)</i>
ATRA	100
HAM	51,2
TAD/HAM	36,1
TAD	27,3
sonstige Therapie	15,4
keine Therapie	12,5

Beim HAM-Schema war der Anteil der Überlebenden 51,2% und damit größer als bei den anderen Therapieformen. Bei TAD/HAM überlebten etwas mehr und bei TAD etwas weniger als ein Drittel der Patienten. Den geringsten Anteil findet man bei Patienten, die mit anderen Therapien behandelt wurden oder keine Therapie erhielten.

Bei ATRA sind zu wenig Fälle vorhanden, so dass die Aussage nicht repräsentativ ist.

#### **4.4.1.5. Blasten im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie**

Bei einer Blastenreduktion im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie unter 5% ist das Überleben signifikant besser als bei einer geringeren Reduktion der Blastenzahl ( $p=0,017$ ). 52,6% der Patienten mit weniger als 5% Blasten überlebten im Vergleich zu 29,3% der Patienten mit mehr als 5% Blasten im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie.

#### **4.4.1.6. Remission**

Patienten in Remission zeigen eine bessere Überlebensrate als solche, die diesen Status nach Chemotherapie nicht erreichen konnten ( $p<0,001$ ). 55,7% mit CR überlebten. Bei einer refraktären AML lag dieser Anteil bei 6,3%

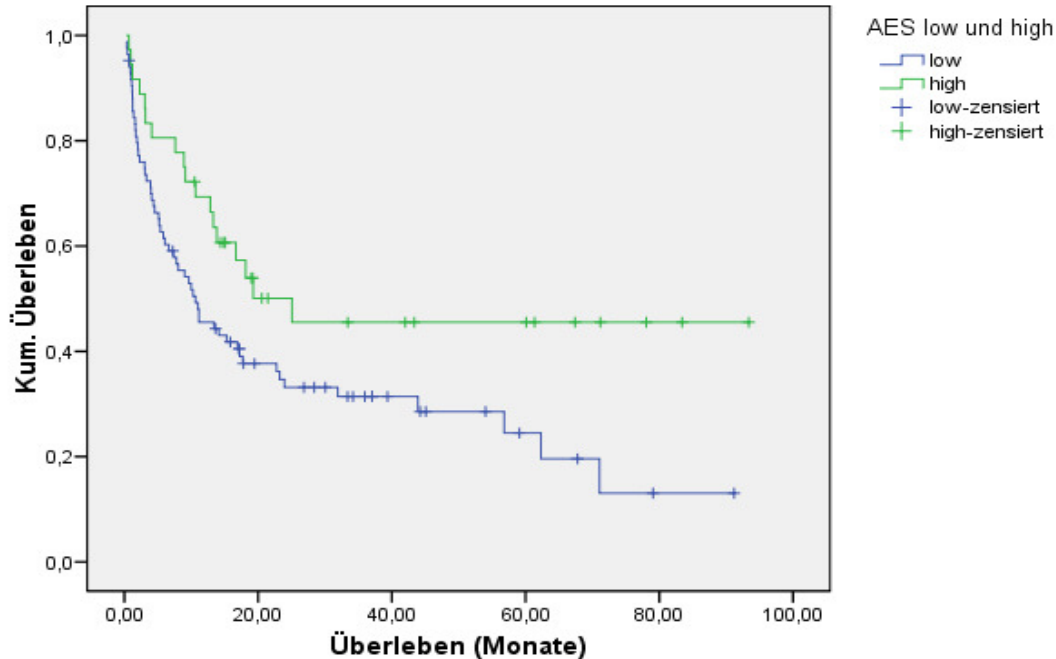
#### **4.4.1.7. Rezidiv**

Patienten mit einem Rezidiv bzw. einer refraktären Leukämie überleben schlechter als solche, die in der Remission bleiben ( $p<0,001$ ). Die Anteile der Überlebenden betragen 83,3% bzw. 24,1%.

#### **4.4.1.8. hAES-Expression „low“ und „high“**

Ein p-Wert von 0,028 ergibt die Analyse der hAES-Expression in „low“ und „high“. Bei einer hohen hAES-Expression ist die Überlebensrate signifikant besser. 29,8% der Patienten mit der niedrigen Expression und 50,0% der Patienten mit hoher Expression überleben. Dies wird in Abbildung 22 veranschaulicht. Zensierte Daten bezeichnen solche Ereignisse, die zum Abschluss des Beobachtungszeitraums noch nicht eingetreten sind.

## Überlebensfunktionen



**Abbildung 22:** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier; dargestellt ist das kumulative Überleben (kum. Überleben) in Abhängigkeit von der hAES-Expression

### 4.4.2. nicht signifikante Ergebnisse

Die Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier bei den in Tabelle 21 genannten Parametern kein signifikantes Ergebnis. Diese Analysen wurden durchgeführt, werden aber in der Diskussion in Kapitel 5 nicht weiter behandelt.

**Tabelle 21:** Parameter ohne signifikanten p-Wert in der Kaplan-Meier-Analyse

<i>Parameter</i>	<i>p-Wert</i>
Primär/sekundär	0,184
Zytogenetik	0,915
Leukozyten	0,835
Thrombozyten	0,184
Hämoglobinwert	0,723
Laktatdehydrogenase	0,498
Blasten im peripheren Blut	0,455
Blasten im Knochenmark bei Erstdiagnose	0,676

## **5. Diskussion**

In der Auswertung wurden zunächst die Parameter der erstellten Tabelle in einer gesamten Übersicht dargestellt. Im zweiten Abschnitt erfolgte eine Verknüpfung mit der Auswertung des Tissue-Arrays und der Expression in der immunhistochemischen Darstellung des humanen amino-enhancer-of-split Proteins. Des Weiteren wurden Überlebensanalysen nach der Methode von Kaplan-Meier durchgeführt.

Um die klinische Bedeutung des humanen amino-enhancer-of-split-Proteins zu bewerten, ist im nächsten Schritt eine Zusammenschau der hAES-Expression in Verbindung zu den untersuchten Parametern und der Überlebensanalyse nötig.

Zuallererst ist festzustellen, dass es in Patienten mit einer AML zu einer höheren Expression des hAES-Proteins kommt, als es bei normalen Knochenmarkproben zu beobachten ist. Dies ist anhand der Tabelle 15 möglich. Nur 5% der Proben des gesunden Knochenmarks zeigen eine hohe hAES-Expression im Vergleich zu den AML-Proben, bei denen man dies in 28,1% findet.

Aus den Abbildungen 16 und 17, die die Tissue-Array der AML- bzw. NBM-Proben zeigen, ist ersichtlich, dass sich die AML-Proben wesentlich stärker mit einem Antikörper gegen hAES in der Immunhistochemie anfärben lassen als die gesunden Knochenmarkproben. Man erkennt dies an der stärkeren Rotfärbung auf dem Tissue-Array der AML-Fälle.

Es wurde weiterhin gezeigt, dass es bei einer hohen Expression des hAES-Proteins im Zellkern zu einem besseren Überleben der Patienten kommt.

Diese Feststellung wirft nun die Frage nach den möglichen Ursachen auf.

Wie in der Einleitung beschrieben, kommt den TLE-Proteinen sowie dem hAES-Protein eine Bedeutung in der Regulation der Transkription zu. Die langen Proteine TLE-1 bis TLE-4 wirken als Inhibitoren der Transkription, indem sie eine Funktion als Korepressor übernehmen. Sie binden über spezifische Proteine an die DNS und erniedrigen die Rate der Transkription (9). Dem hAES-Protein wird eine hemmende Funktion in Bezug auf die anderen Proteine der TLE-Familie zugeschrieben. Es fördert somit die Rate der

Transkription (2). Die genannten Proteine wirken im Wingless-Signalweg mit. Diesem Signalweg kommt eine Bedeutung in der normalen Hämatopoese und der Pathogenese der AML zu (15).

Eine abschließende Erklärung für eine bessere Überlebensrate bei Patienten mit einer hohen hAES-Expression lässt sich aus diesen molekularen Wirkmechanismen nicht vollständig und umfassend erläutern. Welche Gene genau von hAES gesteuert werden und was diese dann für die Tumorentstehung bedeuten, bleibt Gegenstand weiterer Grundlagenforschung. Weitere Vermutungen ergeben sich anhand der Auswertung, wenn man analysiert, bei welchen Parametern eher eine höhere Expression zu finden ist und welche Parameter mit einem signifikant besseren Überleben einhergehen.

Als erstes ist festzuhalten, dass sich eine höhere Expression von hAES bei Patienten findet, die jünger als sechzig Jahre sind. Patienten unter sechzig Jahre haben eine günstigeres Überleben. Dies wurde auch als Prognosefaktor gewertet (21).

Eine vorwiegend höhere Expression findet sich bei weiblichen Patienten. Obwohl die Gesamtanzahl von Patientinnen geringer ist als die von Patienten, stammen 52,8% der Proben mit hoher Expression von Patientinnen. Diese haben in der Kaplan-Meier-Analyse eine bessere Überlebensprognose. Hier ist festzuhalten, dass es relativ betrachtet etwas mehr Patientinnen gibt, die jünger als sechzig Jahre sind. Dies könnte ein Grund für deren bessere Prognose sein.

Patienten unter Therapie haben eine bessere Prognose und ein besseres Überleben als Patienten ohne Therapie. Das beste Überleben zeigte sich bei Anwendung des HAM-Schemas (50% Anteil der Überlebenden). In 67,5% fand sich hier eine low-Expression. Diese Therapieform wurde vorwiegend bei den jüngeren Patienten angewendet. In den Gruppen nach dem TAD/HAM- und TAD-Schema überlebten 36,1% bzw. 27,3%. Die low-Expression lag hier bei 56,8% bzw. 77,3%. 62,2% der Therapien nach TAD/HAM wurden bei den unter 60-Jährigen durchgeführt. Das TAD-Schema fand in 81,8% Anwendung bei Patienten über 60 Jahren. Aus der Korrelation von Alter und Therapie ist erkennbar, weshalb es zu den unterschiedlichen Überlebenskurven kommt. Durch das bessere



Ansprechen der Therapie in der jüngeren Gruppe, welches sich auch im Erreichen einer kompletten Remission und im Nichtauftreten eines Rezidivs zeigte, kann die günstigere Prognose für diese Patienten erklärt werden. Den geringsten relativen Anteil an low-Expression haben das TAD/HAM- und das HAM-Schema, welche vorwiegend bei den jüngeren Patienten angewendet wurden und mit einer besseren Überlebensprognose einhergingen.

Beim Parameter „Blasten im Knochenmark an Tag 16 der Chemotherapie“ ist bei denjenigen eine höhere Expression zu erkennen, die weniger als fünf Prozent Blasten bei dieser Untersuchung haben. Dies ist ebenfalls mit einer guten Prognose assoziiert und die Überlebenswahrscheinlichkeit liegt höher (9). Dieser Zustand wurde eher bei den jüngeren Patienten erreicht.

Patienten in Remission haben eine bessere Überlebensprognose als solche, die diesen Status nicht erreichen konnten oder ein Rezidiv erlitten. Auch bei der hAES-Expression liegen bei Patienten in Remission eher höhere Werte vor.

Aufgrund dieser Feststellungen kann man nun einige Gründe für ein besseres Überleben von Patienten mit einer „high“-Expression erkennen. Es zeigt sich, dass die hohe Expression in Korrelation zu den günstigen Prognosefaktoren steht. Sie kommt vorwiegend bei jüngeren Patienten vor, die in allen Bereichen besser auf die Therapie ansprechen.

Inwieweit ein kausaler Zusammenhang besteht zwischen der molekularen Wirkung von hAES, dem Alter sowie dem Ansprechen auf die Therapie, kann in dieser Arbeit nicht bewiesen werden. Ob eine unterschiedliche Biologie und Pathogenese der AML-Erkrankung in den beiden Altersgruppen vorliegt und welche Rolle dabei hAES spielt, bleibt ebenfalls offen.

## **6. Zusammenfassung**

Das humane amino-enhancer-of-split-Protein (hAES) spielt eine Rolle in der Ausdifferenzierung verschiedenster Zellreihen in der Embryogenese sowie im erwachsenen Organismus. Es gehört zu einer Familie von Korepressoren, die an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind. Hierzu gehören ebenso die Proteine TLE 1-4 (transducin-like-enhancer-of-split). Dem hAES-Protein wird eine hemmende Wirkung auf die TLE-Proteine zugeschrieben. Dadurch kommt es im Wingless/Wnt-Signalweg zu einer erhöhten Expression von Proteinen der Zellzyklusregulierung. Es wurde nachgewiesen, dass die Fusionsproteine der AML wie AML1-ETO, PML-RAR $\alpha$  und PLZF-RAR $\alpha$  zu einer Verstärkung im Wnt-Signalweg führen.

Ziel dieser Arbeit war es, die klinische Bedeutung der Expression von hAES herauszustellen. Hierzu wurden relevante klinische Parameter wie die Blastenzahl im Knochenmark bei Erstdiagnose, die Therapie usw. einbezogen. Weiterhin wurde untersucht, ob im Krankheitsverlauf eine Remission bestand, ein Rezidiv eingetreten ist oder ob der Patient verstorben ist.

Die Expression des hAES-Proteins wurde an Knochenmarkproben auf einem Tissue-Microarray analysiert. Die Proben wurden auf dem Schnitt mittels Immunhistochemie angefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Proben von gesundem Knochenmark dienten als Vergleich.

Bei AML-Patienten kommt es zu einer höheren Expression von hAES als bei Gesunden. Des Weiteren war festzustellen, dass Patienten mit einer höheren Expression in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ein signifikant besseres Überleben zeigen. Eine weitere Relation zwischen hoher hAES-Expression und einem besseren Überleben fand sich bei Patienten unter sechzig Jahren und bei Patientinnen. Dies war auch der Fall bei Patienten, die an Tag 16 der Chemotherapie weniger als fünf Prozent Blasten im Knochenmark aufwiesen, und bei Patienten in Remission. Patienten, die aus verschiedenen Gründen keine Therapie erhalten haben, zeigten eine niedrigere Expression von hAES.

Es ist also festzustellen, dass die unterschiedliche hAES-Expression bei AML-Patienten einen prognostischen Wert für den Krankheitsverlauf hat.

## **7. Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow für die gute Zusammenarbeit und die Zeit, mit der er mir für diese Arbeit zur Verfügung stand.

Des Weiteren möchte ich Dr. rer. nat. Marcus Knop danken, der mir immer als ein guter Betreuer zur Seite gestanden hat und mich bei allen Problemen wissenschaftlicher und privater Art unterstützt hat.

Ohne die Mitarbeit von Dr. med. Uta Brunberg wäre die umfassende Tabelle der Patientendaten nicht entstanden. Dies gilt ebenso für Frau Heike Reimsbach.

Ich danke den Mitarbeiterinnen des Labors für Immunhistochemie im Institut für Pathologie in Münster für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung des Abschnitts über die Herstellung eines Tissue-Microarrays.

Ein ganz besondere Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Stefan, ohne deren Hilfe ich nicht ausgekommen wäre.

Für die Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen danke ich meiner guten Freundin Beatrix Dünschede.

## **8. Lebenslauf**

## **9. Literatur**

1. Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004) Pathologie, Urban & Fischer, 3. Auflage, Seite 81; Seite 507, Seite 510, Seiten 524-533
2. Brantjes H, Roose J, van de Wetering M, Clevers H (2001) All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Research* 7: 1410-1419
3. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughout in situ studies. *Journal of Pathology* 195: 72-79
4. Büchner T (1999) Akute myeloische Leukämie. In: Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA; Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M, Flasnoecker M, Thiemes Innere Medizin, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1. Auflage, Seiten 865-870
5. Chen CC, Yang CF, Yang MH, Lee KD, Kwang WK, You JY, Yu YB, Ho CH, Tzeng CH, Chau WK, Hsu HC, Gau, JP (2005) Pretreatment prognostic factors and treatment outcome in elderly patients with de novo acute myeloid leukemia. *Annals of Oncology* 16; 1366-1373
6. Chen G, Courey AJ (2000) Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene* 249: 1-16
7. Davis RL, Turner LT (2001) Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20: 8342-8357
8. Dolled-Filhart M, Rimm DL Section 4: Tissue Arrays – <http://gateway.tx.ovid.com/ovidweb.cgi?targetFrame=1&S=HMCMFPCMFEDD...> - 19.02.2007

9. Fisher AL, Caudy M (1998) Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes & development* 12: 1931-1940
10. Gökbuget N, Ganser A, Schlenk RF – <http://www.dgho.de> – 24.07.2008
11. Greaves MF (1997) Aetiology of acute leukaemia. *The Lancet* 349: 344-349
12. Heilmeyer B, Buske C, Spiekermann K, Bohlander S, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Braess J (2007) Diagnostik, Klassifikation und Prognosefaktoren der akuten myeloischen Leukämie. *Medizinische Klinik* 102: 296-308
13. <http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html> – 25.07.2008
14. Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, Harrison TR, Resnick WR, Wintrobe MM, Thorn GW, Adams RD, Beeson PB, Bennett IL, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Root R, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (1995) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16<sup>th</sup> Edition; McGraw-Hill, 2005; Seiten 632-637
15. Mikesch HJ, Steffen B, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C (2007) The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 21: 1638-1647
16. Netzwerk für angeborene Störungen der Blutbildung – [http://www.bone-marrow-failure-syndromes.de/erkrankungen/arztinfo\\_ctp.htm](http://www.bone-marrow-failure-syndromes.de/erkrankungen/arztinfo_ctp.htm) – 22.08.2007
17. Noll S, Schaub-Kuhnen S (2000) *Praxis der Immunhistochemie*, Urban & Fischer, 1. Auflage, Seiten 18-19
18. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J (2004) *Basislehrbuch Innere Medizin*, Urban & Fischer, 3. Auflage, Seiten 299-304
19. Russel NH (1997) Biology of acute leukaemia. *The Lancet* 349: 118-122
20. Sitterlin D, Tiollais P, Transy C (1997) The RAR alpha-PLZF chimera associated with Acute Promyelocytic Leukemia has retained a sequence-specific DNA-binding domain. *Oncogene* 14 (9): 1067-1074

21. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA (2004) Acute Myeloid Leukemia. *Hematology* 2004: 98-117
22. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G (2001) Tissue Microarrays for Rapid Linking of Molecular Changes to clinical Endpoints. *American Journal of Pathology* 6: 2249-2256



## **10. Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
+	Pluszeichen
7+3(-Schema)	Chemotherapie mit Cytosin-Arabinosid und Daunorubicin
<=	kleiner gleich
=	gleich
>	kleiner als
>	größer als
>=	größer gleich
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AML1/ETO	Akutes myeloisches Leukämie Gen 1/englisch eight-twenty-one in Anlehnung an die Chromosomen 8 und 21
APC	adenomatous polyposis coli
ATRA	all-trans-Retinolsäure
ATRA(-Schema)	Chemotherapie mit u.a. dem Einsatz von all-trans-Retinolsäure
BFU-E	burst forming unit erythroid
bzw.	beziehungsweise
β-TRCP	β-transducin-repeat-containing-protein
°C	Grad Celsius
CBFβ	core-binding factor β
CD	clusters of differentiation
CFU	colony forming unit)
CFU-FEM	colony-forming unit granulocyte-erythroid-makrophage- megakaryocyte
CFU-GM	colony-forming unit granulocyte-monocyte
CK1	casein-kinase 1

CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CR	komplette Remission
CRi	komplette Remission mit inkompletter hämatopoetischer Regeneration
d	Tag
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ed	Frühtod (early death)
EPO	Erythropoetin
et al.	et alteri
FAB	French-American-British-Group
Flt3	Fms-like tyrosine kinase 3
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-stimulierender Faktor
Grg	Groucho-Proteine
h	Stunde
hAES	humanes amino-enhancer-of-split-Protein
HAM(-Schema)	Chemotherapie mit hochdosiertem Cytosin-Arabinosid und Mitoxantron
Hb	Hämoglobinwert
HD	hypoplastischer Todesfall
HDAC	Histondeacetylase
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	human leukocyte antigen
IL	Interleukin
INF	Interferon

inv(16)	Inversion 16
ITD	interne Tandemduplikation
KOF	Körperoberfläche
kum. Überleben	kumulatives Überleben
l	Liter
LEF	lymphocyte enhancing factor
LRP-Rezeptor	LDL-receptor related protein
LSAB-/AP-Methode	Methode, die ein Enzymkonjugat aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase nutzt
M0-M7	Untergruppen der FAB-Klassifikation für die AML
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MDC	multi-protein destruction complex
MDR1	Multidrug-Resistance-Pumpe 1
MDS	myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
min	Minute
MLL	myeloid/lymphoid leukemia- oder mixed-lineage leukemia-Gen
MYH11	myosin heavy chain 11
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
m <sup>2</sup> KOF	Quadratmeter der Körperoberfläche
NEZ	nichterythrozytäre Zellen
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NBM	normal bone marrow
pH	pH-Wert
PLZF-RAR $\alpha$	promyelocytic leukemia-zinc-finger-protein
PML-RAR $\alpha$	promyelocytic-leukemia-retenoic-receptor $\alpha$
POX	Myeloperoxidase

PR	partielle Remission
PYGO	pygopus
q	langer Chromosomenarm
RD	refraktäre AML, refractory disease
Spalten%	Spaltenprozent
t(11;17)	Translokation der Chromosomen 11 und 17
t(15;17)	Translokation der Chromosomen 15 und 17
t(8;21)	Translokation der Chromosomen 8 und 21
TAD(-Schema)	Chemotherapie mit 6-Thioguanin, Cytosin-Arabinosid, Daunorubicin
TAD/HAM	Kombination des TAD- und HAM-Schemas
Tcf	T-cell factor
TLE-	transducin-like-enhancer-of-split
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
u.a.	unter anderem
WHO	World Health Organisation
Wif-1	Wingless inhibitory factor 1
Wnt-Signalweg	Wingless-Signalweg
z.B.	zum Beispiel
Zeilen%	Zeilenprozent

## **11. Erklärung über selbständige Arbeit**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich erkläre weiterhin, dass ich alles gedanklich, inhaltlich oder wörtlich von anderen (z.B. aus Büchern, Zeitschriften, Zeitungen, Lexika, Internet) Übernommene als solches kenntlich gemacht, d.h. die jeweilige Herkunft im Text oder in den Anmerkungen belegt habe. Dies gilt gegebenenfalls auch für Tabellen, Skizzen, Zeichnungen, bildliche Darstellungen usw. Ich nehme zur Kenntnis, dass die nachgewiesene Unterlassung der Herkunftsangabe als versuchte Täuschung bzw. als Plagiat („geistiger Diebstahl“) gewertet wird. Unkenntnis der in der Wissenschaft gebräuchlichen Regeln gilt nicht als Entlastung. Ich anerkenne hiermit, dass bei Vorliegen eines Plagiats die Arbeit nicht als selbstständige Leistung gewertet wird.