

Aus der Klinik für Innere Medizin
mit Schwerpunkt Hämatologie&Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Etablierung der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR zur Bestimmung des BCL-2-Transkriptes bei akuten myeloischen Leukämien

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Kaishan LIU
aus Beijing, VR CHINA

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Christian A. Schmidt

2. Prof. Dr. Wolfgang Siegert

3. Prof. Dr. Andreas Neubauer

Datum der Promotion: 22. 04. 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das BCL-2 Protein und seine Wirkungen	2
1.1.1	BCL-2 und verwandte Proteine	2
1.1.2	Der Wirkmechanismus von BCL-2	3
1.2	BCL-2 und akute myeloische Leukämien	5
1.2.1	Das Expressionsmuster des BCL-2 Gens	5
1.2.2	Akute myeloische Leukämien	5
1.2.3	BCL-2 Expression bei AML.....	6
1.3	Chemotherapie und Medikamenten bei AML	7
1.3.1	Induktionstherapie	7
1.3.2	Differenzierungsinduktion.....	7
1.4	Die Wirkungsmechanismen der zytotoxischen Substanzen	8
1.4.1	Cytosinarabinosid (Ara-C)	8
1.4.2	Idarubicin.....	8
1.4.3	Der prädiktive Wert von BCL-2 bei AML	9
2	Fragestellung	10
3	Patienten, Material und Methoden	11
3.1	Patienten	11
3.2	Material und Geräte	11
3.2.1	Reagenzien.....	11
3.2.2	Puffer und Lösungen	13
3.2.3	Gel	14
3.2.4	Geräte.....	14
3.3	Methoden	15
3.3.1	Die Separierung der peripheren mononukleären Blutzellen.....	15
3.3.2	Die RNA-Isolierung	15
3.3.3	Die Bestimmung der Konzentration von RNA.....	15
3.3.4	Die Synthese der cDNA	16
3.3.5	Die Qualitätsbestimmung der cDNA.....	16
3.3.6	Die konventionelle Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR).....	16
3.3.6.1	Die Reaktionsansätze und Bedingungen für die RT-PCR.....	17

3.3.7	Die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR.....	18
3.3.7.1	Das ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System	20
3.3.7.2	Primer-Design.....	20
3.3.7.3	Sonden-Design.....	21
3.3.7.4	Die Reaktionsansätze und Bedingungen für die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR	22
4	Ergebnisse	25
4.1	Konstruktion und Nachweis der Standardreihe	25
4.1.1	Nachweis der Standardreihe für das β -Actin-Transkript.....	25
4.1.1.1	Nachweis der β -Actin Standardreihe bei der konventionellen PCR.....	26
4.1.1.2	Nachweis der β -Actin Standardreihe bei der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR	27
4.1.2	Nachweis der Standardreihe für das BCL-2-Transkript.....	30
4.1.2.1	Nachweis der BCL-2 Standardreihe bei der konventionellen PCR.....	30
4.2	Die BCL-2-Expression bei den AML Subtypen.....	33
4.3	Die BCL-2-Expression in den Subpopulationen der mononukleären Zellen	35
4.4	Die Beurteilung der BCL-2 Expression von sieben Patientenproben im Verlauf. 36	
4.4.1	Der Verlauf des BCL-2-Transkriptes bei den Patienten 1 und 2.....	37
4.4.2	Der Verlauf des BCL-2-Transkriptes bei den Patienten 3 und 4.....	38
4.4.3	Der Verlauf des BCL-2-Transkriptes bei dem Patienten 5	39
4.4.4	Der Verlauf des BCL-2-Transkriptes bei den Patienten 6 und 7.....	40
5	Diskussion	41
5.1	Die Bestimmung des BCL-2-Transkriptes mittels Echtzeit-Fluoreszenz-PCR.....	41
5.2	Die Rolle des BCL-2 Gens bei der Chemoresistenz.....	43
5.3	Die Einschätzung der Therapieeffizienz durch BCL-2-Transkripte bei AML.....	45
6	Zusammenfassung.....	47
7	Literaturverzeichnis.....	49
8	Verzeichnis der Abkürzungen.....	61
9	Danksagung.....	63
10	Lebenslauf.....	64
	Erklärung an Eides Statt.....	65

1 Einleitung

Das BCL-2 (BCL, engl.: „B-cell-leukemia/lymphoma“) Onkogen spielt eine wichtige Rolle bei dem programmierten Zelltod (Apoptose). Dieses Gen wurde als Onkogen der t(14;18)(q32;q21)-Translokation in folliculären Non-Hodgkin-Lymphomen entdeckt. Nachdem zuerst bei niedrig malignen Non-Hodgkin Lymphomen eine translokationsbedingte BCL-2-Überexpression gefunden wurde, konnte auch bei normalen Zellen und anderen Malignitäten ein positiver BCL-2-Nachweis geführt werden, obwohl keine BCL-2-Translokation vorhanden ist, wie z.B. bei den akuten myeloischen Leukämien (AML).

Die AML ist eine maligne Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle. Neben einer verstärkten Proliferation kann auch eine gestörte Apoptose zur malignen Erkrankung beitragen. Das BCL-2 Protein blockiert die Apoptose und verlängert das Zellüberleben. Obwohl die AML einen unterschiedlichen BCL-2-Level aufweist, wird das höchste BCL-2-Niveau in den autonom proliferierenden Vorläuferzellen (Blasten) *in vitro* und den Zellen, die das positive Oberflächenantigen CD34 exprimieren, beobachtet.

Trotz der Fortschritte in der Behandlung der AML, entwickelt sich bei einem Anteil der AML Patienten ein Therapieversagen und ein Rezidiv. Das schlechte Therapieergebnis könnte auf einer erhöhten Chemoresistenz beruhen. Goldstandard der Induktionstherapie ist eine Kombination aus Ara-C und Idarubicin. Die beiden Substanzen induzieren Einzel- und Doppelstrangbrüche der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und führen zur Apoptose der Leukämiezellen in der Therapie der AML. In früheren Studien wurde gezeigt, dass das BCL-2 Protein die Chemoresistenz der Leukämiezellen gegenüber zytotoxischen Medikamenten erhöhte. Die höhere BCL-2-Expression in den Leukämiezellen korreliert mit niedriger kompletter Remissionsrate nach Induktionstherapie und kürzerer Überlebenszeit und gilt damit als ein ungünstiger prognostischer Faktor bei den AML. Ziel dieser Untersuchung ist es, mit einer neu entwickelten Methode, der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR, AML-Zellen auf BCL-2 Expression zu untersuchen.

1.1 Das BCL-2 Protein und seine Wirkungen

Das BCL-2-Gen wurde 1985 von Tsujimoto Y *et al.* in folliculären Non-Hodgkin-Lymphomen entdeckt (Tsujimoto *et al.*, 1984, 1985). BCL-2 ist ein Protein mit einer relativen Molmasse von ca. 26-kD (Tsujimoto *et al.*, 1986). Das Protein ist in der äußeren Mitochondrienmembran, der Kernmembran und dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Hockenbery *et al.*, 1990; Mornaghan *et al.*, 1992; Jacobson *et al.*, 1993; Krajewski *et al.*, 1993). Die biologische Wirkung des BCL-2-Proteins ist die Hemmung der Apoptose (Hockenbery *et al.*, 1991, 1993).

1.1.1 BCL-2 und verwandte Proteine

Apoptose, der programmierte Zelltod bezeichnet den Prozess des physiologischen Zelltodes, der durch die betroffene Zelle selbst gesteuert und in speziellen Fällen initiiert wird (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980). Apoptose kann als zelluläre Antwort auf lebensbedrohliche externe Einflüsse wie bakterielle Toxine, Virusinfektionen, ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika ausgelöst werden. Die Apoptose ist in diesem Fall als eine Art biologische Sicherung zu sehen, um geschädigte Zellen zu entfernen (Carson *et al.*, 1993; Kerr *et al.*, 1994). Andererseits ist die Apoptose ein normaler Bestandteil aller Differenzierungs- und Reifungsprozesse eines Organismus. Die Apoptose ist verantwortlich für die Elimination überflüssiger oder redundanter Zellpopulationen und die Anzahl der Zellteilungen ist für jeden Zelltyp genau festgelegt (Graville *et al.*, 1998; Green DR, 1998a). Apoptose ist ein aktiver Prozess und steht unter genetischer Kontrolle. Bei der Apoptose wird beobachtet, dass die Zelle schrumpft, ihr Inhalt dichter wird, sich die Kernmembran auflöst und die Kern-DNA fragmentiert. Schließlich vesikuliert die apoptotische Zelle *in vitro* zu kleinen Partien, den apoptotischen Körperchen. Die Zelle *in vivo* wird sofort von ihren Nachbarn oder einem Makrophagen durch Phagozytose aufgenommen, ohne dass cytoplasmatische Komponenten freigesetzt werden (Ellis *et al.*, 1991; Vaux *et al.*, 1999).

Die Regulation der Apoptose wird insbesondere durch Mitglieder der BCL-2-Familie realisiert (Adams *et al.*, 1998; Reed *et al.*, 1998). Diese können durch Homo- oder Heterodimerisierung sowohl hemmend als auch stimulierend auf die Apoptose wirken. Inzwischen zeigt die sog. BCL-2-Familie eine Gruppe zahlreicher eng miteinander verbundener und interagierender Moleküle wie BCL-2, BCL-W, BAX, BCL-X, BAD, BAK, BIK, A1, MCL-1 BID und BIM. Einige dieser Faktoren wirken antiapoptotisch wie z.B. BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1 und A1 (Vaux *et al.*, 1988; Boise *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1996; Kozopas *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1993), während andere Faktoren wie BAX, BAK, BID, BIM und BAD proapoptotische Faktoren

darstellen (Oltvai *et al.*, 1993; Chittenden *et al.*, 1995; Farrow *et al.*, 1995; Kiefer *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; O'Connor *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1995). Expression und Funktion von Mitgliedern der BCL-2-Familie sind in Tabelle 1 zusammengefasst. BCL-X existiert als Folge alternativen mRNA-Spleißens in verschiedenen Isoformen (Boise *et al.*, 1993).

Tabelle 1: Eigenschaften von Mitgliedern der BCL-2-Familie

Gen	Genprodukt	Wirkung auf Apoptose	Expression
<i>BCL-2</i>	BCL-2 α	Hemmung	embryonal: viele Gewebe postnatal: Stamm- u. Progenitorzellen
<i>BCL-X</i>	BCL-X _L	Hemmung	embryonal: viele Gewebe postnatal: Stamm- u. Progenitorzellen
	BCL-X _s	Förderung	Thymus
	BCL-X _{β}	Hemmung	wie BCL-X _L
<i>BAX</i>	BAX α	Förderung	verschiedene Gewebe
<i>A1</i>	A1	Hemmung	Blutzellen
<i>MCL-1</i>	MCL-1	Hemmung	Myeloische Zellen

BCL-2 selbst ist ein 26-kD schweres Protein. Dieses Protein schützt die Zellen direkt vor Apoptoseinduktion durch diverse Stimuli wie Entzug von Wachstumsfaktoren, Hitzeschock, sowie Exposition gegenüber DNA-schädigenden Substanzen. Deswegen ist BCL-2 der Prototyp einer ganzen Familie ähnlicher Proteine.

1.1.2 Der Wirkmechanismus von BCL-2

Das Produkt des BCL-2-Gens stellt einen wichtigen Regulator der Apoptose dar. BCL-2 führt zur Hemmung der Apoptose. Die molekularen Mechanismen dieser Hemmung sind noch weitgehend ungeklärt. Vermutlich kann BCL-2 die Cytochrom-C-Freisetzung aus den Mitochondrien blockieren. Es wird weiterhin vermutet, dass BCL-2 die Apoptoseinduktion über die Kontrolle von Caspasen reguliert (Uren *et al.*, 1996; Villa *et al.*, 1997).

Auf zellulärer Ebene wird die Apoptose über die Bindung spezifischer Liganden an deren Transmembranrezeptoren, die sog. „Todesrezeptoren“ (death receptors), ausgelöst. Die wichtigsten Transmembranrezeptoren sind TNF-R1 (tumor necrosis factor receptor) und Fas (oder CD95 bzw. APO1) mit ihren Liganden TNF α bzw. FasL (Scaffidi *et al.*, 1998; Wallach *et al.*,

1998; Nagata *et al.*, 1998). Die Bindung von Liganden an den Rezeptor führt zur Bildung des sog. DISC-Komplexes (death-inducing signalling complex) oder Apoptosom. Die Apoptosom besteht aus Cytochrom C, Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor), dATP (deoxyadenosine triphosphate) und Pro-Caspase 9. Cytochrom C aus den Mitochondrien in Anwesenheit von Apaf-1 und dATP aktiviert Caspase 9, die wiederum Caspase 3, 6 und 7 aktiviert (Liu *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998; Krebs *et al.*, 1999). Caspasen (cysteinyll aspartate-specific proteases) sind im Zytoplasma lokalisiert und kommen zunächst als inaktive Proenzyme im Körper vor. Caspasen werden durch enzymatische oder autokatalytische Spaltungen aktiviert. Da die enzymatische Aktivierung vor allem durch andere aktivierte Caspasen erfolgt, wird angenommen, dass die Caspase-Kaskade der Verstärkung des Apoptosesignals dient (Thornberry *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999; Budihardjo *et al.*, 1999). Caspasen sind in ihrer Eigenschaft als Enzyme die eigentlichen ausführenden Effektoren im Rahmen der Apoptose. Durch Caspasen werden zahlreiche Struktur-, Kern- und Signal-proteine der Zelle z.B. Aktin, DNA-abhängige Proteinkinasen zerstört. Caspase 3, 6 und 7 sind die am weitesten terminal gelegenen Vertreter der Caspasenfamilie und erkennen kritische zelluläre Substrate, deren Spaltung zu den typischen morphologischen und funktionellen Veränderungen der Apoptose führt (Green *et al.*, 1998b; Slee *et al.*, 1999).

Der genaue molekulare Wirkmechanismus von BCL-2 ist noch nicht bekannt, jedoch scheint die Interaktion mit Mitochondrien von besonderer Bedeutung zu sein. BCL-2 kann die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol blockieren, oder zusammen mit BCL-X_L den Caspase 9 aktivierenden Apaf-1/Cyto-C-Komplex hemmen (Abb. 1) (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1998c; Pan *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999).

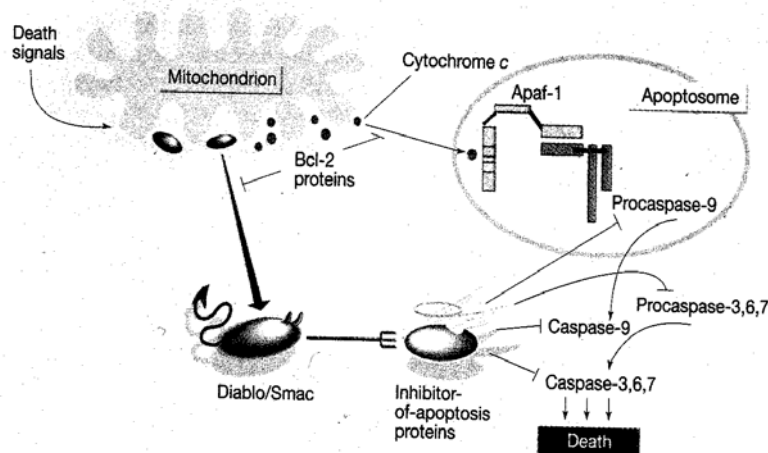


Abbildung 1: Der molekulare Wirkmechanismus von BCL-2 (Laurenzi *et al.*, 2000)..

1.2 BCL-2 und akute myeloische Leukämien

1.2.1 Das Expressionsmuster des BCL-2 Gens

Anfangs wurde das BCL-2 Gen als Translokationsonkogen bezeichnet. Die Translokation findet sich in mehr als 80 % der folliculären Lymphome (Lee *et al.*, 1987), in ca. 20 % diffuser großzelliger Lymphome (Fleischman *et al.*, 1989) und in ca. 50 % der adulten undifferenzierten Lymphome (Weiss *et al.*, 1987). Auf Chromosom 14 liegen die Bruchstellen entweder innerhalb oder in der Nähe eines J-Segments des Immunglobulin-Schwerketten-Locus. Auf Chromosom 18 liegen die Bruchstellen in der Nähe eines Onkogens, das mit BCL-2 bezeichnet wird. Im Rahmen der Translokation wird dieses Gen von Chromosom 18 in Juxtaposition zum Enhancer des Immunglobulin-Schwerketten-Locus auf Chromosom 14 Transloziert. Dadurch wird die Transkription des BCL-2 Gens aktiviert (Cleary *et al.*, 1985; Tsujimoto *et al.*, 1984). Es kommt zur Vermehrung der BCL-2-mRNA, woraus eine erhöhte Menge an BCL-2-Protein in den Lymphomzellen resultiert. Schließlich resultiert dies in einer Akkumulation maligner Lymphozyten. Obwohl bei der Mehrzahl der Non-Hodgkin-B-Zell-Lymphome das BCL-2 Gen in die chromosomale Translokation (14;18) aufgewiesen ist, beobachtet man in normalen hämatopoetischen Zellen und umfangreichen hämatologischen Malignomen z.B. AML eine Überexpression, jedoch in keinem Fall eine Translokation des Gens (Pezella *et al.*, 1990; Zutter *et al.*, 1991; Delia *et al.*, 1992; Bensi *et al.*, 1995).

Im Verlauf der Fetalentwicklung wird BCL-2 in vielen Geweben exprimiert. Im erwachsenen Organismus hingegen wird BCL-2 nur in Stamm- und frühen Vorläuferzellen z.B. des Darms und des hämatopoetischen Systems exprimiert. Im Verlauf der Differenzierung wird die Expression abgeschaltet. Dieses Expressionsmuster deutet darauf hin, dass BCL-2 in regenerierenden Geweben wie dem hämatopoetischen System das Überleben der Stammzell-populationen sichert (McDonnell *et al.*, 1993; Nunez *et al.*, 1990; Vaux *et al.*, 1988).

1.2.2 Akute myeloische Leukämien

Bei den AML handelt es sich um heterogene, maligne Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, denen die maligne Transformation einer hämatopoetischen Vorläuferzelle zugrunde liegt. Folge dieser Transformation ist ein Verlust oder die Einschränkung des Differenzierungspotentials der Zellen mit einem Ausreifungsstopp auf einem frühen Stadium der Myelopoese. Bei erhaltener Proliferationskapazität kommt es zur klonalen Expansion der malignen Zellen mit sukzessiver „Verdrängung“ der normalen Hämatopoese (Büchner T, 1993; Busque *et al.*, 1993).

Die Diagnose der AML basiert auf dem Nachweis von leukämischen Blasten in Knochenmark, peripherem Blut oder extramedullärem Gewebe. Entsprechend der Morphologie der vorherrschenden Blastenpopulation werden die AML den acht Subgruppen der „*French-American-British*“ (FAB)-Klassifikation zugeordnet. Obgleich in der ursprünglichen Fassung der FAB-Klassifikation nicht berücksichtigt, spielen zytochemische Reaktionen, insbesondere der Nachweis der Myeloperoxidase- und der unspezifischen Esterase-expression, für die Klassifikation der AML und insbesondere zur Abgrenzung von lymphatischen Neoplasien eine wichtige Rolle. Die AML unterscheidet acht Subtypen (M0-M7) und orientiert sich dabei an dem Differenzierungsgrad und zellulärer Ausreifung der Blasten. Die Subtypen M1 und M2 umfassen die Myeloblastenleukämien ohne und mit Ausreifung der Zellen, M3 entspricht der Promyelozytenleukämie, M4 der Myelomonoblastenleukämie, M5 der Monoblastenleukämie [ohne Ausreifung (M5a) und mit Ausreifung (M5b)]; Die Gruppe M6 entspricht der Erythroleukämie und M7 der Megakaryoblastenleukämie. Bei einem weiteren Subtyp (M0) handelt es sich um AML-Fälle mit minimaler Differenzierung. Zytochemisch läßt sich Myeloperoxidase nicht nachweisen. Die Zugehörigkeit zur myeloischen Reihe ergibt sich durch Nachweis der Expression myeloischer Antigene (Bennett, *et al.*, 1985a, 1985b, 1991).

1.2.3 BCL-2 Expression bei AML

Bei der AML wird eine vermehrte BCL-2 Expression und eine dementsprechend verminderte Apoptose bei der Akkumulation unreifer myeloischer Zellen gefunden. BCL-2 inhibiert den programmierten Zelltod (Apoptose) und verlängert das Überleben der frühen Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems, und sogar das der genetischen mangelhaften Progenitorzellen. Transformierte Zellen können durch eine veränderte Apoptosesensitivität den physiologischen Eliminationsmechanismen entgehen und im Rahmen des verlängerten Überlebens die Gelegenheit zu weiteren Mutationen erhalten. Störungen in der Regulation bzw. Expression des BCL-2 Proteins wurden für AML gezeigt. Diese Krankheit ist grundsätzlich durch eine verminderte Apoptoserate gekennzeichnet und hierdurch teilweise auch chemoresistent (Bissonnette *et al.*, 1992; Fanidi *et al.*, 1992; Reed JC, 1995). Das höchste Niveau der BCL-2 Expression ist in den *in vitro* autonom proliferierenden Vorläuferzellen der AML (Hunter *et al.*, 1993; Löwenberg *et al.*, 1993; Russell *et al.*, 1995) und den Blasten nachweisbar, die das positive Oberflächenantigen CD34 exprimieren (Bradbury *et al.*, 1995, 1997; Lauria *et al.*, 1997). Die hohe BCL-2-Expression in den Blasten korreliert mit einer Chemotherapieresistenz bei AML.

1.3 Chemotherapie und Medikamenten bei AML

Die Chemotherapie mit zytotoxischen Substanzen ist Basis in der Behandlung der AML. Ziel der Chemotherapie ist die möglichst vollständige Elimination des leukämischen Klonen und die Rekonstitution der normalen Hämatopoese. Dies wurde durch die Einführung effektiver Zytostatika (Kombinationen) durchgesetzt.

1.3.1 Induktionstherapie

Durch Induktionstherapie soll eine Remission erreicht werden. Der Zustand für eine komplette Remission (CR) bezeichnet die Reduktion der Leukämiezellen unter die lichtmikroskopische Nachweisgrenze (< 5 % Blasten in einem normozellulären Knochenmark) und die Rekonstitution der normalen Hämatopoese (Cheson *et al.*, 1990). Inzwischen ist akzeptiert, dass Patienten im Alter bis 60 Jahre von einer Intensivierung der Induktionstherapie profitieren. Dies ist die sog. „Doppelinduktion“, bei der der zweite Induktionsstoß unabhängig von der Rekonstitution der normalen Hämatopoese zu einem festen Zeitpunkt begonnen wird.

Wichtigste Substanzen in der Induktionstherapie sind Cytosinarabinosid (Ara-C) und Anthrazykline. Bei der Induktionstherapie werden beide Substanzen miteinander kombiniert, teilweise unter Hinzufügung einer dritten Substanz wie Etoposid (VP16). Damit kann bei *de novo* AML-Patienten eine Remissionsrate von bis zu 75 % erzielt werden. Als Anthrazyklin wird Idarubicin zunehmend verwendet, da dieses Medikament den Vorteil einer höheren CR-Rate und einer geringeren Myokardtoxizität hat (Bishop *et al.* 1990; Stone *et al.*, 1993; Ganser *et al.*, 1994).

1.3.2 Differenzierungsinduktion

Ein besonderes Therapieprinzip wurde für Patienten mit Promyelozytenleukämie (M3) entwickelt (Fenaux *et al.*, 1993). Bei dieser AML-Form kann eine Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 17 nachgewiesen werden. Durch diese Translokation kommt es zur Expression eines aberranten Retinsäure-rezeptors. Es wurde entdeckt, dass unter Gabe von *all-trans*-Retinsäure (ATRA) promyelozytäre Blasten ausdifferenzieren und damit ihre Teilungsfähigkeit verlieren. Die zusätzliche Gabe von ATRA zur Induktionschemotherapie kann die Remissionsergebnisse und die Langzeitprognose von Patienten mit M3 verbessern (Breitman *et al.*, 1980, 1981; Chomienne *et al.* 1990; Chen *et al.*, 1991).

1.4 Die Wirkungsmechanismen der zytotoxischen Substanzen

Für Zytostatika bei den AML konnte inzwischen gezeigt werden, dass sie ihre zytotoxische Wirkung durch Apoptoseinduktion erzielen. Etwa zwei Drittel der Patienten erreichen im Rahmen der Induktionsbehandlung, in der Regel mit Ara-C und Idarubicin, eine komplette Remission.

1.4.1 Cytosinarabinosid (Ara-C)

Ara-C ist eines der effizientesten Medikamente in der Behandlung der AML. Es interferiert mit der DNA-Replikation und wirkt damit zytotoxisch. Das Ara-C ist ein Strukturanalogon des Cytidin (Cyt) und des Deoxy-cytidin (d-Cyt). Diese chemische Verwandtschaft ist der Schlüssel für die biologischen Effekte des Ara-C an der DNA-Synthese.

Ara-C wird wie Cytidin und Deoxy-cytidin durch intrazelluläre dreistufige Phosphorylierung zum Ara-C-Triphosphat (Ara-CTP) aufgenommen, was die Voraussetzung für die Hemmung der DNA-Polymerase und den Einbau in die DNA ist. Das Ara-CTP hemmt kompetitiv die DNA-Polymerase. Der Einbau in die DNA und die Induktion von Einzelstrangbrüchen und DNA-Strangabbruch wird mit terminalem Ara-CTP erreicht. Dem intrazellulären Ara-CTP kommt damit eine zentrale Bedeutung zu (Kessel *et al.*, 1967; Harris *et al.*, 1981; Kufe *et al.*, 1984, 1985).

1.4.2 Idarubicin

Anthrazykline stellen eine der wichtigsten Substanzgruppen in der Behandlung hämatologischer Neoplasien. Idarubicin (4-demethoxy-daunorubicin) ist ein Daunorubicin-Derivat. Der exakte Wirkungsmechanismus der Anthrazykline konnte noch nicht abschließend geklärt werden, jedoch scheinen DNA-Interkalation, Hemmung der Topoisomerase II und intrazelluläre Bildung freier Sauerstoffradikale von zentraler Bedeutung. Idarubicin weist im Vergleich zu Daunorubicin eine verstärkte Fähigkeit zur DNA-Interkalation und Hemmung der Topoisomerase-II-Aktivität auf. In intakten Tumorzellen zeigt Idarubicin eine um 20 % höhere DNA-Bindung als Daunorubicin und induziert in höherem Maße Doppel- und Einzelstrangbrüche der DNA (Ganzina *et al.*, 1986; Glisson *et al.*, 1987; Rose KM, 1988; Speth *et al.*, 1989).

Chemotherapeutische Substanzen, wie Ara-C und Idarubicin, induzieren Doppel- und Einzelstrangbrüche der DNA und führen schließlich zur Apoptose der Leukämiezellen. Dazu gibt es auch andere zytotoxische Substanzen wie VP16, Methotrexat (MTX), und Bleomycin, die eine Apoptose-induzierende Wirkung auf Tumorzellen zeigen.

1.4.3 Der prädiktive Wert von BCL-2 bei AML

Obwohl die verschiedenen Chemotherapie Protokolle die Heilungschancen akuter myeloischer Leukämien deutlich verbessern, zeigt ein Teil der AML ein schlechtes Ergebnis. Die schlechten Ansprechraten bei diesem Anteil der AML Patienten könnten auf einer erhöhten Chemoresistenz beruhen. Klinische Chemoresistenz kann auf physiologisch-pharmakokinetischer Ebene wirksam sein oder sich durch molekulare Mechanismen erklären.

BCL-2 könnte auf molekularer Ebene zur Chemoresistenz beitragen. Die Aussagen über den prognostischen Wert der BCL-2-Expression bei Tumoren und der Korrelation zum Ansprechen auf eine Chemotherapie sind unterschiedlich. Fisher *et al.* korreliert die BCL-2-Expression bei großzelligen Lymphomen mit einem schlechten Ansprechen auf die Chemotherapie. Im Gegensatz dazu, ist die Prognose für Patienten mit Adeno- und Plattenepithelkarzinomen bei positivem BCL-2-Status deutlich besser als mit negativem BCL-2-Status (Yunis *et al.*, 1989; Fisher *et al.*, 1993).

Ob die BCL-2-Expression einen prädiktiven Wert für die Prognose von AML besitzt, bedarf es weiterer Untersuchungen. In früheren Studien ist der Zusammenhang von BCL-2 und einer erhöhten Chemotherapieresistenz untersucht worden. Dabei zeigte sich, dass zahlreiche Zytostatika wie Ara-C und Idarubicin ihre Wirkung über eine Apoptoseinduktion erzielen. Die hohe BCL-2-Expression in den Blasten der AML blockiert die von zytotoxischen Substanzen induzierte Apoptose und erhöht die Chemoresistenz der Leukämieblasten gegenüber Medikamenten (Miyashita *et al.*, 1992; Kamesaki *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1994). Damit hängt das hohe BCL-2-Niveau in den Leukämiezellen mit einem schlechten Ansprechen auf die Chemotherapie zusammen (Campos *et al.*, 1993; Miyashita *et al.*, 1993; Maung *et al.*, 1994). Der BCL-2-Nachweis würde bei den AML als chemotherapeutisch ungünstiger Faktor zu werten sein. Aber zur Zeit fehlt eine schnelle und effektive Methode, die das BCL-2 Gen im Therapieverlauf der AML Patienten überwachen kann. In dieser Studie wird eine exakte quantitative PCR, die sog. Echtzeit-Fluoreszenz-PCR entwickelt. Mit dieser neuen Methode kann das BCL-2 Transkript genauer analysiert werden.

2 Fragestellung

Die akuten myeloischen Leukämien beruhen auf der Proliferation unreifer maligner myeloischer Vorläuferzellen. Daraus resultiert eine Suppression der normalen Blutbildung. Eine Chance auf Heilung besteht nur durch Chemotherapie, die bei der *de novo* AML eine Remissionsrate von bis zu 75 % erreicht. Trotz adäquater Therapie kommt es bei einem Teil der Patienten zu einem Therapieversagen und zu Rezidiven. Ein Grund für das schlechte Ansprechen auf die Chemotherapie besteht in einer erhöhten Chemoresistenz. Die vorherigen Studien haben gezeigt, dass die BCL-2 Gen Expression mit der Chemoresistenz korreliert.

Um die Rolle des BCL-2 Gens im klinischen Verlauf bei AML Patienten beurteilen zu können, wurden folgende Fragen bearbeitet:

- Kann die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR zur Messung des BCL-2 Transkriptes verwendet werden?
- Wird das BCL-2 Gen bei den AML exprimiert?
- Kann das BCL-2 Gen bei den AML als Vorhersageparameter der Chemotherapieresistenz verwendet werden?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Patienten

Es wurden Patientenproben aus dem Virchow-Klinikum Berlin, Abteilung für Innere Medizin und Poliklinik m.S. Hämatologie und Onkologie untersucht. Die Diagnose „AML“ (53 Fälle) basiert auf der Morphologie und der Immunphänotypisierung der vorherrschenden Blasten. Die Einteilung erfolgte nach den Kriterien der FAB-Klassifizierung (Bennett *et al*, 1985a, 1985b, 1991). Periphere Blutproben von 8 Gesunden standen als Kontrolle zur Verfügung. Die Leukämiezelllinie K562 (Chronische myeloische Leukämie) und die Lymphomzelllinie SUDHL4 (Follikuläres Lymphom) standen als Originale der Standardreihe zur Verfügung.

3.2 Material und Geräte

3.2.1 Reagenzien

Agarose	SERVA, Heidelberg
Ammoniumchlorid	MERCK, Darmstadt
<i>AmpliTaq</i> [®] DNA Polymerase	PERKIN ELMER USA,
Aqua ad iniectabilia Braun (dH ₂ O)	B. BRAUN, Melsungen
Bacto-agar	SIGMA, Steinheim
Bacto-Trypton	SIGMA, Steinheim
Bayol F (Öl)	SERVA, Heidelberg
Borsäure	MERCK, Darmstadt
Bromphenolblau	SERVA, Heidelberg
Chloroform	MERCK, Darmstadt
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	GIBCO BRL, Eggenstein
Dithiothreitol (DTT)	GIBCO BRL, Eggenstein
Ethylendinitrilotetraessigsäure,	
Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA-Titriplex)	MERCK, Darmstadt
Diethyl-Pyrocabonate (DEPC)	SIGMA, Steinheim
Eisessig	MERCK, Darmstadt
Ethanol	MERCK, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	SIGMA, St.Louis, USA

Kalium-hydrogencarbonat	MERCK, Darmstadt
HCl 32 %	MERCK, Darmstadt
Isoamylalkohol	MERCK, Darmstadt
Isopropanol	MERCK, Darmstadt
123 bp-DNA-Ladder	GIBCO BRL, Eggenstein
25 bp-DNA-Ladder	
Magnesium Chlorid (MgCl ₂)	GIBCO BRL, Eggenstein
Na-Citrat	MERCK, Darmstadt
Natrium Chlorid (NaCl)	MERCK, Darmstadt
PCR-Puffer (10 x)	GIBCO BRL, Eggenstein
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (10 x)	GIBCO BRL, Eggenstein
Platinum [®] <i>Taq</i> DNA Polymerase	GIBCO BRL, Eggenstein
Primer Oligonukleotide	TIB Mol Biol, Berlin
QIAprep [®] Spin Plasmid Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraktion Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Quick Spin [™] Column Sephadex [®] G-50	BOEHRINGER, Mannheim
Random Primed Labeling Kit	BOEHRINGER, Mannheim
Restriktive Endonuklease (Hind III, Xba I)	BOEHRINGER, Mannheim
RNasin Ribonuklease Inhibitor	PROMEGA, Madison, USA
5,6-Carboxy-x-Rhodamin (ROX) (150 µM)	Gennova
Sonde	TIB Mol Biol, Berlin
Superscript [™] RNase H Reverse Transcriptase	GIBCO BRL, Eggenstein
TA-Cloning [®] Kit	INVITROGEN BV, the Netherlands
Tris-(hydroxymethyl) aminomethan	MERCK, Darmstadt
Tris-HCl (pH 8,0)	MERCK, Darmstadt
X-Gal	Karl Roth, Karlsruhe

3.2.2 Puffer und Lösungen

Dextranlösung 5 %

Dextran T500	5	g
NaCl	0,876	g

Mit dH₂O auf 100 ml auffüllen

Lösung A (für RNA-Isolierung)

Guanidiniumisothiocyanat	8	M
Na-Citrat	0,1	M (pH 7,0)
N-Laurylsarcosin-Natrium-Salz	0,	5 % (w/v)

Lösung B (für RNA-Isolierung)

Lösung A	5	ml
β-Mercaptoethanol	0,36	ml

Binding & Washing Puffer

Tris-HCl pH 8,0	1,0	M
EDTA pH 8,0	0,5	M
NaCl	5	M

10x Lyse-Puffer

Ammoniumchloride	8,02	g
Kalium-hydrogencarbonat	1,0	g
EDTA-Titriplex III	0,037	g

Mit dH₂O auf 100 ml auffüllen

50x TAE-Puffer

Tris-hydroxymethyl-aminomethan	2	M
Eisessig	1	M
EDTA	50	mM

Mit dH₂O auf 500 ml auffüllen

10x TBE-Puffer

Tris-hydroxymethyl-aminomethan	0,89	M
Borsäure	0,89	M
EDTA-Titriplex	20	mM

Mit dH₂O auf 1000 ml auffüllen

Gelladepuffer (GLB)

Glycerol	87	%
Bromphenolblau	7,2	mM

Mit dH₂O auf 50 ml auffüllen

TE Puffer (pH 8,0)

Tris-HCl	10	mM
EDTA	1	mM

Mit dH₂O auf 1000 ml auffüllen

3.2.3 Gel

Agarose Gel	3,0	% (w/v)
Agarose	80	ml
1x TAE Puffer	5	µl (10 ug/µl)
EtBr		

3.2.4 Geräte

ABI Prism™ 7700 Sequence Detector System	PE Applied Biosystems, USA
Zentrifuge 5402	EPPENDORF, Hamburg
Vakuumbzentrifuge 5403	EPPENDORF, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus
Polaroid-Kamera MP4	SIGMA, München
UV-Spektrophotometer	Pharmacia Biotech
Horizontal-Elektrophorese	GIBCO BRL, Berlin
Elektrophoresekammer für Agarosegele	GIBCO BRL, Berlin
Polyethylenröhrchen 10 ml	FALCON, New Jersey, USA
Polyethylen Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 1 ml)	EPPENDORF, Hamburg
MicroAmp® Optical Tubes	PERKIN ELMER,
MicroAmp® Optical Caps	Foster City, USA

3.3 Methoden

3.3.1 Die Separierung der peripheren mononukleären Blutzellen

10 ml Heparinblut wird mit 2 ml Dextranlösung (4 °C) gemischt und dann 40 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird der Überstand abgehoben. Diese Proben werden 6 min. bei 1100 rpm zentrifugiert. Danach wird der Überstand mit einer Pasteur-Pipette abgehoben und verworfen. Das Sediment, das die mononukleären Zellen enthält, wird mit 10 ml Lyse-Puffer (1:10 Verdünnung) gemischt und 5 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 6 min. bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt. Anschließend wird dieses Zell-pellet mit PBS-Puffer gewaschen und für die RNA-Isolierung verwendet. Außerdem werden T-Zellen, B-Zellen und Granulozyten durch die „*Fluorescence-Activated Cell Sorting*“ (FACS) Technik separiert.

3.3.2 Die RNA-Isolierung

Die mononukleären Zellen werden in 900 µl Lösung B aufgenommen und gut gemischt. Dazu werden 100 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gegeben, 30 sek. auf dem Vortexer durchgemischt und für 5 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wird alles bei 13000 rpm für 25 min. bei 4 °C zentrifugiert. Der wässrige, die RNA enthaltende Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und 600 µl Isopropanol darin gegeben. Diese Probe kann bei –20 °C über Nacht aufbewahrt werden. Das RNA-Präzipitat wird danach bei 13000 rpm für 25 min. bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und verworfen, das Pellet wird in 600-700µl Ethanol (75 %) gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das trockene RNA-Pellet wird in DEPC/H₂O gelöst und die Konzentration bestimmt. Danach wird die RNA bei –80 °C aufbewahrt. Die Qualität der RNA wird durch eine 2,0 % Agarose Gel-Elektrophorese beurteilt. Die RNA-Probe (ca. 4 µl) wird mit 2 µl Gel-Ladepuffer in die Taschen des Minigels pipettiert und läuft bei 100 V über 40 min.

3.3.3 Die Bestimmung der Konzentration von RNA

Die RNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt. Zu diesem Zweck wird eine 1:50 Verdünnung der Probe hergestellt und gegen das gleiche Volumen der Verdünnungslösung in einem UV-Spektrophotometer bei λ 260 nm (A_{260}) und λ 280 (A_{280}) gemessen. Die Konzentration kann mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten berechnet werden.

3.3.4 Die Synthese der cDNA

cDNA ist eine DNA-Kopie durch Abschrift der Nukleotid-Sequenz einer mRNA. Das 3'-poly(A)-segment der mRNA dient als Hybridisierungspartner für ein Oligo-(dT)-Fragment, an dessen 3'-Ende die reverse Transkriptase starten kann. Es entsteht ein mRNA-DNA-Hybrid. Die folgende alkalische Hydrolyse zerstört dann die mRNA und hinterläßt eine einzelsträngige cDNA. RNA (1 µg) wird mit 2 µl 10x PCR-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 5 µl 2,5 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 1 µl (100 mM) Random Hexamer (Primer) und *aqua dest.* für 5 min. bei 85 °C im Hitzeblock inkubiert. Anschließend wird der Ansatz 1-2 min. auf Eis abgekühlt. Zum Ansatz wird dann 1 µl (33 U) RNase Inhibitor (RNasin) und 0,7 µl (200 U) Superscript (Reverse Transkriptase) gegeben. Anschließend wird der Ansatz 10 min. bei Raumtemperatur, dann für 50-55 min. bei 42 °C und weitere 5 min. bei 95 °C im Hitzeblock inkubiert. Dann wird der Ansatz 1-2 min. auf Eis gestellt. Danach ist der Syntheseprozess der cDNA abgeschlossen. Der Ansatz wird bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.5 Die Qualitätsbestimmung der cDNA

Die Qualität der cDNA-Synthese läßt sich aus einem PCR-Amplifikat mit einem bekannten ubiquitär exprimierten Gen, z.B. dem β -Actin Gen, unter Verwendung der 5'-Primer (5'-CCTTCCTgggCATggAgTCCT-3') und 3'-Primer (5'-AATCTCATCTTgTTTTCTgCg-3') ermitteln.

3.3.6 Die konventionelle Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)

Bei der PCR werden definierte DNA-Sequenzen spezifisch durch thermostabile DNA-Polymerasen vermehrt. Die Spezifität der Amplifikation wird durch den Einsatz von zwei Oligonukleotiden, sog. Primern, gewährleistet, welche zwei bestimmte, zu beiden Seiten der zu amplifizierenden Zielsequenz gelegene Regionen erkennen. Dabei liegt jeweils eine dieser Primerbindungsstellen auf einem der komplementären DNA-Stränge, sodass jeder der beiden DNA-Stränge als Vorlage (Template) dient. Die DNA-Polymerase synthetisiert den neuen DNA-Strang vom Primer ausgehend (Primer-extension).

Während eines Reaktionszyklus entstehen aus einem Doppelstrang zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle. Da jedes dieser DNA-Moleküle im nächsten Reaktionszyklus erneut als Template dient, kommt es nach wenigen Reaktionszyklen zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Moleküle. Die sequentielle Trennung des DNA-Doppelstrangs (Schritt 1: Denaturierung), die Bindung der Primer (Schritt 2: Annealing), die Synthese des neuen komplementären Stranges (Schritt 3: Extension) und die erneute Auftrennung der Doppelstränge werden durch

ein definiertes Temperaturprogramm gesteuert. Dieses Temperaturprogramm wird durch die „PCR-Maschine“ verwirklicht.

Auch RNA kann durch PCR amplifiziert werden, wenn sie zuvor durch reverse Transkriptase in DNA sog. cDNA (c steht für „complementary“) umgeschrieben wurde. Man spricht dann von RT-PCR. Die hohe Sensitivität der PCR resultiert aus der exponentiellen Zunahme der spezifischen DNA-Moleküle. Die Methode ist abhängig von der spezifischen DNA-Polymerase. Aus dem Bakterium *Thermus Aquaticus*, welcher in heißen Quellen vorkommt, kann diese hitzebeständige Polymerase gewonnen werden. Da diese sogenannte *Taq*-Polymerase durch wiederholtes Erhitzen nicht zerstört wird, konnte diese Methode vollautomatisiert werden (Mullis *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988; Arnheim *et al.*, 1992).

3.3.6.1 Die Reaktionsansätze und Bedingungen für die RT-PCR

Die Reaktionsansätze und Bedingungen der RT-PCR werden in Tabelle 2 und Tabelle 3 skizziert.

Tabelle 2: Die RT-PCR Reaktionsansätze für einen Ansatz von je 50 µl

Reagenzien	Volumen(µl)	Konzentration	Endkonzentration
10x PCR-Puffer	5	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 0,01 % Gelatine	1 mM Tris-HCl 5 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,001 % Gelatine
dNTP	4	je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	0,2 mM
5'-Primer (<i>Sense</i>)	2,5	10 µM	0,5 µM
3'-Primer (<i>Antisense</i>)	2,5	10 µM	0,5 µM
dH ₂ O	33,75		
<i>Taq</i> -Polymerase	0.25	5 U/µl	1,25 U/50µl
cDNA	2	50 ng /µl	100 ng /50µl

Tabelle 3: Tabelle 3 Die Amplifikationsbedingungen der RT-PCR

Schritte	Temperatur (°C)	Laufzeit (Minuten)	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	94	5	1
Annealing	60 (BCL-2) 67 (β -Actin)	1	1
Extension	72	1	1
Denaturierung	94	1	34
Annealing	60 (BCL-2) 67 (β -Actin)	1	34
Extension	72	1	34
Denaturierung	94	1	1
Annealing	60 (BCL-2) 67 (β -Actin)	10	1
Abkühlen/Aufbewahren	14		

Der Ansatz wird gründlich durchgemischt, in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und mit 50 μ l Öl überschichtet, um Kondensation an der Gefäßwand zu vermeiden. Es werden je nach Ansatz 2 μ l cDNA (100 ng) dazupipettiert. Danach wird die Amplifikationsreaktion im Thermozykler durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen der PCR werden in Tabelle 3 gezeigt. Nachdem die PCR-Zyklen (35) durchgelaufen sind, werden 7 μ l aus dem Ansatz entnommen und zusammen mit 3 μ l Gellade-Puffer auf ein 3 % Agarose-Gel aufgetragen. Die PCR-Produkte werden bei 100 V, 60 min. aufgetrennt. Die Amplifikatgröße kann anhand eines Markers, dessen Banden einen Abstand von 25 Basenpaaren haben, durch Anfärbung mit Ethidiumbromid ermittelt werden.

3.3.7 Die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine schnelle und sensitive Methode der DNA-Analyse. Es handelt sich um eine *in vitro* Vermehrung von DNA, bei der durch sich wiederholende Zyklen eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht wird. Obwohl die tägliche Laborarbeit erleichtert wird, verbraucht der Nachweis der PCR-Produkte noch immer viel Zeit und Arbeit. Um diese Methode zu verbessern, entwickelt man einen neuen As-

say, bei dem Amplifikation und der Nachweis der PCR-Produkte simultan in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden.

Dies gelang erstmals 1993 mit der von Lee *et al.* entwickelten Echtzeit-Fluoreszenz-PCR. Dieser sogenannte TaqMan™ PCR Assay basiert auf der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase. Bei diesem Assay wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht. Die Sonde befindet sich downstream eines der beiden Primer. Sie selbst kann nicht durch die Polymerase verlängert werden, da das 3'-Ende der Sonde mit einem Phosphatrest blockiert ist. Das 5'-Ende der Sonde ist mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (z.B. 6-Carboxyfluorescein, FAM) markiert, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (z.B. 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, TAMRA) trägt. Zwischen den beiden Farbstoffen entsteht ein Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET). FRET ist eine Übertragung der Anregungszustände von Elektronen zweier Fluorophore in hoher räumlicher Nähe (10-100 Å). Wenn die intakte Sonde mit den Primern zunächst an den DNA-Strang bindet, wird die Fluoreszenzemission des Reporter-Farbstoffs (FAM: $\lambda=518\text{nm}$) aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen FRET unterdrückt (Förster V, 1948; Lakowitz *et al.*, 1983). Während der PCR trifft die Taq-Polymerase nun auf diese Sonde. Die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase wird aktiviert und die Sonde wird bei der Verlängerung der Primer in 5'-3'-Richtung geschnitten. Freie, nicht-hybridisierte Sonde wird hingegen nicht hydrolisiert. Wenn es jedoch zum SONDENSCHNITT kommt, wird die räumliche Nähe und damit auch der FRET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Das Reporter-Signal wird freigesetzt. Entsprechend der Akkumulation der PCR-Produkte steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Die Veränderung der Fluoreszenzen kann schließlich mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus detektiert werden. Das Prinzip der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR ist in der Abbildung 2 dargestellt.

1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer
2. Primer-Verlängerung und SONDENSCHNITT
3. PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert, die Farbstoffe getrennt
4. In Abhängigkeit von der Zahl freigesetzter Reporter-moleküle wächst das Reporter-Signal

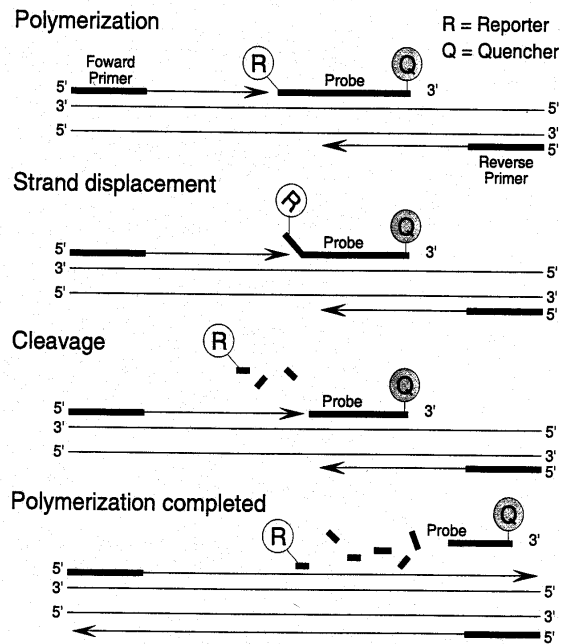


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Der Einfluss der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der *Taq*-Polymerase auf eine fluorogene Sonde, während der Verlängerung der Primer (TaqMan methodology; Perkin Elmer, Foster City, CA).

3.3.7.1 Das ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System

Mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detector Systems (7700 SDS) ist es möglich, den Verlauf einer Echtzeit-Fluoreszenz-PCR On-Line zu verfolgen. Das 7700 SDS besitzt eine CCD-Kamera (charge-coupled device camera). Das Fluoreszenzsignal wird der Kamera über Glasfaserkabel von 96 Probengefäßen zugeführt. Diese CCD-Kamera kann die Fluoreszenzemissionsdaten über einen Wellenlängenbereich von 500 bis 660 nm sammeln. Die Proben sind mit einer durchsichtigen Abdeckung geschlossen. Eine Analyse im geschlossenen Reaktionsgefäß bietet verschiedene Vorteile: Zum einen wird die Gefahr der Kontamination auf ein Minimum reduziert. Zum anderen ist die tatsächliche Arbeitszeit deutlich verringert, weil Post-PCR Schritte wie Gelelektrophoresen entfallen. Die Steuerung des Systems erfolgt vollständig über einen Power Macintosh 7200.

3.3.7.2 Primer-Design

Primer, eine synthetische Basen-Sequenz mit bestimmter Anzahl an Nukleotiden, werden für eine PCR-Amplifizierung benutzt. Die Primer sind so gewählt, dass sie antiparallel zueinander an die beiden Stränge der DNA binden. Die Primer sollten eine passende Länge von 15-25 bp

mit 50-60 % G + C enthalten, um die spezifische Anlagerung und optimale Annealingtemperatur (50-70 °C) zu erreichen. Für das BCL-2-Gen und das β -Actin-Gen werden je ein Primerpaar (Tab. 4, Abb. 3), über die Aminosäure kodierende Domäne verteilt, ausgewählt, damit die PCR-Produkte der cDNA amplifiziert werden können. Jedes Fragment ist zwischen 100 bis 200 Basenpaare lang.

3.3.7.3 Sonden-Design

Die fluorogene Sonde beeinflusst in großem Maße den Erfolg einer Echtzeit-Fluoreszenz-PCR. Diese Sonde besteht aus einem Oligonukleotid-Fragment. Sie trägt am 5'-Ende einen Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff. Durch einen Phosphatrest am 3'-Ende wird die Verlängerung der Sonde verhindert. Die Sonde befindet sich zwischen den beiden Primer-Zielsequenzen. Das 5'-Ende der Sonde sollte relativ nahe beim 3'-Ende des Primers liegen. Damit es zum Sondenschnitt durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq* DNA Polymerase kommen kann, muß die Sonde zuvor stabil an die Zielsequenz gebunden haben. Um dies zu erreichen, sollte der GC-Gehalt der Sonde etwa 50 % betragen. Bei der Sonde sollte es keine Komplementarität zu den beiden PCR-Primern geben, um eine Primer-Dimer Bildung zu verhindern. Die Sonde enthält eine Länge von ca. 20-30 bp. Die optimale Länge der Sonde liegt zwischen 24 und 30 Nukleotiden. Die verwendeten Sonden werden in der Abbildung 3 gezeigt.

Tabelle 4: Sequenzen der eingesetzten Primer und Sonde

Primer und Sonden	Sequenz der Primer und Sonden
BCL-2 5'-Primer	5'-gTTTGGTTTTATTTgAAAACCTg-3'
BCL-2 3'-Primer	5'-TTCTTTATAgTTCCCCACCATT-3'
β -Actin 5'-Primer	5'-AgCCTCgCCTTTgCCgA-3'
β -Actin 3'-Primer	5'-CTggTgCCTggggCg-3'
BCL-2 Sonde	5'-FAM-TgggggTTATCTgTACATCCTggggCAT-TAMRA
β -Actin Sonde	5'-FAM-CCgCCgCCCgTCCACACCCgCC-TAMRA

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

BCL-2

3661 TATCTTGTCACTGTAGTTTGGTTTTATTTGAAAACCTGACAAAAAAAAAAGTTCCAGGTGT

3721 GGAATATGGGGGTTATCTGTACATCCTGGGGCATTAAAAAAAAAATCAATGGTGGGGAAC

TTACCACCCCTTGA

3781 ATAAAGAAGTAACAAAAGAAGTGACATCTTCAGCAAATAAACTAGGAAATTTTTTTTTCT

TATTTCTT

β -Actin

355 AGAGCCTCGCCTTTGCCGATCCGCCGCCCGTCCACACCCGCCGCCAGCTCACCATGGATG

415 ATGATATCGCCGCGCTCGTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGCTTCGCGG

475 GCGACGATGCCCCCGGGCCGTCTTCCCCTCCATCGTGGGGCGCCCCAGGCACCAGGGGC

GCGGGGTCCGTGGTC

Abbildung 3: Die Position der verwendeten Primer und Sonden in der cDNA-Sequenz von BCL-2 und β -Actin (Bereich der Aminosäuren-kodierenden-Domäne). Die Primer und Sonden sind fett dargestellt. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

3.3.7.4 Die Reaktionsansätze und Bedingungen für die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Während der Extensionsphase der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR kann die Sonden-Template-Bindung im Gegensatz zur Primer-Template-Bindung durch die *Taq* DNA Polymerase nicht verlängert werden. Die Stabilität der Primer-Template-Bindung ist höher als die der Sonden-Template-Bindung. Um diese höhere Stabilität der Primer-Template-Bindung zu erreichen, sollte der Schmelzpunkt der Fluoreszenzsonde mindestens um ca. 5 °C über dem der PCR-Primer liegen. Die Bindung der Sonde an den Zielstrang wird für einen effizienten SONDENSCHNITT stabilisiert. Um dies zu erzielen, sollte sich die Temperatur des Extensionsschrittes unter dem Schmelzpunkt der Sonde befinden. Die *Taq* DNA Polymerase hat bereits bei Temperaturen von > 55 °C eine Aktivität. Deshalb können der Annealing- und Extensionsschritt kombiniert werden. Die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq* DNA Polymerase scheint in der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR von zentraler Bedeutung. *AmpliTaq* Platinum ist eine modifizierte Form der *Taq* DNA Polymerase. Das Enzym wird inaktiv geliefert und durch eine kurze Inkubation bei 95 °C irreversibel aktiviert. Diese Eigenschaft des Enzyms bietet einen Vorteil: Ohne vorherige

Aktivierung dieses Enzyms wird die Primer-Dimer-Bildung verhindert. Die Reaktionsansätze und Bedingungen der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR werden in Tabelle 5 und Tabelle 6 skizziert.

Tabelle 5: Die Reaktionsansätze der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Reagenzien	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration
10x PCR-Puffer	5	200 mM Tris-HCl 500 mM KCl ROX	20 mM Tris-HCl 50 mM KCl
MgCl ₂	4,5	50 mM	4,5 mM
TE-Puffer	0,8		
dNTP	4	je 2,5 mM dATP, dCTP dGTP, dTTP	0,2 mM
5'-Primer (<i>Sense</i>)	2,5	10 µM	0,5 µM
3'-Primer (<i>Antisense</i>)	2,5	10 µM	0,5 µM
Sonde	0,5	10 µM	0,1 µM
dH ₂ O	27,95		
GIBCO <i>Taq</i> Platinum	0,25	5 U/µl	1,25 U/50 µl
cDNA	2	50 ng /µl	100 ng /50 µl

Tabelle 6: Die Amplifikationsbedingungen der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Schritte	Temperatur	Laufzeit	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min. (BCL-2)	1
		5 min. (β-Actin)	
Denaturierung	95 °C	15 sek. (BCL-2)	45
		30 sek. (β-Actin)	
Annealing/Extension	60 °C (BCL-2)	30 sek. (BCL-2)	45
	67 °C (β-Actin)	60 sek. (β-Actin)	

Der Ansatz wird gründlich durchgemischt, in durchsichtigen Reaktionsgefäßen gegeben und mit durchsichtigen Abdeckungen geschlossen. Danach wird die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR Reaktion in ABI PRISM™ 7700 SDS Gerät durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen werden in Tabelle 6 gezeigt. Nachdem die PCR-Zyklen (45) durchgelaufen sind, wird die Endpunkanalyse sofort gemacht und eine solche Analyse dauert nur wenige Minuten.

Die statistische Analyse

Die Beurteilung und Charakterisierung von Analysenverfahren und Analysen-ergebnissen erfolgt durch statistische ANOVA und Student's Test. Das Modell der „*least-squares*“ linearen Regression wird für Analyse von Konzentration-Effekten Beziehungen angewandt. Der Wert „*r*“ wird mit Hilfe des t-Tests auf seine statistische Signifikanz hin untersucht und die Signifikanz wird als $P < 0,05$ bzw. $P < 0,01$ definiert. Alle Werte in den Abbildungen und Tabellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Konstruktion und Nachweis der Standardreihe

In dieser Studie wird die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR angewandt. Bei der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR sollte eine Standardreihe etabliert werden, um zum Beispiel eine unbekannte cDNA-Kopienzahl zu bestimmen. Um dies zu erreichen, werden Zielsequenzen bekannter Konzentration in einer Verdünnungsreihe eingesetzt. Die bekannten Sequenzen werden in logarithmischen Stufen von 10^7 bis 10 cDNA-Kopien verdünnt.

4.1.1 Nachweis der Standardreihe für das β -Actin-Transkript

Die quantitative Bestimmung einer Zielsequenz geht nur mit der Amplifikation eines Referenzgens. Referenzgene sind Homöostasegene, die stabil in einer Zelle vorhanden sind und nicht von Krankheiten beeinflusst werden sollten.

Als Referenzgen wird das β -Actin Gen benutzt, das in jeder Zelle nachgewiesen werden kann. Vorherige Arbeiten zeigten, dass in je 100 ng cDNA mehr als 10^5 Kopien des β -Actin Transkriptes vorhanden waren. Dies stellt eine für eine effiziente Reaktion ausreichende Menge an Kopien dar. Zur Etablierung einer Standardreihe für das β -Actin-Transkript, wird die β -Actin Sequenz zunächst in der chronischen myeloischen Leukämiezelllinie, K562 amplifiziert und daraus kloniert. Danach wird das β -Actin-Transkript in logarithmischen Stufen von 10^7 bis 10 cDNA-Kopien verdünnt.

4.1.1.1 Nachweis der β -Actin Standardreihe bei der konventionellen PCR

Die β -Actin Standardreihe wird mittels der konventionellen PCR amplifiziert und ihre Produkte werden auf ein 3,0 % Agarose Gel aufgetragen. Die Amplifikationsbanden von 10^7 bis 10^0 Kopien/100 ng cDNA sind deutlich sichtbar. Die Größe des β -Actin Transkriptes ist 175 bp.

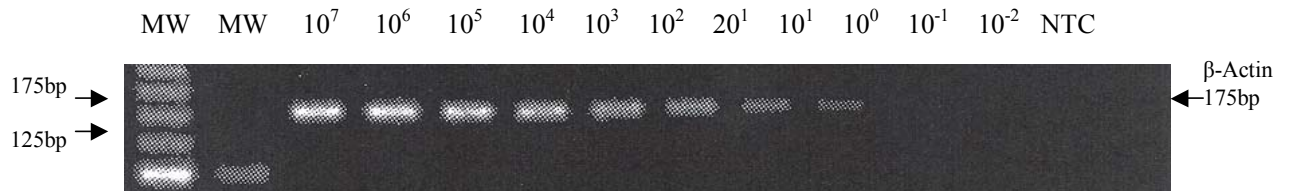


Abbildung 4: Nachweis der β -Actin Standardreihe bei der konventionellen PCR nach 35 Zyklen. Die Banden können durch Anfärbung mit Ethidiumbromid ermittelt werden. Die Ausgangstemplatezahl wird gezeigt. MW: Molekulargewichtsmarker (25bp und 123bp). NTC: Negativkontrolle (Wasser).

4.1.1.2 Nachweis der β -Actin Standardreihe bei der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Bei der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR stehen die Fluoreszenzänderungen im Verhältnis zur Akkumulation der PCR Produkte. Der Betrag der emittierten Fluoreszenzen in den ersten 15 Zyklen wird vom Reportersignal abgezogen, und somit die Signale aller Proben auf ein Ausgangsniveau gebracht. In einem Diagramm wird das Fluoreszenzsignal (Ordinate) gegen die Zykluszahl (Abszisse) aufgetragen. Das Sondensignal (ΔR_n) wird dann diskriminiert, wenn es auf den 10fachen Wert der Standardabweichung oberhalb der Ausgangsfluoreszenz ansteigt. Der Zyklus in dem dieser erste signifikante Anstieg geschieht, ist als Schwellenzyklus (threshold cycle, Ct-Wert) definiert. Der Ct-Wert ist proportional zur Ausgangsmenge der Probe und stellt der Quantifizierung einen verlässlichen Parameter zur Verfügung. Um die Templatezahl einer unbekannt Probe zu bestimmen, wird die bekannte Ausgangstemplatezahl einer Zielsequenz gegen ihren Ct-Wert aufgetragen. Dadurch wird eine Standardgerade festgelegt. Diese Standardgerade kann die Ausgangstemplatezahl einer unbekannt Probe durch Ct-Werte bestimmen.

Die β -Actin-Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10 cDNA-Kopien wird bei der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR quantifiziert. In der Abbildung 5 ist das Fluoreszenzsignal gegen die Zykluszahl dargestellt. In der Abbildung 6 wird die bekannte Ausgangstemplatezahl gegen ihren Ct-Wert gezeigt. Dadurch wird eine Standardgerade festgelegt.

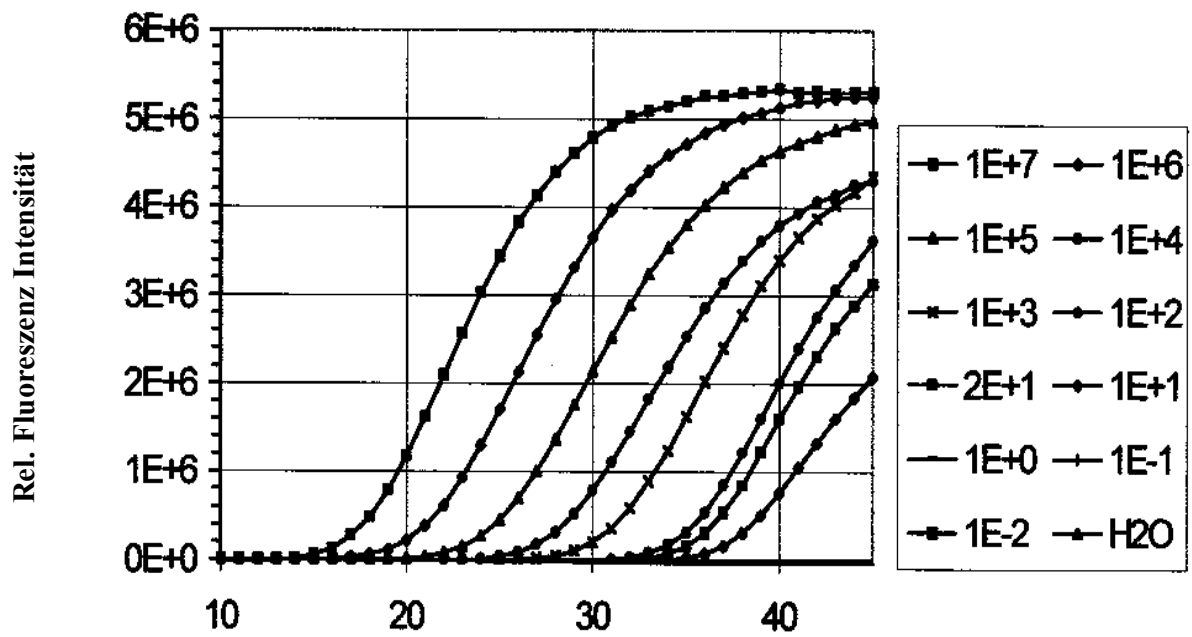


Abbildung 5: Das Fluoreszenzsignal gegen die Zykluszahl von der β -Actin Standardreihe.
Ct: Der Schwellenzyklus.

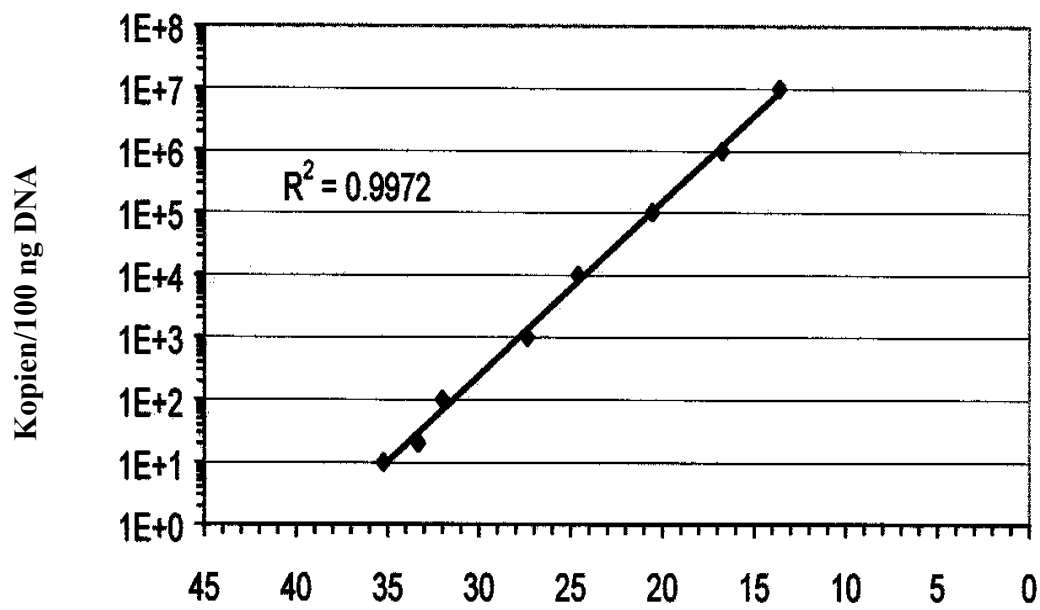


Abbildung 6: Die Standardgerade für das β -Actin Transkript. Ct: Der Schwellenzyklus.
 R^2 : Korrelationskoeffizient.

4.1.2 Nachweis der Standardreihe für das BCL-2-Transkript

Zur Quantifizierung des BCL-2-Transkriptes bei der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR sollte zuerst eine Standardreihe für das BCL-2-Transkript etabliert werden. Diese Zielsequenz wird aus der folliculären Lymphomzelllinie SUDHL4 erhalten. Dann wird dieses BCL-2-Transkript in einer Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10^{-2} cDNA-Kopien eingesetzt.

4.1.2.1 Nachweis der BCL-2 Standardreihe bei der konventionellen PCR

Die BCL-2 Standardreihe wird bei der konventionellen PCR amplifiziert und ihre Produkte werden auf ein 3,0 % Agarose Gel aufgetragen. Die positiven Banden von 10^7 bis 10^{-2} Kopien/100ng cDNA sind bemerkbar. Die Größe des BCL-2 Transkriptes ist 107 bp.

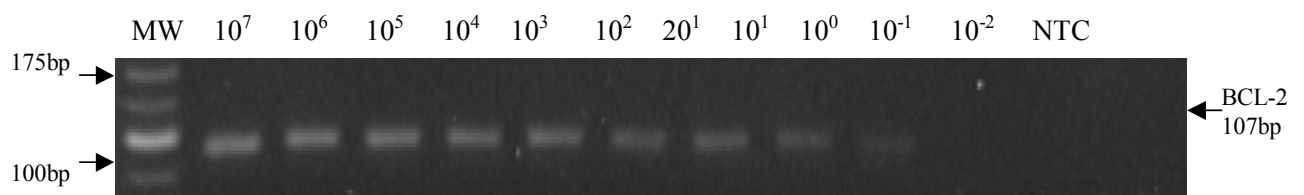


Abbildung 7: Nachweis der BCL-2 Standardreihe bei der konventionellen PCR nach 35 Zyklen. Die Produkte werden durch Anfärbung mit Ethidiumbromid ermittelt. Gekennzeichnet ist die Ausgangstemplatezahl dieser Standardreihe. MW: Molekulargewichtsmarker (25 bp). NTC: Negativkontrolle (Wasser).

4.1.1.1 Nachweis der BCL-2 Standardreihe bei der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Die BCL-2 Standardreihe von 10^7 bis 10 cDNA-Kopien wird bei der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR quantifiziert. In der Abbildung 8 ist das Fluoreszenzsignal gegen die Zykluszahl dargestellt. In der Abbildung 9 wird die bekannte Ausgangstemplatezahl gegen ihren Ct-Wert aufgetragen und durch diese Punkte eine Standardgerade gelegt.

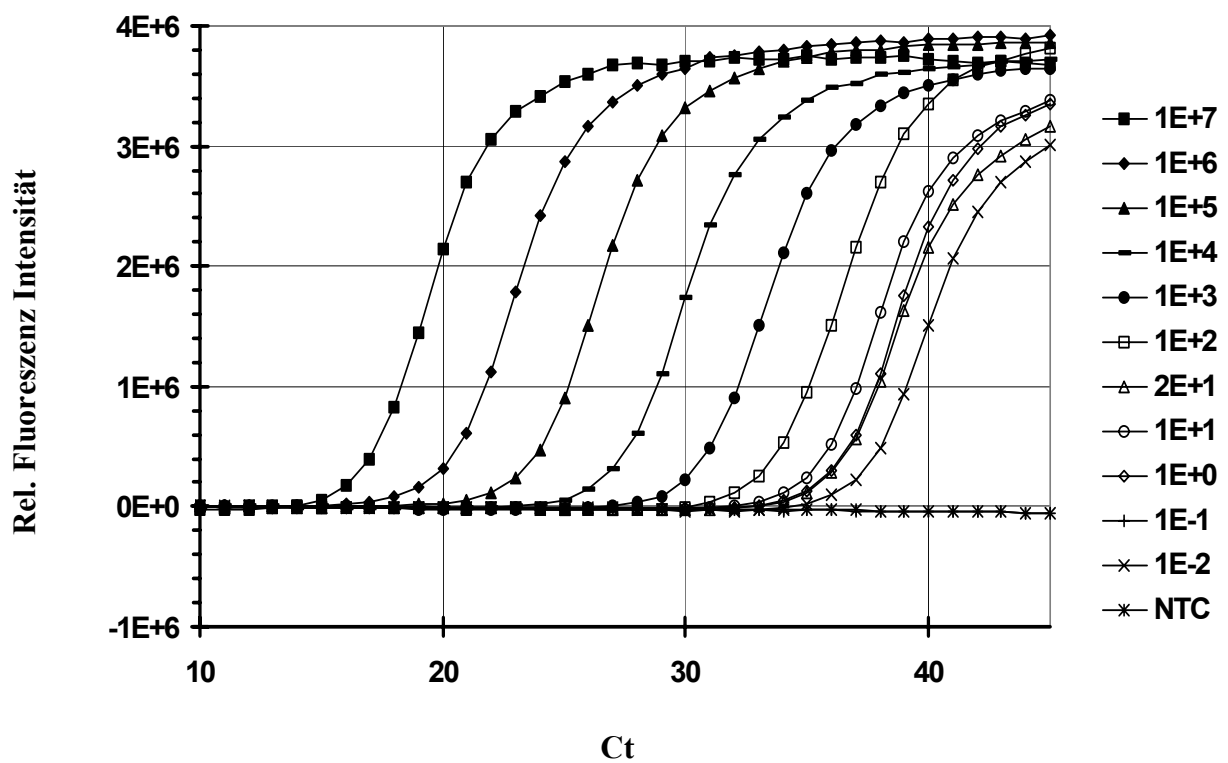


Abbildung 8: Das Fluoreszenzsignal gegen die Zykluszahl von der BCL-2 Standardreihe. Ct: Der Schwellenzyklus. NTC: Negativkontrolle (Wasser).

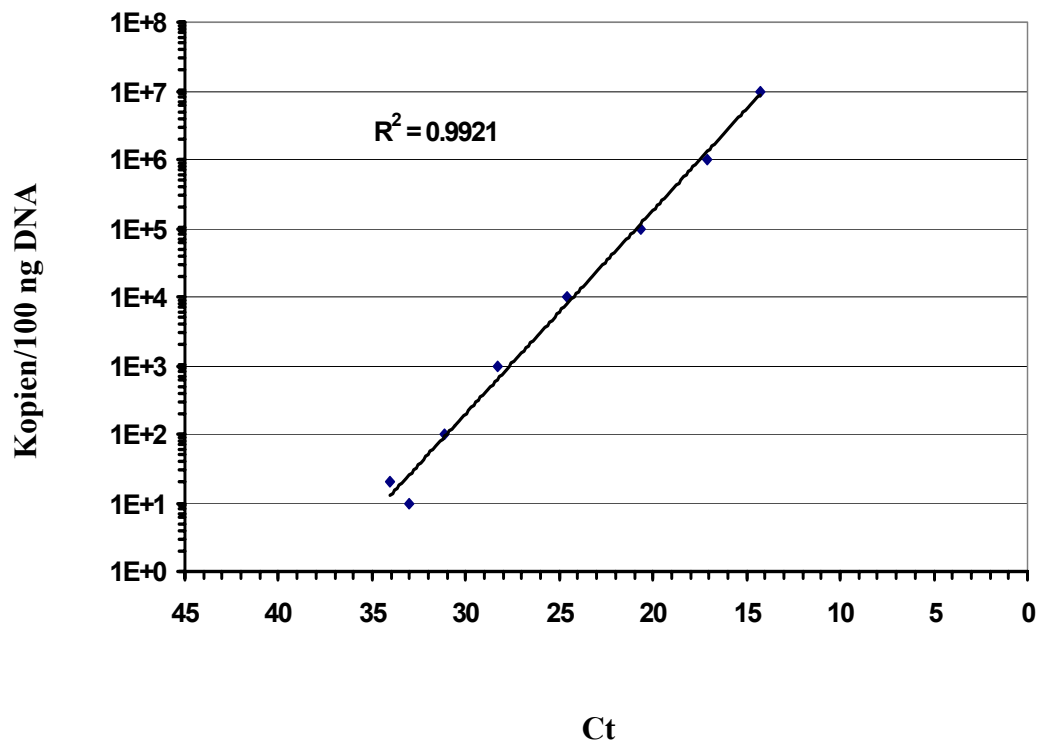


Abbildung 9: Die Standardgerade für das BCL-2-Trankript. Ct: Der Schwellenzyklus.
R²: Korrelationskoeffizient.

4.2 Die BCL-2-Expression bei den AML Subtypen

Entsprechend der Morphologie der vorherrschenden Blastenpopulationen werden die akuten myeloischen Leukämien (AML) den 8 Subgruppen der French-American-British (FAB)-Klassifikation zugeordnet. Die AML unterscheidet acht Subtypen (M0-M7). Die Subtypen M0, M1 und M2 umfassen die Myeloblastenleukämien ohne und mit Ausreifung der Zellen, M3 entspricht der Promyelozytenleukämie, M4 der Myelomonoblastenleukämie, M5 der Monoblastenleukämie [ohne Ausreifung (M5a) und mit Ausreifung (M5b)]; die Gruppe M6 entspricht der Erythroleukämie und M7 der Megakaryoblastenleukämie. Außer der Gruppe M6 wurde die BCL-2-Expression in allen sieben AML Subtypen aus 53 AML-Fällen mittels der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR untersucht. Für die BCL-2-Expression wurde eine Ratio BCL-2/ β -Actin bestimmt.

Bei 53 AML-Fällen wurde eine Expression von BCL-2 nachgewiesen, somit ergibt sich das in der Abbildung 10 dargestellte Bild. In der Abbildung 10 lässt sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression des BCL-2 Gens und den AML Subtypen in den untersuchten Fällen nicht belegen. Im Vergleich zur normalen Kontrolle weisen die Mittelwerte der BCL-2-Expression in den AML Subtypen keine signifikante Differenz auf ($P > 0,05$).

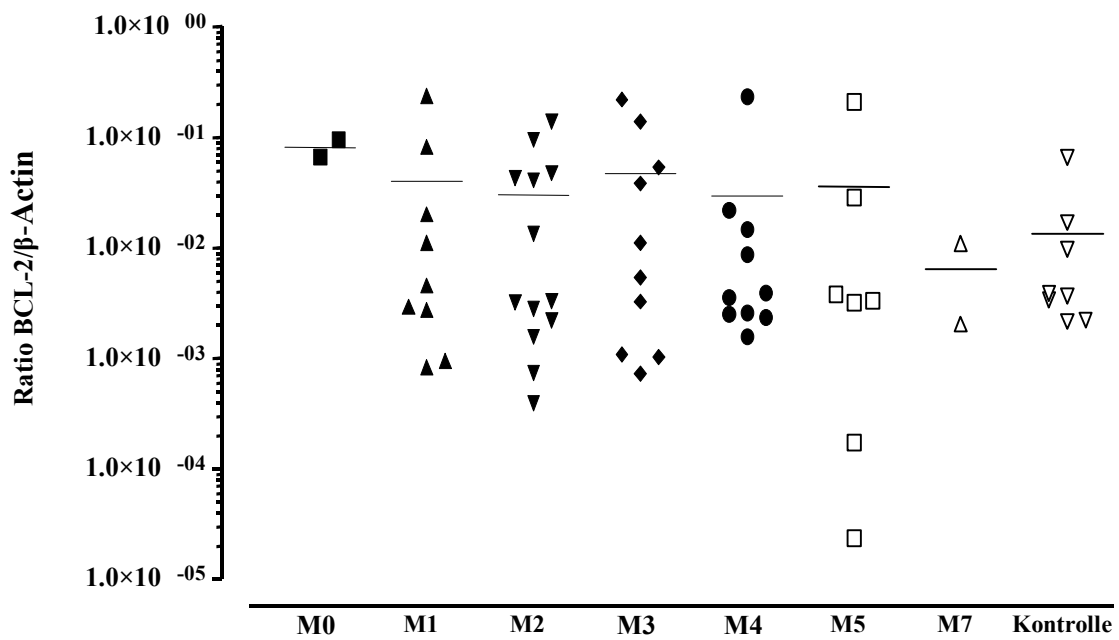


Abbildung 10: Die BCL-2-Expression in den AML Subtypen. Dargestellt ist die BCL-2/β-Actin Ratio gegen AML Subtypen und Kontrolle.

4.3 Die BCL-2-Expression in den Subpopulationen der mononukleären Zellen

Die BCL-2-Expression wurde in T-Zellen, B-Zellen und Granulozyten aus 5 AML-Patienten mit der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR untersucht. Eine BCL-2-Expression wurde in T-Zellen, B-Zellen und Granulozyten nachgewiesen. Daraus resultierte eine Ratio BCL-2/ β -Actin für die BCL-2-Expression. In der Abbildung 11 sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der BCL-2-Expression in drei Subgruppen der mononukleären Zellen dargestellt. Es gibt keine statistische Signifikanz bei der Differenz der BCL-2 Expression in diesen drei Subpopulationen ($P > 0,05$).

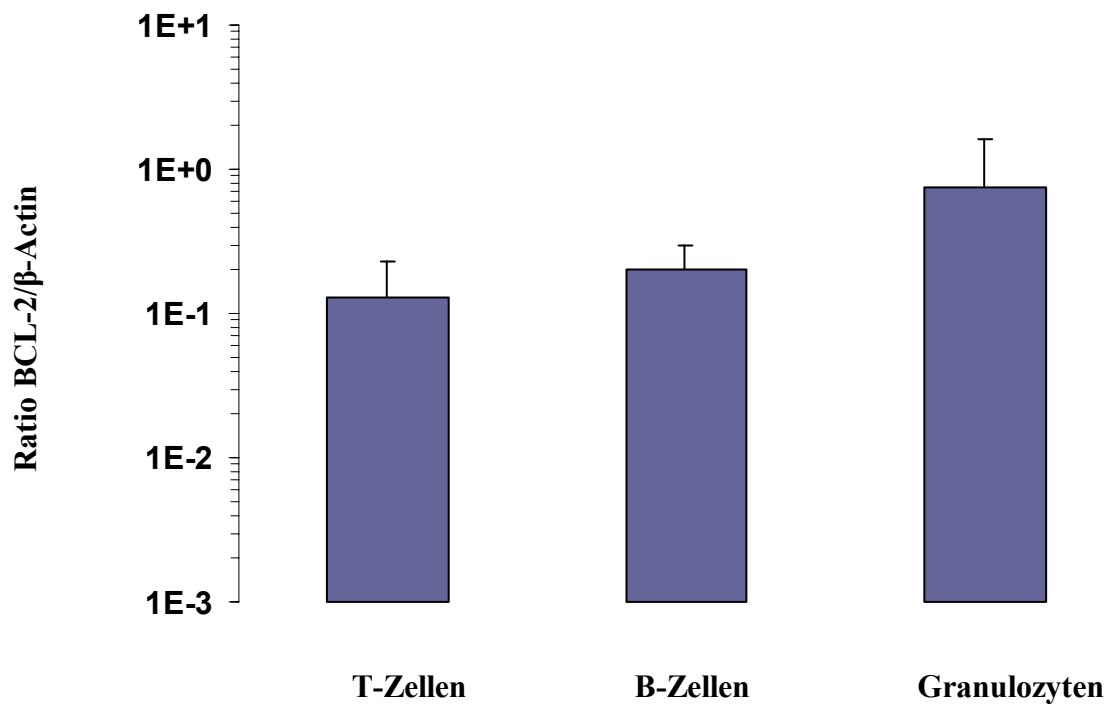


Abbildung 11: Die BCL-2-Expression in T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten. Dargestellt ist die BCL-2/ β -Actin Ratio gegen drei Subpopulationen der mononukleären Zellen. Die Balken bezeichnen die Mittelwerte der BCL-2-Expression.

4.4 Die Beurteilung der BCL-2 Expression von sieben Patientenproben im Verlauf

Trotz der Fortschritte in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämien des Kindes- und Jugendalters, rezidivieren ein Drittel dieser Patienten und ca. 15 % sind therapierefraktär. Nur ein Teil dieser Patienten, insbesondere solche mit langer Erstremission, können durch eine erneute zytostatische Chemotherapie eine zweite Remission erreichen. Die Untersuchungen zur Klärung der Ursachen dieser Chemotherapieresistenz stehen erst am Anfang. Da die Medikamente bei der Chemotherapie der AML zur Apoptose der Leukämiezellen führen und das Produkt des BCL-2 Gens die Apoptose blockiert, ist zu vermuten, dass die BCL-2 Expression im Zusammenhang mit der Chemoresistenz steht.

Nach einer kurzen Einleitung über die theoretischen Grundlagen der Chemotherapie wird über sieben Patienten, welche mit Ara-C und Idarubicin behandelt wurden, berichtet. Bei allen sieben Fällen lag eine akute myeloische Leukämie vor. Die FAB Subtypen von diesen Patienten sind wie folgt: M1 (n=1), M2 (n=1), M3 (n=1), M4 (n=2), M5 (n=1), M7 (n=1). Fünf der behandelten Patienten kamen in eine partielle oder komplette Remission, zwei sprachen auf die Therapie nicht an. Die Messung des BCL-2-Transkriptes im Verlauf der Chemotherapie eines Patienten erfolgte durch Echtzeit-Fluoreszenz-PCR. Das β -Actin Gen wurde als Referenzgen benutzt. Die BCL-2/ β -Actin Ratio repräsentierte die BCL-2-Expression.

4.4.1 Der Verlauf des BCL-2-Transkriptes bei den Patienten 1 und 2

Fall 1: Bei dem damals 47jährigen Patienten traten im Juli 1995 vermehrt Leukozyten im Blut Bild auf. Die Knochenmarkuntersuchung im Juli 1995 ergab die Diagnose einer akuten Myeloblastenleukämie (M1). Ein erster Behandlungszyklus mit Idarubicin und Ara-C wurde durchgeführt. Eine komplette Remission trat nicht ein. Eine zweite Doppelinduktionsbehandlung wurde deshalb im September 1995 durchgeführt. Damit wurde eine komplette Remission erreicht. Wie in Abbildung 12 gezeigt ist die BCL-2/ β -Actin Ratio mit der Induktionstherapie erniedrigt.

Fall 2: Der Patient erkrankte Anfang 1991. Bei der durchgeführten Knochenmarkpunktion wurde die Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie mit dem Subtyp M2 gestellt. Nach einer Induktionsbehandlung kam dieser Patient damit rasch in eine komplette Remission. Die Expression des BCL-2 Gens im Verlauf der Behandlung ist in der Abbildung 12 dargestellt. Während der Induktionstherapie sank die BCL-2/ β -Actin Ratio ab.

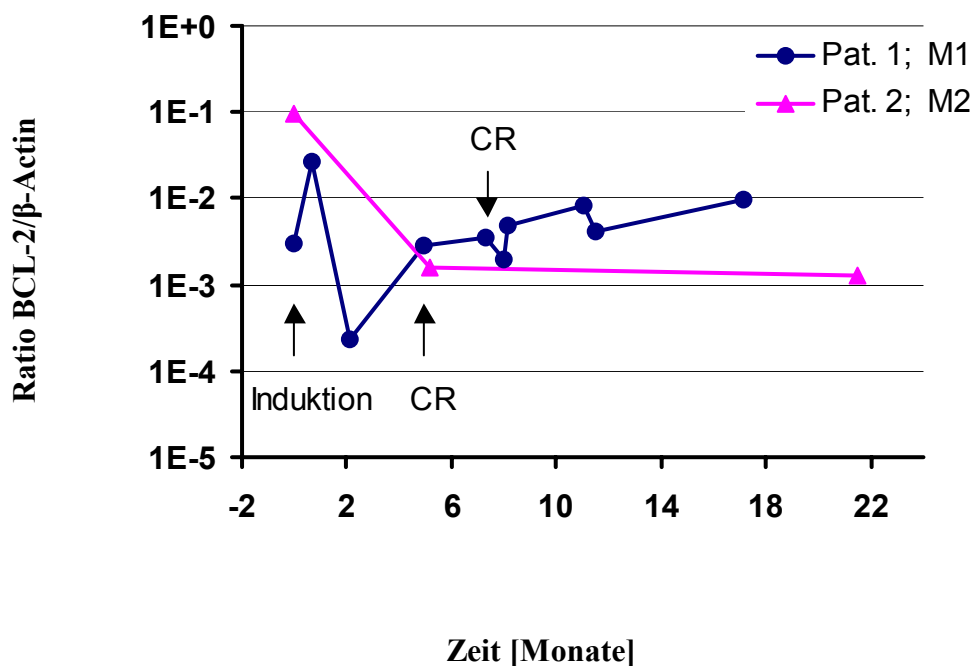


Abbildung 12: Die BCL-2/ β -Actin Ratio im Verlauf der Induktionsbehandlung der Patienten 1 und 2. CR: Komplette Remission.

4.4.2 Der Verlauf des BCL-2-Transkriptes bei den Patienten 3 und 4

Fall 3: Bei dieser Patientin wurde 1996 eine akute Megakaryoblastenleukämie (M7) diagnostiziert. Wie man in der Abbildung 13 sehen kann, fiel die BCL-2/ β -Actin Ratio im Verlauf der Chemotherapie signifikant ab. Danach erhielt sie eine Knochenmarktransplantation.

Fall 4: Bei dem 1951 geborenen Patienten zeigte eine Knochenmarkpunktion vermehrte Blasten. Als Ursache derselben wurde mittels der Knochenmarkuntersuchung die Diagnose einer akuten Promyelozytenleukämie (M3) gestellt. Zusätzlich zur konventionellen Induktionstherapie (Ara-C und Idarubicin) erhielt der Patient *all-trans*-Retinsäure (Tretinoin). Das Therapieansprechen wurde nach Ende der Induktionstherapie mit der BCL-2/ β -Actin Ratio geprüft. Der Rückgang der BCL-2/ β -Actin Ratio ist deutlich in der Abbildung 13 zu sehen. Bei diesem Patienten wurde eine komplette Remission (CR) erzielt.

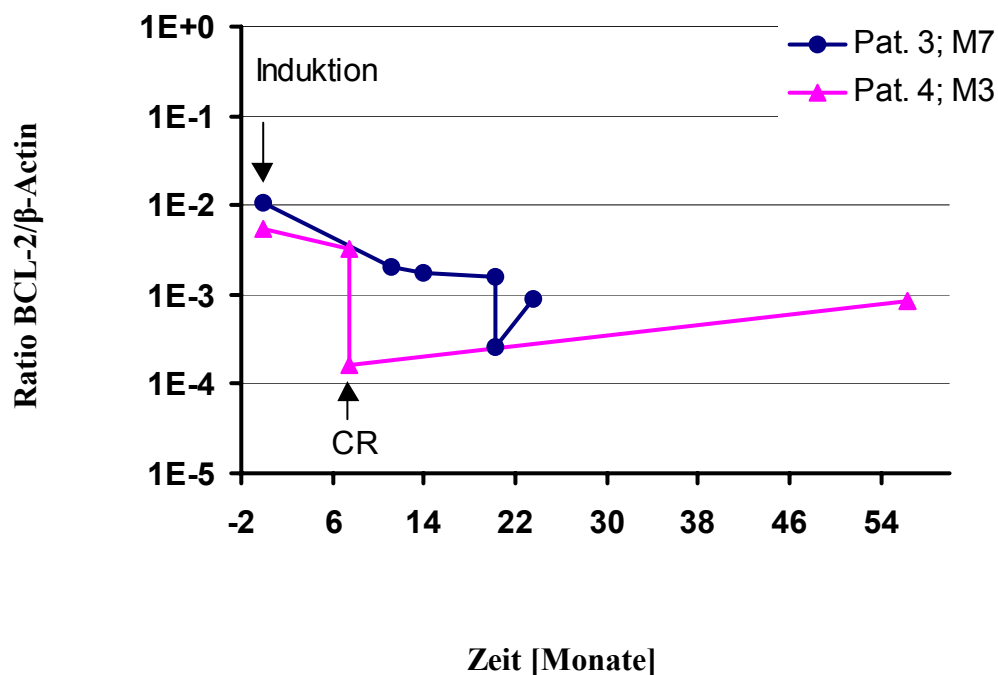


Abbildung 13: Die BCL-2/ β -Actin Ratio im Verlauf der Induktionstherapie der Patienten 3 und 4. CR: komplette Remission.

4.4.3 Der Verlauf des BCL-Trankriptes bei dem Patienten 5

Fall 5: In der Abbildung 14 ist die BCL-2/ β -Actin Ratio im Verlauf der Chemotherapie von Patient 5 dargestellt. Bei diesem Patienten wurde eine Myelomonoblastenleukämie (M4) diagnostiziert. Während des ersten Induktionszyklus, sank die BCL-2/ β -Actin Ratio ab. Im Gegensatz dazu kam es schon innerhalb des zweiten Therapiezyklus zu einem Anstieg der BCL-2/ β -Actin Ratio, sodass für diesen Patienten nach dem zweiten Zyklus noch ein Blastengehalt von 30 % nachgewiesen werden konnte.

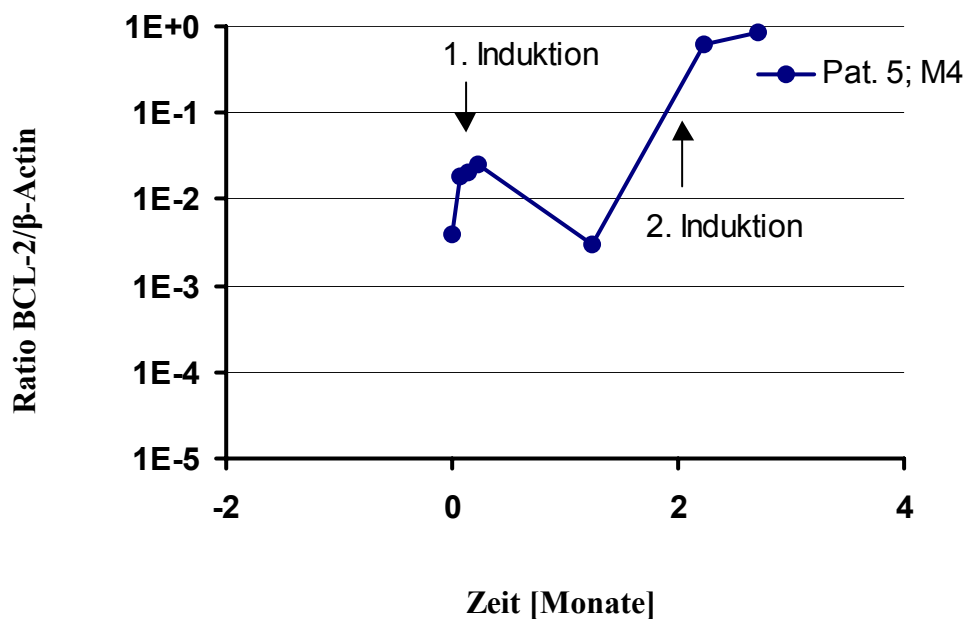


Abbildung 14: Die BCL-2/ β -Actin Ratio während der Induktionstherapie bei Patient 5 mit Myelomonoblastenleukämie (M4).

4.4.4 Der Verlauf des BCL-2-Transkriptes bei den Patienten 6 und 7

Fall 6: Bei dieser Patientin wurde im April 1996 eine hohe Anzahl an Monoblasten in einer Knochenmarkuntersuchungen festgestellt. Die Abklärung führte zur Diagnose einer akuten Monoblastenleukämie (M5). Wie in der Abbildung 15 dargestellt, stieg die BCL-2/ β -Actin Ratio mit der Entwicklung eines Rezidives an.

Fall 7: Bereits im Frühling 1996 fand sich im Knochenmark dieses Patienten, eine große Zahl an Blasten. Die Diagnose einer akuten Myelomonoblastenleukämie (M4) wurde gestellt. Auf die eingeleitete Therapie, sprach der Patient jedoch nicht an.

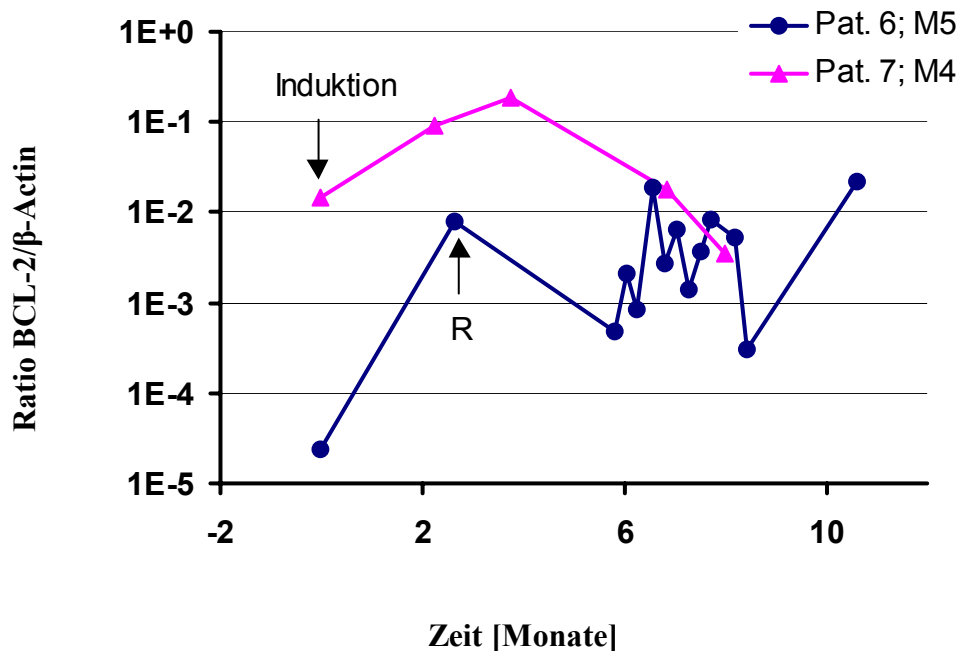


Abbildung 15: Die BCL-2/ β -Actin Ratio während der Induktionstherapie bei den Patienten 6 und 7. R: Rezidiv.

5 Diskussion

Nach der Entdeckung einer BCL-2-Überexpression durch chromosomale Translokation (14;18) bei folliculären Non-Hodgkin-Lymphomen wurde auch bei akuten myeloischen Leukämien eine positive BCL-2-Expression gefunden. Trotzdem wurde keine BCL-2-Translokation nachgewiesen. Die AML ist durch eine verminderte Apoptose gekennzeichnet und auch teilweise chemoresistent. Die Apoptose wird durch das Protein BCL-2 unterdrückt, sodass dieses Protein die Leukämiezellen vor Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika schützt. Die BCL-2-Überexpression spielt eine Rolle bei der Chemoresistenz der AML. Bei AML wurde eine Korrelation zwischen dem BCL-2 Gen und negativen Prognosefaktoren beschrieben.

5.1 Die Bestimmung des BCL-2-Transkriptes mittels Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Der Nachweis des BCL-2 Gens bei der Chemotherapie wurde in der Vergangenheit fast nur durch qualitative Methoden erbracht. Die (RT)-PCR erlaubt den Nachweis des BCL-2-Transkriptes. Trotz ihrer Sensitivität und Spezifität, wird die Quantifizierung des BCL-2-Transkriptes durch die konventionelle PCR nicht ermöglicht. Ob ein Therapieprotokoll in der Behandlung der AML Patienten effektiv ist, schlägt sich in der Kinetik der zunehmenden oder abnehmenden BCL-2-Transkripte nieder. Zur Kontrolle des BCL-2-Transkriptes ist die quantitative PCR der qualitativen PCR überlegen.

Bislang sind quantitative Verfahren selten im Laboralltag anzutreffen. Der Grund liegt darin, dass Techniken, wie die quantitativ kompetitive PCR, viel Zeit und Laborarbeit benötigen. Deshalb ist ihre Anwendung begrenzt. Bei anderen Techniken, wie z.B. Southern- und Dot Blotting wird das PCR-Produkt nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulose-Membran aufgebracht. Die Menge der Zielsequenz wird dann über eine Anreicherung der Radioaktivität durch die Sonde bestimmt. Zusätzliche Fixierungs- und Waschschriffe sind erforderlich und der Umgang mit Radioaktivität zu berücksichtigen.

Die neu entwickelte Echtzeit-Fluoreszenz-PCR ist eine verbesserte Methode zur Überwachung von molekularen Markern. Grundsätzlich zeigt diese Methode eine Änderung des Fluoreszenzverhaltens der Probe, die in jedem Zyklus gemessen wird. Die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR basiert auf der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase. Sie spaltet bei der Verlängerung der Primer in 5'-3'-Richtung eine doppelt fluoreszenzmarkierte Sonde, die downstream eines der beiden Primer hybridisiert hat. Die Sonde trägt am 5'-Ende einen Reporter-Farbstoff (z.B.

FAM) und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (z.B. TAMRA), zwischen denen ein FRET stattfindet. Die Bindung an die intakte Sonde unterdrückt die Fluoreszenzemission des Reporters durch eine Übertragung auf den Quencher. Wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase gespalten, steigt die Fluoreszenz im Emissionsmaximum des Reporters an. Die Fluoreszenzänderung ist dabei aufgrund der spezifischen Hybridisierung der Sonde an den Zielstrang proportional zu dessen Amplifikation (Abb.5 und 8). Um eine unbekannte cDNA-Menge zu bestimmen, wird eine Standardgerade festgelegt. Wie in den Abbildung 6 und 9 dargestellt, ermöglicht diese Standardgerade die Bestimmung der Ausgangstemplatezahl in den unbekanntenen Proben durch ihre Ct-Werte. Der Ct-Wert steht in proportionaler Beziehung zur Ausgangstranskriptmenge und stellt einen verlässlichen Parameter zur Quantifizierung dar ($R^2 > 0,99$) (Holland *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1993; Livak *et al.*, 1995; Heid *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 1996).

Mit der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR wird die Vermehrung der Zielsequenz über eine Fluoreszenzmessung detektiert. Die Messungen erfolgen auf dem ABI PRISM 7700 SDS. Da keine Post-PCR Schritte nötig sind, können relevante Daten in der Durchführung einer Echtzeit-Fluoreszenz-PCR gesammelt werden. Durch ein 96-well-Format ist die Überprüfung zahlreicher Proben innerhalb eines Laufes möglich.

Bei der konventionellen PCR sind falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse hauptsächliche Probleme, welche durch Kontamination der zu untersuchenden Probe entstehenden sein können. Bei der hier dargestellten Echtzeit-Fluoreszenz-PCR wird die Reaktion im geschlossenen Reaktionsgefäß durchgeführt und auf eine weitere Bearbeitung der Proben nach der Messung verzichtet. So kann die Gefahr der Kontamination minimiert werden.

Die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR erlaubt eine exakte Quantifizierung der ursprünglichen Transkriptzahl. Außerdem wird ihre Spezifität durch eine spezifische Sonde-Zielsequenz-Bindung garantiert. Das Fluoreszenz-Signal wird nur generiert, wenn es zu einer Amplifikation der Zielsequenz kommt. Unspezifische Nebenprodukte wie unspezifische Banden und Primer-Dimer werden nicht detektiert. Aus den Meßpunkten sind genaue Informationen erhältlich. Die BCL-2-Transkriptzahl ist ein verlässlicher Parameter im Hinblick auf die Kontrolle von Therapieeffizienz. Die Quantifizierung dieses Transkriptes wurde mittels Echtzeit-Fluoreszenz-PCR realisiert (Kreuzer *et al.*, 1999a, 1999b, 2000).

5.2 Die Rolle des BCL-2 Gens bei der Chemoresistenz

Durch Mitglieder der BCL-2-Familie wird die Apoptose reguliert. BCL-2 ist ein 26-kD schweres Protein. Es ist der Prototyp der BCL-2-Familie ähnlicher Proteine. BCL-2 schützt die Zellen direkt vor Apoptoseinduktion durch Exposition gegenüber DNA-schädigenden Substanzen wie z.B. Chemotherapeutika (Miyashita *et al.*, 1992; Kamesaki *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde die BCL-2-Expression in 53 AML-Fällen mittels Echtzeit-Fluoreszenz-PCR untersucht. Bei 53 AML-Fällen, die man den sieben AML-Subtypen (FAB M0-M7) zuordnen konnte, konnte die Expression von BCL-2 nachgewiesen werden (Abb.10). In dieser Abbildung konnte ein unterschiedlicher BCL-2-Level in den Blasten der AML nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht, dass jeder AML-Patient sein eigenes BCL-2-Niveau hat. Das höchste BCL-2-Niveau wird bei den AML-Patienten beobachtet, deren Blasten *in vitro* autonom proliferieren oder das positive Oberflächen-antigen CD34 exprimieren (Hunter *et al.*, 1993; Löwenberg *et al.*, 1993; Russell *et al.*, 1995; Bradbury *et al.*, 1995, 1997; Lauria *et al.*, 1997). Inzwischen wurde gezeigt, dass etwa ein Drittel der Patienten von AML nach Induktionsbehandlung rezidivieren und ca. 15 % therapierefraktär sind. Eine mögliche Ursache dieses Problems, könnte eine Chemotherapieresistenz sein. Campos, Miyashita, und Maung *et al.* konnten zeigen, dass BCL-2 eine wichtige Rolle bei der Chemoresistenz spielt (Campos *et al.*, 1993; Miyashita *et al.*, 1993; Maung *et al.*, 1994).

Ara-C und Idarubicin sind beides Substanzen, die miteinander kombiniert und zur Induktionstherapie bei den AML verwendet werden. Chemotherapeutika wie Ara-C und Idarubicin induzieren Doppel- und Einzelstrangbrüche der DNA. Schließlich ist die Schädigung der DNA durch chemische Verbindung ein wichtiger Auslöser der Apoptose. Deshalb ist die Apoptose einer der Hauptmechanismen, mit der die Leukämiezellen der AML durch Zytostatika zerstört werden (Kerr *et al.*, 1994; Hassan *et al.*, 1995a, 1995b). Durch die DNA-Schädigung wird die Apoptose der Leukämiezellen ausgelöst. Hierbei spielt Fas Ligand (FasL) eine entscheidende Rolle (Scaffidi *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 1998). FasL ist in der Lage, rezeptorvermittelt über Fas (CD95 bzw. APO1), Caspasen direkt zu aktivieren. Caspasen als ausführende Effektoren im Rahmen der Apoptose, vermitteln die weiteren Schritte, wie z.B. Degradation von Proteinen und DNA der Leukämiezellen (Friesen *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998; Green *et al.*, 1998b; Slee *et al.*, 1999; Krebs *et al.*, 1999).

Einige Autoren konnten zeigen, dass das BCL-2 Protein einen Regulator der Apoptose darstellt. BCL-2 hemmt upstream den Signalweg der Apoptose. Vermutlich führt BCL-2 zur Hemmung der Apoptose, indem es die Caspase-Kaskade blockiert. BCL-2 kann die Freisetzung von Cy-

tochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol blockieren (Abb.1). Weiterhin reguliert BCL-2 die Apoptoseinduktion über die Kontrolle von Caspasen. Deswegen kann BCL-2 die Leukämiezellen der AML vor Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika schützen (Uren *et al.*, 1996; Villa *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1998c; Pan *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999).

Darüber hinaus beeinflusst BCL-2 auch den Zellzyklus. Im Jahre 1951 wurde von A. Howard und St. Pelc erstmals das Konzept des Zellzyklus formuliert (Howard *et al.*, 1951). Es wurde beschrieben, dass das Intervall (G_1) zwischen Mitose (M) und DNA-Synthese (S) lang ist, und im Gegensatz dazu das Intervall (G_2) zwischen DNA-Synthese und der Mitose kurz ist. Diese Publikation bildete die Basis für die Definition der vier Zellzyklusphasen, wie wir sie heute kennen: G_1 , S, G_2 und M. Zusätzlich wurden Zellen identifiziert, die sich in einem Ruhezustand befinden. Die ruhenden Zellen werden als G_0 -Zellen bezeichnet. Es wurde nachgewiesen, dass die BCL-2-exprimierenden Zellen nach Entzug des Wachstumsfaktors überlebten, ohne allerdings zu proliferieren (Vaux *et al.*, 1988; Nunez *et al.*, 1990; Marvel *et al.*, 1994). Die BCL-2-überexprimierenden Zellen können den Zellzyklus verlassen und gehen in die G_0 -Phase über. Deshalb befinden sich die BCL-2-überexprimierenden Zellen nicht im Zellzyklus sondern im Ruhezustand. Es zeigte sich, dass BCL-2 die Zellzyklusprogression durch die Verlängerung der G_1 -Phase verhindert. BCL-2 kann den Eintritt der ruhenden Zellen in die S-Phase verzögern. Diese Funktion ist getrennt von der Apoptoseinhibition. Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt, jedoch könnte die Phosphorylierung des Proteins BCL-2 eine Ursache sein (Borner *et al.*, 1996; Mazel *et al.*, 1996; Linette *et al.*, 1996; Vairo *et al.*, 1996; O'Reilly *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997).

Die Wirkung von BCL-2 auf den Zellzyklus ist für Chemotherapie bei den AML von besonderer Bedeutung. Da sich vor allem teilende Zellen durch Chemotherapeutika zerstören lassen und die Zellen in der G_0 -Phase schlecht auf die Chemotherapie ansprechen, stellt BCL-2 den Leukämiezellen von AML „doppelten“ Schutz zur Verfügung. Die BCL-2-überexprimierenden Blasten der AML sind sowohl refraktär gegenüber der Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika als auch vermehrt in der G_0 -Phase zu finden.

5.3 Die Einschätzung der Therapieeffizienz durch BCL-2-Transkripte bei AML

Obwohl die Patienten der AML von der Entwicklung effektiver Zytostatika profitieren, zeigt ein Teil der AML Patienten ein Therapieversagen. Die Ursache könnte in einer Chemoresistenz bestehen. Zur Zeit wird die Induktionstherapie häufig für die Behandlung der AML-Patienten verwendet. Dabei gibt es verschiedene Protokolle der Induktionstherapie. Klinische Untersuchungen zeigen, dass die optimale Induktionsstrategie aus Ara-C und Idarubicin besteht. Diese beiden Medikamente bewirken die Apoptose der Leukämiezellen durch Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA. Das BCL-2 Protein verhindert die Apoptose. Dadurch kann BCL-2 die Sensitivität von Leukämiezellen auf eine apoptose-induzierende Chemotherapie beeinflussen. Die höhere Expression von BCL-2, in Blasten der AML-Patienten, steht im Zusammenhang mit einer Chemoresistenz, niedriger kompletter Remissionsrate und kürzerer Überlebenszeit (Porwit-MacDonald *et al.*, 1995; Karakas *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die BCL-2-Expression in 53 AML Fällen mittels Echtzeit-Fluoreszenz-PCR untersucht. Hiervon konnte bei 53 Fällen eine unterschiedlich hohe BCL-2 Expression nachgewiesen werden. Trotz der heterogenen BCL-2-Expression bei den AML läßt sich eine signifikante Expression des BCL-2 Gens in einem Subtyp der AML nicht belegen (Abb.10). Dieses Ergebnis entspricht der Beobachtung einer anderen Arbeitsgruppe, in der keine Korrelation zwischen der BCL-2-Expression und FAB-Subtypen beschrieben wurde (Campos *et al.*, 1993). Darüber hinaus wurde eine Expression von BCL-2 in T-Zellen, B-Zellen und Granulozyten aus 5 AML-Patienten nachgewiesen. Die BCL-2-Expression steht in keiner signifikanten Beziehung zur Subpopulation der mononukleären Zellen wie T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten (Abb.11).

BCL-2 könnte bei den AML als Vorhersageparameter für Chemoresistenz dienen, da gezeigt werden konnte, dass mit einem Anstieg des BCL-2-Niveaus in den Blasten, sich die Chemoresistenz der Blasten gegenüber zytotoxischen Medikamenten erhöhte. Im Gegensatz dazu, ist die Chemoresistenz gesunken, wenn die Herabregulation des BCL-2-Proteins in Leukämiezellen nachgewiesen wurde. Ein Beispiel dafür ist die zusätzliche Gabe von *all-trans*-Retinsäure (ATRA), die zur Induktionstherapie bei akuter Promyelozytenleukämie (M3) gegeben wird und die die Differenzierung der Blasten induziert. Die Untersuchung zeigte, dass die Chemoresistenz der Leukämiezellen *in vitro* mittels ATRA gesunken ist. Daraus resultierte eine BCL-2-Suppression (Yang *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1995; Bradbury *et al.*, 1996; Pisani *et al.*, 1997;

Ahmed *et al.*, 1999). Ein weiteres Beispiel ist die Behandlung der Leukämiezellen aus AML-Patienten mit Antisense-Oligomer (Gegenstränge), die an die BCL-2-mRNA binden. Dadurch wurde in diesen Zellen die Expression des BCL-2 Gens gehemmt. Antisense-Oligomer gegen BCL-2 führte zur Apoptose der Leukämiezellen und erhöhte die Sensitivität von Leukämiezellen auf eine apoptose-induzierende Chemotherapie (Campos *et al.*, 1994; Keith *et al.*, 1995; Konopleva *et al.*, 2000). Deswegen schlägt sich die Therapieeffizienz bei den AML in der Kinetik der zunehmenden oder abnehmenden BCL-2-Transkripte nieder. Zur Kontrolle des BCL-2-Transkriptes wurde die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR angewandt.

In der Abbildung 12 bis 15 ist der Verlauf von 7 AML-Patienten nach der Induktionstherapie dargestellt. β -Actin wurde als Referenzgen benutzt. Die BCL-2/ β -Actin Ratio steht für das BCL-2-Niveau in den 7 AML-Patienten. Wie in den Abbildungen 12 und 13 gezeigt ist die Ratio BCL-2/ β -Actin rasch nach der Induktionstherapie abgesunken. Danach erreichten diese Patienten eine komplette Remission. Wie in der Abbildung 14 dargestellt, belegt der Rückgang der BCL-2/ β -Actin Ratio ein Ansprechen auf die erste Induktionstherapie deutlich. Mit der Entwicklung einer Chemoresistenz stieg die Ratio BCL-2/ β -Actin wieder an. Wenn sich eine Chemoresistenz unter verwendeten Protokollen entwickelt, wird ein Teil der Leukämiezellen der AML nicht von den Chemotherapeutika zerstört. Dieser Teil der Leukämiezellen kann weiter proliferieren und schließlich zum Rezidiv führen. In der Abbildung 15 kann man sehen, dass sich ein Rezidiv mit dem Anstieg der BCL-2/ β -Actin Ratio bei gegenwärtigem Therapieprotokoll entwickelte.

In der vorliegenden Studie kann die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR bei der Überwachung des BCL-2-Transkriptes als Vorhersageparameter der Chemoresistenz verwendet werden. Dadurch kann dem Kliniker eine hilfreiche Therapieinformation zur Verfügung gestellt werden.

6 Zusammenfassung

Das BCL-2 Gen wurde als Onkogen der t (14;18) (q32;q21)-Translokation bei folliculären Non-Hodgkin-Lymphomen identifiziert. Die biologische Wirkung des BCL-2 Proteins liegt in der Hemmung der Apoptose. Bei der AML wird eine vermehrte BCL-2 Expression und eine dementsprechend verminderte Apoptose bei unreifen malignen myeloischen Vorläuferzellen gefunden. Diese Krankheit ist teilweise auch chemoresistent. Goldstandard der Induktionstherapie bei AML ist eine Kombination aus Ara-C und Idarubicin, welche Doppel- und Einzelstrangbrüche der DNA induzieren. Apoptose der Leukämiezellen wird durch Schädigung der DNA ausgelöst. BCL-2 kann die Zellen durch Hemmung der Apoptose schützen, indem es die Cytochrom-C-Freisetzung blockiert. Darüber hinaus befinden sich die BCL-2-überexprimierenden Zellen in der G₀-Phase und sprechen dabei schlecht auf die Chemotherapie an. Deshalb stellt BCL-2 den Leukämiezellen „doppelten“ Schutz zur Verfügung. BCL-2 spielt somit eine wichtige Rolle bei der Chemoresistenz. Ob ein Therapieprotokoll in der Behandlung der AML effektiv ist, schlägt sich in der Kinetik der zunehmenden oder abnehmenden BCL-2-Transkripte nieder.

Zur Kontrolle des BCL-2-Transkriptes ist die quantitative PCR der qualitativen PCR überlegen. Die Quantifizierung dieses Transkriptes wurde mittels Echtzeit-Fluoreszenz-PCR realisiert. Bei der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR wird die Reaktion im geschlossenen Reaktionsgefäß durchgeführt, sodass die Gefahr von Kontamination minimiert werden kann. Da keine Post-PCR Schritte nötig sind, wird die Überprüfung zahlreicher Proben durch ein 96-well-Format innerhalb eines Laufes ermöglicht. Die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR garantiert ihre Spezifität durch eine spezifische Sonde-Zielsequenz-Bindung und erlaubt eine exakte Quantifizierung der BCL-2-Transkriptzahl.

In der vorliegenden Arbeit wurde die BCL-2-Expression in 53 AML-Fällen mittels Echtzeit-Fluoreszenz-PCR untersucht. Das β -Actin Gen wurde als Referenzgen benutzt. Für die BCL-2-Expression wurde eine Ratio aus der Transkriptzahl des BCL-2 Gens und des β -Actin Gens gebildet. Bei 53 AML-Fällen, die den sieben AML-Subtypen zugeordnet werden konnten (FAB M0-M7), konnte eine BCL-2-Expression nachgewiesen werden. Trotz der unterschiedlich hohen BCL-2-Expression bei diesen Patienten, ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen der BCL-2-Expression und den FAB-Subtypen. Außerdem wurde die BCL-2-Expression in T-Zellen, B-Zellen und Granulozyten aus 5 AML-Patienten nachgewiesen. Die BCL-2-Expression wurde nicht von den Subpopulationen der mononukleären Zellen wie z.B. T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten beeinflusst. Bei sieben Patienten wurden Proben im Verlauf untersucht. Dabei

korrelierte eine hohe oder ansteigende BCL-2 Expression mit einem Rückfall der AML. Die Anzahl der untersuchten Proben im Verlauf ist jedoch zu klein, um definitive Schlußfolgerungen zu ziehen. Eine prospektive Untersuchung von größeren Patientenzahlen erscheint sinnvoll.

7 Literaturverzeichnis

1. ADAMS JM, CORY S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 1998; **281**: 1322-1326.
2. AHMED N, LAVERICK L, SAMMONS J, BAUMFORTH KRN, HASSAN HT. Effect of all-trans retinoic acid on chemotherapy induced apoptosis and down-regulation of bcl-2 in human myeloid leukaemia CD34 positive cells. *Leuk Res* 1999; **23**: 741-749.
3. ARNHEIM N, ERLICH H. Polymerase chain reaction strategy. *Ann Rev Biochem* 1992; **61**: 131-156.
4. BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DAG, GRALNICK HR, SULTAN C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med* 1985a; **103**: 620-625.
5. BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DAG, GRALNICK HR, SULTAN C. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7): A report of the French-American-British cooperative group. *Ann Intern Med* 1985b; **103**: 460-462.
6. BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DAG, GRALNICK HR, SULTAN C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). *Br J Haematol* 1991; **78**: 325-329.
7. BENSI L, LONGO R, VECCHI A. Bcl-2 oncoprotein expression in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 1995; **80**: 98-102.
8. BISHOP JF, LOWENTHAL RM, JOSHUA D. Etoposide in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* 1990; **75**: 27-32.
9. BISSONNETTE RP, ECHEVERRI F, MAHBOUBI A, GREEN DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; **359**: 552-554.
10. BOISE LH, GONZALEZ-GARCIA M, POSTEMA CE, DING L, LINDSTEN T, TURKA LA, MAO X, NUNEZ G, THOMPSON CB. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; **74**: 597-608.
11. BORNER C. Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J Biol Chem* 1996; **271**: 12695-12698.

12. BRADBURY DA, RUSSELL NH. Comparative quantitative expression of bcl-2 by normal and leukaemic myeloid cells. *Br J Haematol* 1995; **91**: 374-379.
13. BRADBURY DA, ALDINGTON S, ZHU YM, RUSSELL NH. Down-regulation of bcl-2 in AML blasts by all-trans retinoic acid and its relationship to CD34 antigen expression. *Br J Haematol* 1996; **94**:671-675.
14. BRADBURY DA, ZHU YM, RUSSELL NH. Bcl-2 expression in acute myeloblastic leukaemia: relationship with autonomous growth and CD34 antigen expression. *Leuk Lymph* 1997; **24**: 221-228.
15. BREITMAN TR, SELONICK SE, COLLINS SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 2936-2940.
16. BREITMAN TR, COLLINS SJ, KNEENE BR. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood* 1981; **57**: 1000-1004.
17. BUDIARDJO I, OLIVER H, LUTTER M, LUO X, WANG XD. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; **15**: 269-290.
18. BÜCHNER T. Acute leukemia. *Curr Opin Hematol* 1993; **1**: 172-182.
19. BUSQUE L, GILLILAND DG. Clonal Evolution in acute myeloid leukemia. *Blood* 1993; **82**: 337-342.
20. CAMPOS L, ROUAULT JP, SABIDO O, ORIOL P, ROUBI N, VASSELON C, ARCHIMBAUD E, MAGAUD JP, GUYOTAT D. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 1993; **81**: 3091-3096.
21. Campos L, Sabido O, Rouault JP, Guyotat D. Effects of Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides on in vitro proliferation and survival of normal marrow progenitors and leukemic cells. *Blood* 1994; **84**: 595-600.
22. CARSON DA, RIBEIRO JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; **341**: 1251-1254.
23. CHEN ZX, XUE YQ, ZHANG R, TAO RF, XIA XM, LI C, WANG W, ZU WY, YAO XZ, LING BJ. A clinical and experimental study on all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 1991; **78**: 1413-1419.

24. CHESON BD, CASSILETH PA, HEAD DR. Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 1990; **8**: 813-819.
25. CHITTENDEN T, HARRINGTON EA, O'CONNOR R, FLEMINGTON C, LUTZ RJ, EVAN GI, GUILD BC. Induction of apoptosis by the bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; **374**: 733-736.
26. CHOMIENNE C, BALLERINI P, BALITRAND N, DANIEL MT, FENAUX P, CASTAIGNE S, DEGOS L. all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemias. II. In vitro studies: structure-function relationship. *Blood* 1990; **76**: 1710-1717.
27. CLEARY MC, SKLAR J. Nucleotide sequence of t (14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 7439-7443.
28. DELIA D, AIELLO A, SOLIGO D, FONTANELLA E, MELANI C, PEZZELLA F, PIEROTTI MA, PORTA GD. Bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. *Blood* 1992; **79**: 1291-1298.
29. ELLIS RE, YUAN J, HORVITZ HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991; **7**: 663-698.
30. FANIDI A, HARRINGTON EA, EVAN GI. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* 1992; **359**: 554-556.
31. FARROW SN, WHITE JHM, MARTINOI I, RAVEN T, PUN KT, GRINHAM CJ, MARTINOI JC, BROWN R. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 1995; **374**: 731-733.
32. FENAUX P, LE DELEY MC, CASTAIGNE S. Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a multicenter randomized trial. *Blood* 1993; **82**: 3241-3249.
33. FISHER TC, MILNER AE, GREGORY CD, JACKMAN AL, AHERNE GW, HARTLEY JA, DIVE C, HICKMAN JA. Bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classic resistance pathways. *Cancer Res* 1993; **53**: 3321-3326.
34. FLEISCHMAN EW, PRIGOGINA EL, DYNKAYA GW, PROBATOVA NA, KONSTANTINOVA LN, KRUGLOVA GV, VOLKOVA MA, OSMANOV DS.

- Chromosomal characteristics of malignant lymphoma. *Hum Genet* 1989; **82**: 343-348.
35. FÖRSTER V. TH. Zwischenmolekulare Energie-wanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics (Leipzig)* 1948; **2**: 55-75.
36. FRIESEN C, HERR I, KRAMMER PH, DEBATIN KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 1996; **2**: 574-577.
37. GANSER A, HOELZER D. Acute leukemia. *Curr Opin Hematol* 1994; **1**: 248-255.
38. GANZINA F, PACCIARINI MA, DI PIETRO N. Idarubicin (4-demethoxydaunorubicin), a preliminary overview of preclinical and clinical studies [Review]. *Invest New Drugs* 1986; **4**: 85-105.
39. GIBSON L, HOLMGREEN S, HUANG DCS, BERNARD O, COPELAND NG, JENKINS N, SUTHERLAND GR, BAKER E, ADAMS JM, CORY S. Bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 1996; **13**: 665-675.
40. GIBSON UEM, HEID CA, WILLIAMS PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; **6**: 995-1001.
41. GLISSON BS, ROSS WE. DNA topoisomerase II: A primer on the enzyme and its unique role as a multidrug target in cancer chemotherapy. *Pharmacol Therap* 1987; **32**: 69-106.
42. GRANVILLE DJ, CARTHY CM, HUNT DW, MCMANUS BM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 1998; **78**: 893-913.
43. GREEN DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998a; **94**: 695-698.
44. GREEN DR, KROEMER G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 1998b; **8**: 267-271.
45. GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998c; **281**: 1309-1312.
46. HARRIS AL, GRAHAME-SMITH DG. Cytosine arabinoside triphosphate production in human leukaemic myeloblasts: Interactions with deoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol* 1981; **5**: 185-192.
47. HASSAN HT, FREUND M. Stem cell factor protects CD34 positive human myeloid leukaemia cells from chemotherapy-induced apoptosis. In : Pieters R,

- editor. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Harwood: Gordon and Breach, 1995a: 123-127.
48. HASSAN HT, FREUND M. Effect of human stem cell factor on chemotherapy-induced apoptosis in myeloid leukaemia cells. *Eur J Cancer* 1995b; **31**: 1883-1884.
49. HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; **6**: 986-994.
50. HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, WATSON R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; **11**: 1026-1030.
51. HOCKENBERY D, NUNEZ G, MILLIMAN C, SCHREIBER RD, KORSMEYER SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; **348**: 334-336.
52. HOCKENBERY DM, ZUTTER M, HICKEY W, NAHM M, KORSMEYER SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6961-6965.
53. HOCKENBERY D, OLTVAI Z, YIN XM, MILLIMAN C, KORSMEYER SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; **75**: 241-251.
54. HOLLAND PM, ABRAMSON RD, WATSON R, GELFAND DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7276-7280.
55. HOWARD A, PELC SR. Nuclear incorporation of P32 as demonstrated by autoradiographs. *Exp Cell Res* 1951; **2**: 178-187.
56. HU Y, BENEDICT MA, WU D, INOHARA N, NUNEZ G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4386-4391.
57. HU Z, MINDEN MD, MCCULLOCH EA. Direct evidence for the participation of bcl-2 in the regulation by retinoic acid of the Ara-C sensitivity of leukemic stem cells. *Leukemia* 1995; **9**: 1667-1673.
58. HUANG DCS, O'REILLY LA, STRASSER A, CORY S. The anti-apoptosis function of bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J* 1997; **16**: 4628-4638.

59. HUNTER AE, ROGERS SY, REILLY IAG, BARRETT AJ, RUSSELL NH. Autonomous growth of blast cells is associated with reduced survival in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1993; **82**: 899-903.
60. JACOBSON MD, BURNETT JF, KING MD, MIYASHITA T, REED JC RAFF MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondria. *Nature* 1993; **361**: 365-369.
61. KAMESAKI S, KAMESAKI H, JORGENSEN TJ, TANIZAWA A, POMMIER Y, COSSMAN J. Bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res* 1993; **53**: 4251-4256.
62. KARAKAS T, MAURER U, WEIDMANN E, MIETHING CC, HOELZER D, BERGMANN L. High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Ann Oncol* 1998; **9**: 159-165.
63. KEITH FJ, BRADBURY DA, ZHU YM, RUSSELL NH. Inhibition of bcl-2 with antisense oligonucleotides induces apoptosis and increases the sensitivity of AML blasts to Ara-C. *Leukemia* 1995; **9**: 131-138.
64. KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239-257.
65. KERR JF, WINTERFORD CM, HARMON BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; **73**: 2013-2026.
66. KESSEL D, HALL TC, WODINSKY I. Transport and phosphorylation as factors in the antitumor action of cytosine arabinoside. *Science* 1967; **156**: 1240-1241.
67. KIEFER MC, BRAUER MJ, POWERS VC, WU JJ, UMANSKY SR, TOMEI LD, BARR PJ. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; **374**: 736-739.
68. KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR, NEWMYER DD. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of Apoptosis. *Science* 1997; **275**: 1132-1136.
69. KONOPLEVA M, TARI AM, ESTROV Z, HARRIS D, XIE Z, ZHAO SR, LOPEZ-BERESTEIN G, ANDREEFF M. Liposomal bcl-2 antisense oligonucleotides enhance proliferation, sensitize acute myeloid leukemia to cytosine-arabioside, and induce apoptosis independent of other antiapoptotic proteins. *Blood* 2000; **95**: 3929-3938.

70. KOZOPAS KM, YANG T, BUCHAN HL, ZHOU P, CRAIG RW. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3516-3520.
71. KRAJEWSKI S, TANAKA S, TAKAYAMA S, SCHIBLER MJ, FENTON W, REED JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993; **53**: 4701-4714.
72. KREBS JF, ARMSTRONG RC, SRINIVASAN A, AJA T, WONG AM, ABOY A, SAYERS R, PHAM B, VU T, HOANG K, KARANEWSKY DS, LEIST C, SCHMITZ A, WU JC, TOMASELLI KJ, FRITZ LC. Activation of membrane-associated procaspase-3 is regulated by Bcl-2. *J Cell Biol* 1999; **144**: 915-926.
73. KREUZER KA, LASS U, BOHN A, LANDT O, SCHMIDT CA. LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Res* 1999a; **59**: 3171-3174.
74. KREUZER KA, LASS U, LANDT O, NITSCHKE A, ELLERBROK H, PAULI G, LASER J, HUHND, SCHMIDT CA. A highly sensitive and specific fluorescence RT-PCR assay for the pseudogene free detection of β -actin transcripts as quantitative reference. *Clin Chem* 1999b; **45**: 297-300.
75. KREUZER KA, LASS U, NAGEL S, ELLERBROK H, PAULI G, PAWLACZYK-PETER B, SIEGERT W, HUHND, SCHMIDT CA. Applicability of an absolute quantitative procedure to monitor intra-individual bcr-abl transcript kinetics in clinical samples from chronic myelogenous leukemia patients. *Int J Cancer* 2000; **86**: 741-746.
76. KUFU DW, SPRIGGS DR, EGAN EM, MUNROE D. Relationships among ara-CTP pools, formation of (ara-C) DNA, and cytotoxicity of human leukemic cells. *Blood* 1984; **64**: 54-58.
77. KUFU DW, SPRIGGS DR. Biochemical and cellular pharmacology of cytosine arabinoside. *Semin Oncol* 1985; **12** (Suppl.3): 34-48.
78. LAKOWITZ, JOSEPH R. Energy transfer. *Principles of Fluorescent Spectroscopy*. Plenum Press, NY 1983; Chapter 10: 303-309.
79. LAURENZI DV, GERRY M. The little devil of death. *Nature* 2000; **406**: 135-136.
80. LAURIA F, RASPADORI D, RONDELLI D, VENTURA MA, FIACCHINI M, VISANI G, FORCONI F, TURA S. High bcl-2 expression in acute myeloid

- leukemia cells correlates with CD34 positivity and complete remission rate. *Leukemia* 1997; **11**: 2075-2078.
81. LEE LG, CONNELL CR, BLOCH W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 3761-3766.
82. LEE MS, BLICK MB, PATHAK S, TRUJILLO JM, BUTLER JJ, KATZ RL, MCLAUGHLIN P, HAGEMEISTER FB, VELASQUEZ WS, GOODACRE A.. The gene located at chromosome 18 band q21 is rearranged in uncultured diffuse lymphomas as well as follicular lymphoma. *Blood* 1987; **70**: 90-95.
83. LI P, NIJHAWAN D, BUDIHARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, WANG X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; **91**: 479-489.
84. LIN EY, ORLOFSKY A, BERGER MS, PRYSTOWSKY MB. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* 1993; **151**: 1979-1988.
85. LIU X, KIM CH, YANG J, JEMMERSON R, WANG X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; **86**: 147-157.
86. LINETTE GP, LI Y, ROTH K, KORSMEYER SJ. Cross talk between cell death and cell cycle progression: Bcl-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 9545-9552.
87. LIVAK KJ, FLOOD JA, MARMARO J, GIUSTI W, DEETZ K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; **4**: 357-362.
88. LÖWENBERG B, VAN POTTEN WLJ, TOUW IP, DELWEL R, SANTINI V. Autonomous proliferation of leukemic cells in vitro as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia. *New Engl J Med* 1993; **328**: 614-619.
89. MARVEL J, PERKINS GR, LOPEZ-RIVAS A, COLLINS MKL. Growth factor starvation of bcl-2 overexpressing murine bone marrow cells induced refractoriness of IL-3 stimulation of proliferation. *Oncogene* 1994; **9**: 1117-1122.
90. MAUNG ZT, MACLEAN FR, REID MM. The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukemia. *Br J Haematol* 1994; **88**: 105-109.

91. MAZEL S, BURTRUM D, PETRIE HT. Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J Exp Med* 1996; **183**: 2219-2226.
92. MCDONNELL TJ, MARIN MC, HSU B, BRISBAY SM, MCCONNELL K, TU SM, CAMPBELL ML, RODRIGUEZ-VILLANUEVA J. The bcl-2 oncogene: apoptosis and neoplasia. *Rad Res* 1993; **136**: 307-312.
93. MIYASHITA T, REED JC. Bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEH17.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticosteroids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992; **52**: 5407-5411.
94. MIYASHITA T, REED JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993; **81**: 151-157.
95. MONAGHAN P, ROBERTSON D, AMOS TAS, DYER MJS, MASON D, GREAVES MF. Ultrastructural localization of the bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 1819-1825.
96. NAGATA S. Fas-induced apoptosis. *Intern Med* 1998; **37**: 179-181.
97. NUNEZ G, LONDON L, HOCKENBERY D, ALEXANDER M, MCKEARN JP, KORSMEYER SJ. Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs the survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990; **144**: 3602-3610.
98. O'CONNOR L, STRASSER A, O'REILLY LA, HAUSMANN G, ADAMS JM, CORY S, HUANG DCS. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998; **17**: 384-395.
99. OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; **74**: 609-619.
100. O'REILLY LA, HUANG DCS, STRASSER A. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J* 1996; **15**: 6979-6990.
101. PAN G, O'ROURKE K, DIXIT VM. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 1998; **273**: 5841-5845.
102. PEZELLA F, TSE A, CORDELL JL, PULFORD K, GATTER KC, MASON DY. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; **137**: 225-232.

103. PISANI F, DEL POETA G, ARONICA G, VENDITTI A, CARAVITA T, AMADORI S. In vitro down-regulation of bcl-2 expression by all-trans retinoic acid in AML blasts. *Ann Hematol* 1997; **75**: 145-147.
104. PORWIT-MACDONALD A, IVORY K, WILKINSON S, WHEATLEY K, WONG L, JANOSSY G. Bcl-2 protein expression in normal human bone marrow precursors and in acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 1995; **9**: 1191-1198.
105. REED JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 1995; **7**: 541-546.
106. REED JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; **17**: 3225-3236.
107. ROSE KM. DNA topoisomerases as targets for chemotherapy. *FASEB J* 1988; **2**: 2474-2478.
108. RUSSELL NH, HUNTER AE, BRADBURY DA, ZHU YM, KEITH F. Biological features of leukaemic cells associated with autonomous growth and reduced survival in acute myeloblastic leukaemia. *Leuk Lymph* 1995; **16**: 223-229.
109. SCAFFIDI C, FULDA S, SRINIVASAN A, FRIESEN C, LI F, TOMASELLI KJ, DEBATIN KM, KRAMMER PH, PETER ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; **17**: 1675-1687.
110. SLEE EA, HARTE MT, KLUCK RM, WOLF BB, CASIANO CA, NEWMAYER DD, WANG HG, REED JC, NICHOLSON DW, ALNEMRI ES, GREEN DR, MARTIN. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase -9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; **144**: 281-292.
111. SPETH PA, MINDERMAN H, HAANEN C. Idarubicin vs daunorubicin: Preclinical and clinical pharmacokinetic studies [Review]. *Semin Oncol* 1989; **16** [Suppl 2]: 2-9.
112. STONE RM, MAYER RJ. Treatment of the newly diagnosed adult with de novo acute myeloid leukemia. *Hematol/Oncol: Clinics North America* 1993; **7**: 47-64.
113. SUN XM, MACFARLANE M, ZHUANG J, WOLF BB, GREEN DR, COHEN GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999; **274**: 5053-5060.
114. SUSIN SA, LORENZO HK, ZAMZAMI N, MARZO I, SNOW BE, BROTHERS GM, MANGION J, JACOTOT E, COSTANTINI P, LOEFFLER M, LAROCLETTE N, GOODLETT DR, AEBERSOLD R, SIDEROVSKI DP,

- PENNINGER JM, KROEMER G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; **397**: 441-446.
115. TANG C, WILLINGHAM MC, REED JC. High levels of p26BCL-2 oncoprotein retard taxol-induced apoptosis in human pre-B leukemia cells. *Leukemia* 1994; **8**:1960-1969.
116. THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; **281**: 1312-1316.
117. TSUJIMOTO Y, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; **228**: 1440-1443.
118. TSUJIMOTO Y, FINGER LR, YUNIS J. Cloning of the chromosomal breakpoint of neoplastic B-cells with the t (14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; **226**: 1097-1099.
119. TSUJIMOTO Y, CROCE CM. Analysis of the structure, transcripts and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**. 5214-5218.
120. UREN AG, VAUX DL. Molecular and clinical aspects of apoptosis. *Pharmacol Ther* 1996; **72**: 37-50.
121. VAIRO G, INNES KM, ADAMS JM. Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene* 1996; **13**: 1511-1519.
122. VAUX DL, CORY S, ADAMS JM. Bcl-2 promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; **335**: 440-442.
123. VAUX DL, KORSMEYER. Cell death in development. *Cell* 1999; **96**: 245-254.
124. VILLA P, KAUFMANN SH, EARNSHAW WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 388-393.
125. WALLACH D, KOVALENKO AV, VARFOLOMEEV EE, BOLDIN MP. Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**: 279-288.
126. WANG K, YIN XM, CHAO DT, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 1996; **10**: 2859-2869.
127. WEISS LM, WARNKE RA, SKLAR J, CLEARY ML. Molecular analysis of the t (14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *New Engl J Med* 1987; **317**: 1185-1189.
128. WYLLIE AH, KERR JF, CURRIE AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; **68**: 251-306.

129. YANG E, ZHA J, JOCKEL J, BOISE LH, THOMPSON CB, KORSMEYER SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995; **80**: 285-291.
130. YANG GS, MINDEN MD, MCCULLOCH EA. Regulation by retinoic acid and hydrocortisone of the anthracycline sensitivity of blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1994; **8**:2065-2075.
131. YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG TI, JONES DP, WANG X. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; **275**: 1129-1132.
132. YOSHIDA H, KONG YY, YOSHIDA R, ELIA AJ, HAKEM A, HAKEM R, PENNINGER JM, MAK TW. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 1998; **94**: 739-750.
133. YUNIS JJ, MAYER MG, ARNESEN MA, AEPPLI DP, OKEN MM, FRIZZERA G. Bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphomas. *New Engl J Med* 1989; **320**: 1047-1054.
134. ZUTTER M, HOCKENBERY D, SILVERMAN GA, KORSMEYER SJ. Immunolocalisation of the bcl-2 protein within haemopoietic neoplasms. *Blood* 1991; **81**: 3091-3096.

8 Verzeichnis der Abkürzungen

AML	Akute myeloische Leukämie
Apaf	Apoptotic Protease-activating Factor
Ara-C	Cytosinarabinosid
Ara-CTP	Ara-C-Triphosphat
ATRA	<i>all-trans</i> -Retinsäure
BCL-2	B-Zell-Lymphom/Leukämie-2 Gen
bp	Basenpaar
Caspasen	Cysteinyll Aspartate-specific Proteases
CCD-Kamera	Charge-coupled Device Camera
CD	Cluster of Differentiation
CR	Komplette Remission
Ct	Schwellenzyklus
Cyt	Cytidin
cDNA	complementary DNA
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
d-Cyt	Deoxy-cytidin
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DISC-Komplex	Death-inducing Signalling Complex
DEPC	Diethyl-Pyrocabonate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
FasL	Fas Ligand

FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
MgCl ₂	Magnesium Chlorid
MTX	Methotrexat
MW	Molekulargewichtsmarker
NaCl	Natrium Chlorid
NTC	Negativkontrolle
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	Carboxy-x-Rhodamin
RT	Reverse Transkription
SDS	Sequence Detector System
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TNF-R	Tumor Necrosis Factor Receptor
VP-16	Etoposid

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. C. A. Schmidt, unter dessen Leitung diese Arbeit entstand. Nicht zuletzt danke ich für die intensive Betreuung und die Bereitschaft, ein Gutachten für die vorliegende Dissertation zu erstellen.

Bei Herrn Dr. med. K-A Kreuzer möchte ich mich herzlich für die jederzeit gewährte Diskussionsbereitschaft und Betreuung bedanken.

Herrn U. Lass danke ich für die Hilfe bei der Erstellung dieses Manuskriptes.

Bedanken möchte ich mich auch bei Mitarbeitern des Molekularbiologischen Labors von Prof. Dr. med. C. A. Schmidt, namentlich seien genannt Frau J. Laser und Frau B. Pawlaczyk-Peter.

Nicht zuletzt möchte ich dem Deutschen-Akademischen-Austauschdienst (DAAD) besonders dafür danken, dass er meine Doktorarbeit in Berlin für zwei Jahre unterstützt hat.

Mein herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern und meiner Schwester, die mich mit ihrer Anteilnahme unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Geboren am 17.10.1967 in Beijing der Volksrepublik China, als zweites von zwei Kindern der Familie Tao LIU (Vater) und Yuxiang JI (Mutter).

Ausbildung:

- | | |
|------------------|---|
| 9. 1974- 7. 1979 | Grundschule in Hefei, Provinz Anhui, V. R. China |
| 9. 1979- 7. 1985 | Mittelschule, Gymnasium in Guangzhou,
Provinz Guangdong, V. R. China |
| 9. 1985- 7. 1991 | Studium der Humanmedizin an der Jinan Universität,
Guangzhou, V. R. China |
| 7. 1991 | Abschluß: Bachelor der Medizin |
| 9. 1991- 7. 1994 | Magisterarbeit in der Abteilung Pathologie der
Medizinischen Fakultät der Jinan Universität,
Guangzhou, V. R. China |
| 7. 1994 | Abschluß: Magister der Medizin |
| 7. 1994- 9. 1996 | Assistenzärztin in der Abteilung für Pathologie an der
Medizinischen Fakultät der Jinan Universität,
Guangzhou, V. R. China |
| 9. 1996- 4. 1998 | Dozentin (Fachärztin) in der Abteilung für Pathologie an
der Medizinischen Fakultät der Jinan Universität,
Guangzhou, V. R. China |
| 4. 1998- 2. 2003 | Gastaufenthalt und Promotionsarbeit in der Abteilung
Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie&Onkologie im
molekularbiologischen Labor von Prof. Dr. med. C. A. Schmidt
am Universitätsklinikum Rudolf-Virchow, Berlin |

Erklärung an Eides Statt

Ich bin Frau Kaishan LIU. Ich erkläre, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.