

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie
und Tumorimmunologie, Campus Virchow-Klinikum der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expression und klinische Bedeutung von Apoptose-
Proteinen bei akuten myeloischen Leukämien des
Kindes- und Erwachsenenalters**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Richter

aus Elsterwerda

Datum der Promotion: 22.06.2014

INHALTSVERZEICHNIS

I	Abstrakt deutsch	2
II	Abstrakt englisch	4
1	EINLEITUNG	6
1.1	Einführung in das Thema.....	6
1.2	Akute myeloische Leukämie (AML).....	7
1.3	Apoptose.....	18
2	MATERIAL UND METHODEN	30
2.1	Durchflußzytometrie.....	30
2.2	Immunoblot	35
2.3	Klinische, morphologische und zytogenetische Daten - Statistische Analysen	45
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Apoptose.....	48
3.2	Gegenüberstellung: Kinder – Erwachsene.....	59
4	DISKUSSION	63
4.1	Apoptoseassoziierte Proteine bei der AML des Erwachsenenalters.....	63
4.2	Apoptoseassoziierte Proteine bei der AML des Kindesalters.....	66
4.3	Vergleich der Daten bei der AML des Kindes-und Erwachsenenalters	69
4.4	Methodische Einschränkungen	72
5	LITERATURVERZEICHNIS	73
6	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	80
7	LEBENS LAUF	82
8	PUBLIKATIONS LISTE	83
9	DANKSAGUNG	84

I. Abstrakt:

Verbesserte diagnostische Methoden - der Zyto- und Molekulargenetik – machen deutlich, dass die akuten myeloischen Leukämien (AML) eine heterogene Gruppe mit unterschiedlicher Empfindlichkeit auf Chemotherapie und Prognose darstellen. Die differenzielle Expression apoptoseassoziiertes Proteine spielt hierbei eine entscheidende Rolle.

In dieser Arbeit wurden eine Auswahl pro- und antiapoptotischer Proteine der Familie der „inhibitors of apoptosis proteins (IAP)“ (XIAP, cIAP1, Survivin) und anderer apoptoseassoziiertes Proteine (Caspase-3, Bcl-2, Bcl-xL, Bax) an insgesamt 137 kryokonservierten AML-Proben des Kindes- und Erwachsenenalters auf deren Expression und prognostische Bedeutung untersucht. 62 der 92 erwachsenen Patienten wurden im Rahmen der AMLCG-92-Studie behandelt. Alle 45 Kinder mit AML wurden nach dem Protokoll der AMLBFM-93 therapiert. Die Expression der Proteine wurde dabei mittels Immunoblot oder Durchflusszytometrie bestimmt.

Passend zur antiapoptotischen Wirkung von XIAP war eine hohe Expression von XIAP sowohl bei AML des Kindes- als auch des Erwachsenenalters mit einem geringerem mittlerem Gesamtüberleben verbunden: Erwachsene [9 Monate (n=21) vs 19 Monate (n=41), $p < 0,05$]; Kinder [30 Monate (n=10) vs. 41 Monate (n=34), $p = 0,02$].

Zudem korrelierte bei AML des Erwachsenenalters eine hohe XIAP-Expression mit intermediär/schlechtem Karyotyp [mittlere relative optische Dichte (mROD) 3563; n=69 vs mROD 184; n=5; $p = 0,011$]. Bei der AML des Kindesalters korrelierte sowohl eine hohe XIAP-Expression als auch eine hohe Bcl-xL-Expression mit intermediär/schlechtem Karyotyp; XIAP (mROD 2509 ± 503 , n=30, $p < 0,002$) und Bcl-xL (mROD 2615 ± 439 , $p < 0,001$).

Ferner konnte eine Assoziation der XIAP-Expression sowohl mit zytomorphologisch myelomonozytär differenzierten Blasten [French–American–British (FAB) Subtypen M4/M5] ($p < 0,05$) als auch mit immunphänotypisch monozytärem Markerprofil (CD 14, CD 36; $P < 0,05$; CD 4, HLA-DR; $p < 0,01$) nachgewiesen werden.

Für Survivin, als antiapoptotisch wirkendem Protein, konnte bei der AML des Kindesalters ein Zusammenhang zwischen hoher Expression und kürzerem Gesamtüberleben gezeigt werden: [27 Monate (n=10) vs. 41 Monate (n=34); $p < 0,026$].

Bei der Untersuchung der Expression apoptoseassoziiierter Proteine auf altersspezifische Unterschiede zeigte sich für XIAP eine signifikant unterschiedliche Expression ($p < 0,05$) zwischen den Altersgruppen. Passend zur antiapoptotischen Wirkung von XIAP fand sich in der prognostisch ungünstigeren Gruppe der AML Erwachsener im Vergleich zu AML des Kindesalters eine höhere XIAP-Expression. Allerdings konnte auch eine höhere Expression der proapoptotischen Proteine Bax ($p < 0,001$) und Procaspase-3 ($p < 0,05$) in der Gruppe Erwachsener nachgewiesen werden.

Insgesamt wurde in der Untersuchung eine deutliche Variabilität der Expression der verschiedenen IAP in primären AML deutlich, was auf eine differenzierte Regulation dieser Proteine hinweist. Einige IAP scheinen bei der AML eine prognostische Rolle zu spielen und definieren möglicherweise neue prognostische Gruppen.

Ziel der aktuellen Forschung ist es, der Identifikation bestimmter Risikogruppen eine dem Risikoprofil des Patienten angepasste und zielgerichtetere Therapie folgen zu lassen.

II. Abstract:

Improved diagnostic methods of cyto- and molecular genetics illustrate that acute myeloid leukemias (AML) represent a heterogeneous group of different sensitivity to chemotherapy and prognosis. The differential expression of apoptosis-associated proteins plays a major role in this regard.

In this study, a selection of pro- and antiapoptotic proteins of the inhibitors of apoptosis proteins (IAP) family (XIAP, cIAP1, survivin) and other apoptosis-associated proteins (caspase -3, Bcl -2, Bcl -xL , Bax) were examined for their level of expression and prognostic significance in 137 cryopreserved AML samples of children and adults. 62 of the 92 examined adult patients were treated according to the AMLCG-92-study-protocol. All examined children (n=45) were treated according to the protocol of the AMLBFM-93 study. The expression levels were examined by immunoblot or flowcytometry.

Matching the antiapoptotic effect of XIAP, high expression of XIAP, in both AML of childhood and adulthood, was associated with a lower overall survival: adults [9 months (n=21) vs 19 months (n=41), $p < 0,05$]; children [30 months (n=10) vs. 41 months (n=34), $p = 0,02$].

In addition, a high XIAP expression correlated with intermediate / poor karyotype in AML of adult [mean relative optical density (mROD) 3563; n=69 vs mROD 184; n=5; $p = 0.011$]. In AML of childhood a high expression of XIAP (mROD 2509 ± 503 , n=30, $p < 0.002$) and Bcl-XL (mROD 2615 ± 439 , $p < 0.001$) correlated with intermediate / poor karyotype.

Furthermore, XIAP expression correlated with myelomonocytic French–American–British (FAB) subtypes M4/M5 ($p = 0.05$) and expression of monocytic markers (CD 14, CD 36; $p < 0.05$; CD 4, HLA-DR; $p < 0.01$) in AML blasts of adults.

For the antiapoptotic protein survivin, a shorter overall survival [27 Monate (n=10) vs. 41 Monate (n=34); $p < 0.026$] was associated with high expression levels for AML in children.

Comparing expression in view of age specific differences, different expression levels were shown for XIAP ($p < 0.05$). Matching the antiapoptotic function of XIAP the higher expression was detected in the unfavorable group of adult AML. However, a higher expression of pro-apoptotic proteins Bax ($p < 0.001$) and procaspase-3 ($p < 0.05$) was detected in the adult group, too.

However, a significant variability in the expression of the different IAP in primary AML was apparent in this study, indicating a differential regulation of these proteins. Some IAP seem to play a prognostic role in AML and probably new prognostic groups of AML can be defined.

The aim of current and future research is the identification of specific patient risk groups, risk adapted and targeted therapies for better responses and outcomes.

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Thema

Durch Fortschritte in der chemotherapeutischen Behandlung akuter Leukämien kann heute eine zunehmende Zahl der Patienten geheilt werden. Allerdings zeigt sich aufgrund der immer spezialisierteren Diagnostik, insbesondere mittels zyto- und molekulargenetischer Techniken, dass bestimmte Risikogruppen trotz aller therapeutischen Fortschritte eine schlechte Prognose aufweisen.

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass schlechtes Therapieansprechen möglicherweise mit einer reduzierten Empfindlichkeit der Leukämiezellen gegenüber einer durch die Chemotherapie induzierten Apoptose (= programmierter Zelltod) zusammenhängt. Studien deuten an, dass die Expression von pro- und antiapoptotischen Proteinen wichtige Prognosefaktoren bei akuten Leukämien darstellen könnten. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Zellproben von Kindern und Erwachsenen mit neu diagnostizierter akuter myeloischer Leukämie (AML) hinsichtlich der Expression wichtiger Apoptose- regulierender Moleküle sowie deren prognostische Bedeutung für das Therapieansprechen und Langzeitüberleben untersucht.

1.2 Akute myeloische Leukämie (AML)

1.2.1 Definition

AML sind Erkrankungen, welche durch eine maligne Expansion- und Reifungsblockierung von hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks gekennzeichnet sind. Nahezu immer sind die granulozytäre oder die monozytäre Zellreihe betroffen. Eine zusätzliche Beteiligung der erythrozytären Reihe sowie eine gelegentlich ausschließliche Beteiligung der megakaryozytären Zellreihe sind ebenfalls möglich. Der natürliche akute Verlauf der AML wurde besonders in der Zeit vor Einführung der Chemotherapie deutlich. So betrug die mediane Überlebenszeit von Patienten mit akuter Leukämie, welche zwischen 1926 und 1948 in das Memorial Sloan Kettering Cancer Center von New York aufgenommen wurden, nur 17 Wochen [1].

1.2.2 Epidemiologie und Ätiologie

Etwa 80 % der akuten Leukämien im Erwachsenenalter sind AML. Während die Inzidenz im Kindes- und Jugendalter 2/100.000 nicht überschreitet, wird im Alter von >80 Jahren eine Inzidenz von >20/100.000 erreicht (s. Abb. 1.2.2-1) [2].

Der Anteil an der Gesamtkrebssterblichkeit beträgt für die AML 1-2 % [3]. In den USA geht man heute von einer Heilungsrate von ca. 18 % aus [4]. Die Prognose ist dabei stark altersabhängig. So werden bei Patienten, die jünger als 45 Jahre sind, 5-Jahres-Überlebensraten bis 46,6 % erreicht, während die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten > 65 Jahre nur noch bei 6,1 % liegt [4].

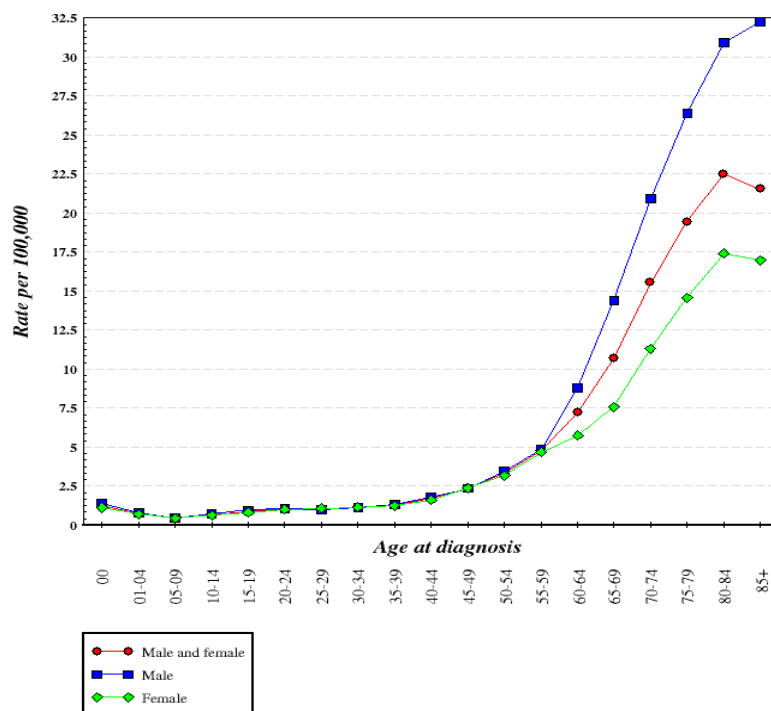
In der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts stieg sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität von Patienten mit AML deutlich an [3, 5]. Ein Grund für die Häufigkeitszunahme der AML liegt sicherlich in der Verbesserung und Erweiterung diagnostischer Techniken. Als weiterer Grund für die Häufigkeitszunahme lässt sich der Altersbezug der AML verbunden mit dem zunehmenden Alter der Bevölkerung nennen. Zudem lassen eine Vielzahl von Beobachtungen an AML-Patienten auf einen Einfluss bestimmter Umweltfaktoren schließen. Zu den Umweltfaktoren, welche eine AML auslösen können, gehören ionisierende Strahlen, Benzol, und bestimmte Chemotherapeutika. Schon in der ersten Generation von Radiologen beobachtete man das gehäufte Auftreten strahleninduzierter Leukämien. Eine

deutlicher Anstieg der Häufigkeit von AML fand sich auch bei Überlebenden der Atombombenabwürfe von Hiroshima und Nagasaki [6]. Als Folge des Atomunfalls von Tschernobyl rechnet man mit einer Zunahme an Leukämieerkrankungen um 1000 – 4000 Fällen innerhalb von 50 Jahren [7, 8]. Benzol, ein chemischer Stoff, dem vor allem Arbeiter in der Gummi- und Lederindustrie sowie in Raffinerien ausgesetzt waren und sind, ist als auslösender Faktor für Leukämien schon seit 1928 bekannt.

Bis zu 15 % aller Fälle von AML entstehen infolge Radiatio und/oder Chemotherapie einer anderen neoplastischen Erkrankung [9]. Zwei Gruppen von Chemotherapeutika stehen hierbei vor allem im Mittelpunkt. So wurde eine erhöhte Risiko für Leukämien durch alkylierende Substanzen wie Cyclophosphamid, Chlorambucil oder Busulfan beschrieben. Als zweite wesentliche Substanzgruppe erhöhen DNS-Topoisomerase II Inhibitoren wie Etoposid das Risiko für Leukämien. So wurde eine sekundäre AML häufig bei Kindern mit ALL nach Therapie mit Etoposid beobachtet [10]. Ein AML-Risiko von bis zu 6 % wurde nach einer Therapie des Morbus Hodgkin festgestellt [11]. Eine weitere Risikoerhöhung wird durch die Kombination von Alkylantien mit Strahlentherapie induziert [12].

Zu den ätiologischen Faktoren zählen neben Umweltfaktoren auch genetische Veränderungen. Bei einzelnen Patienten kann man eine familiäre Häufung beobachten. Eine eindeutige Disposition besteht für Patienten mit Down-Syndrom und einige weitere kongenitale Anomalien [13].

Abbildung 1.2.2-1 Inzidenz der AML nach Altersgruppen, USA (1994-2003) [2]



1.2.3 Symptome

Das initiale Beschwerdebild der AML ist vor allem Ausdruck einer Verdrängung der normalen Hämatopoese durch die malignen Blasten. Als Folge der Anämie finden sich Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Blässe und Dyspnoe. Eine erhöhte bakterielle Infektanfälligkeit infolge der Granulozytopenie findet sich ebenso wie Pilzinfektionen. Weiterhin besteht eine erhöhte Blutungsneigung aufgrund der Thrombozytopenie. Eine Leukozytose >100 GPT/l kann ferner zu Gefäßverschlüssen im Gehirn und in deren Folge zu Nekrosen und intrazerebralen Blutungen führen. Bei Subtypen mit Beteiligung der monozytären Reihe findet man des Weiteren eine Disposition zu Gewebs- und Organinfiltration mit Hepatosplenomegalie, Hautinfiltraten und Gingivahyperplasie [1].

1.2.4 Diagnostik und Klassifikation

Die Diagnostik der AML erfolgt in erster Linie durch zytomorphologische und zytochemische Untersuchung von Blut- und Knochenmarkausstrichen. Zur genaueren Klassifikation der AML werden zusätzliche Untersuchungen des Immunphänotyps sowie der Zyto- und Molekulargenetik hinzugezogen.

Die AML umfasst eine Vielzahl von Subtypen charakteristischer Zytologie und Biologie. Einige Subtypen lassen sich bereits durch ihre Zellmorphologie und

Zytochemie klassifizieren. Auf dieser Grundlage beruht die von französischen, amerikanischen und britischen Hämatologen erstmalig 1976 vorgenommene FAB-Klassifikation (French Amerikan British) [14] (s. Tabelle 1.2.44-1). Während einige Subtypen morphologisch bereits gut definiert sind, lassen sich andere Subtypen in weitere biologisch unterschiedliche Entitäten unterteilen. Durch bestimmte chromosomale und/oder immunologische Marker (s. Tabelle 1.2.44-2) lassen sich diese Entitäten weiter differenzieren. Die aktuelle von der WHO vorgeschlagene Klassifikation der AML (s. Tabelle 1.2.44-3) berücksichtigt noch stärker die Bedeutung von Genmutationen für die Genese und die Charakterisierung von Subtypen der AML ohne zytogenetische Veränderungen. Die WHO-Klassifikation hat das Ziel, möglichst homogene, biologisch relevante und sich gegenseitig ausschließende Entitäten zu schaffen, welche nicht nur auf den prognostischen Wert einer genetischen Veränderung zurückgehen, sondern auch auf morphologischen, anderen phänotypischen, sowie klinischen und anderen einzigartigen biologischen Eigenschaften beruhen. Dieses Ziel lässt sich heute zum Teil nur schwer realisieren. Eine Vielzahl prognostisch bedeutsamer genetischer Mutationen von zytogenetisch normalen AML kann beispielsweise einzeln oder kombiniert vorliegen mit jeweils unterschiedlicher prognostischer Bedeutung [15], [16]. Eine Mutation von NPM1 (Nucleophosmin) wird beispielsweise bei 50-60 % zytogenetisch normaler AML nachgewiesen und ist mit einer hohen 4-Jahresüberlebensrate von annähernd 50 % assoziiert [17, 18]. Betrachtet man AML mit mutiertem NPM1 und gleichzeitig FLT3-ITD-Negativität (fms-related tyrosinkinase-3-Gen – interne Tandemduplikation) so ergibt sich eine 4-Jahresüberlebensrate von etwa 60 %, während AML mit entweder NPM1-Wildtyp und/oder FLT3-ITD-Positivität nur eine 4-Jahresüberlebensrate von etwa 30 % aufweisen [17, 18].

**Tabelle 1.2.44-1 FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien
(mod. nach [19])**

FAB-Subtyp	MPO/SBB	NSE	Granulozytäre Komponente	Monozytäre Komponente	Häufigkeit
M0* "AML mit minimaler myeloischer Differenzierung"	< 3%	< 3%	< 10%	< 10%	2-10%
M1 "Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung"	≥ 3%	- (+)	< 10%	< 10%	15-20%
M2 "Myeloblastenleukämie mit Ausreifung"	≥ 3%	- (+)	> 10%	< 20%	30%
M3 / M3v "akute Promyelozytenleukämie / Variantform"	> 3%	- (+)	abnorme Promyelozyten	< 20%	5-10%
M4 / M4Eo "myelomonozytäre Leukämie / mit abnormen Eosinophilen"	≥ 3%	+	> 20%	> 20%	15-25%
M5a "akute Monoblastenleukämie"	< 3%	++	< 20%	> 80% (Monoblasten)	10-15%
M5b "akute Monozytenleukämie"	≥ 3%	++	< 20%	> 80% (Pro-, Monozyten > 20%)	
M6 „akute Erythroleukämie“	≥ 3%	+	variabel	variabel	3-4%
M7* "akute Megakaryoblastenleukämie"	< 3%	+	variabel	variabel	3-4%

* diese FAB-Subtypen bedürfen einer weiteren immunologischen Analyse zum Nachweis myeloischer bzw. megakaryozytärer Antigene; MPO, Myeloperoxidase; SBB Sudan-Schwarz-B; NSE, unspezifische Esterase

Tabelle 1.2.44-2 Auswahl von CD-Antigen, die in der Diagnostik akuter myeloischen Leukämien verwendet werden (modifiziert aus [20])

CD Antigen	Zelluläre Expression	Funktion
CD4	Thymozyten, T _H 1 und T _H 2 T-Zellen, Monozyten, Makrophagen	Co-Rezeptor für MHC-Klasse-II Moleküle Rezeptor für HIV-1 und HIV-2 gp120
CD13	Myelomonozytäre Zellen	Zink Metalloproteinase
CD14	Myelomonozytäre Zellen	Rezeptor für Komplex von Lipopolysaccharid and Lipopolysaccharid bindendem Protein (LBP)
CD15	Neutrophile, Eosinophile, Monozyten	Terminales Trisaccharid von Glycolipiden und vielen Zelloberflächen- Glycoproteinen
CD33	Myeloische Progenitorzellen, Monozyten	Bindet Sialo-Konjugate
CD34	Hämatopoetische Vorläuferzellen, kapilläre Endothelzellen	Ligand für CD62L (L-selectin)
CD36	Thrombozyten, Monozyten, Endothelzellen	Thrombozyten-Adhäsions-Molekül; beteiligt an der Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen
CD41	Thrombozyten, Megakaryozyten	IIb Integrin, assoziiert mit CD61 zur Bildung von GPIIb; bindet Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrand Faktor, und Thrombospondin
CD54	Hämatopoetische und nichthämatopoetische Zellen	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-1 bindet CD11a/CD18 Integrin (LFA-1) and CD11b/CD18 Integrin (Mac-1), Rezeptor für Rhinoviren
CD64	Monozyten, Makrophagen	Hochaffiner Rezeptor für IgG, bindet IgG3>IgG1>IgG4>>>IgG2, vermittelt Phagozytose, Antigen-Bindung,
CD65	Myeloische Zellen	Oligosaccharid-Komponente eines Ceramid-dodecasaccharids
CD117	Hämatopoetische Vorläuferzellen	Stammzell-Faktor Rezeptor

Tabelle 1.2.44-3 WHO-Klassifikation der AML 2008 [15]**Akute myeloische Leukämie und verwandte Neoplasien****Akute myeloische Leukämie mit rekurrenten genetischen Aberrationen**

AML mit t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1

AML mit inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11

APL mit t(15;17)(q22;q12); PML-RARA

AML mit t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL

AML mit t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214

AML mit inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1

AML (megakaryoblastic) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1

Vorläufige Entität: AML mit mutiertem NPM1

Vorläufige Entität: AML mit mutiertem CEBPA

Akute myeloische Leukämie mit Myelodysplasie assoziierten Veränderungen**Therapie assoziierte myeloische Neoplasien****Akute myeloische Leukämie, nicht weiter klassifiziert**

AML mit minimaler Differenzierung

AML ohne Ausreifung

AML mit Ausreifung

Akute myelomonozytäre Leukämie

Akute monoblastische/monozytische Leukämie

Akute erythroide Leukämie

Pure erythroide Leukämie

Erythrozytenleukämie, erythroide/myeloische

Akute Megakaryoblastenleukämie

Akute Basophilenleukämie

Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Myelosarkom**Myeloische Proliferationen assoziiert mit Down-Syndrom**

Transiente abnormale Myelopoese

Myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom

Neoplasie blastisch plasmazytoider dendritischer Zellen

1.2.5 Therapie

Zentraler Bestandteil der Therapie der AML ist seit mehr als 50 Jahren die Chemotherapie. Man unterscheidet 3 Phasen der Chemotherapie: Induktion, Konsolidierung und Erhaltungstherapie. Gegenstand einer Vielzahl multizentrischer, randomisierter Therapiestudien ist die Variierung von Dauer, Dosisintensität und Art der verwendeten Zytostatika innerhalb der verschiedenen Therapiephasen.

Beispielgebend soll hier das Therapieprotokoll der AMLCG92 (Studie der deutschen AML-Cooperative Group) dargestellt werden (s. Abbildung 1.2.55-1).

Wesentliche Erkenntnisse hinsichtlich der Therapie von kindlichen AML lieferten die Ergebnisse der deutschen BFM-Studiengruppe. Durch intensivierte Induktionstherapie, zusätzlicher Schädelbestrahlung und Erhaltungstherapie über 2 Jahre konnten in 80 % Komplettremissionen und in 61% eine Langzeitrezidivfreiheit erreicht werden [21]. Als Beispiel soll hier das Therapieschema der AML-BFM 93-Studie dienen (s. Abbildung 1.2.55-2) [21]. Neben der Chemotherapie stellt die Knochenmarktransplantation (KMT) einen weiteren Bestandteil der AML-Therapie dar. Bei Vorliegen eines histokompatiblen Spenders und prognostisch ungünstigem Subtyp oder nach erstem Rezidiv wird die allogene KMT bei Patienten in Remission nach Reinduktionstherapie durchgeführt.

Abbildung 1.2.55-1 Studiendesign der AMLCG 92 (mod. nach [1])

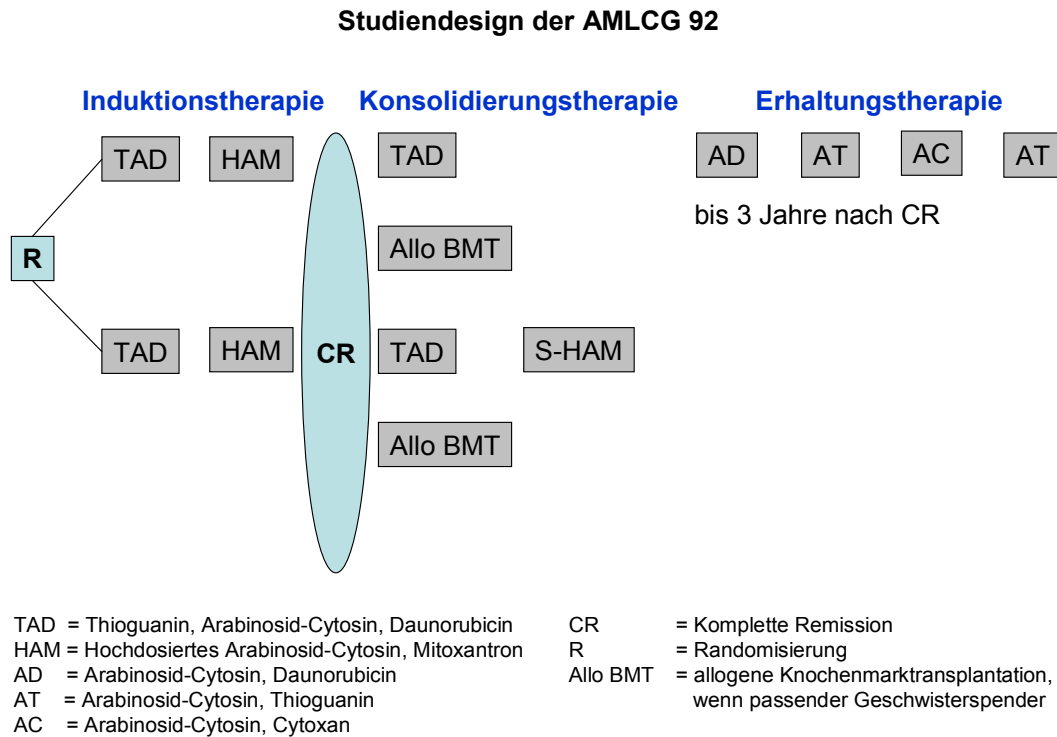
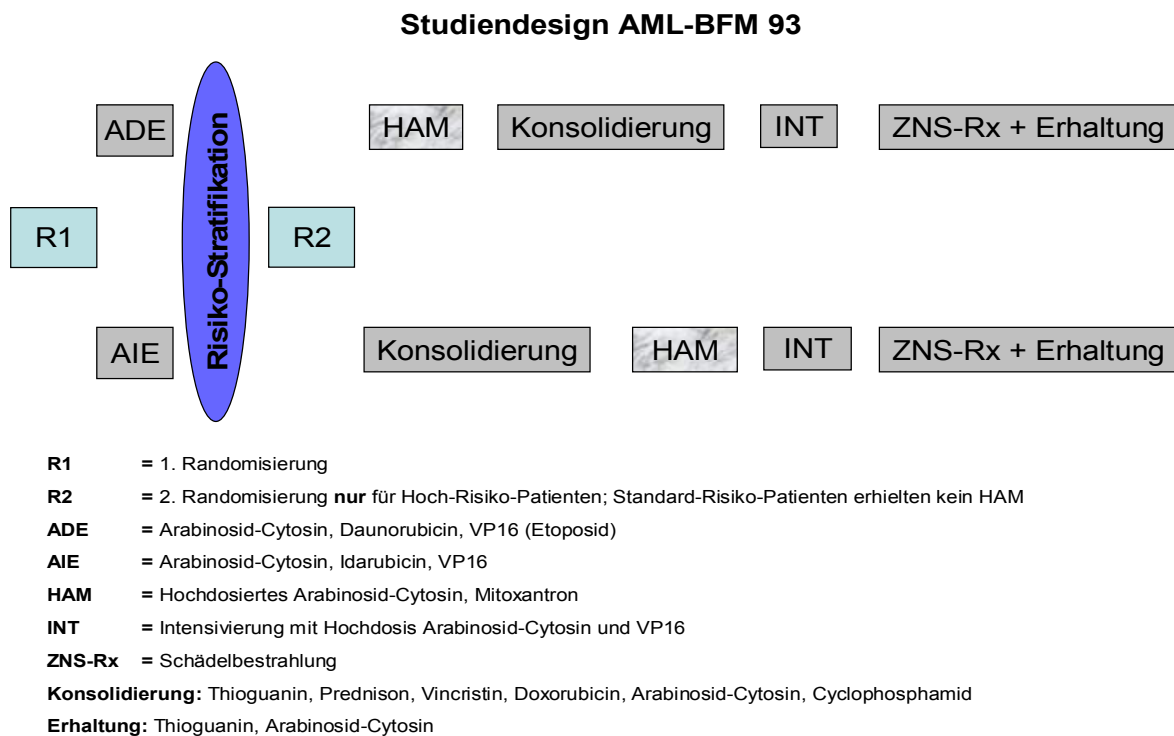


Abbildung 1.2.55-2 Studiendesign der AML-BFM 93 (nach [21])



1.2.6 Prognose

Die Prognose der AML bei Kindern und Erwachsenen ist unterschiedlich. So liegt das 5-Jahresüberleben von Kindern bei etwa 60 %, bei Erwachsenen hingegen bei 28,4 % und bei Erwachsenen ≥ 60 Jahre nur bei etwa 6,6 % (s. Tabelle 1.2.66-2). Eine Theorie, welche diese Tatsache erklären könnte, beruht auf der Annahme, dass Progenitorzellen von Erwachsenen und Kindern auf unterschiedlichen Entwicklungsstufen maligne transformieren (s. Abbildung 1.2.66-1) [22]. Kindliche Progenitorzellen könnten demnach von einem reiferen, differenzierteren Klon ausgehen, welcher besser auf Chemotherapeutika reagiert, weniger Resistenz- und Reparaturmechanismen aufweist, somit einer Therapie besser zugänglich ist und eine bessere Prognose der Patienten zur Folge hätte.

Als heute wichtigster Prognoseparameter haben sich zytogenetische, Veränderungen herauskristallisiert. Bei mehr als 50 % aller AML-Patienten lassen sich verschiedene Chromosomenaberrationen nachweisen, welche mit unterschiedlicher Prognose korrelieren. Eine Einteilung in verschiedene Risikogruppen, wie sie auch in die WHO-Klassifikation (s. Tabelle 1.2.64-3) Eingang fand, fasst dabei verschiedene Aberrationen mit ähnlicher Prognose hinsichtlich des Ansprechens auf Chemotherapie, dem krankheitsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben zusammen. Zu den Aberrationen mit niedrigem Risiko, d.h. hoher Anzahl von Patienten mit kompletter Remission (CR) und günstigem Gesamtüberleben, zählt die Core-Binding-Factor (CBF) AML mit den Aberrationen $t(8;21)/AML1-ETO$ und $inv(16)/CBFB-MYH11$ sowie die mit der Promyelozytenleukämie assoziierten Translokation $t(15;17)/PML-RAR-alpha$. Dem stehen als Hochrisiko-Leukämien mit ungünstiger Prognose z.B. Aberrationen mit komplexem Karyotyp (≥ 3 Aberrationen ohne $[t(8;21), inv(16)/t(16;16), t(15;17)]$, $t(11q23)$, $inv(3)/t(3;3)$, $t(9;22)$, $t(6;9)$, 17p-Anomalie und die Aberrationen $-5/5q-$ sowie $-7/7q-$) gegenüber [23].

Die vorhandenen genetischen Prognosemarker wurden, wie durch verschiedene Arbeiten gezeigt werden konnte, um einige molekulare Marker erweitert. So weisen FLT3-Mutationen [24, 25] und MLL-Mutationen [26] auf eine ungünstige Prognose hin, während beispielsweise Mutationen von CEBPA [27, 28] und NPM1 ohne FLT3 Mutationen [29, 30] eine Assoziation mit einer günstigen Prognose zeigen. Diese molekularen Marker können zur Vorhersage der Prognose gerade bei Leukämien mit normalem Karyotyp verwendet werden. Darüber hinaus gelangten einige für die

Apoptose bedeutsame Proteine wie Bcl-2 oder Bax als mögliche prognostische Marker in den Fokus der Forschung [31, 32].

Einen weiteren Ansatz für die Diagnostik und Neudefinition prognostisch relevanter Subgruppen stellt die Genexpressionsanalyse dar. [33, 34]. So ist in Zukunft vielleicht die genauere Definition prognostisch relevanter Subgruppen und somit eine an das individuelle Risikoprofil des Patienten besser angepasste Therapie möglich.

Abbildung 1.2.66-1 Modell für Ursprung leukämischer Stammzellen (nach [22])

Hierarchischer Ursprung von Stammzellen akuter Leukämien

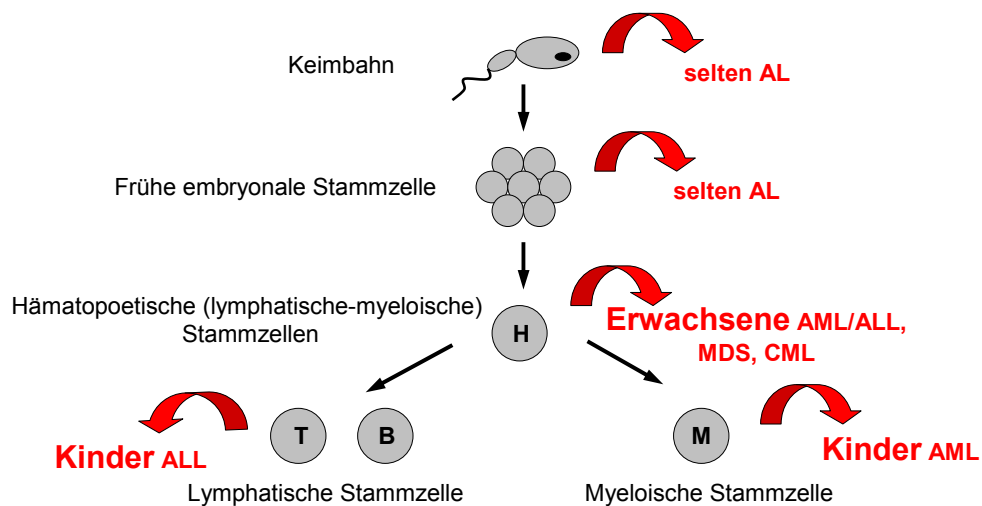


Tabelle 1.2.66-2 Übersicht Therapieansprechen der AML in verschiedenen Altersgruppen

	Erwachsene [35]	Erwachsene ≥ 60 Jahre [36]	Kinder [21]
CR	72,6%	48,5%	82%
OS (5 J.)	28,4%	6,6 %	60%
EFS (5 J.)	21,6%		51%

OS - Overall Survival (5-Jahres-Gesamtüberleben), CR - Complete Remission (Komplette Remission), EFS - Event Free Survival (5-Jahres-Ereignisfreies Überleben)

1.3 Apoptose

Bereits Mitte des vorletzten Jahrhunderts erkannte man, dass das Absterben von Zellen ein wichtiger Bestandteil der Entwicklung tierischer Organismen ist. Carl Vogt entdeckte bereits 1842 anhand der Metamorphose von Amphibien, dass Zellen durch „programmierten Zelltod“ sterben können [37]. 1951 führte Glücksmann den Tod embryonalen Gewebes auf den Tod einzelner Zellen zurück [38]. In der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts (1972), zeigten Kerr, Wyllie und Currie morphologische Unterschiede zwischen dem Absterben von Zellen, wie es sich während der Entwicklung oder zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase darstellt, und dem Zelltod, der durch Traumata oder Ischämien bedingt ist [39]. Die letztgenannte Art des Zelltodes wird Nekrose genannt, welche durch eine Schwellung der Zelle und ihrer Organellen bis zur Ruptur charakterisiert ist. Des Weiteren kommt es hier zur Kernpyknose und Karyorrhexis mit folgender Karyolyse. Schliesslich wird durch den Austritt von Zellinhalt in den Interzellularraum eine Entzündungsreaktion induziert.

Während des programmierten Zelltodes hingegen kommt es zu einer Schrumpfung und Kondensation der Zellen und ihrer Organellen mit Erhalt der Zellmembranintegrität. Membranhüllte Zellfragmente („apoptotic bodies“) oder die Zelle in toto werden von umgebenden Zellen oder Makrophagen phagozytiert, so dass eine Entzündungsreaktion ausbleibt. Kerr, Wyllie und Currie prägten für diese charakteristischen Vorgänge des programmierten Zelltodes schließlich den Begriff der Apoptose, welcher dem Griechischen entlehnt ist, und das Herabfallen der Blätter von Bäumen beschreibt.

Zur späteren allgemeinen Akzeptanz der Existenz eines programmierten Zelltodes trugen vor allem genetische Untersuchungen des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) bei. Mit der Identifikation von Genen, die für den Zelltod und seine Kontrolle verantwortlich zeichneten [40, 41], und den entdeckten Homologien zu Genen von Säugetieren [42], wurde die Erforschung der Apoptose und der damit verbundenen Mechanismen ein zentraler Bestandteil wissenschaftlicher Forschung. Ein Indiz dafür ist nicht zuletzt die Vergabe des Nobelpreises für Medizin und Physiologie an die drei Wissenschaftler John E. Sulston, Sydney Brenner und H. Robert Horvitz für ihre Entdeckungen hinsichtlich der genetischen Regulation des programmierten Zelltodes.

1.3.1 Die Morphologie der Apoptose

Schon als Kerr, Wyllie und Currie den Begriff der Apoptose prägten gingen sie von morphologischen Veränderungen der Zellen aus. Heute weiß man, dass die morphologischen Veränderungen ein Resultat der Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionswegen sind, die wiederum durch verschiedene Stoffe induziert werden können. So unterschiedlich die Substanzen zur Apoptoseinduktion auch sein mögen, weisen die daraus resultierenden morphologischen Veränderungen letztendlich viele Gemeinsamkeiten auf [43].

Welche Veränderungen lassen sich nun licht- oder elektronenmikroskopisch beobachten? Die sterbende Zelle verliert während der Apoptose ihre Kontakte zu Nachbarzellen sowie zur Extrazellulärmatrix und beginnt sich abzurunden. Weiterhin bildet die Zelle blasenartige Austülpungen. Mittels DNA-Markierung kann man eine Kondensation des Zellkerns erkennen, welche als ringförmige Struktur entlang der Kernhülle beginnt und schließlich den gesamten Kern ausfüllt. Der kondensierte Zellkern löst sich in einzelne Fragmente auf. Schließlich kondensiert die gesamte Zelle und es bilden sich sogenannte „apoptotic bodies“. „Apoptotic bodies“ sind membranumhüllte Vesikel von unterschiedlicher Größe und Inhalt [39]. Sie enthalten zytosolische Elemente, Organellen oder Teile des fragmentierten Zellkerns. Mittels Elektronenmikroskopie konnten auch Veränderungen an einzelnen Organellen beobachtet werden. So zeigen Mitochondrien nach einiger Zeit entweder eine Kondensation oder eine Schwellung, während das Endoplasmatische Retikulum (ER) und der Golgiapparat, zumindest in frühen Stadien der Apoptose, morphologisch unauffällig scheinen. Des Weiteren wurde eine Vakuolisierung des Zytoplasmas oder ein Verlust von Mikrovilli während der Apoptose beschrieben [37].

Die Phagozytose von „apoptotic bodies“, als auch der apoptotischen Zellen selbst, wird von Makrophagen und zur Phagozytose fähigen epithelialen Zellen gewährleistet. Die phagozytierten Bestandteile werden schließlich durch lysosomalen Prozesse endgültig abgebaut.

Im Folgenden sollen nun drei Proteinfamilien beschrieben werden, die entscheidenden Anteil an der Ausführung des apoptotischen Programms haben: 1. Caspasen, die sowohl als Initiatoren als auch Effektoren des Apoptoseprogramms fungieren, 2. Moleküle der Bcl-2-Familie als wichtige Regulatoren des programmierten Zelltodes durch Stabilisierung oder Destabilisierung des

mitochondrialen Membranpotentials, sowie 3. Mitglieder der Inhibitor of Apoptosis (IAP)-Proteinfamilie als Blocker des aktivierten Apoptoseprogramms.

1.3.2 Caspasen

Als Caspasen werden die Mitglieder einer Familie von Proteasen bezeichnet, welche Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität aufweisen. Cystein im aktiven Zentrum und die Tatsache, dass die von Caspasen gespaltenen Proteine immer nach einem Aspartat gespalten werden, standen bei der Namensgebung der Caspasen (Cystein-Aspartasen) Pate [44]. Durch die Entdeckung des bei Säugern vorhandenen Interleukin-1- β -converting enzymes (= ICE oder Caspase-1) wurden Caspasen erstmalig in Zusammenhang mit Apoptose gebracht. Caspase-1 ist homolog zu Ced-3 („cell death abnormal“), welches wiederum ein für den Zelltod bei *C.elegans* verantwortliches Genprodukt darstellt [45, 46]. So wurde das Interleukin-1- β -converting-enzyme zum ersten Mitglied der großen Familie der Caspasen. Caspasen sind sowohl bei der Initiierung der Apoptose als auch an der eigentlichen Zerstörung der Zelle selbst beteiligt. Es erwies sich daher als zweckmäßig, eine Einteilung der Caspasen in sogenannte Initiator-Caspasen, welche als Antwort auf proapoptotische Signale das Todesprogramm in Gang setzen, und die so genannten Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) vorzunehmen, welche durch ihre proteolytische Funktion unmittelbar an der Zerstörung der Zelle beteiligt sind und kurze Prodomänen aufweisen. Initiator-Caspasen besitzen lange Prodomänen, welche eine von zwei wichtigen Protein-Interaktions-Stellen aufweisen: der Death-Effector-Domain (DED) [Caspase-8,-10] und der Caspase-Activation-and-Recruitment-Domain (CARD) [Caspase-1, -2, -4, -5, -9, -11, -12], welche für die Interaktion mit Apoptose auslösenden Proteinen von Bedeutung sind. Eine weitere Möglichkeit der Klassifizierung der Caspasenfamilie besteht in der Unterscheidung hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Durch Thornberry et. al wurden mittels *in vitro* Untersuchungen bevorzugte Tetrapeptide als Substrate für die Caspasen 1-11 definiert [47]. Darüber hinaus können Untersuchungen hinsichtlich der Substratspezifität von Caspasen Informationen bieten, um die unterschiedlichen physiologischen Bedeutungen einzelner Caspasen zu klären, auch wenn dabei stets beachtet werden sollte, dass die Daten anhand synthetischer Substrate und *in vitro* gewonnen wurden.

Im Folgenden soll nun die Aktivierung und intrazelluläre Wirkung der Caspasen näher beleuchtet werden.

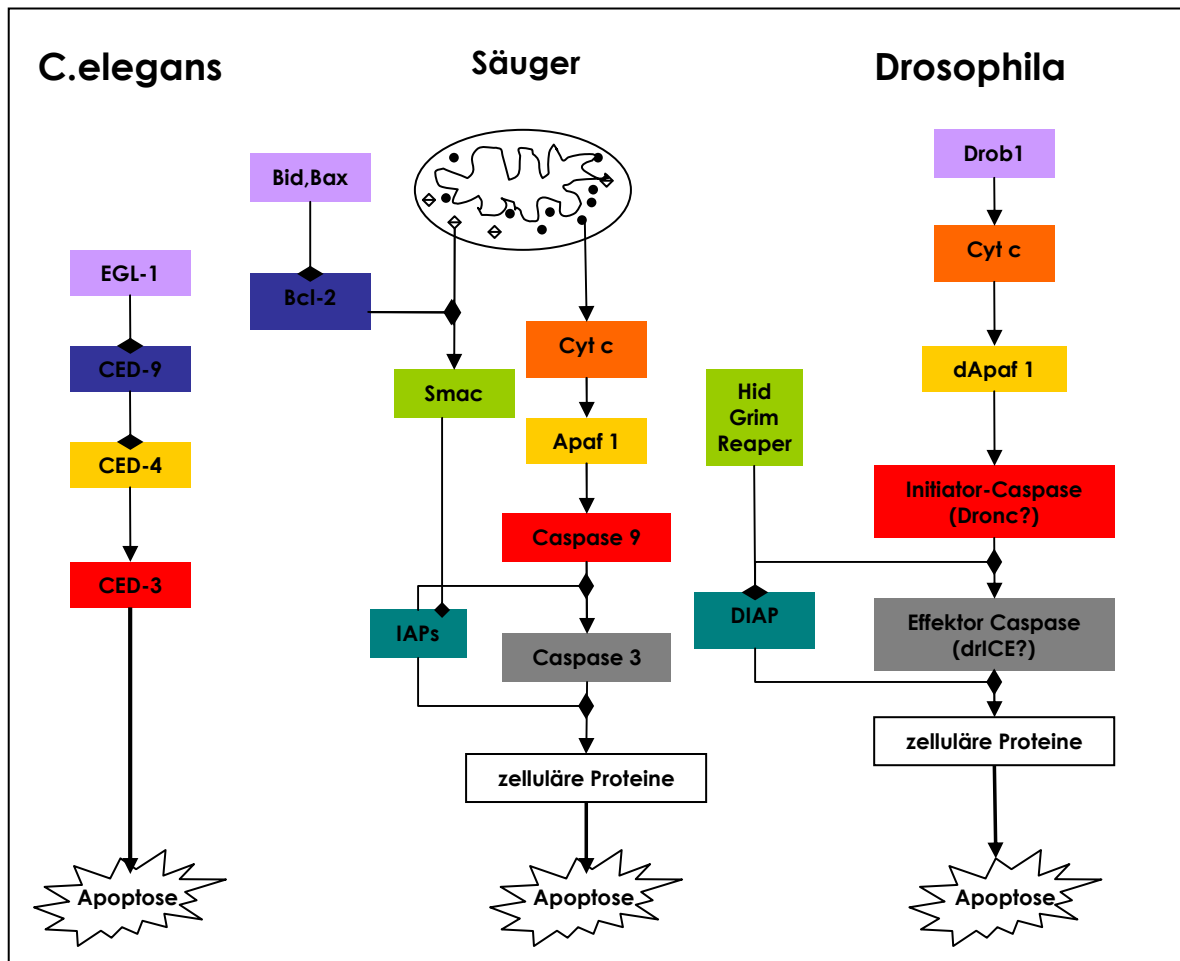
Die als Proenzyme vorliegenden Caspasen werden kaskadenartig durch proteolytische Prozessierung in aktive Proteasen umgewandelt. Erste Erkenntnisse zur Aktivierung und Regulierung von Caspasen lieferten Untersuchungen an *C. elegans*. Die Aktivierung der Initiatorcaspase Ced-3 von *C. elegans* wird durch ein Adapterprotein Ced-4 vermittelt, wobei die gegenseitige Erkennung durch die so genannten CARDS (Caspase recruitment domains) und die anschließende Oligomerisierung von Ced-4 von entscheidender Bedeutung sind. Die proapoptotische Wirkung von Ced-4 wiederum wird durch das antiapoptotisch wirkende Protein Ced-9 reguliert. Die hemmende Wirkung von Ced-9 auf Ced-4 kann durch EGL-1 aufgehoben werden. EGL-1 ist ein Mitglied der Bcl-2-Familie, welche später noch Gegenstand der Betrachtung sein soll. Die Interaktion von Ced-3, Ced-4, Ced-9 und EGL-1 hat die genaue Steuerung der Zellentwicklung von *C. elegans* zur Folge [41]. Schließlich wurden bei Säugern homologe Proteine zu den für die Entwicklung von *C. elegans* so bedeutenden Proteinen gefunden. Dazu gehören Bid und Bcl-2 als Homologe zu Ced-9 und EGL-1, sowie Caspase-9 und Apaf-1 (apoptosis activating factor 1) als Homologe zu Ced-3 und Ced-4 [48, 49] s. (Abbildung 1.3.2-1.3.2).

Caspase-9 wird durch das so genannte Apoptosom aktiviert. Das Apoptosom, als multimerer Komplex, entsteht aus einem Komplex aus Cytochrom c und Apaf-1 durch die Bindung von ATP. Cytochrom-c (Cyt c), welches sich im Intermembranspalt der Mitochondrien befindet, wird durch verschiedenste apoptotische Stimuli aus den Mitochondrien freigesetzt und bindet im Zytoplasma Apaf-1. Schließlich wird ATP gebunden und das somit entstehende Apoptosom kann Caspase-9 aktivieren. Caspase-9 wiederum aktiviert dann die Effektorcaspase Caspase-3.

Caspase-3 kann dann eine Vielzahl für die Zelle lebenswichtiger Proteine spalten und so den Zelltod induzieren. Dazu gehören unter anderem wichtige Strukturproteine wie Aktin und Enzyme wie DNA abhängige Proteinkinase. Caspase-3 ist damit an der Regulation von Degradationprozessen der Zelle beteiligt, welche einen zentralen Bestandteil der Apoptose darstellen [50]. Bei verschiedenen Zelltypen aus knock-out Tieren konnte eine Inhibierung apoptotischer Veränderungen, wie das Membran-Blebbing, die Fragmentierung des Zellkerns

sowie eine Degradierung der DNA, nachgewiesen werden [51]. So stellt Caspase-3 ein wichtiges Schlüsselprotein bei der Ausführung des Apoptoseprogramms dar.

Abbildung 1.3.2-1.3.2 Homologe apoptoseassoziierte Proteine verschiedener Spezies, modifiziert nach [50]



Legende: gleiche Farben, funktionelle Homologe; → aktivierend, —◆ inhibierend

1.3.3 Die Familie der Bcl-2-Proteine

1.3.3.1 Bcl-2-Proteine - Einteilung und Struktur

Die Entdeckung von Bcl-2 als Regulator der Apoptose geht auf die Beobachtung zurück, dass bei follikulären Lymphomen eine Translokation des Gens *bcl-2* (breakpoint cluster region lymphoma-2) von Chromosom 18 auf Chromosom 14 auftritt. Diese Translokation hat eine Überexpression von Bcl-2 zur Folge, was wiederum dazu führt, dass diese Zellen länger überleben. Im letzten Jahrzehnt wurde klar, dass Bcl-2 zu einer ganzen Familie von Proteinen gehört zu deren Mitgliedern sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirkende Proteine gehören, die die Freisetzung von Caspasen steuern. Allein bei Säugern sind bis jetzt etwa 20 Mitglieder der Bcl-2-Familie bekannt, von denen einige ebenfalls in anderen Organismen wie *C. elegans* oder *Drosophila* vorhanden sind.

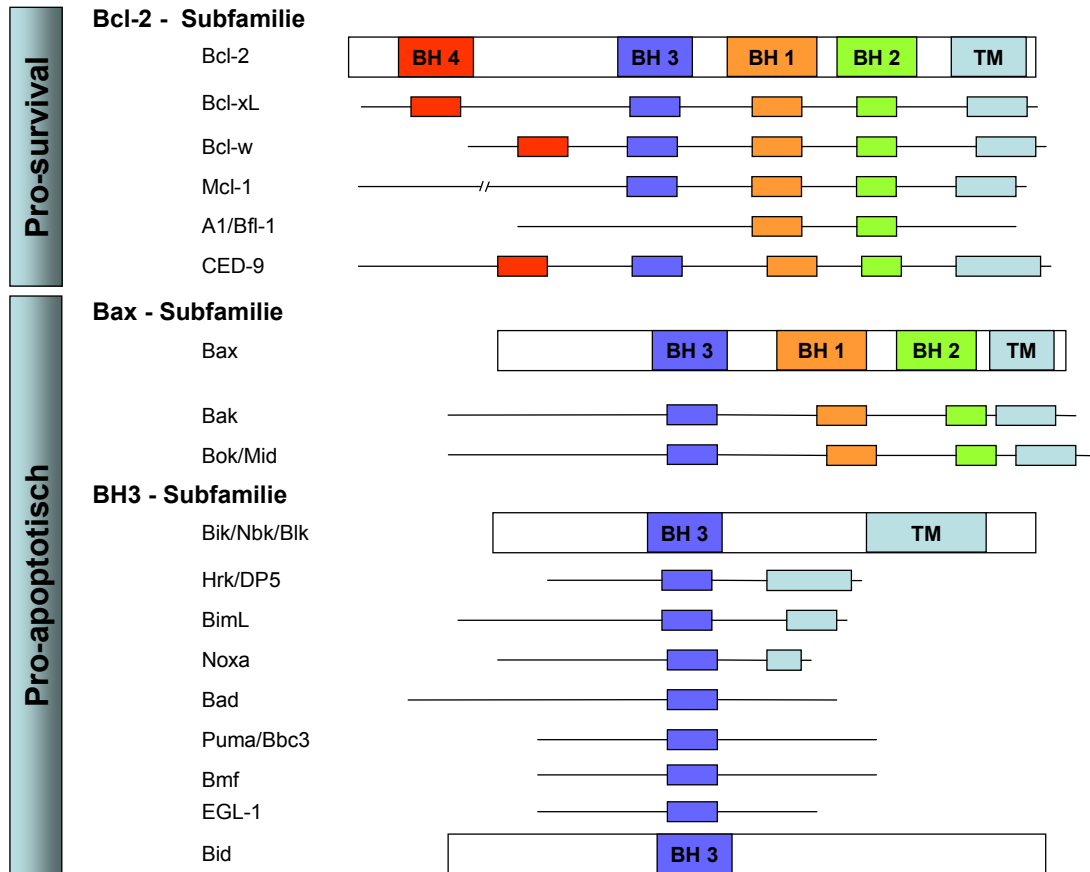
Die Familie der Bcl-2-Proteine wird heute in eine anti-apoptotische und eine pro-apoptotische Gruppe unterteilt. Alle Mitglieder enthalten bis zu vier hoch konservierte Domänen, welche als Bcl-2 Homologe (BH)-Domänen 1-4 bezeichnet werden [52]. (s. Abbildung 1.3.3-1).

Die *anti-apoptotischen* Proteine enthalten typischerweise alle 4 Domänen, von denen BH1, BH2 und BH4 für die antiapoptotische Aktivität benötigt werden [53, 54]. Ein weiterer Bestandteil der Proteinstruktur ist eine hydrophobe C-Terminale Domäne, welche für eine Bindung an intrazelluläre Membranen notwendig ist. Die *pro-apoptotischen* Proteine hingegen können noch in zwei weitere Gruppen unterteilt werden. Die Mitglieder der als Multidomän-Proteine bezeichneten Gruppe, beinhalten die Domänen BH1-3 sowie die C-terminale hydrophobe Domäne. Die zweite pro-apoptotische Gruppe enthält nur die BH3-Domäne (BH3-only). Innerhalb dieser Gruppe finden sich Proteine, welche ausschließlich die BH3-Domäne enthalten, als auch solche, welche noch zusätzlich die hydrophobe C-terminale Domäne besitzen [55].

Des Weiteren lassen sich Unterschiede in der zellulären Lokalisation der antiapoptotischen als auch der proapoptotischen Bcl-2-Proteine feststellen. Während man Bcl-2 vor allem als Bestandteil der äußeren Mitochondrienmembranen, dem endoplasmatischen Retikulum (ER) oder auch der Kernhülle findet, sind Proteine wie Bcl-xl oder Bcl-w vornehmlich an Mitochondrien

lokalisiert. Das proapoptotische Protein Bak ist eher mit Mitochondrien oder ER-Membranen assoziiert, während Bax vornehmlich im Zytosol zu finden ist [55].

Abbildung 1.3.3-1 Mitglieder der Bcl-2-Protein-Familie, modifiziert nach [52]



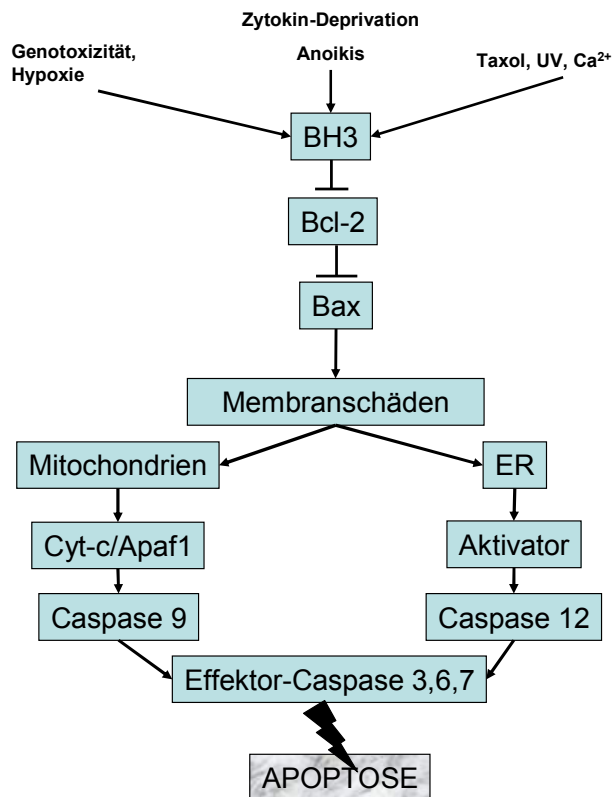
1.3.3.2 Wirkungsweise und Interaktionen der Bcl-2-Protein-Familie

Proteine der Bcl-2-Familie reagieren auf unterschiedliche zelluläre Stressfaktoren.

Wie fördert Bcl-2 das Überleben von Zellen und wie induzieren BH3-only Proteine Apoptose?

Bax-ähnliche Proteine scheinen Membranen beschädigen zu können, so auch die äußere Mitochondrienmembran, was die Freisetzung verschiedener Apoptose-Mediatoren, wie beispielsweise Cytochrom-c zur Folge hat (s. Abbildung 1.3.3-2). Bax und Bak sind ebenfalls an der Apoptoseinitiierung beteiligt, welche als Antwort auf eine gestörte Calcium-Homöostase oder ein Überschuss an ungefalteten Proteinen vom ER ausgeht. Wie genau allerdings Bax bzw. Bak eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran induzieren ist unklar. Ein Modell beinhaltet die induzierte Schwellung und Ruptur von Mitochondrien, ein weiteres basiert auf dem strukturellen Umbau von Bax und Bcl-2 ähnlichen Proteinen zu Kanal-bildenden Proteinen [55]. Das genaue und komplexe Zusammenspiel der Bcl-2 Protein-Familie bleibt weiterhin Gegenstand aktueller Forschungen.

Abbildung 1.3.3-2 Wirkungsweise von Bcl-2-Proteinen während der Apoptose modifiziert nach [52]



Legende: → aktivierend, —| inhibierend

1.3.3.3 Bcl-2 Proteine als Onkogene, Tumorsuppressoren und Proteine mit Einfluss auf den Zellzyklus

Durch Mausmodelle konnte auch eine onkogenetische Bedeutung von Bcl-2 bei der AML nachgewiesen werden. So führt die Koexpression von Bcl-2 mit PML-RAR- α bei der akuten Promyelozytenleukämie (APL) zu einer gesteigerten Zahl unreifer Zellen im Knochenmark und einer beschleunigten Entwicklung der APL [56]. Des Weiteren fördert die Bcl-2-Überexpression die Entwicklung von Leukämien, welche durch ionisierende Strahlung induziert wurde. In Analogie zu Untersuchungen, die eine onkogene Bedeutung von Bcl-2 unterstreichen, existieren auch Erkenntnisse, welche für proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie eine Wirkung als Tumorsuppressoren wahrscheinlich macht. Bei Mäusen, die Myc aber kein Bim exprimieren, konnte eine gesteigerte Leukämieentwicklung festgestellt werden [57]. In einer anderen Arbeit wurde die Entwicklung einer chronischen myelomonozytären Leukämie bei Bid-

defizienten Mäusen gezeigt [58]. Ferner konnte bei einigen humanen Tumorarten Mutationen von Bax und Bak festgestellt werden [59], [60]. Neben der Bedeutung für die Regulation apoptotischer Zellvorgänge bestehen Hinweise aus in-vitro-Versuchen und Studien mit transgenen Mäusen, die auf Einflüsse der Bcl-2-Proteinfamilie auf den Zellzyklus hindeuten.

1.3.3.4 Beeinflussung der Funktion von Bcl-2-Proteinen als Therapiemöglichkeit

Da die gestörte Apoptose eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Tumorerkrankungen zu spielen scheint, ist die Beeinflussung von apoptotischen Vorgängen zu therapeutischen Zwecken ein zentraler Bestandteil gegenwärtiger Forschung. Die Beeinflussung der Bcl-2-Funktion stellt dabei ein vielversprechendes Ziel dar. Verschiedenste Ansätze werden dabei verfolgt. Die am weitesten fortgeschrittenen Studien zielen auf die Beeinflussung der Expression von Bcl-2 mittels antisense-Oligonukleotiden, hier wurden bereits Phase-III-Studien bei verschiedenen malignen Entitäten durchgeführt [61]. Weitere Möglichkeiten der Apoptosebeeinflussung bei malignen Erkrankungen sind Bax-Adenoviren und Adenoviren, die durch tumorspezifische Targets möglichst nur Veränderungen in Tumorzellen zur Folge haben. Ferner könnte gegebenenfalls eine Therapie mit BH3-only-Proteinen oder die Entwicklung von Peptiden, welche die BH3-Bindungsdomäne imitieren und so Bcl-2 inaktivieren, proapoptotische Wirkung an malignen Zellen entfalten. Insgesamt stellen jedoch auch hier eventuelle Toxizitäten oder eine zu ungezielte Therapie Probleme dar, welche in der Zukunft gelöst werden müssen, um die für die Therapie von AML gezielteren und für die Patienten insgesamt weniger toxische Therapien bereitzustellen.

1.3.4 Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAP)

IAP gehen auf die erstmalige Entdeckung von Proteinen im Baculovirus zurück, die den Zelltod von infizierten Wirtszellen verhindern können [62, 63]. Die Familie der IAP sind durch so genannte BIR-Domänen (Baculoviral IAP Repeats), eine etwa 70 Aminosäuren umspannende Domäne, gekennzeichnet. Proteine, die BIR-Domänen enthalten, wurden bei einer Vielzahl von Eukaryonten gefunden. Darunter finden sich Hefen, *C. elegans* oder *Drosophila melanogaster* ebenso wie verschiedene Säugetiere, so bei Mäusen, Ratten, Schweinen und auch im Menschen.

Struktur-Funktionsanalysen haben die Notwendigkeit des Vorhandenseins von mindestens einer BIR-Domäne zur Apoptose-Hemmung deutlich gemacht [64]. Weiterhin kann die BIR-Domäne bei verschiedenen IAP mit weiteren anderen Leitstrukturen, wie der so genannten Ring-Domäne, CARD-Domänen, einer Ubiquitin-bindenden Domäne oder einer Nukleotid-bindenden Struktur verbunden sein (s. Abbildung 1.3.4-1).

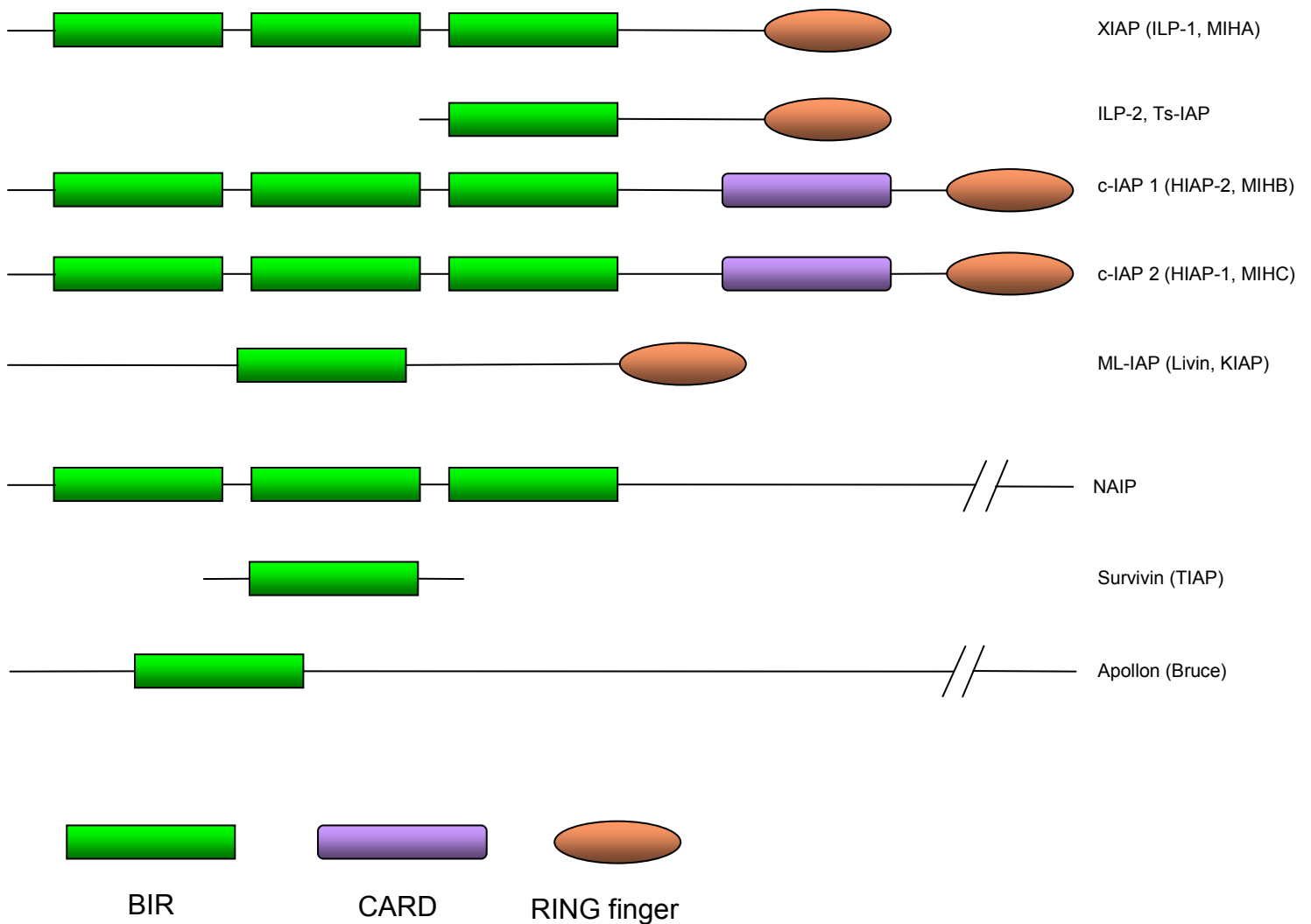
Die IAP stellen eine multifunktionelle Gruppe im Rahmen der Apoptose-Inhibitoren dar. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Beeinflussung von Caspasen, wobei IAPs mit Initiator- und Effektor-Caspasen in Wechselwirkung treten. Der wirksamste Inhibitor von Caspasen und wohl am besten charakterisierte Vertreter innerhalb der IAP-Familie ist XIAP. XIAP hemmt sowohl die Initiator-Caspase-9 als auch die Effektor-Caspasen-3 und -7. XIAP besteht aus drei BIR-Domänen und einer Ringstruktur. Den verschiedenen BIR-Domänen konnten hierbei unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden. Die BIR2-Domäne ist für die Hemmung von Caspase-3 und -7 verantwortlich. Die BIR3-Domäne hingegen ist mit der Hemmung der Initiator-Caspase-9 verknüpft.

Survivin, als ein weiteres Mitglied der IAP-Familie, besitzt nur eine BIR-Domäne, eine verlängerte c-Terminale α -Helix [65] und eine dimere Struktur [66]. Durch in vitro Experimente wurde gezeigt, dass Survivin die Effektor-Caspasen-3 und -7 binden kann und ihre Aktivität inhibiert [67]. Survivin-Antisense-Konstrukte führen zu einer stärkeren Caspaseaktivität, Spontanapoptoserate und Hemmung der Zellteilung [68]. Neben seiner antiapoptotischen Wirkung spielt Survivin auch eine wichtige Rolle im Zellzyklus. Erste Hinweise für die direkte Beteiligung Survivins an den Mechanismen der Zellteilung ergaben sich durch die Beobachtung, dass Survivin Zellzyklus-abhängig periodisch exprimiert wird. Die höchste Expressionsstärke ist während der

Mitose nachweisbar. Survivin ist während der Mitosephase an Bestandteilen des Spindelapparates lokalisiert. Bis zu 80 % des Survivinpools ist dabei mit den Mikrotubuli assoziiert. Funktionelle Untersuchungen an *C. elegans*, Hefen und knock-out-Mäusen führen zu Störungen während der Zellteilung. Eine homozygote Deletion des Survivin-Gens bei Knock-out-Mäusen führte zu Störungen der Mikrotubuluzusammensetzung und völligem Fehlen des Spindelapparates, einer daraus folgenden Entstehung multinukleärer Zellen und einer 100 % igen Letalität der Embryonen [69].

Weitere IAPs, die eine wichtige Rolle in der Apoptoseregulation spielen, sind c-IAP1, c-IAP2 und NIAP.

Abbildung 1.3.4-1 Struktur verschiedener IAP, modifiziert nach [70]



2 Material und Methoden

2.1 Durchflußzytometrie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen in primären Zellen akuter myeloischer Leukämien mittels Durchflusszytometrie und Immunoblot untersucht. Diese beiden Techniken werden zunächst dargestellt.

Die Durchflußzytometrie ist ein Verfahren zur Charakterisierung von Zellen hinsichtlich ihrer physikalischen und biochemischen Eigenschaften mittels optischer Meßprinzipien. Bei der durchflußzytometrischen Analyse von Zellen handelt es sich um die Summe vieler schnell aufeinander folgender Einzelzellmessungen. Die Zellen, welche sich in einer Zellsuspension befinden, werden dafür einzeln hintereinander zu einem Analysepunkt geleitet, an dem sie von einem fokussierten Lichtstrahl einer Lichtquelle beleuchtet werden. Durch das optische Detektionssystem und die Elektronik des Durchflußzytometers erfolgt die Quantifizierung jeder einzelnen Zelle hinsichtlich ihrer Streulicht- und Fluoreszenzemission [71].

Die Streuung des Lichts beim Auftreffen eines Lichtstrahls auf eine Zelle ist dabei von verschiedenen Eigenschaften der Zelle abhängig. Hierzu zählen die Größe der Zelle, deren intrazellulären Bestandteile, wie Granula und Vakuolen, sowie die Struktur der Zellmembran. Für die Messung werden zwei Richtungen des gestreuten Lichts berücksichtigt. Das sogenannte Vorwärtsstreulicht (engl. „forward light scatter“ [FSC]), welches den größten Anteil des Streulichts darstellt, ist vor allem ein Maß für die Zellgröße. Das so genannte Seitwärtsstreulicht (engl. „side scatter“ [SSC]), das seitwärts dazu streut, ist hauptsächlich von der intrazellulären Granularität abhängig. So ergibt sich, aufgrund unterschiedlicher Streulichteigenschaften der Zellen, die Möglichkeit, Rückschlüsse auf ihre Größe und Granularität zu ziehen [71].

Die Charakterisierung von Zellen mittels Fluoreszenzemission hingegen erfolgt durch die Darstellung von mit Fluorochromen konjugierten monoklonalen Antikörpern. Fluorochrome absorbieren Lichtenergie eines für sie charakteristischen Wellenlängenbereichs, dem so genannten Absorptionsspektrum. Die absorbierte Energie bewirkt dabei die temporäre Anhebung der Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim anschließenden Zurückfallen auf das energetische Grundniveau emittiert ein Elektron dann ein Photon. Dieser Vorgang wird als

Fluoreszenz bezeichnet. Da allerdings ein Teil der Energie beim Rückfall auf das Grundniveau als Wärmeenergie verloren geht, ist das abgegebene Licht, welches als Emissionsspektrum bezeichnet wird, energieärmer und damit langwelliger als das Anregungslicht.

Als Lichtquelle zur Anregung der Fluochrome kommen in der Durchflußzytometrie vor allem Argonionlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm zum Einsatz. Dies hat zur Folge, dass nur Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden können, deren Absorptionsspektren diesen Wellenbereich beinhalten. Eine weitere Anforderung an die benutzten Fluoreszenzfarbstoffe besteht in der Unterschiedlichkeit ihrer Emissionsmaxima. Nur dadurch können Emissionen von unterschiedlichen Detektoren erfasst, und somit mehrere Merkmale gleichzeitig analysiert werden. So erlaubt die Verwendung von geeigneten Antikörpern in Verbindung mit bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen eine Vielzahl von Charakterisierungs- und Unterscheidungsmöglichkeiten von Zellen. Die Anwendung reicht von der Markierung einzelner Oberflächenstrukturen der Zelle über Markierung intrazellulärer Proteine bis hin zu funktionellen Tests. Die für die Auswertung notwendige Konvertierung der optischen Signale in elektrische Impulse erfolgt mit Hilfe von Photodioden und Photoröhren (photomultiplier tubes). Über eine vorhandene Computersoftware können dann die verschiedenen Eigenschaften der Zellen bildlich dargestellt und statistisch ausgewertet werden.

Die Auswertung der Höhe der entsprechenden Antigenexpression erfolgte als Relativer Fluoreszenzindex (RFI), der Quotient aus der mittleren Fluoreszenzintensität der mit dem entsprechenden Antigen markierten Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensität der korrespondierenden Negativkontrolle.

2.1.1 Zellproben

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden ausschließlich kryokonservierte Zellproben verwendet, welche vorher mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation von anderen Blutbestandteilen separiert wurden. Hierbei handelt es sich um Zellproben aus peripherem Blut oder Knochenmark von insgesamt 137 Patienten mit neu diagnostizierter akuter myeloischer Leukämie (92 Erwachsene und 45 Kinder), welche einen Blastengehalt von mindestens 80 % aufwiesen.

Die AML-Diagnosestellung erfolgte anhand immunologischer und morphologischer Kriterien. Die morphologische Diagnostik richtete sich nach den Kriterien der FAB-Klassifikation (s. Abschnitt 1.2.4) Die immunologische Diagnostik mittels Durchflußzytometrie, welche nach den Richtlinien der European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) [72] durchgeführt wurde, beinhaltet die Färbung bestimmter linien- und reifungsassoziierter CD-Antigene mit monoklonalen Antikörpern (s. Tabelle 1.2.44-2). Mindestens 20 % der Zellen müssen das jeweilige CD-Antigen exprimieren, damit das Merkmal als positiv gewertet werden kann.

2.1.2 Auftauen

Zunächst wurden die Probenröhrchen aufgetaut und die Gesamtzellzahl bestimmt.

Auftauprotokoll:

Schwenken des Probenröhrchens in lauwarmem Wasser bis zur vollständigen Verflüssigung der Zellprobe

Überführung der Zellprobe in ein 10 ml Röhrchen

Zugabe von 5 ml RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-Medium (im Abstand von 1 min je 1ml)

Durchmischung der Probe durch leichtes Schwenken

Zentrifugieren der Probe für 5 min bei 1000 U/min

Aufnahme des Zellpellets in 1ml Medium

Bestimmung der Zellzahl (Cellanalyzer CA460, Dilab)

2.1.3 Detektion Apoptose-assoziiierter Proteine

2.1.3.1 Färbung der intrazytoplasmatischen Proteine Bax und Bcl-2 mittels Durchflusszytometrie

Hierbei wurde die Expression der intrazytoplasmatisch gelegenen Proteine Bax und Bcl-2 untersucht. Dafür erfolgte die Fixierung (Lösung A) der Zellen und anschließend eine Permeabilisierung (Lösung B) (Fix&Perm Cell Permeabilization Kit, An der Grub GmbH, Österreich). Bei der Färbung von Bax (s. Tabelle 2.1.33-2) wurde eine indirekte Färbemethode angewendet. Dafür wurde zunächst der monoklonale primäre Antikörper (α -Bax YTH-2D2, mouse; Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) mit der Zellprobe inkubiert. Daran anschließend erfolgte die Inkubation mit dem FITC-konjugierten sekundären Antikörper (α -mouse-FITC, goat; Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), welcher an den primären bindet und so die Expressionsmessung von intrazytoplasmatischem Bax ermöglicht. Zur Ermittlung des Anteils an unspezifischen Bindungen kam eine IgG₁ Antikörper-Isotypenkontrolle (mouse IgG1; Immunotech, Marseille, France) als Primärantikörper zur Anwendung. Für die Bestimmung der Expression von Bcl-2 (s. Tabelle 2.1.33-1) wurde ein mit FITC konjugierter Antikörper (α -bcl-2-FITC, mouse IgG1; DAKO, Glostrup, Dänemark) benutzt. Bei der verwendeten Negativkontrolle handelte es sich um eine IgG1 Isotypenkontrolle mit konjugiertem FITC und PE (mouse IgG1; Immunotech, Marseille, Frankreich)

Bei der Messung am Durchflusszytometer wurden jeweils 10000 Ereignisse/Zellen aufgenommen und die Auswertung anhand von Histogramm-Plots vorgenommen (s. Beispiel Abbildung 2.1.33-1) .

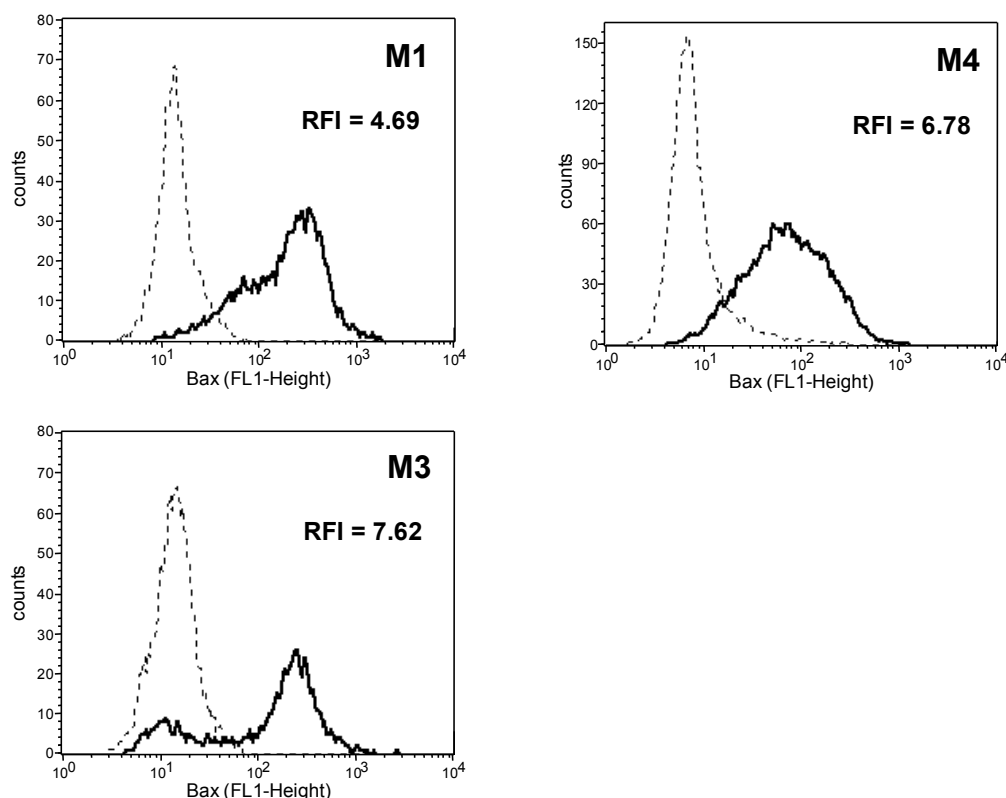
Tabelle 2.1.33-1 Protokoll Bcl2-Expression

	Röhrchen 1 (Negativkontrolle)	Röhrchen 2 (mit Antikörper anti-Bcl2)
	je 0,5 x 10 ⁶ Zellen	
	je 1 ml PBS	
	<i>Zentrifugieren</i> 5 min bei 1000 U/min	
	je 10 μ l Lösung A	
	je 50 μ l Lösung B	
	je 10 μ l RPMI/FKS (20%)	
	3 μl NK FITC-PE	3 μl α - Bcl2-FITC
	<i>Inkubation</i> für 30 min im Dunkeln	
	2 ml PBS	
	<i>Zentrifugieren</i> 5 min bei 1000 U/min	
	je 150 μ l RPMI	
	MESSEN (Aufnahme von 10000 Zellen/Ereignissen)	

Tabelle 2.1.33-2 Protokoll Bax-Expression

Röhrchen 1 (Negativkontrolle)	Röhrchen 2 (mit Antikörper anti-Bax)
je $0,5 \times 10^6$ Zellen	
je 1 ml PBS	
<i>Zentrifugieren</i> 5 min bei 1000 U/min	
je 10 μ l Lösung A	
je 50 μ l Lösung B	
je 10 μ l RPMI/FKS (20%)	
3 μ l IgG1	1 μ l α - Bax
<i>Inkubation</i> für 30 min im Dunkeln	
2 ml PBS	
<i>Zentrifugieren</i> 5 min bei 1000 U/min	
je 40 μ l RPMI	
je 10 μ l RPMI/FKS (20%)	
1 μ l goat-α-mouse-FITC	
<i>Inkubation</i> für 30 min im Dunkeln	
2 ml PBS	
<i>Zentrifugieren</i> 5 min bei 1000 U/min	
je 150 μ l RPMI	
MESSEN (Aufnahme von 10000 Zellen/Ereignissen)	

Abbildung 2.1.33-1 Intrazelluläre Expression von Bax mittels Durchflußzytometrie



Legende: Intrazelluläre Expression von Bax: Antigenexpression als RFI (Relativer Fluoreszenzindex); x-Achse: Fluoreszenzintensität; y-Achse: registrierte Ereignisse/Zellzahl; M1; M3; M4 verschiedene Patientenproben; ---- Negativkontrolle, — Patientenprobe

2.2 Immunoblot

2.2.1 Immunoblot – Methodik

Der Immunoblot ist eine Methode, um Proteine, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf einer Membran zu fixieren. Das so genannte Semi-Dry-Verfahren, welches in dieser Arbeit zur Anwendung kam, ist dabei eine schnelle und wenig aufwendige Transfermethode. Die auf die Membran („Blot“) transferierten Proteine stehen dann für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Hierfür werden die „Blots“ in einer Lösung mit einem primären Antikörper inkubiert, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist. Um die Bindung an das entsprechende Protein zu visualisieren, erfolgt die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und selbst mit einem Enzym, radioaktiven oder anderen Elementen verbunden ist, um eine Visualisierung der Protein-Antikörperbindung zu ermöglichen. In dieser Arbeit wurde die Methode der Chemolumineszenz angewandt, bei der eine am sekundären Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid Luminol oxidiert und somit für eine Emission von Licht sorgt, welche durch einen weiteren Stoff („Enhancer“) verstärkt wird. Die Lichtemission kann dann durch die Schwärzung eines Fotofilms detektiert werden.

2.2.2 Initiale Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Zunächst erfolgte die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Zellproben mittels Erstellung einer Eichreihe aus definierten Proteinkonzentrationen und deren photometrischer Extinktionsmessung (s. Reihe A + B Tabelle 2.2.2-1). Hierfür wurden die Zellproben, welche als Zellpellet vorlagen, zunächst mit 100 µl Lysispuffer (LP) pro 1×10^7 Zellen lysiert. Nach Zugabe des Lysispuffers und einer einstündigen Lagerung der Zellsuspension auf Eis erfolgte, bei nicht homogener Suspension, eine Behandlung im Ultraschallbad für 3 mal 5 s. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen. Die Erstellung der Eichreihe mit entsprechenden Reagenzien wurde lt. Pipettierschema (s. Tabelle 2.2.2-1) durchgeführt.

Nach der Inkubation für 30 min bei 37 °C erfolgte die Extinktionsmessung der definierten Proteinkonzentrationen sowie der Zellproben bei 560 nm.

Durch die anschließende Berechnung einer Regressionsgeraden aus den Extinktions-Mittelwerten für die definierten Proteinkonzentrationen wurde die jeweilige Proteinkonzentration der AML-Zellproben unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ermittelt (s. Abbildung 2.2.2-1)

Tabelle 2.2.2-1 Erstellung der Eichreihe - Pipettierschema

	1	2	3	4	...	7	8	9	10	11
A	BSA 0 µl	BSA 10 µl	BSA 20 µl	BSA 30 µl		BSA 60 µl	BSA 70 µl	BSA 80 µl	BSA 90 µl	BSA 100 µl
	LP 100 µl	LP 90 µl	LP 80 µl	LP 70 µl		LP 40 µl	LP 30 µl	LP 20 µl	LP 10 µl	LP 0 µl
	BCA 100 µl	BCA 100 µl	BCA 100 µl	BCA 100 µl		BCA 100 µl	BCA 100 µl	BCA 100 µl	BCA 100 µl	BCA 100 µl
B	BSA 0 µl	BSA 10 µl	BSA 20 µl	BSA 30 µl		BSA 60 µl	BSA 70 µl	BSA 80 µl	BSA 90 µl	BSA 100 µl
	LP 100 µl	LP 90 µl	LP 80 µl	LP 70 µl		LP 40 µl	LP 30 µl	LP 20 µl	LP 10 µl	LP 0 µl
	BCA 100 µl	BCA 100 µl	BCA 100 µl	BCA 100 µl		BCA 100 µl	BCA 100 µl	BCA 100 µl	BCA 100 µl	BCA 100 µl
C	Patient1 1:20	Patient2 1:20								
D	Patient1 1:20	Patient2 1:20								

Legende:

BSA: Bovine Serum Albumin (ICN, USA) 2 mg/ml

LP: Lysispuffer 10 mmol TRIS-Base

2 mmol EDTA

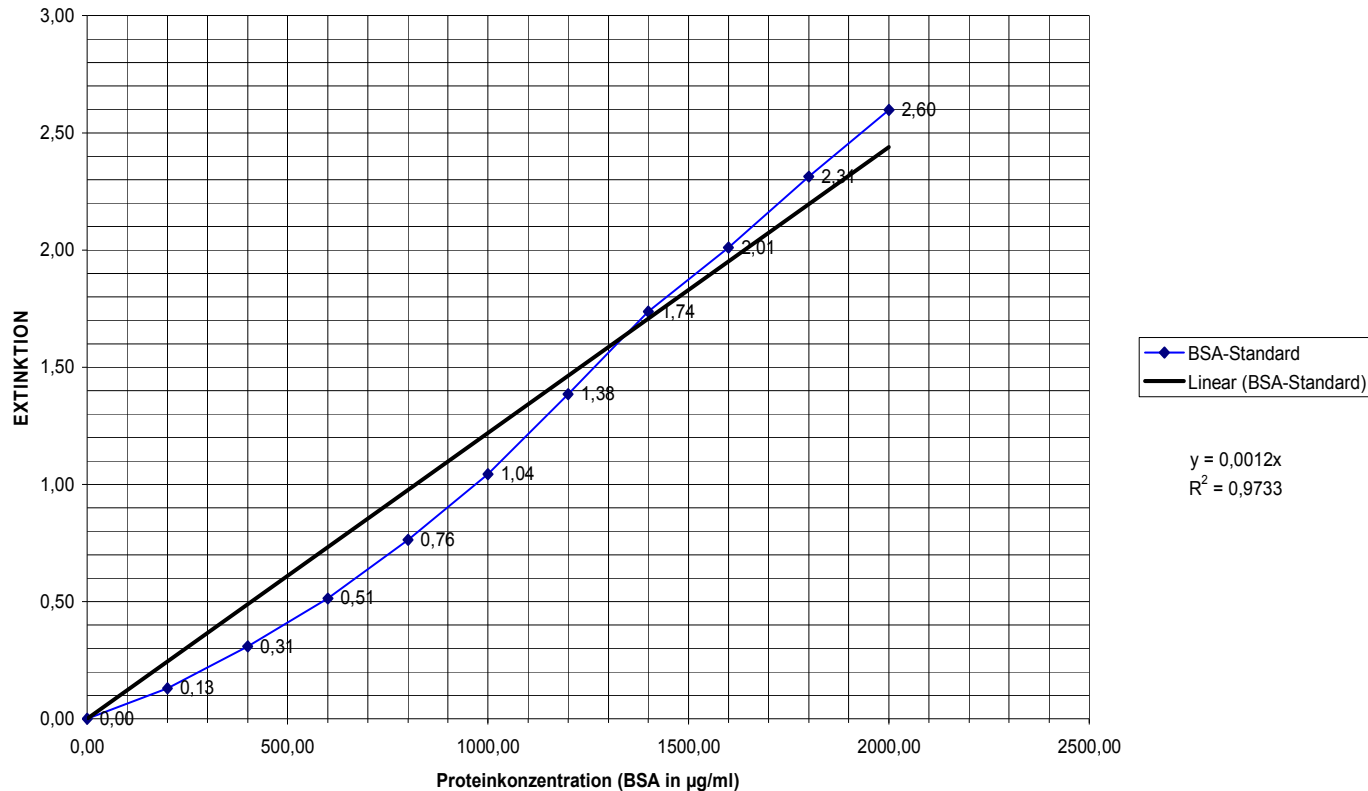
1 % Triton 100 (Sigma)

0,1 % SDS (Merck)

Proteinaseinhibitor (Complete Böhlinger) 1 Tablette pro 50 ml

BCA: BCA-Reagenz (Pierce,USA), Reagenz A:Reagenz B=50:1

Patientenproben: in Lysispuffer, BCA-Reagenz 100µl, Gesamtvolumen 200 µl

Abbildung 2.2.2-1 Bestimmung Proteinkonzentration - Regressionsgerade

2.2.3 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Für die Herstellung des Trenngels wurden 3-3,5 ml des Gelansatzes zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit aqua bidest überschichtet. Nach beendeter Polymerisation wurde das überstehende aqua bidest entfernt und mit dem Sammelgelansatz bis zur oberen Kante der Glasplatten aufgefüllt. Das Einsetzen des Kamms für die späteren Geltaschen erfolgte unter Vermeidung von Luftblasenbildung. Nach beendeter Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Gele in die Elektrophoresekammer (Biorad) überführt. Vor der Beladung des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer aufgefüllt.

Jede Geltasche des über dem Trenngel befindlichen Sammelgels wurde mit 20 µg Protein einer Patientenprobe bestückt, welche zuvor mit einem Ladepuffer auf 15 µl

aufgefüllt und anschließend bei 95°C für 5 min denaturiert wurde. Weiterhin wurde eine Bahn des Gels jeweils mit 20 µg Protein der Zelllinie BJAB (human Burkitt-like lymphoma cell line) bestückt, welche alle der mittels Immunoblot untersuchten Proteine exprimiert und damit als Positiv-Kontrolle fungierte. Eine weitere Geltasche wurde jeweils mit 4 µl eines Markers für das Molekulargewicht bestückt. Nach der Beladung des Gels erfolgte zunächst die Passage des Sammelgels für ca. 15-20 min bei 100 mV. Zur daran anschließenden Passage des Trenngels wurde die Spannung auf 200 mV für eine Zeit von 35 min erhöht. Nachdem die Bromphenolblau-Front des Ladepuffers das Trenngelende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und die Gele für den anschließenden Western Blot aus den Kammern entfernt.

2.2.3.1 Zusammensetzung der Substanzen für Gelherstellung für Polyacrylamid-Gel -Elektrophorese (wie in 2.2.3 beschrieben)

Herstellung des Trenngels (12%):

Ansatz für zwei kleine Gele (in 15 ml Röhren):

PAA	3,60 ml
Trenngel-Puffer	2,25ml
Aqua bidest	3,15ml
APS	45,0 µl
TEMED	4,5 µl

Herstellung des Sammelgels (5%):

Ansatz für zwei kleine Gele (in 15 ml Röhren):

PAA	0,85ml
Sammelgel-Puffer	1,25ml
Aqua bidest	2,90ml
APS	20,0 µl
TEMED	5,0 µl

Legende für Gelansätze:

PAA: Polyacrylamid (Biorad)
APS: Ammoniumperoxidisulfat
Temed: Tetramethyldiamin

Trenngel-Puffer(4-fach): 91,0 g Tris-Base
ca. 120,0 ml 1 N HCL (Merck)
2,0 g SDS
ad 500 ml aqua bidest; pH 8,8

Sammelgel-Puffer: 6,0 g Tris-Base
ca. 48,0 ml 1 N HCL (Merck)

	0,4 g	SDS
	ad 100 ml	aqua bidest; pH 6,8
Laufpuffer (10-fach):	30,3 g	Tris-Base
	144,0 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1000 ml	aqua bidest; pH 8,3
Ladepuffer (2-fach):	12,5 ml	Sammelgelpuffer
	2,0 g	SDS
	1,0 ml	2- Mercaptoethanol (Merck)
	10 ml	Glycerin (Merck)
	2,0 mg	Bromphenolblau (Merck)
	ad 50 ml	aqua bidest

2.2.4 Western Blot im Semidry-Verfahren

Im Anschluss an die Elektrophorese folgte der Western Blot. Die Proteine aus dem Gel wurden dabei auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Transferzeit betrug 1h bei 0,8 mA/cm².

Aufbau des Transfer -„Sandwiches“:

Zuschneiden von Filterpapieren und Nitrozellulosemembran auf Gelgröße

Kathode (-)

3 Filterpapiere getränkt in Puffer C

G E L

Nitrozellulosemembran getränkt in Puffer B

2 Filterpapiere getränkt in Puffer B

1 Filterpapier getränkt in Puffer A

Anode (+)

Legende:

Filterpapier: Whatman-Paper®

Nitrozellulosemembran: Porengröße 0,2 µm (Schleicher&Schuell)

Puffer A: 300,0 mmol/l Tris-Base pH 10,4

Puffer B: 25,0 mmol/l Tris-Base pH 9,4

Puffer C: 25,0 mmol/l Tris-Base pH 10,4

40,0 mmol/l Glycin (Merck)

2.2.5 Immundetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran folgte die Immundetektion. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer inkubiert. Daran anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in geeigneter Verdünnung mit Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubation folgten mehrere Waschschrte um die Membran von überschüssiger Antikörperlösung zu trennen. Hierfür wurde Blockierungspuffer für 3 x 5 min und 1 x 15 min verwendet.

An die Waschrte schloss sich die Inkubation mit dem sekundären, einem Meerrettich-Peroxidase konjugierten, Antikörper an. Nach der einstündigen Inkubation folgten wiederum mehrere Waschrte:

3 x 5 min in Blockierungspuffer

1 x 10 min in TBS mit 0,05 % Tween 20

1 x 15 min in entmineralisiertem Wasser

Lösungen:

Blockierungspuffer:	0,5 %	fettarme Trockenmilch
	0,05 %	Tween 20 (Calbiochem)
Tris gepufferte Saline (TBS):	50 mmol/l	Tris-Base pH 7,4
	150 mmol/l	NaCl (Roth)

Bei den untersuchten Proteinen und den verwendeten Antikörpern handelte es sich im einzelnen um:

Actin (rabbit, Sigma, USA) Verdünnung 1:1000

clAP-1 (rabbit, R&D Sytems, Deutschland) Verdünnung 1:1000

Bcl-xl (rabbit, Santa Cruz Biotechnology, USA) Verdünnung 1:200

Caspase 3 (rabbit, Pharmingen, USA) Verdünnung 1:1500

XIAP (mouse, Transduction Laboratories, USA) Verdünnung 1:250

Survivin (rabbit, R&D Sytems, Deutschland) Verdünnung 1:1000

sekundäre Antikörper:

anti-rabbit (goat, Promega Corporation, USA) Verdünnung 1:5000

anti-mouse (goat, Promega Corporation, USA) Verdünnung 1:5000

Zur Inkubation mit den o.g. Antikörpern wurden zunächst zwei verschiedene Kombinationen von Antikörpern benutzt. Nach der ersten Inkubation und nachfolgender Entwicklung, wurden die Membranen „gestrippt“, d.h. alle vorher verwendeten sekundären und primären Antikörper wurden entfernt, so dass eine erneute Antikörperinkubation mit derselben Membran vorgenommen werden konnte (s. Abbildung 2.2.55-1). Die Bestückung der Gele mit Patientenmaterial wurde so gewählt, dass je eine Probe desselben Patienten auf zwei verschiedene Gele aufgetragen und demnach auf zwei Membranen transferiert wurde.

Die Inkubation erfolgte mit zwei verschiedenen Antikörperkombinationen.

“Stripping” - Prozedur

1. 5 min Waschen in TBS-Tween (0,05%)
2. Überführung der Membran in Gefäß mit 25 ml Stripping-Puffer
3. Stripping bei 50 °C für 20 min
4. Waschen für 2 x 5 min in TBS-Tween
5. Blockieren für 1 Stunde in Blockierungspuffer

2.2.6 Entwicklung

Für die Entwicklung wurde die Membran aus der Waschlösung entnommen und die noch anhaftende Waschlösung abgesaugt. Danach wurde die Membran auf die Unterseite einer zusammenklappbaren Zellophanfolie aufgelegt. Anschließend erfolgte das Auftragen einer Mischung von je 1 ml von Lösung A und B der Detektionsreagenz (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK). Nachfolgend wurde die Oberseite der Blotting-Membran mit dem Oberteil der Zellophanfolie bedeckt. Nach der Inkubation mit der Detektionsreagenz für 1 Minute wurde die überstehenden Reagenz ausgestrichen. Schließlich wurde ein Film (Amersham Pharmacia Biotech, UK) auf die Membran aufgelegt und für eine 1 Minute belichtet. Die Filmentwicklung wurde durch eine Entwicklungsmaschine gewährleistet. (s. Abbildung 2.2.66-1)

Abbildung 2.2.65-1 Schema der Antikörperinkubation nach Western Blot

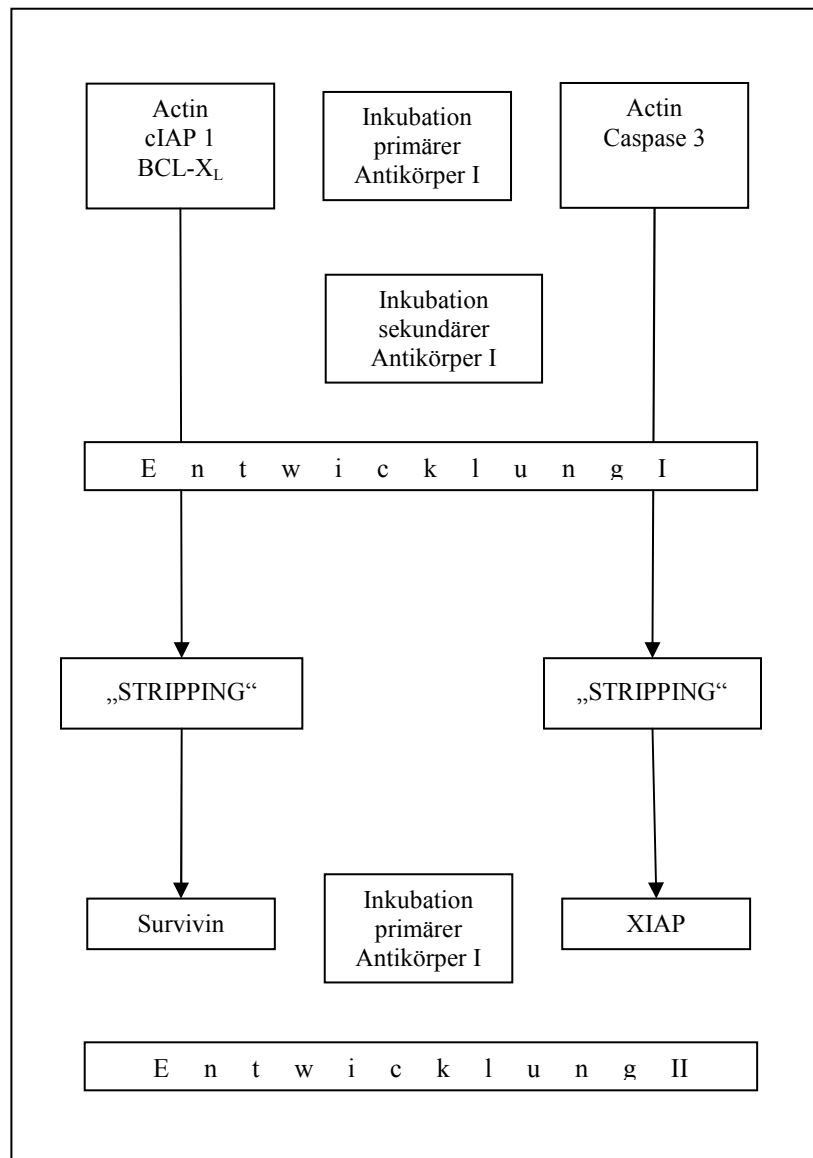
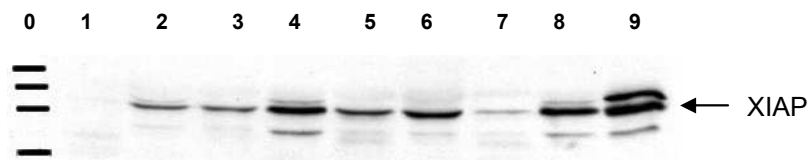


Abbildung 2.2.66-1 Beispiel für Entwicklung nach Immunoblot mit Antikörper für XIAP:



Legende: 0: Marker für Molekulargewicht
 1 – 8: AML-Patientenproben
 9: Positiv-Kontrolle

2.2.7 Auswertung

Die entwickelten Filme wurden mittels eines Durchlichtscanners (Duoscan T1200, AGFA) eingescannt und als Datei im Grafikformat „.tiff“ gespeichert.

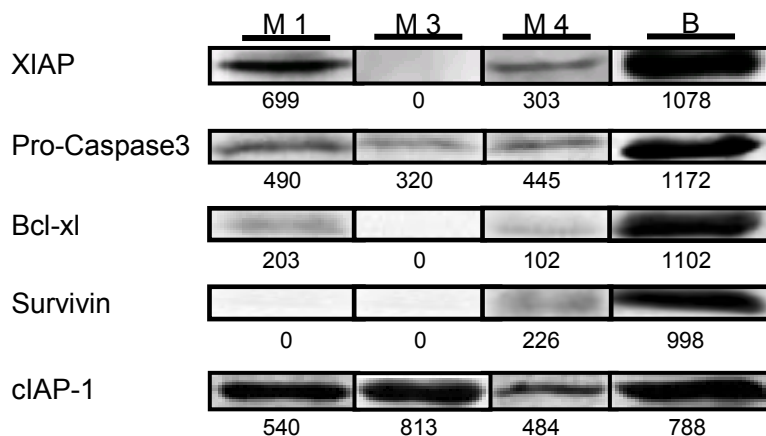
Zur Bestimmung der mittleren Dichte, d.h. dem Quotienten aus der Summe der Grauwerte der einzelnen Pixel einer Bande und der darin enthaltenen Anzahl von Pixeln, wurde die Software NIH-Image (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health, USA) verwendet. Um die Vergleichbarkeit der jeweiligen Banden für einen Antikörper auf verschiedenen Blots (s. Abbildung 2.2.77-1) zu gewährleisten, wurden die mittleren Dichten der einzelnen Banden anhand der Positiv-Kontrolle (PK) eines Blottes wie folgt normalisiert:

$$\text{nMD}_{\text{Bande Probe y (Blot n)}} = \frac{\text{MD}_{\text{Bande PK(Blot x)}}}{\text{MD}_{\text{Bande PK(Blot n)}}} \cdot \text{MD}_{\text{Bande Probe y (Blot n)}}$$

Legende:

- nMD normalisierte mittlere Dichte
- MD mittlere Dichte
- PK Positiv-Kontrolle (Bande BJAB)

Abbildung 2.2.77-1 Expressionsstärke Apoptose-assoziiierter Proteine bei de novo AML



Legende:

drei repräsentative Beispiele für FAB-Typen M1, M3, M4; B- Positivkontrolle, Zelllinie: BJAB;
Ziffern: ROD (Relative Optische Dichte, bestimmt mit Software NIH-Image)

2.3 Klinische, morphologische und zytogenetische Daten - Statistische Analysen

2.3.1 Patienteninformationen und Quellen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen standen Blut- und Knochenmarkszellproben 92 Erwachsener mit de novo AML zur Verfügung. Die Proben wurden im Rahmen der Diagnostik in der Robert-Rössle-Klinik (Berlin-Buch) einer Ficoll-Präparation unterzogen und kryokonserviert. 62 der 92 Patienten wurden im Rahmen der AMLCG-92-Studie behandelt. Für die im Rahmen der AMLCG-92-Studie behandelten erwachsenen AML-Patienten (AML-E) wurden die Daten (s. Tabelle 2.3.13.1-1) durch die AMLCG-Studienzentrale in Münster (Universität Münster, Medizinische Universitätsklinik AMLCG-Koordinatoren: Prof. Dr. T. Büchner, Prof. Dr. W. Berdel, Prof. Dr. W. Hiddemann, Prof. Dr. B. Wörmann) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Daten der hier untersuchten kindlichen AML-Patienten (AML-K), welche im Rahmen der AML-BFM 93-Studie behandelt wurden, stellte die AML-BFM-Studienzentrale in Hannover (Kooperative AML-BFM Therapiestudien, Medizinische Hochschule Hannover Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde - Pädiatrische Hämatologie/ Onkologie; AML-BFM-Koordinatoren: Frau Prof. Dr. U. Creutzig, Prof. Dr. J. Ritter) zur Verfügung (s. Tabelle 2.3.11.-2). Für die in diesen Untersuchungen verwendeten Patientenproben lagen folgende Patienteninformationen vor:

1. FAB-Morphologie, dankenswerterweise von Frau Prof. Dr. U. Creutzig Universitätsklinikum Münster; Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (AML-K) und Prof. Dr. Dr. T. Haferlach (Medizinische Klinik und Poliklinik III; Klinikum der Universität München-Großhadern) (AML-E) zur Verfügung gestellt.
2. initiale Laborparameter: periphere Leukozyten- und Thrombozytenzahl, Laktatdehydrogenase (LDH)
3. Ansprechen auf Induktionschemotherapie
4. Verlauf (Rezidiv, Tod)

Die zytogenetischen Daten für die untersuchten AML-E stellte uns Frau Dr. C. Schoch, München dankenswerterweise zur Verfügung. Für die AML-K wurden die zytogenetischen Befunde ebenfalls von Prof. Dr. J. Harbott, Justus-Liebig-Universität Giessen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.3.11.-3 Patientencharakteristika der untersuchten Kinder mit de novo AML

Anzahl der Patienten (gesamt):	45 (21 männlich, 24 weiblich)
Alter in Jahren, Mittelwert:	9 (0-16)
Initiales Hämoglobin g/dl, Mittelwert:	8.3 (3.7-14.4)
Initiale Leukozytenzahl x 10 ⁹ /L, Mittelwert:	71.739 (1.500 - 355.500)
Initiale Thrombozytenzahl x 10 ⁹ /L, Mittelwert:	61.104 (5.000 - 343.000)
Initiale LDH Units/L, Mittelwert:	784 (192 - 2.584)
FAB-Morphologie (n=42 von 45):	M0 (n=3), M1 (n=7), M2 (n=9),
	M3 (n=5), M4 (n=11), M5 (n=6), M6 (n=1)
Zytogenetische Risikogruppen (n=37 von 45):	gut (n=7), intermediär/schlecht (n=30)

Tabelle 2.3.13.1-4 Patientencharakteristika der untersuchten Erwachsenen mit de novo AML

Anzahl der Patienten (gesamt):	92 (38 männlich, 54 weiblich)
Alter in Jahren, Mittelwert:	55 (17-77)
Initiale Leukozytenzahl x 10 ⁹ /L, Mittelwert:	97.910 (1.100-1.017.000)
Initiale Thrombozytenzahl x 10 ⁹ /L, Mittelwert:	65.534 (8.000-325.000)
Initiale LDH Units/L, Mittelwert:	734 (171-2.949)
FAB-Morphologie (n=88 von 92):	M0 (n=7), M1 (n=21), M2 (n=21),
	M3 (n=4), M4 (n=22), M5 (n=11), M6 (n=2)
Zytogenetische Risikogruppe (n= 74 von 92):	gut (n=5), intermediär/schlecht (n=69)

2.3.2 Statistische Methoden

Sämtliche statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS (Version 11.0) durchgeführt. Die durchflusszytometrisch ermittelte Expression der Apoptose-assoziierten Proteine (Bcl-2, Bax) wurde als Mittelwert (\pm Standardfehler ; SEM) der RFI-Werte (relativer Fluoreszenzindex) berechnet. Die mittels Immunoblot untersuchten Proteine (Procaspase 3, Bcl-xl, XIAP, cIAP1, Survivin) wurden als Mittelwerte (\pm Standardfehler ; SEM) der ROD-Werte (relative optische Dichte) berechnet. Eine Prüfung auf Unterschiede der Expressionshöhe zwischen CD-Marker positiven und negativen AML-Gruppen (z.B. CD34 positive vs. CD34 negative), FAB-Subtypen, zytogenetische Risikogruppen sowie Respondern vs. Non-Respondern und Patienten mit Rezidiv vs. Patienten in Remission wurden mittels Tests nach Mann-Whitney und

Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Einflüsse der Proteinexpressionen auf das Gesamtüberleben wurden nach Kaplan-Meier analysiert. Ein Vergleich erfolgte mit 2-seitigem log-rank-Test, p-Werte $<0,05$ wurden als signifikant angesehen. Eine Prüfung auf Unterschiede der Expressionsmuster der o.g. apoptoseassoziiierter Proteine zwischen Kindern und Erwachsenen erfolgte durch Anwendung des U-Tests nach Mann-Whitney. Unterschiede zwischen Kindern und Erwachsenen hinsichtlich der FAB-Morphologie, des Immunphänotyps sowie der Zytogenetik wurden mittels des Chi-Quadrat-Tests analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Apoptose

3.1.1 Korrelation zwischen Proteinexpression und Reifungsgrad

3.1.1.1 Korrelation zwischen Proteinexpression und FAB Morphologie

3.1.1.1.1 Proteinexpression und FAB Morphologie der AML Erwachsener

Zur Korrelation der FAB-Morphologie mit den verschiedenen Expressionsstärken der hier untersuchten Proteine wurde eine Gruppierung der FAB-Typen in eher unreife (FAB M0 und M1), granulozytäre (FAB M2 und M3) sowie FAB-Typen mit myelomonozytärer Ausreifung (FAB M4 und M5) vorgenommen.

Für 74 der untersuchten Patienten konnten zytomorphologische Daten zur Analyse herangezogen werden. Dabei fand sich eine Korrelation zwischen hoher XIAP-Expression und den FAB-Subtypen myelomonozytärer Morphologie FAB M4 und M5 ($p < 0,001$). Für die Bcl-2-Expression ergab sich eine signifikante Assoziation mit der Gruppe unreifer FAB-Typen FAB M0 und M1 ($p = 0,034$). Für alle weiteren untersuchten Proteine konnte keine Korrelation zwischen deren Expression und den jeweiligen FAB-Subtypengruppen gezeigt werden (s. Tabelle 3.1.1.1.1-1).

3.1.1.1.2 Proteinexpression und FAB Morphologie der AML im Kindesalter

Auch für die hier untersuchten kindlichen Zellproben konnte eine Korrelation zwischen der Expression von XIAP mit FAB-Subtypen ($p = 0,002$) nachgewiesen werden. Die höchsten mittleren Expressionsspiegel waren hier mit der Gruppe der unreifen FAB-Subtypen M0 und M1 assoziiert. Für alle anderen Proteine konnten keine Korrelationen nachgewiesen werden (s. Tabelle 3.1.1.1.2-1).

Tabelle 3.1.1.1.1-1 Proteinexpression und FAB-Gruppen der AML Erwachsener

Proteinexpression (ROD/RFI \pm SEM (n))	M0/1 (n)	M2/3 (n)	M4/5 (n)	P
XIAP	2765 \pm 486 (27)	2514 \pm 90 (24)	4465 \pm 595 (33)	0.034
ciAP1	1846 \pm 470 (13)	2326 \pm 740 (7)	2083 \pm 709 (19)	n.s.
Survivin	821 \pm 228 (27)	584 \pm 80 (24)	462 \pm 188 (33)	n.s.
Pro-Caspase-3	4811 \pm 799 (27)	4576 \pm 32 (24)	4031 \pm 516 (33)	n.s.
Bcl-xL	2871 \pm 547 (27)	2832 \pm 625 (24)	2632 \pm 393 (33)	n.s.
BAX	7,7 \pm 0,9 (27)	7,4 (1,1 (24)	7,8 (1,0 (33)	n.s.
Bcl-2	2,9 (0,2 (27)	2,2 (0,1 (24)	1,7 (0,1 (33)	0.000

Tabelle 3.1.1.1.1-2 Proteinexpression und FAB-Gruppen der AML im Kindesalter

Proteinexpression (ROD/RFI (SEM (n))	M0/1 (n)	M2/3 (n)	M4/5 (n)	P
XIAP	5449 (1060 (9)	678 (342 (14)	2810 (737 (17)	0,002
ciAP1	8354 (1631 (8)	6577 (1624 (3)	8216 (2081 (11)	n.s.
Survivin	207 (143 (9)	246 (177 (14)	500 (228 (17)	n.s.
Pro-Caspase-3	5600 \pm 1187 (9)	2674 \pm 560 (14)	3868 \pm 605 (17)	n.s.
Bcl-xL	3606 \pm 1175 (9)	1253 \pm 482 (14)	1874 \pm 350 (17)	n.s.
BAX	4,4 \pm 0,7 (10)	5,4 \pm 0,8 (11)	5,4 \pm 0,5 (14)	n.s.
Bcl-2	2,7 \pm 0,4 (10)	2,6 \pm 0,3 (11)	2,5 \pm 0,3 (14)	n.s.

Legende:

n, Anzahl untersuchter Proben ; SEM, Standard Fehler des Mittelwertes; n.s., nicht signifikant. CD95, Bax, und Bcl-2 mittlere Expressionstärke als RFI (relative Fluoreszenz-Intensität) und Bcl-xL, Procaspase-3, XIAP, Survivin and ciAP1 Expressionsstärken als standardisierte Mittelwerte (ROD, relative optische Dichte), wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

3.1.1.2 Korrelationen der Proteinexpressionen mit dem Immunphänotyp

3.1.1.2.1 Proteinexpression und Immunphänotyp der AML Erwachsener

Für die Korrelation der untersuchten Proteinexpression mit dem Immunphänotyp wurde die folgende Auswahl von Antigenen näher beleuchtet: Progenitorzellmarker (CD34, CD117), monozytäre Marker (CD4 , CD14 , CD36, CD64, HLA-DR) sowie granulozytäre Marker (CD15, CD65).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten AML-Proben Erwachsener ließ sich eine Korrelation der Bcl-2-Expression mit der Expression der Progenitorzellmarker CD34 ($p=0,007$) und CD117 ($p<0,001$) nachweisen. Ebenfalls mit CD117 korrelierte die c-IAP-1-Expression ($p=0,025$). Die jeweils höheren mittleren Expressionswerte von Bcl-2 und cIAP-1 wiesen hierbei die für CD34 und CD117 positiven Proben auf. Zusätzlich ergab sich eine Korrelation der CD4-Expression mit der von Bcl-2, dabei zeigten CD4-negative Zellproben eine höhere mittlere Bcl-2-Expression als CD4-positive. Für die XIAP-Expression ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit den monozytären Eigenschaften CD4 ($p=0,004$), CD14 ($p=0,036$), CD36 ($p=0,038$) sowie HLA-DR ($p=0,001$) nachweisen. Für die Proteinexpression von Bax, Bcl-xL, Procaspase-3 und Survivin konnten keine Korrelationen mit den hier untersuchten immunphänotypischen Eigenschaften nachgewiesen werden (s. Tabelle 3.1.1.2-1).

Tabelle 3.1.1.2-1 Proteinexpression und Immunphänotyp Erwachsener

	Bcl-2			XIAP			cIAP1		
„unreife AML“	RFI \pm SEM	n	p-Wert	ROD \pm SEM	n	p-Wert	ROD \pm SEM	n	p-Wert
CD 34 pos	2,6 \pm 0,2	33	0,007	3410 \pm 503	33	n.s.	2460 \pm 631	14	n.s.
CD 34 neg	2,1 \pm 0,1	57		3348 \pm 470	57		2250 \pm 535	28	
CD 117 pos	2,5 \pm 0,1	56	0,000	3698 \pm 606	35	n.s.	2942 \pm 559	23	0,025
CD 117 neg	1,9 \pm 0,2	34		3162 \pm 417	55		1567 \pm 570	19	
„Monozytär differenzierte AML“	RFI \pm SEM	n	p-Wert	ROD \pm SEM	n	p-Wert	ROD \pm SEM	n	p-Wert
CD 4 pos	1,8 \pm 0,1	30	0,001	4860 \pm 601	29	0,004	2298 \pm 776	18	n.s.
CD 4 neg	2,5 \pm 0,1	60		2663 \pm 397	61		2336 \pm 436	24	
CD 14 pos	1,6 \pm 0,1	23	n.s.	4756 \pm 769	23	0,036	1625 \pm 525	14	n.s.
CD 14 neg	2,5 \pm 0,1	67		2895 \pm 368	67		2667 \pm 550	28	
CD 36 pos	1,8 \pm 0,1	36	n.s.	4234 \pm 560	37	0,038	2163 \pm 722	20	n.s.
CD 36 neg	2,6 \pm 0,1	54		2769 \pm 431	53		2462 \pm 442	22	
CD 64 pos	1,8 \pm 0,1	56	n.s.	3724 \pm 460	55	n.s.	2265 \pm 585	26	n.s.
CD 64 neg	2,9 \pm 0,2	34		2815 \pm 511	35		2408 \pm 527	16	
HLA-DR pos	2,2 \pm 0,1	67	n.s.	4025 \pm 417	66	0,001	2443 \pm 474	35	n.s.
HLA-DR neg	2,4 \pm 0,2	23		1571 \pm 436	24		1703 \pm 659	7	
„Granulozytär differenzierte AML“	RFI \pm SEM	n	p-Wert	ROD \pm SEM	n	p-Wert	ROD \pm SEM	n	p-Wert
CD 15 pos	1,8 \pm 0,1	39	n.s.	3756 \pm 578	39	n.s.	2776 \pm 826	17	n.s.
CD 15 neg	2,6 \pm 0,1	51		3076 \pm 421	51		2010 \pm 403	25	
CD 65 pos	1,9 \pm 0,1	48	n.s.	3608 \pm 521	48	n.s.	2169 \pm 658	23	n.s.
CD 65 neg	2,7 \pm 0,2	42		3100 \pm 444	42		2502 \pm 449	19	

Legende:

n, Anzahl untersuchter Proben ; neg. < 20% der Zellen für Merkmal positiv; pos. \geq 20% der Zellen für Merkmal positiv; SEM, Standard-Fehler des Mittelwertes; n.s., nicht signifikant; Bcl-2 mittlere Expressionsstärke als RFI (relative Fluoreszenz-Intensität); XIAP, cIAP1 Expressionsstärken als standardisierte Mittelwerte (ROD, relative optische Dichte) wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

3.1.1.2.2 Proteinexpression und Immunphänotyp der AML im Kindesalter

Insgesamt wiesen das Expressionsprofil Apoptose-regulierender Proteine der AML Erwachsener und das Expressionsprofil Apoptose-regulierender Proteine kindlicher AML deutliche Unterschiede auf. Bei den kindlichen AML-Proben konnten Korrelationen mit vorwiegend monozytären Differenzierungsmarkern festgestellt werden. Dabei korrelierte die Expressionshöhe von Proteinen mit antiapoptotischer Wirkung wie Survivin mit der CD36-Expression ($p=0,019$), die Expressionshöhe von XIAP mit der HLA-DR- und CD4-Positivität ($p=0,049$; $p=0,044$) sowie die Expressionshöhe von Bcl-xL ebenfalls mit der HLA-DR-Positivität ($p=0,030$). Eine stärkere Expressionshöhe von Bcl-2 hingegen korrelierte mit CD14- und CD 36-Negativität ($p=0,010$; $p=0,012$).

Für das proapoptotisch wirkende Protein Pro-Caspase3 ergab sich eine Korrelation einer hohen Expressionshöhe mit HLADR-Positivität ($p=0,013$) als auch mit CD65-Negativität ($p=0,040$).

Die Expression von Bax und cIAP1 zeigte keine Korrelation mit den hier untersuchten Immunphänotypen. (Tabelle 3.1.1.2.2-1)

Tabelle3.1.1.2.2-1 Proteinexpression und Immunphänotyp der AML im Kindesalter

	Bcl-2			Bcl-xL			Procaspace-3			XIAP			Survivin		
„unreife AML“	RFI ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert
CD34 pos	2,6 ± 0,2	20	ns	1644 ± 284	24	ns	4110 ± 515	24	ns	1565 ± 455	24	ns	368 ± 143	24	ns
CD34 neg	2,6 ± 0,3	17		2568 ± 683	19		3449 ± 715	19		3709 ± 814	19		410 ± 195	19	
CD117 pos	2,7 ± 0,2	30	ns	2183 ± 415	33	ns	4205 ± 497	33	ns	2340 ± 508	33	ns	234 ± 92	21	ns
CD117 neg	2,1 ± 0,2	7		1621 ± 564	10		2539 ± 696	10		3082 ± 1120	10		889 ± 367	10	
„monozytär differenzierte AML“	RFI ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert
CD4 pos	2,5 ± 0,2	14	ns	2551 ± 622	17	ns	4682 ± 777	17	ns	3745 ± 880	17	,044	634 ± 248	17	ns
CD4 neg	2,7 ± 0,3	23		1726 ± 394	26		3253 ± 465	26		1706 ± 457	26		225 ± 95	26	
CD14 pos	1,7 ± 0,1	7	,010	1671 ± 492	10	ns	2742 ± 760	10	ns	1631 ± 708	10	ns	655 ± 337	10	ns
CD14 neg	2,8 ± 0,2	30		2168 ± 424	33		4144 ± 495	33		2780 ± 563	33		305 ± 112	33	
CD36 pos	1,9 ± 0,1	10	,012	1833 ± 394	13	ns	3701 ± 715	13	ns	2996 ± 962	13	ns	840 ± 290	13	,019
CD36 neg	3,0 ± 0,2	25		2186 ± 491	28		3856 ± 531	28		2390 ± 558	28		204 ± 98	28	
CD64 pos	2,4 ± 0,2	26	ns	1676 ± 291	30	ns	3559 ± 452	30	ns	2265 ± 547	30	ns	408 ± 154	30	ns
CD64 neg	3,0 ± 0,4	11		2921 ± 896	13		4414 ± 951	13		3084 ± 888	13		338 ± 151	13	
HLA-DR pos	2,5 ± 0,2	30	ns	2471 ± 424	32	,030	4446 ± 489	32	,013	3033 ± 564	32	,049	390 ± 131	32	ns
HLA-DR neg	2,9 ± 0,3	7		833 ± 339	11		1992 ± 595	11		999 ± 605	11		377 ± 255	11	
„granulozytär differenzierte AML“	RFI ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert	ROD ± SEM	n	p-Wert
CD15 pos	2,5 ± 0,2	21	ns	1427 ± 266	24	ns	3033 ± 523	24	ns	2124 ± 532	24	ns	436 ± 168	24	ns
CD15 neg	2,7 ± 0,3	16		2842 ± 669	17		4809 ± 643	19		3003 ± 811	19		325 ± 159	19	
CD65 pos	2,5 ± 0,2	25	ns	1671 ± 290	31	ns	3223 ± 447	31	,040	2324 ± 542	31	ns	498 ± 153	31	ns
CD65 neg	2,7 ± 0,4	12		3037 ± 948	12		5354 ± 873	12		3000 ± 920	12		98 ± 98	12	

Legende:

n, Anzahl untersuchter Proben ; neg. < 20% der Zellen für Merkmal positiv; pos. ≥ 20% der Zellen für Merkmal positiv; SEM, Standard Fehler des Mittelwertes; n.s., nicht signifikant.; Bcl-2 mittlere Expressionsstärke als RFI (Relative Fluoreszenz Intensität); Bcl-xL, XIAP, Procaspace-3, Survivin Expressionsstärken als standardisierte Mittelwerte (ROD, Relative Optische Dichte) wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

3.1.2 Proteinexpression und Zytogenetik

3.1.2.1 Proteinexpression und zytogenetische Risikogruppen der AML des Erwachsenen

Zur Untersuchung der Daten auf Zusammenhänge zwischen zytogenetischen Veränderungen und der Expressionshöhe der hier untersuchten Proteine wurde eine Einteilung in Patienten mit guter Prognose {t(8;21), inv(16)/t(16;16), t(15;17)}, Patienten mit intermediärer {normaler Karyotyp, andere Anomalien} oder schlechter Prognose {-5/5q-, -7/7q-, 11q23-Anomalie, inv(3)/t(3;3), t(9;22), t(6;9), 17p-Anomalie, komplex aberranter Karyotyp} vorgenommen [23].

Bei den hier untersuchten AML-Proben des Erwachsenenalters standen für die Auswertung zytogenetische Daten von 74 Patienten zur Verfügung. Einzig für XIAP konnte eine Korrelation zwischen der Proteinexpression und den zytogenetischen Risikogruppen nachgewiesen werden. Die mittlere Expressionshöhe von XIAP war dabei in der AML-Gruppe mit intermediärer/schlechter Prognose (n=69; mittlere ROD: 3563; p=0,011) signifikant höher als in der Gruppe von Patienten guter Prognose (n=5; mittlere ROD: 184). Für Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Procaspase-3 sowie cIAP1 und Survivin konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang bezüglich ihrer mittleren Expressionshöhe und dem zytogenetischen Risiko der hier untersuchten Patienten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.2 Proteinexpression und zytogenetische Risikogruppen der AML des Kindes

Für die Analyse von AML des Kindesalters auf Zusammenhänge zwischen zytogenetischen Prognosegruppen mit den in dieser Arbeit untersuchten Apoptose-Parametern konnten Daten von 37 Patienten herangezogen werden. Die Einteilung der Patienten in verschiedene Gruppen wurde wie in 3.1.2.1 beschrieben vorgenommen. Zellproben von Patienten aus der Gruppe mit intermediärer/schlechter Prognose zeigten eine signifikant höhere mittlere Expression für XIAP (2509 ± 503 ROD, n=30, p<0,002) und Bcl-xL (2615 ± 439 ROD, p<0,001) als Proben aus der Gruppe mit günstiger Prognose. Die Expressionshöhe aller anderen analysierten Proteine korrelierten nicht mit den verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Korrelation zwischen Proteinexpression und klinischen Daten: Ansprechen auf Induktionstherapie, Rezidivrate, Gesamtüberleben

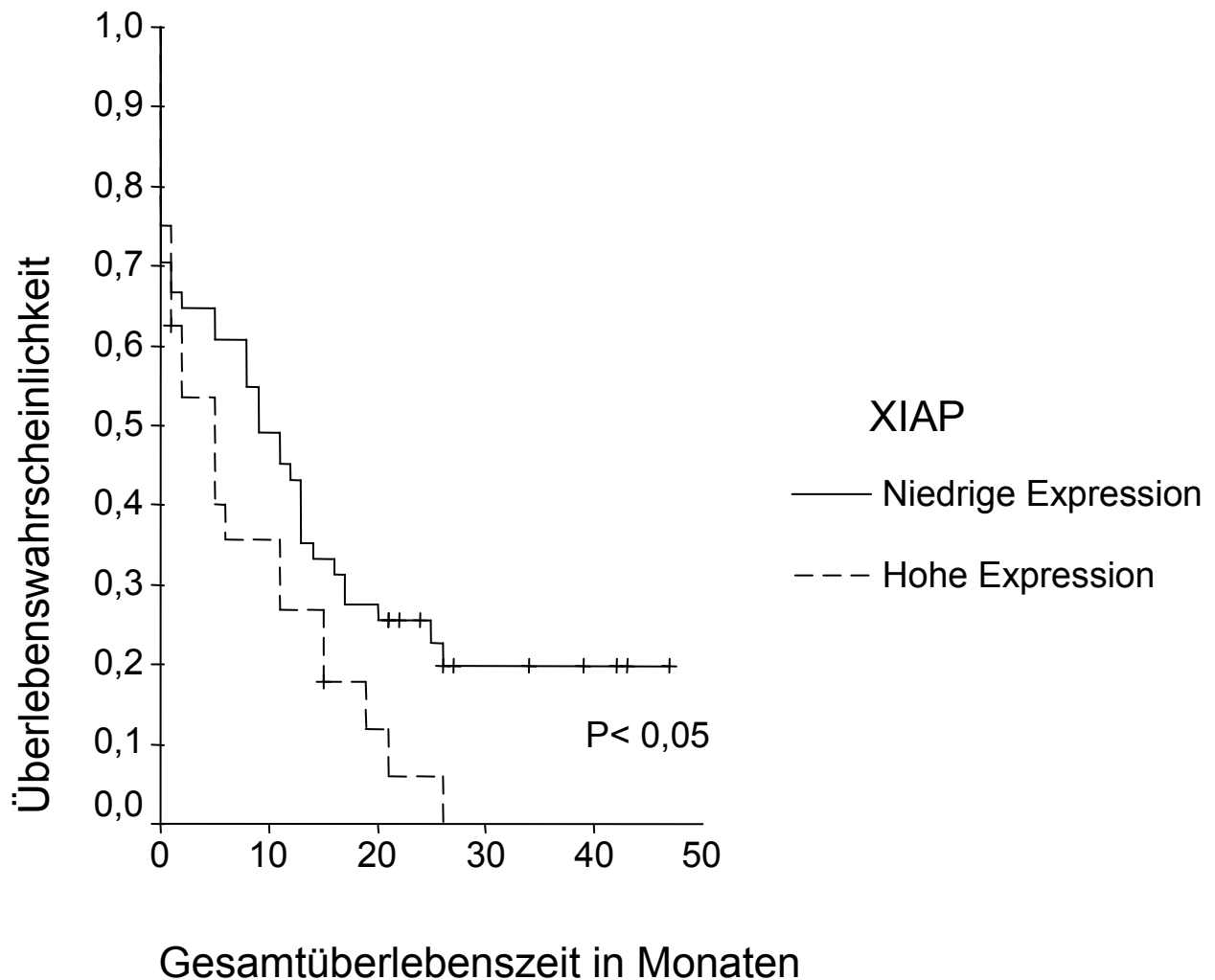
3.1.3.1 Korrelation zwischen Proteinexpression und klinischen Daten Erwachsener

Für die Korrelation der Proteinexpression und prognostischen Parametern lagen Daten für 62 untersuchte Patientenproben, welche im Rahmen einer bundesweiten Therapiestudie (AMLCG92) behandelt wurden, vor. Für das Ansprechen auf die Induktionstherapie wurde eine Gruppierung der Patienten wie folgt vorgenommen: *Responder* [n=46; komplette Remission (CR), n=41; Hypoplasie ohne AML-Nachweis, n=3; früher Tod ohne Nachweis einer AML, n=2] und *Non-Responder* (n=13; persistierende AML, n=7; früher Tod mit persistierender AML, n=6). Weitere drei Patienten verstarben ohne auswertbaren Erkrankungsstatus. Für keines der hier untersuchten Proteine konnte eine Korrelation zwischen seiner mittleren Expressionshöhe und dem Ansprechen auf die Induktionstherapie gezeigt werden.

Eine Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Rezidiven und der Expressionshöhe der in dieser Arbeit untersuchten Proteine konnte für 41 Patienten (Rezidiv, n=23; CR und kein Rezidiv, n=18) durchgeführt werden. Keines der untersuchten Proteine zeigte jedoch einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten von Rezidiven (Daten nicht gezeigt).

Für eine Korrelation der Gesamtüberlebenszeit (Overall survival [OS]) mit den hier untersuchten Expressionsparametern standen die Informationen für 62 Patienten zur Verfügung. Allein für die XIAP-Expression konnte ein signifikanter Unterschied in der Gesamtüberlebenszeit festgestellt werden. Patienten mit hoher XIAP-Expression (oberes Drittel der Expressionhöhe, n=21) zeigten im Mittel eine geringeres OS als Patienten mit niedriger XIAP-Expression (untere 2/3 der Expressionhöhe; n=41, Mittelwert: 9 vs. 19 Monate; $p < 0,05$), s. Abb. 3.1.3.1-1).

Abbildung 3.1.3.1-1 Kaplan-Meier-Kurve XIAP-Expression und Gesamtüberlebenszeit bei erwachsenen AML-Patienten



3.1.3.2 Korrelation zwischen Proteinexpression und klinischen Daten kindlicher AML

Von 45 Patienten standen 39 Responder und 3 Non-Responder für die Analyse auf unterschiedliche Proteinexpression hinsichtlich des Ansprechens auf *Induktionstherapie* zur Verfügung. Drei Patienten starben während der Therapie (ED, "early death"). Es ließen sich jedoch für keines der untersuchten Proteine statistisch signifikante Unterschiede in der Proteinexpression zwischen Respondern und Non-Respondern feststellen (Daten nicht gezeigt).

Ebenso konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede der hier analysierten Proteine zwischen Patienten mit *Rezidiv* (n= 12) und Patienten in kompletter Remission (n=27) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der Korrelation der Proteinexpression mit der Gesamtüberlebenszeit zeigten Patienten mit hoher XIAP-Expression (oberes Drittel der Expressionshöhe) eine geringere mittlere Überlebenszeit als Patienten mit niedriger Expression (unteres Drittel der Expressionshöhe) [Mittelwert 30 Monate (n=10) vs. 41 Monate (n=34); $p=0,02$; (s. Abbildung 3.1.3.2-1). Patienten, deren AML-Blasten Survivin exprimierten, wiesen eine geringere Überlebenszeit auf als die Gruppe von Patienten, bei der kein Survivin zu detektieren war (Mittelwert 27 Monate (n=10) vs. 41 Monate (n=34); $p<0,026$; s. Abbildung 3.1.3.2-2).

Für alle anderen hier untersuchten Proteine konnte keine Korrelation zwischen Expression und Gesamtüberlebenszeit gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 3.1.3.2-1 Kaplan-Meier-Kurve XIAP-Expression bei der kindlichen AML und Gesamtüberlebenszeit

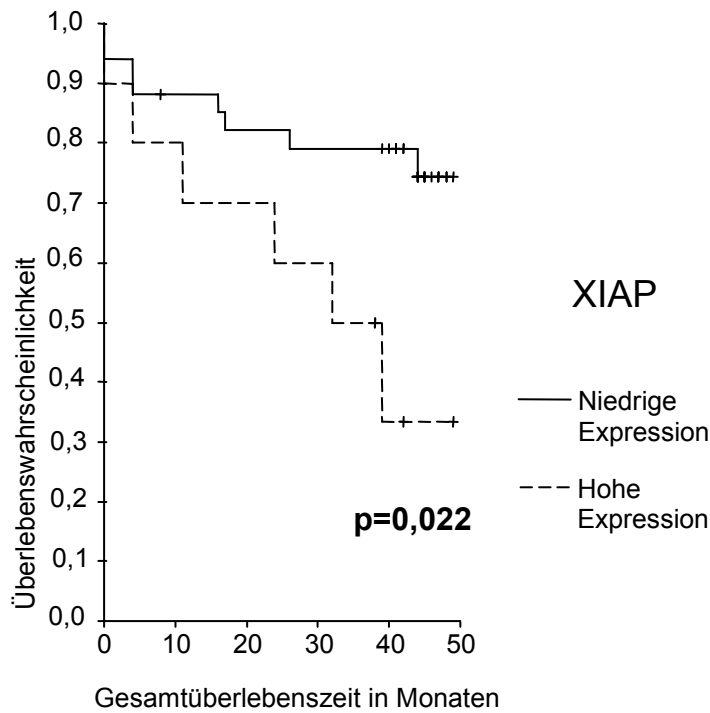
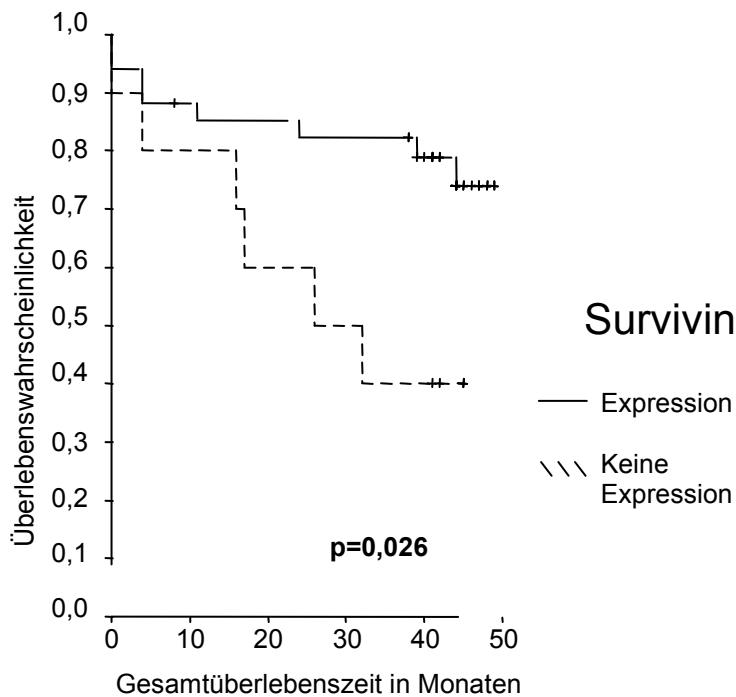


Abbildung 3.1.3.2-2 Kaplan-Meier-Kurve Survivin-Expression bei der kindlichen AML und Gesamtüberlebenszeit



3.2 Gegenüberstellung: Kinder – Erwachsene

3.2.1 Korrelation von Altersgruppen mit Reifungsgrad

3.2.1.1 Korrelation von Altersgruppen mit FAB Morphologie

Für die Untersuchung auf altersspezifische Unterschiede bezüglich der Expression von in dieser Arbeit analysierten Proteinen wurde eine Gruppierung der Patienten in Kinder (n=45), Erwachsene <60 Jahre (n=44) und Erwachsene ≥60 Jahre (n=48) vorgenommen. Informationen über die FAB-Morphologie standen von 42 Kindern, 41 Erwachsenen <60 Jahre sowie 47 Patienten ≥60 Jahre zur Verfügung.

Hinsichtlich der Verteilung der FAB-Klassen konnte zwischen den o.g. Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (s. Tabelle 3.2.1.1-1)

Tabelle 3.2.1.1-2 FAB-Morphologie bei AML verschiedener Altersgruppen

AML Gruppen	FAB-Morphologie						
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Kinder n=42	3 (7%)	7 (17%)	9 (21%)	5 (12%)	11 (26%)	6 (14%)	1 (2%)
Erwachsene < 60 Jahre n=41	2 (5%)	6 (15%)	12 (29%)	3 (7%)	12 (29%)	5 (13%)	1 (2%)
Erwachsene ≥ 60 Jahre n=47	5 (11%)	15 (32%)	9 (19%)	1 (2%)	10 (21%)	6 (13%)	1 (2%)
<i>p-Wert</i>	<i>Ns</i>						

3.2.1.2 Korrelation von Altersgruppen mit Immunphänotyp

Eine Analyse von Zusammenhängen zwischen den untersuchten Altersgruppen und bestimmten immunphänotypischen Eigenschaften wurde für folgende CD-Antigene durchgeführt: CD34, CD117; CD4, CD14, CD36, CD64, HLA-DR, CD15 sowie CD65. Einzig für CD117 konnte eine Abhängigkeit der Antigenexpression von der Altersgruppe nachgewiesen werden ($p=0,035$) (s. Tabelle 3.2.1.2-1).

Tabelle 3.2.1.2-1 Immunphänotyp der AML bei verschiedenen Altersgruppen

	Kinder	Erwachsene < 60 Jahre	Erwachsene ≥ 60 Jahre	
„unreife AML“	n (%)	n (%)	n (%)	p-Wert
CD34 pos	24 (55%)	15 (35%)	19 (40%)	n.s.
CD34 neg	20 (45%)	28 (65%)	29 (60%)	
CD117 pos	34 (77%)	23 (52%)	34 (71%)	p=0,035
CD117 neg	10 (23%)	21 (48%)	14 (29%)	
„monozytär differenzierte AML“	n (%)	n (%)	n (%)	p-Wert
CD4 pos	17 (39%)	14 (33%)	17 (35%)	n.s.
CD4 neg	27 (61%)	29 (67%)	31 (65%)	
CD14 pos	10 (23%)	11 (25%)	12 (25%)	n.s.
CD14 neg	34 (77%)	33 (75%)	36 (75%)	
CD36 pos	13 (31%)	20 (45%)	17 (36%)	n.s.
CD36 neg	29 (69%)	24 (55%)	30 (64%)	
CD64 pos	31 (70%)	29 (66%)	28 (58%)	n.s.
CD64 neg	13 (30%)	15 (34%)	20 (42%)	
HLA-DR pos	33 (75%)	33 (75%)	35 (73%)	n.s.
HLA-DR neg	11 (25%)	11 (25%)	13 (27%)	
„granulozytär differenzierte AML“	n (%)	n (%)	n (%)	p-Wert
CD15 pos	25 (57%)	22 (50%)	19 (40%)	n.s.
CD15 neg	19 (43%)	22 (50%)	29 (60%)	
CD65 pos	32 (73%)	27 (61%)	23 (48%)	n.s.
CD65 neg	12 (27%)	17 (39%)	25 (52%)	

3.2.2 Zytogenetik in verschiedenen Altersgruppen der AML

Um altersspezifische Unterschiede bezüglich zytogenetischer Veränderungen und deren Prognose zu untersuchen, standen die zytogenetischen Risikoprofile von 37 Kindern, 34 Erwachsenen unter 60 Jahren sowie für 40 Patienten mit 60 Jahren oder älter zur Verfügung. Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung des zytogenetischen Risikos zwischen den jeweiligen Altersgruppen war nicht zu erkennen (s. Tabelle 3.2.2-1)

Tabelle 3.2.2-2 Zytogenetische Risikogruppen in verschiedenen Altersgruppen der AML

AML Gruppen	Zytogenetische Risiko Gruppen			n (%)
	gut	intermediär	schlecht	
Kinder	7 (19%)	22 (59%)	8 (22%)	37 (100%)
Erwachsene < 60 Jahre	4 (12%)	22 (65%)	8 (23%)	34 (100%)
Erwachsene ≥ 60 Jahre	1 (2%)	34 (85%)	5 (13%)	40 (100%)
p-Wert	n.s.			

3.2.3 Expression apoptoseassoziiierter Proteine in verschiedenen Altersgruppen der AML

Die Untersuchung auf altersspezifische Unterschiede der AML erstreckte sich ferner auf die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Apoptose-Proteine. Signifikante Unterschiede in der Expressionshöhe bezüglich der Altersgruppen ergaben sich für Bax ($p < 0,001$) sowie dem Verhältnis von Bax zu Bcl-2 ($p < 0,001$), Pro-Caspase-3 ($p < 0,05$) XIAP ($p < 0,05$) und cIAP1 ($p < 0,001$). Die Stärke der Expressionshöhe stieg dabei mit dem Alter der Patientengruppe. Für cIAP-1 hingegen fiel die Stärke der Expressionshöhe mit dem Alter der Patientengruppe (s. Tabelle 3.2.3-1).

Tabelle 3.2.3-1 Altersspezifische Unterschiede der AML bei der Expression von Apoptose-Proteinen

AML Gruppen	Expression Höhe	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2 Ratio	Pro-Caspase-3	XIAP	Bcl-xL	Survivin	cIAP1
Kinder	Mittelwert	5,1	2,6	2,2	3837	2455	2006	378	7827
	n	38	38	38	44	44	44	44	23
	SEM	0,4	0,2	0,2	415	457	339	114	1153
Erwachsene < 60 Jahre	Mittelwert	6,9	2,2	3,5	3714	2647	2499	641	2739
	n	43	43	43	44	44	44	44	17
	SEM	0,8	0,2	0,5	540	455	376	176	833
Erwachsene ≥ 60 Jahre	Mittelwert	8,4	2,3	4,6	5488	4064	3082	616	2035
	n	47	47	47	46	46	46	46	25
	SEM	0,8	0,1	0,6	656	502	407	151	399
<i>p-Wert</i>		<0,001	<i>n.s.</i>	<0,001	<0,05.	<0,05	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<0,001

Legende:

n, Anzahl untersuchter Proben; SEM, Standard-Fehler des Mittelwertes; n.s., nicht signifikant.; CD95, Bax, Bcl-2 mittlere Expressionsstärke als RFI (relative Fluoreszenz-Intensität); Bcl-xL, XIAP, Procaspase-3, Survivin, cIAP1 Expressionsstärken als standardisierte Mittelwerte (ROD, relative optische Dichte) wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

4 Diskussion

4.1 Apoptoseassoziierte Proteine bei der AML des Erwachsenenalters

In dieser Arbeit wurden die Expression und prognostische Bedeutung einiger Mitglieder der IAP-Familie (XIAP, cIAP1, Survivin) und anderer apoptoseassoziiierter Proteine (Caspase-3, Bcl-2, Bcl-xL, Bax) bei der de novo AML Erwachsener untersucht. Die relativen Expressionshöhen der IAP waren sehr variabel, was auf eine differenzierte Regulation der Expression dieser antiapoptotischen Gene hindeutet.

Die Expression von XIAP war mit immunophänotypischen Markern myelomonozytärer Differenzierung (CD 14, CD 64) und zytomorphologischen Eigenschaften (FAB-Typ M4 und M5) myeloischer Blasten assoziiert. Da XIAP in normalen Monozyten im Vergleich zu anderen myeloischen Zellen überexprimiert wird [73], scheint XIAP bei der Differenzierung maligner und normaler Monozyten eine Rolle zu spielen. Diese Annahme wird auch dadurch untermauert, dass die Expression von XIAP mit der monozytären Differenzierung Bryostatin1-behandelter myeloischer Leukämiezelllinien in vitro korreliert und die Herunterregulation von XIAP eine Blockade der monozytären Differenzierung zur Folge hat [74]. Im Einklang damit wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, dass die Induktion einer monozytären Differenzierung durch Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) in einer myeloischen Zelllinie (HL-60) eine deutliche Steigerung der XIAP-Expression zur Folge hat und die Hemmung der XIAP-Expression mit Antisenseoligonukleotiden zu einer reduzierten Lebensfähigkeit monozytär differenzierter Zellen führt [75]. Zudem konnte eine NF- κ B-Abhängigkeit der XIAP-Expression gezeigt werden [76]. Es lässt sich deshalb spekulieren, dass eine verstärkte Expression von XIAP durch eine gesteigerte Aktivität von NF- κ B hervorgerufen wird. So wurden bei FAB M4 und M5 AML-Blasten im Vergleich zu Blasten mit früher oder granulozytärer Differenzierung eine signifikant höhere NF- κ B-Expressionsstärke beschrieben [76]. Dies weist auf differenzierungsassoziierte Unterschiede Apoptose-regulierender Signaltransduktionswege bei der AML hin. Eine ähnliche Bedeutung der konstitutiven NF- κ B Aktivierung wurde auch für andere hämatologische Erkrankungen wie z.B. das Hodgkin-Lymphom beschrieben [77, 78]. Für die sekundäre Entwicklung einer AML aus einem MDS (Myelodysplastisches Syndrom) scheint XIAP ebenfalls von

Bedeutung zu sein. Bei Zellproben von Patienten mit MDS im Übergang zur AML konnte in einer 2004 erschienenen Arbeit zunächst ein deutlicher Anstieg der XIAP-Expression festgestellt werden, dem ein Absinken bei manifester Leukämie folgte [79]. Auch diese Arbeit ist ein Indiz für eine reifungsassoziierte Expression von XIAP bei der AML. Weitere Studien werden jedoch notwendig sein, um die Rolle von XIAP und dessen Regulation bei myelomonozytär differenzierter AML und innerhalb der normalen Hämatopoese zu klären.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die XIAP-Expression bei AML-Patienten mit prognostisch günstigem zytogenetischem Karyotyp signifikant niedriger ausfiel als bei den übrigen zytogenetischen Risikogruppen. Möglicherweise erklärt die niedrigere Expressionshöhe des antiapoptotischen Proteins XIAP die stärkere Empfindlichkeit der AML-Blasten gegenüber chemotherapieinduzierter Apoptose bei dieser prognostisch günstigen Patientengruppe.

Um die klinische Bedeutung der Proteinexpression verschiedener an der Apoptose beteiligter Proteine zu untersuchen, wurden die Expressionsdaten auf Korrelation mit dem Ansprechen auf Chemotherapie, Gesamtüberlebenszeit und anderen Überlebensdaten analysiert. Dabei ließ sich eine Assoziation von hoher XIAP-Expression mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit zeigen. Ähnlich den Ergebnissen einer anderen Arbeit, welche ebenso einen Trend zu schlechterer Prognose bei AML mit hoher XIAP-Expression zeigte [80], lassen sich die hier vorliegenden Ergebnisse gut mit den bekannten antiapoptotischen Wirkungen von XIAP in Einklang bringen [81]. Den hier gezeigten Ergebnissen steht eine 2003 erschienene Arbeit entgegen, welche keinen Zusammenhang zwischen der XIAP-Expressionshöhe und klinischem Ansprechen ergab [82]. In anderen Arbeiten mit Leukämiezelllinien wurde indes eine Inhibierung des caspasenabhängigen Zelltods durch XIAP gezeigt [67]. Darüber hinaus konnte bereits in AML-Zelllinien durch die Verwendung von XIAP-Antagonisten eine Apoptoseinduktion erreicht werden [83, 84]. So stellen diese Untersuchungen weitere Indizien für die zentrale Rolle von XIAP bei der Apoptoseregulation leukämischer Zellen dar. In einer Phase-I/II-Studie konnten bereits vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der therapeutischen Wirksamkeit einer Hemmung von XIAP durch ein Antisenseoligonukleotid in Kombination mit Reinduktionschemotherapie gezeigt werden [85]. In einer randomisierten Phase-II-Studie war bei therapierefraktären AML die Kombination aus Reinduktionschemotherapie und XIAP-Antisenseoligonukleotid (AEG35156) der alleinigen Chemotherapie allerdings nicht überlegen [86]. Die

Hemmung der XIAP-Expression durch AEG35156 zeigt auch bei anderen Tumorentitäten eine vielversprechende Aktivität und sichere Anwendung und könnte zukünftig auch bei der AML eine therapeutische Rolle spielen [87, 88].

Für das IAP-Mitglied cIAP1 konnte eine Assoziation mit der Positivität für CD 117 nachgewiesen werden, was möglicherweise ebenfalls auf eine reifungsassoziierte Expression von cIAP1 hindeuten könnte. Eine Korrelation zwischen der cIAP1-Expression und klinischem Ansprechen konnte an den hier untersuchten AML aber nicht nachgewiesen werden. In einer Arbeit, welche die Expression verschiedener IAP beim Übergang eines MDS zur AML untersuchte, konnte ein Abfall der cIAP1-Expression nach Übergang in die akute Leukämie gezeigt werden [79]. Somit lässt sich spekulieren, dass cIAP1 eine Rolle bei Reifungsprozessen hämatologischer Neoplasien spielen könnte. Eine prognostische Bedeutung der cIAP1-Expression konnte indes bei verschiedenen soliden Tumoren nachgewiesen werden. Bei Ösophaguskarzinomzelllinien mit Amplifikation von 11q22 konnte eine Überexpression von cIAP1 festgestellt werden [89]. Bei Zervixkarzinomen mit Überexpression von cIAP1, ebenfalls eine Tumorart bei der häufig die Amplifikation von 11q22 nachweisbar ist, wurde ein vermindertes Ansprechen auf eine Radiotherapie gezeigt [90]. Inwiefern cIAP1 eine tragende Rolle bei der Zelldifferenzierung der normalen Hämatopoese oder auch innerhalb hämatologischer Neoplasien wie der AML spielt und ob die cIAP1-Expression von prognostischer Bedeutung ist, sollten zukünftige Studien zeigen.

Bcl-2 als ein weiteres zentrales antiapoptotisches Protein war im Einklang mit verschiedenen anderen Arbeiten mit unreifem FAB-Typ sowie den immunphänotypischen Progenitormarkern CD117 und CD34 assoziiert [91, 92]. Eine Korrelation der Bcl-2-Expression mit ungünstigem zytogenetischen Risikoprofil oder ungünstiger Prognose, wie es in mehreren Arbeiten gezeigt wurde [92-94], konnte in der hier untersuchten Serie von AML-Proben nicht nachvollzogen werden. Eine therapeutische Wirksamkeit des Bcl-2-Antisenseoligonukleotids bei der AML in Kombination mit etablierten Chemotherapien legen mehrere Phase-I und II-Studien nahe [95-97]. Für die chronisch lymphatische Leukämie konnte bereits in einer randomisierten Phase-III-Studie ein therapeutischer Nutzen in Kombination mit Fludarabin gezeigt werden. [98, 99]. Nachfolgende Studien werden weiteren Aufschluss über den therapeutischen Nutzen und eventuelle Risiken der Therapie mit Bcl-2-Antisenseoligonukleotiden geben.

4.2 Apoptoseassoziierte Proteine bei der AML des Kindesalters

Um die Expression und den prognostischen Wert verschiedener Apoptoseproteine bei der AML des Kindesalters näher zu charakterisieren, wurden in dieser Serie 45 Zellproben von Kindern mit de novo AML untersucht, welche innerhalb einer bundesweiten Therapiestudie behandelt wurden.

Vergleichbar mit den Erkenntnissen der AML des Erwachsenen korrelierte auch bei kindlichen AML eine höhere XIAP-Expression mit myelomonozytärer Differenzierung hinsichtlich des Immunphänotyps. Somit scheint XIAP eine wesentliche Rolle bei der monozytären Differenzierung sowohl bei der AML Erwachsener als auch der AML des Kindesalters zu spielen.

Die Zytogenetik ist gegenwärtig der am besten charakterisierte prognostische Faktor der AML. Neuere Studien gaben bedeutende Einblicke in das Transformationspotential spezifischer Leukämie-assoziiierter chromosomaler Aberrationen [100]. Jedoch ist zu großen Teilen unklar, warum sich die verschiedenen zytogenetischen Subgruppen in ihrem Therapieansprechen unterscheiden und ob diese Veränderungen in Zusammenhang mit Unterschieden bei der zellulären Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika stehen [101]. Passend zur antiapoptotischen Aktivität von XIAP und Bcl-xL kann die in dieser Serie beobachtete geringere Expression bei Patienten mit vorteilhaften zytogenetischen Aberrationen zur Erklärung der besseren Prognose dieser Risikogruppe beitragen.

Trotz großer Fortschritte in der Supportivtherapie geht die Chemotherapie auch heute noch mit einer erheblichen Toxizität einher. Die AML-BFM Studiengruppe untersucht in ihrer aktuellen Studie „AML-BFM 2004“ unter anderem, ob die Intensivierung der Konsolidierungstherapie von Hochrisikopatienten eine Verbesserung der Überlebensraten bewirkt. Bisher gehen die Morphologie, Zytogenetik, molekulargenetische Parameter und das Therapieansprechen auf die Induktionstherapie in die Risikostratifikation Standard- vs. Hochrisiko ein. Um weitere Subgruppen von Patienten zu definieren, die von einem speziellen risikoadaptierten Therapieschema profitieren, bedarf es geeigneter prognostischer Marker. In der hier untersuchten Serie kindlicher AML zeigte sich eine Assoziation zwischen hohen Expressionsstärken der antiapoptotischen Proteine XIAP und Survivin und einer

kürzeren Gesamtüberlebenszeit. Dieser Zusammenhang charakterisiert Survivin und XIAP als potenzielle prognostische Faktoren bei der AML

Survivin wird in myeloischen Leukämien hoch exprimiert, durch Zytokine reguliert [102] und stellt bei einer Vielzahl solider Tumoren als auch bei diffus großzelligen B-Zell Lymphomen einen negativen prognostischen Marker dar [103-105]. Adida et al. konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Remissionsrate oder in der Überlebenszeit zwischen Erwachsenen AML-Patienten mit hohen gegenüber Patienten mit niedrigen Expressionshöhen Survivins feststellen. Jedoch konnte die Survivinexpression nach Adjustierung für Zytogenetik, Alter, Leukozytenzahl als ein unabhängiger negativer prognostischer Faktor für die Überlebenszeit identifiziert werden [106]. In einer anderen Arbeit zeigten Patienten mit einer Überexpression von Survivin und/oder XIAP ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie und eine kürzere Überlebenszeit als Patienten mit normaler Expression [107]. Neuere Untersuchungen haben bestätigt, dass Survivin ein multifunktionales Protein ist, welches nicht nur eine wichtige Rolle bei Mitoseprozessen spielt und an caspaseabhängigen Apoptosemechanismen beteiligt ist, sondern auch bei der caspaseunabhängigen Apoptosekontrolle eine bedeutende Stellung einnimmt. Zudem rücken verschiedene Splicevarianten Survivins mit unterschiedlichen modulatorischen Eigenschaften für die Funktion Survivins in den Mittelpunkt des Interesses. Eine hohe Expression der Splicevariante Survivin-2B wird dabei eher mit proapoptotischen Vorgängen in Verbindung gebracht, während die Expression von Survivin-Delta-Ex3 mit antiapoptotischen Vorgängen assoziiert sein soll [108]. Verschiedene Arbeiten mit Zelllinien solider Tumore konnten Zusammenhänge zwischen der Induktion von Apoptose mit Chemotherapeutika und einer erhöhten Survivin-2B-Expression und gleichzeitig erniedrigter Expression von Survivin-Delta-Ex3 darstellen [109, 110]. In einer Arbeit an nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen konnten diese Vorstellungen zudem mit dem klinischem Ergebnis in Einklang gebracht werden. Hierbei korrelierte eine höhere Expression von Survivin-2B mit besserem Gesamtüberleben und niedriger Rezidivrate. Hohe Expressionsstärken von Survivin-Delta-Ex3 korrelierten dementsprechend invers mit Gesamtüberleben und Rezidivrate [111]. In einer weiteren Arbeit wurden die Expression von Survivin m-RNA und verschiedener Splicevarianten hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung für AML von Kindern und Erwachsenen untersucht. Bei kindlichen AML korrelierte hier eine hohe m-RNA-Expression der Variante Survivin-DeltaEx3 mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberlebenszeit Die

Expression Survivins und bestimmter Survivin-Splicevarianten scheint somit von prognostischer Bedeutung für die AML des Kindesalters und andere Neoplasien zu sein. Jedoch sind ein besseres Verständnis der Funktion und des Zusammenwirkens der verschiedenen Splicevarianten sowie größere prospektive Studien zur Beurteilung der prognostischen Relevanz notwendig.

Survivin-Inhibitoren kamen bereits in Phase-II-Studien bei Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen im Stadium IIIb/IV oder auch beim nicht resektablen Melanom Stadium III/IV mit teils vielversprechender Effektivität und moderater Toxizität zum Einsatz [112-114]. Untersuchungen an Mäusen zeigen, dass Survivin die Vermehrung ITD-FLT3 transformierter hämatopoetischer Progenitorzellen reguliert [115]. Darüber hinaus konnte in einer Arbeit an AML-Zelllinien ein Zusammenhang zwischen der Resistenz von AML gegenüber FLT3-Inhibitoren und der Überexpression von Survivin gezeigt werden [116]. Eine weitere Arbeit zeigte eine Überexpression von Survivin in CD34+/CD38- AML-Stamm/Progenitorzellen und eine Korrelation hoher Expressionsstärken mit kürzerem Gesamtüberleben [117]. In einer ersten Therapiestudie konnte die Wirksamkeit und Sicherheit eines Survivin-Antisense-Oligonukleotids bei AML-Patienten in Monotherapie und in Kombination mit Chemotherapie gezeigt werden [118]. Zukünftige Studien werden den therapeutischen Nutzen einer Survivin-Inhibierung als Mono- oder Kombinationstherapie mit konventioneller Chemotherapie bei verschiedenen soliden Tumoren oder auch hämatologischen Neoplasien untersuchen.

4.3 Vergleich der Daten bei der AML des Kindes- und Erwachsenenalters

Bis heute herrscht Unklarheit darüber, warum Kinder mit AML im Vergleich zu Erwachsenen ein besseres Therapieansprechen aufweisen. Unterschiede im Reifungsgrad des transformierten Zellklons und ein damit verbundenes spezifisches Expressionsmuster von Apoptoseproteinen könnten für die unterschiedliche Prognose verantwortlich sein [22, 119, 120]. In dieser Arbeit wurden deshalb Kinder und Erwachsene mit de novo AML auf altersbezogene Unterschiede hinsichtlich der Expression einer Auswahl sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirkender Proteine sowie Unterschiede im Reifegrad der Leukämiezellpopulationen und der Verteilung von zytogenetischen Risikogruppen untersucht.

Hinsichtlich der Expressionsstärke von Apoptoseproteinen konnten signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen für die Proteine XIAP, cIAP1, Bax und Procaspase-3 festgestellt werden. Passend zur antiapoptotischen Funktion von XIAP fand sich eine höhere Expression in der prognostisch ungünstigeren Gruppe der AML Erwachsener im Vergleich zur prognostisch günstigeren Gruppe der AML des Kindesalters. CIAP1 als weiteres Protein mit antiapoptotischer Funktion wurde allerdings in der prognostisch günstigeren Gruppe der Kinder mit AML deutlich höher exprimiert. Zudem zeigte sich auch eine statistisch signifikant höhere Expressionshöhe der proapoptotischen Proteine Bax und Procaspase-3 in der prognostisch ungünstigen Gruppe Erwachsener mit AML. Die hier gewonnenen Ergebnisse lassen sich nicht mit der allgemeinen Annahme vereinbaren, dass die prognostisch günstigere Gruppe der Kinder mit AML höhere Expressionsstärken proapoptotischer und eine niedrigere Expression antiapoptotischer Proteine aufweist als die prognostisch ungünstigeren Gruppe Erwachsener mit AML. Mögliche Erklärungen für diese insgesamt eher unerwarteten Ergebnisse wären: (I) Die intrazelluläre Lokalisation der Proteine beeinflusst ihre apoptotische Aktivität. Zum Beispiel ist für die proapoptotische Wirkung von Bax die Translokation aus dem Zytoplasma zu den Mitochondrien notwendig, wo es dann die Freisetzung von Cytochrom-c verursacht [121]. (II) Posttranslationale Modifizierungen (z.B. Phosphorylierung) haben Einfluss auf die Aktivität von Mitgliedern der Bcl-2-Familie [122]. (III) Die Bestimmung der aktiven Form von Caspase-3 ist möglicherweise von höherem prognostischen Wert als die hier untersuchte inaktive Proform. (IV) Die

Expression anderer neu charakterisierter Moleküle wie z.B. Diabolo/Smac, welche die antiapoptotische Aktivität der IAP modulieren, könnten ebenfalls von prognostischer Bedeutung sein. (V) Andere Apoptose-regulierende Proteinfamilien haben möglicherweise eine größere Bedeutung hinsichtlich Prognose und Therapie der AML [103, 123].

Hinsichtlich des Reifungsgrades konnten in der hier untersuchten Patientenpopulation keine signifikanten altersabhängigen Unterschiede beobachtet werden. Weder anhand der FAB-Gruppierung noch durch immunphänotypische Merkmale. Es wird allgemein angenommen, dass die leukämische Zellpopulation aus einem kleinen, maligne transformierten Progenitor-Zellklon hervorgeht [22, 124]. Die Identifikation und phänotypische Charakterisierung von Subklonen innerhalb der Leukämiezellpopulation ist somit ein wichtiger Bestandteil bei der Determinierung zellbiologischer Unterschiede altersspezifischer AML-Subgruppen.

Bezüglich der zytogenetischen Risikogruppen konnten in der hier durchgeführten Untersuchung keine Unterschiede hinsichtlich der Verteilung zwischen AML des Kindes- und Erwachsenenalters festgestellt werden. Diese Beobachtung stimmt mit den Erkenntnissen einer Arbeit überein, welche den Vergleich der Zytogenetik an einer großen Serie von Kindern und Erwachsenen mit de novo AML vornahm. Obwohl bei Kindern eine höhere Inzidenz von chromosomalen Anomalien zu verzeichnen war, erwiesen sich die Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der Anomalie-Typen zwischen Kindern und Erwachsenen jedoch als minimal [125]. Eine andere Studie zeigte, dass einige chromosomale Anomalien, so z.B. t(8;21) häufiger bei Kindern auftreten. Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede im Verteilungsmuster der zytogenetischen Risikogruppen zwischen Kindern und Erwachsenen beobachtet werden [126]. Im Erwachsenenalter werden zytogenetische Anomalien, welche mit einer schlechteren Prognose einhergehen (z.B. komplex aberranter Karyotyp) am häufigsten bei älteren Patienten beobachtet. Aberrationen wie z.B. t(15;17) oder t(8;21), die mit einer guten Prognose assoziiert sind, treten häufiger bei jüngeren erwachsenen AML-Patienten auf [127-129]. Das Alter des Patienten ist jedoch ebenso ein unabhängiger Risikofaktor. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Alter als unabhängiger prognostischer Faktor mit steigendem Alter (≥ 50 Jahre) im Vergleich zur Zytogenetik eine zunehmende Rolle spielt, wenngleich zytogenetische Veränderungen auch im Alter > 60 Jahre noch einen unabhängigen Risikofaktor darstellten [130]. Die Beobachtungen zeigen

insgesamt, dass neben der zytogenetischen Risikogruppe auch andere Faktoren mit bedeutendem Einfluss auf altersabhängige Unterschiede hinsichtlich Therapieansprechen und Prognose existieren. Microarray-Untersuchungen von AML unterschiedlicher Altersgruppen zeigten in der Gruppe älterer Patienten (≥ 55 Jahre) eine statistisch signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für die Aktivierung von RAS-, Src-, und TNF-Signaltransduktionswegen im Vergleich zu jüngeren Patienten sowie eine geringere Sensitivität gegenüber Anthrazyklinen und damit verbundenes geringeres Gesamt- und ereignisfreies Überleben [131]. Zudem unterstreichen die Untersuchungen die Vermutung, dass durchaus sehr heterogene Mechanismen eine Rolle bei der Pathogenese der AML spielen und die AML bei älteren Patienten eine eigene biologische Entität darstellt.

Dies ist die erste systematische Studie, welche mögliche Expressionsunterschiede von Apoptoseproteinen zwischen AML des Kindes- und Erwachsenenalters untersucht hat. Die Theorie ausgehend von einer vorzugsweisen Expression antiapoptotischer Proteine bei der AML Erwachsener und stärkeren Expression proapoptotischer Proteine bei der AML des Kindesalters konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Das unterschiedliche Therapieansprechen und die unterschiedliche Prognose von verschiedenen Altersgruppen mit AML lässt sich so allein nicht hinreichend erklären. Weiterführende molekulargenetische und funktionelle Untersuchungen sollten zukünftig die Bedeutung bestimmter apoptoseassoziiertes Proteine für die Therapieresistenz der verschiedenen Altersgruppen von AML-Patienten klären.

4.4 Methodische Einschränkungen

Die Ergebnisse der vorliegenden retrospektiven Arbeit basieren ausschließlich auf der Untersuchung kryokonservierter Zellen. So kann der Prozess der Kryokonservierung zu Veränderungen der Proteinexpression führen. Einfrier- und Auftauvorgänge sowie die dabei verwendeten Substanzen sind mögliche proapoptotische Stimuli und beeinflussen so gegebenenfalls die Expressionshöhe der gemessenen Proteine. Zudem beschränkte sich die Arbeit auf eine Auswahl von Leukämieproben mit hoher Blastenzahl, um eine Kontamination mit normalen Blutzellen zu vermeiden und eine ausreichende Zellmenge für die geplanten Untersuchungen sicherzustellen. Die mittlere Leukozytenzahl der in die AML-BFM93-Studie eingeschlossenen Patienten war beispielsweise im Vergleich zu den in dieser Serie untersuchten Patienten geringer [21]. Ferner wurden sämtliche Messungen an therapienaiven Zellen, so genannten de novo AML vorgenommen. Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen hinsichtlich posttranslationaler Modifizierungen, wie z.B. Phosphorylierungen, durchgeführt, welche eine Auswirkung auf die Funktionalität der Proteine haben. Für weiterführende Interpretationen der in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse hinsichtlich der Unterschiede zwischen AML des Kindes- und Erwachsenenalters sind weitere Einschränkungen zu berücksichtigen. Vergleichbar mit der Unterscheidung verschiedener AML-Altersgruppen Erwachsener (z.B. ≥ 60 Jahre vs < 60 Jahre) kann eine weitere Unterteilung anhand des Alters auch bei kindlichen AML weitere zellbiologische Unterschiede offenbaren. Allerdings lässt die geringe Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Zellproben derartige Subgruppenanalysen nicht zu. Des Weiteren enthält das AML-BFM93-Therapieprotokoll diverse Randomisationsschritte und Risikostratifizierungen. Studien mit größeren Patientenzahlen und prospektiver Evaluierung der Proteinexpression könnten genauer Aufschluß über deren prognostische Bedeutung geben.

5 Literaturverzeichnis

1. Büchner, T., *Akute myeloische Leukämien. Hämatologie/Onkologie*. 1997: Urban+Schwarzenberg.
2. Surveillance, E., and End Results (SEER) Program SEER*Stat Database, *Incidence - SEER 13 Regs Public-Use, Nov 2005 Sub (1992-2003)*. National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, 2006.
3. Sandler, D.P., *Epidemiology of acute myelogenous leukemia*. *Semin Oncol*, 1987. **14**(4): p. 359-64.
4. Surveillance, E., and End Results (SEER) Program SEER*Stat Database, *Incidence - SEER 17 Regs Public-Use, Nov 2005 Sub (1973-2003 varying)*. National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, 2006.
5. Silverberg, E. & J.A. Lubera, *Cancer statistics, 1989*. *CA Cancer J Clin*, 1989. **39**(1): p. 3-20.
6. Ichimaru, M., T. Ishimaru & J.L. Belsky, *Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia*. *J Radiat Res (Tokyo)*, 1978. **19**(3): p. 262-82.
7. Gale, R.P. & A. Butturini, *Perspective: Chernobyl and leukemia*. *Leukemia*, 1991. **5**(5): p. 441-2.
8. Mole, R.H., *Radiation from Chernobyl and the risk of leukaemia*. *Leukemia*, 1991. **5**(5): p. 443-4.
9. Kantarjian, H.M. & M.J. Keating, *Therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome*. *Semin Oncol*, 1987. **14**(4): p. 435-43.
10. Pui, C.H., F.G. Behm, S.C. Raimondi, R.K. Dodge, S.L. George, G.K. Rivera, J. Mirro, Jr., D.K. Kalwinsky, G.V. Dahl & S.B. Murphy, *Secondary acute myeloid leukemia in children treated for acute lymphoid leukemia*. *N Engl J Med*, 1989. **321**(3): p. 136-42.
11. Engert, A., V. Diehl, J. Franklin, A. Lohri, B. Dorken, W.D. Ludwig, P. Koch, M. Hanel, M. Pfreundschuh, M. Wilhelm, L. Trumper, W.E. Aulitzky, M. Bentz, M. Rummel, O. Sezer, H.K. Muller-Hermelink, D. Hasenclever & M. Loffler, *Escalated-Dose BEACOPP in the Treatment of Patients With Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma: 10 Years of Follow-Up of the GHSG HD9 Study*. *J Clin Oncol*, 2009.
12. Cadman, E.C., R.L. Capizzi & J.R. Bertino, *Acute nonlymphocytic leukemia: a delayed complication of Hodgkin's disease therapy: analysis of 109 cases*. *Cancer*, 1977. **40**(3): p. 1280-96.
13. Schwartz, C.L. & H.J. Cohen, *Preleukemic syndromes and other syndromes predisposing to leukemia*. *Pediatr Clin North Am*, 1988. **35**(4): p. 853-71.
14. Bennett, J.M., D. Catovsky, M.T. Daniel, G. Flandrin, D.A. Galton, H.R. Gralnick & C. Sultan, *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. *Br J Haematol*, 1976. **33**(4): p. 451-8.
15. Swerdlow SH, C.E., Harris NL, et al, eds., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2008. **Lyon, France: IARC**.
16. Vardiman, J.W., J. Thiele, D.A. Arber, R.D. Brunning, M.J. Borowitz, A. Porwit, N.L. Harris, M.M. Le Beau, E. Hellstrom-Lindberg, A. Tefferi & C.D. Bloomfield, *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. *Blood*, 2009. **114**(5): p. 937-51.
17. Schlenk, R.F., K. Dohner, J. Krauter, S. Frohling, A. Corbacioglu, L. Bullinger, M. Habdank, D. Spath, M. Morgan, A. Benner, B. Schlegelberger, G. Heil, A. Ganser & H. Dohner, *Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(18): p. 1909-18.
18. Mrozek, K., G. Marcucci, P. Paschka, S.P. Whitman & C.D. Bloomfield, *Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?* *Blood*, 2007. **109**(2): p. 431-48.
19. Ratei, R.S., C.; Ludwig, W-D, *Morphological , immunological and cytogenetic diagnosis in acute leukemias*. *Therapeutische Umschau*, 1996. **53**: p. 88-96.

20. Janeway, C.A.T., Paul; Walport, Mark; Shlomchik, Mark, *Immunobiology*. 2001, New York and London: Garland Science.
21. Creutzig, U., J. Ritter, M. Zimmermann, D. Reinhardt, J. Hermann, F. Berthold, G. Henze, H. Jurgens, H. Kabisch, W. Havers, A. Reiter, U. Kluba, F. Niggli & H. Gadner, *Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia patients after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone: results of Study Acute Myeloid Leukemia-Berlin-Frankfurt- Munster 93*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(10): p. 2705-13.
22. Greaves, M., *Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia*. *Eur J Cancer*, 1999. **35**(2): p. 173-85.
23. Schoch, C., T. Haferlach, D. Haase, C. Fonatsch, H. Loffler, B. Schlegelberger, P. Staib, M.C. Sauerland, A. Heinecke, T. Buchner & W. Hiddemann, *Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients*. *Br J Haematol*, 2001. **112**(1): p. 118-26.
24. Frohling, S., R.F. Schlenk, J. Breitruck, A. Benner, S. Kreitmeier, K. Tobis, H. Dohner & K. Dohner, *Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm*. *Blood*, 2002. **100**(13): p. 4372-80.
25. Schnittger, S., C. Schoch, M. Dugas, W. Kern, P. Staib, C. Wuchter, H. Loffler, C.M. Sauerland, H. Serve, T. Buchner, T. Haferlach & W. Hiddemann, *Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease*. *Blood*, 2002. **100**(1): p. 59-66.
26. Dohner, K., K. Tobis, R. Ulrich, S. Frohling, A. Benner, R.F. Schlenk & H. Dohner, *Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(15): p. 3254-61.
27. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., C. Erpelinck, J. Meijer, S. van Oosterhoud, W.L. van Putten, P.J. Valk, H. Berna Beverloo, D.G. Tenen, B. Lowenberg & R. Delwel, *Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML*. *Hematol J*, 2003. **4**(1): p. 31-40.
28. Frohling, S., R.F. Schlenk, I. Stolze, J. Bihlmayr, A. Benner, S. Kreitmeier, K. Tobis, H. Dohner & K. Dohner, *CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(4): p. 624-33.
29. Dohner, K., R.F. Schlenk, M. Habdank, C. Scholl, F.G. Rucker, A. Corbacioglu, L. Bullinger, S. Frohling & H. Dohner, *Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations*. *Blood*, 2005. **106**(12): p. 3740-6.
30. Schnittger, S., C. Schoch, W. Kern, C. Mecucci, C. Tschulik, M.F. Martelli, T. Haferlach, W. Hiddemann & B. Falini, *Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. *Blood*, 2005. **106**(12): p. 3733-9.
31. Kornblau, S.M., H.T. Vu, P. Ruvolo, Z. Estrov, S. O'Brien, J. Cortes, H. Kantarjian, M. Andreeff & W.S. May, *BAX and PKCalpha modulate the prognostic impact of BCL2 expression in acute myelogenous leukemia*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(4): p. 1401-9.
32. Kohler, T., C. Schill, M.W. Deininger, R. Krahl, S. Borchert, D. Hasenclever, S. Leiblein, O. Wagner & D. Niederwieser, *High Bad and Bax mRNA expression correlate with negative outcome in acute myeloid leukemia (AML)*. *Leukemia*, 2002. **16**(1): p. 22-9.
33. Valk, P.J., R.G. Verhaak, M.A. Beijnen, C.A. Erpelinck, S. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, J.M. Boer, H.B. Beverloo, M.J. Moorhouse, P.J. van der Spek, B. Lowenberg & R. Delwel, *Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(16): p. 1617-28.
34. Bullinger, L., K. Dohner, E. Bair, S. Frohling, R.F. Schlenk, R. Tibshirani, H. Dohner & J.R. Pollack, *Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(16): p. 1605-16.
35. Kern, W., T. Haferlach, C. Schoch, H. Loffler, W. Gassmann, A. Heinecke, M.C. Sauerland, W. Berdel, T. Buchner & W. Hiddemann, *Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial*. *Blood*, 2003. **101**(1): p. 64-70.
36. Farag, S.S., K.J. Archer, K. Mrozek, A.S. Ruppert, A.J. Carroll, J.W. Vardiman, M.J. Pettenati, M.R. Baer, M.B. Qumsiyeh, P.R. Koduru, Y. Ning, R.J. Mayer, R.M. Stone, R.A. Larson & C.D. Bloomfield, *Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete*

- remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood*, 2006. **108**(1): p. 63-73.
37. Häcker, G., *The morphology of apoptosis*. *Cell Tissue Res*, 2000. **301**(1): p. 5-17.
 38. Glucksmann, A., *Cell deaths in normal vertebrate ontogeny*. *Biol. Rev.*, 1951. **26**: p. 5986.
 39. Kerr, J.F., A.H. Wyllie & A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
 40. Ellis, H.M. & H.R. Horvitz, *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans*. *Cell*, 1986. **44**(6): p. 817-29.
 41. Horvitz, H.R., *Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*, 1999. **59**(7 Suppl): p. 1701s-1706s.
 42. Hengartner, M.O. & H.R. Horvitz, *C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2*. *Cell*, 1994. **76**(4): p. 665-76.
 43. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
 44. Degterev, A., M. Boyce & J. Yuan, *A decade of caspases*. *Oncogene*, 2003. **22**(53): p. 8543-67.
 45. Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H.M. Ellis & H.R. Horvitz, *The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 641-52.
 46. Thornberry, N.A., H.G. Bull, J.R. Calaycay, K.T. Chapman, A.D. Howard, M.J. Kostura, D.K. Miller, S.M. Molineaux, J.R. Weidner, J. Aunins & et al., *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes*. *Nature*, 1992. **356**(6372): p. 768-74.
 47. Thornberry, N.A., *Caspases: a decade of death research*. *Cell Death Differ*, 1999. **6**(11): p. 1023-7.
 48. Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri & X. Wang, *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. *Cell*, 1997. **91**(4): p. 479-89.
 49. Zou, H., W.J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg & X. Wang, *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. *Cell*, 1997. **90**(3): p. 405-13.
 50. Shi, Y., *A structural view of mitochondria-mediated apoptosis*. *Nat Struct Biol*, 2001. **8**(5): p. 394-401.
 51. Zheng, T.S., S.F. Schlosser, T. Dao, R. Hingorani, I.N. Crispe, J.L. Boyer & R.A. Flavell, *Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(23): p. 13618-23.
 52. Cory, S., D.C. Huang & J.M. Adams, *The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis*. *Oncogene*, 2003. **22**(53): p. 8590-607.
 53. Yin, X.M., Z.N. Oltvai & S.J. Korsmeyer, *BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax*. *Nature*, 1994. **369**(6478): p. 321-3.
 54. Hirota, M., Y. Zhang, N. Fujita, M. Naito & T. Tsuruo, *NH2-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(29): p. 20415-20.
 55. Antonsson, B., *Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion*. *Cell Tissue Res*, 2001. **306**(3): p. 347-61.
 56. Kogan, S.C., D.E. Brown, D.B. Shultz, B.T. Truong, V. Lallemand-Breitenbach, M.C. Guillemin, E. Lagasse, I.L. Weissman & J.M. Bishop, *BCL-2 cooperates with promyelocytic leukemia retinoic acid receptor alpha chimeric protein (PMLRARalpha) to block neutrophil differentiation and initiate acute leukemia*. *J Exp Med*, 2001. **193**(4): p. 531-43.
 57. Egle, A., A.W. Harris, M.L. Bath, L. O'Reilly & S. Cory, *VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia*. *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2276-83.
 58. Zinkel, S.S., C.C. Ong, D.O. Ferguson, H. Iwasaki, K. Akashi, R.T. Bronson, J.L. Kutok, F.W. Alt & S.J. Korsmeyer, *Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression*. *Genes Dev*, 2003. **17**(2): p. 229-39.
 59. Meijerink, J.P., E.J. Mensink, K. Wang, T.W. Sedlak, A.W. Sloetjes, T. de Witte, G. Waksman & S.J. Korsmeyer, *Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX*. *Blood*, 1998. **91**(8): p. 2991-7.
 60. Kondo, S., Y. Shinomura, Y. Miyazaki, T. Kiyohara, S. Tsutsui, S. Kitamura, Y. Nagasawa, M. Nakahara, S. Kanayama & Y. Matsuzawa, *Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers*. *Cancer Res*, 2000. **60**(16): p. 4328-30.
 61. Manion, M.K. & D.M. Hockenbery, *Targeting BCL-2-related proteins in cancer therapy*. *Cancer Biol Ther*, 2003. **2**(4 Suppl 1): p. S105-14.

62. Birnbaum, M.J., R.J. Clem & L.K. Miller, *An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs*. J Virol, 1994. **68**(4): p. 2521-8.
63. Crook, N.E., R.J. Clem & L.K. Miller, *An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2168-74.
64. Duckett, C.S., F. Li, Y. Wang, K.J. Tomaselli, C.B. Thompson & R.C. Armstrong, *Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 608-15.
65. Ambrosini, G., C. Adida & D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 917-21.
66. Verdecia, M.A., H. Huang, E. Dutil, D.A. Kaiser, T. Hunter & J.P. Noel, *Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(7): p. 602-8.
67. Tamm, I., Y. Wang, E. Sausville, D.A. Scudiero, N. Vigna, T. Oltersdorf & J.C. Reed, *IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs*. Cancer Res, 1998. **58**(23): p. 5315-20.
68. Altieri, D.C., *The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy*. Trends Mol Med, 2001. **7**(12): p. 542-7.
69. Uren, A.G., L. Wong, M. Pakusch, K.J. Fowler, F.J. Burrows, D.L. Vaux & K.H. Choo, *Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype*. Curr Biol, 2000. **10**(21): p. 1319-28.
70. Salvesen, G.S. & C.S. Duckett, *IAP proteins: blocking the road to death's door*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 401-10.
71. G. Schmitz, G.R., *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*, ed. G.R. G. Schmitz. 1994, Stuttgart, New York: Schattauer.
72. Bene, M.C., G. Castoldi, W. Knapp, W.D. Ludwig, E. Matutes, A. Orfao & M.B. van't Veer, *Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)*. Leukemia, 1995. **9**(10): p. 1783-6.
73. Tamm, I., S. Richter, F. Scholz, K. Schmelz, D. Oltersdorf, L. Karawajew, C. Schoch, T. Haferlach, Ludwig W-D & W. C., *XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: Impact on prognosis*. Hematol J, 2004. **5**(6): p. 489-85.
74. Lin, H., C. Chen, X. Li & B.D. Chen, *Activation of the MEK/MAPK pathway is involved in bryostatin 1-induced monocytic differentiation and up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein*. Exp Cell Res, 2002. **272**(2): p. 192-8.
75. Miranda, M.B., K.F. Dyer, J.R. Grandis & D.E. Johnson, *Differential activation of apoptosis regulatory pathways during monocytic vs granulocytic differentiation: a requirement for Bcl-X(L) and XIAP in the prolonged survival of monocytic cells*. Leukemia, 2003. **17**(2): p. 390-400.
76. Stehlik, C., R. de Martin, I. Kumabashiri, J.A. Schmid, B.R. Binder & J. Lipp, *Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis*. J Exp Med, 1998. **188**(1): p. 211-6.
77. Krappmann, D., F. Emmerich, U. Kordes, E. Scharschmidt, B. Dorken & C. Scheidereit, *Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells*. Oncogene, 1999. **18**(4): p. 943-53.
78. Wood, K.M., M. Roff & R.T. Hay, *Defective IkappaBalpha in Hodgkin cell lines with constitutively active NF-kappaB*. Oncogene, 1998. **16**(16): p. 2131-9.
79. Yamamoto, K., S. Abe, Y. Nakagawa, K. Suzuki, M. Hasegawa, M. Inoue, M. Kurata, K. Hirokawa & M. Kitagawa, *Expression of IAP family proteins in myelodysplastic syndromes transforming to overt leukemia*. Leuk Res, 2004. **28**(11): p. 1203-11.
80. Tamm, I., S.M. Kornblau, H. Segall, S. Krajewski, K. Welsh, S. Kitada, D.A. Scudiero, G. Tudor, Y.H. Qui, A. Monks, M. Andreeff & J.C. Reed, *Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1796-803.
81. Takahashi, R., Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa Munt, G.S. Salvesen & J.C. Reed, *A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 7787-90.
82. Carter, B.Z., S.M. Kornblau, T. Tsao, R.Y. Wang, W.D. Schober, M. Milella, H.G. Sung, J.C. Reed & M. Andreeff, *Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition in vitro with pan-caspase inhibitors or in vivo by XIAP or Survivin does not affect cell survival or prognosis*. Blood, 2003. **102**(12): p. 4179-86.
83. Carter, B.Z., M. Gronda, Z. Wang, K. Welsh, C. Pinilla, M. Andreeff, W.D. Schober, A. Nefzi, G.R. Pond, I.A. Mawji, R.A. Houghten, J. Ostresh, J. Brandwein, M.D. Minden, A.C. Schuh, R.A. Wells, H. Messner, K. Chun, J.C. Reed & A.D. Schimmer, *Small-molecule XIAP inhibitors*

- derepress downstream effector caspases and induce apoptosis of acute myeloid leukemia cells.* Blood, 2005. **105**(10): p. 4043-50.
84. Carter, B.Z., D.H. Mak, W.D. Schober, E. Koller, C. Pinilla, L.T. Vassilev, J.C. Reed & M. Andreeff, *Simultaneous activation of p53 and inhibition of XIAP enhance the activation of apoptosis signaling pathways in AML.* Blood, 2010. **115**(2): p. 306-14.
 85. Schimmer, A.D., E.H. Estey, G. Borthakur, B.Z. Carter, G.J. Schiller, M.S. Tallman, J.K. Altman, J.E. Karp, J. Kassis, D.W. Hedley, J. Brandwein, W. Xu, D.H. Mak, E. LaCasse, C. Jacob, S.J. Morris, J. Jolivet & M. Andreeff, *Phase I/II trial of AEG35156 X-linked inhibitor of apoptosis protein antisense oligonucleotide combined with idarubicin and cytarabine in patients with relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia.* J Clin Oncol, 2009. **27**(28): p. 4741-6.
 86. Schimmer, A.D., W. Herr, M. Hanel, G. Borthakur, A. Frankel, H.A. Horst, S. Martin, J. Kassis, P. Desjardins, K. Seiter, W. Fiedler, R. Noppeney, A. Giagounidis, C. Jacob, J. Jolivet, M.S. Tallman & S. Koschmieder, *Addition of AEG35156 XIAP antisense oligonucleotide in reinduction chemotherapy does not improve remission rates in patients with primary refractory acute myeloid leukemia in a randomized phase II study.* Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2011. **11**(5): p. 433-8.
 87. LaCasse, E.C., *Pulling the plug on a cancer cell by eliminating XIAP with AEG35156.* Cancer Lett, 2013. **332**(2): p. 215-24.
 88. Tamm, I., *AEG-35156, an antisense oligonucleotide against X-linked inhibitor of apoptosis for the potential treatment of cancer.* Curr Opin Investig Drugs, 2008. **9**(6): p. 638-46.
 89. Imoto, I., Z.Q. Yang, A. Pimkhaokham, H. Tsuda, Y. Shimada, M. Imamura, M. Ohki & J. Inazawa, *Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas.* Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6629-34.
 90. Imoto, I., H. Tsuda, A. Hirasawa, M. Miura, M. Sakamoto, S. Hirohashi & J. Inazawa, *Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy.* Cancer Res, 2002. **62**(17): p. 4860-6.
 91. Wuchter, C., L. Karawajew, V. Ruppert, T. Buchner, C. Schoch, T. Haferlach, R. Ratei, B. Dorken & W.D. Ludwig, *Clinical significance of CD95, Bcl-2 and Bax expression and CD95 function in adult de novo acute myeloid leukemia in context of P-glycoprotein function, maturation stage, and cytogenetics.* Leukemia, 1999. **13**(12): p. 1943-53.
 92. Tothova, E., M. Fricova, N. Stecova, A. Kafkova & A. Elbertova, *High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy.* Neoplasma, 2002. **49**(3): p. 141-4.
 93. Lauria, F., D. Raspadori, D. Rondelli, M.A. Ventura, M. Fiacchini, G. Visani, F. Forconi & S. Tura, *High bcl-2 expression in acute myeloid leukemia cells correlates with CD34 positivity and complete remission rate.* Leukemia, 1997. **11**(12): p. 2075-8.
 94. Del Poeta, G., A. Venditti, M.I. Del Principe, L. Maurillo, F. Buccisano, A. Tamburini, M.C. Cox, A. Franchi, A. Bruno, C. Mazzone, P. Panetta, G. Suppo, M. Masi & S. Amadori, *Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML).* Blood, 2003. **101**(6): p. 2125-31.
 95. Marcucci, G., W. Stock, G. Dai, M.I. Klisovic, K. Maharry, T. Shen, S. Liu, D.A. Sher, D. Lucas, A. Zwiebel, R.A. Larson, M.A. Caligiuri, C.D. Bloomfield, K.K. Chan, M.R. Grever & J.C. Byrd, *G3139, a BCL-2 antisense oligo-nucleotide, in AML.* Ann Hematol, 2004. **83** Suppl 1: p. S93-4.
 96. Marcucci, G., W. Stock, G. Dai, R.B. Klisovic, S. Liu, M.I. Klisovic, W. Blum, C. Kefauver, D.A. Sher, M. Green, M. Moran, K. Maharry, S. Novick, C.D. Bloomfield, J.A. Zwiebel, R.A. Larson, M.R. Grever, K.K. Chan & J.C. Byrd, *Phase I study of oblimersen sodium, an antisense to Bcl-2, in untreated older patients with acute myeloid leukemia: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity.* J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3404-11.
 97. Del Poeta, G., A. Bruno, M.I. Del Principe, A. Venditti, L. Maurillo, F. Buccisano, R. Stasi, B. Neri, F. Luciano, A. Siniscalchi, P. de Fabritiis & S. Amadori, *Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia.* Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(3): p. 207-22.
 98. O'Brien, S., J.O. Moore, T.E. Boyd, L.M. Larratt, A. Skotnicki, B. Koziner, A.A. Chanan-Khan, J.F. Seymour, R.G. Bociek, S. Pavletic & K.R. Rai, *Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia.* J Clin Oncol, 2007. **25**(9): p. 1114-20.
 99. O'Brien, S., J.O. Moore, T.E. Boyd, L.M. Larratt, A.B. Skotnicki, B. Koziner, A.A. Chanan-Khan, J.F. Seymour, J. Gribben, L.M. Itri & K.R. Rai, *5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen.* J Clin Oncol, 2009. **27**(31): p. 5208-12.

100. Schoch, C. & T. Haferlach, *Cytogenetics in acute myeloid leukemia*. *Curr Oncol Rep*, 2002. **4**(5): p. 390-7.
101. Zwaan, C.M., G.J. Kaspers, R. Pieters, K. Hahlen, D.R. Huismans, M. Zimmermann, J. Harbott, R.M. Slater, U. Creutzig & A.J. Veerman, *Cellular drug resistance in childhood acute myeloid leukemia is related to chromosomal abnormalities*. *Blood*, 2002. **100**(9): p. 3352-60.
102. Carter, B.Z., M. Milella, D.C. Altieri & M. Andreeff, *Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia*. *Blood*, 2001. **97**(9): p. 2784-90.
103. Tamm, I., F. Schriever & B. Dorken, *Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology*. *Lancet Oncol*, 2001. **2**(1): p. 33-42.
104. Adida, C., C. Haioun, P. Gaulard, E. Lepage, P. Morel, J. Briere, H. Dombret, F. Reyes, J. Diebold, C. Gisselbrecht, G. Salles, D.C. Altieri & T.J. Molina, *Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas*. *Blood*, 2000. **96**(5): p. 1921-5.
105. Skagias, L., E. Politi, A. Karameris, D. Sambaziotis, A. Archondakis, A. Ntinis, I. Moreas, O. Vasou, H. Koutselini & E. Patsouris, *Survivin expression as a strong indicator of recurrence in urothelial bladder cancer. Predictive value of nuclear versus cytoplasmic staining*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(10): p. 4163-7.
106. Adida, C., C. Recher, E. Raffoux, M.T. Daniel, A.L. Taksin, P. Rousselot, F. Sigaux, L. Degos, D.C. Altieri & H. Dombret, *Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia*. *Br J Haematol*, 2000. **111**(1): p. 196-203.
107. Ibrahim, A.M., I.M. Mansour, M.M. Wilson, D.A. Mokhtar, A.M. Helal & H.M. Al Wakeel, *Study of survivin and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) genes in acute myeloid leukemia (AML)*. *Lab Hematol*, 2012. **18**(1): p. 1-10.
108. Li, F. & X. Ling, *Survivin study: an update of "what is the next wave"?* *J Cell Physiol*, 2006. **208**(3): p. 476-86.
109. Li, F., *Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(2): p. 212-6.
110. Zhu, N., L. Gu, H.W. Findley, F. Li & M. Zhou, *An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitizes leukemia cells to chemotherapy*. *Oncogene*, 2004. **23**(45): p. 7545-51.
111. Ling, X., J. Yang, D. Tan, N. Ramnath, T. Younis, B.N. Bundy, H.K. Slocum, L. Yang, M. Zhou & F. Li, *Differential expression of survivin-2B and survivin-DeltaEx3 is inversely associated with disease relapse and patient survival in non-small-cell lung cancer (NSCLC)*. *Lung Cancer*, 2005. **49**(3): p. 353-61.
112. Lewis, K.D., W. Samlowski, J. Ward, J. Catlett, L. Cranmer, J. Kirkwood, D. Lawson, E. Whitman & R. Gonzalez, *A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma*. *Invest New Drugs*, 2009.
113. Giaccone, G., P. Zatloukal, J. Roubec, K. Floor, J. Musil, M. Kuta, R.J. van Klaveren, S. Chaudhary, A. Gunther & S. Shamsili, *Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(27): p. 4481-6.
114. Wagner, M., K. Schmelz, C. Wuchter, W.D. Ludwig, B. Dorken & I. Tamm, *In vivo expression of survivin and its splice variant survivin-2B: impact on clinical outcome in acute myeloid leukemia*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(6): p. 1291-7.
115. Fukuda, S., P. Singh, A. Moh, M. Abe, E.M. Conway, H.S. Boswell, S. Yamaguchi, X.Y. Fu & L.M. Pelus, *Survivin mediates aberrant hematopoietic progenitor cell proliferation and acute leukemia in mice induced by internal tandem duplication of Flt3*. *Blood*, 2009. **114**(2): p. 394-403.
116. Zhou, J., C. Bi, J.V. Janakakumara, S.C. Liu, W.J. Chng, K.G. Tay, L.F. Poon, Z. Xie, S. Palaniyandi, H. Yu, K.B. Glaser, D.H. Albert, S.K. Davidsen & C.S. Chen, *Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML*. *Blood*, 2009. **113**(17): p. 4052-62.
117. Carter, B.Z., Y. Qiu, X. Huang, L. Diao, N. Zhang, K.R. Coombes, D.H. Mak, M. Konopleva, J. Cortes, H.M. Kantarjian, G.B. Mills, M. Andreeff & S.M. Kornblau, *Survivin is highly expressed in CD34(+)/38(-) leukemic stem/progenitor cells and predicts poor clinical outcomes in AML*. *Blood*, 2012. **120**(1): p. 173-80.
118. Erba, H.P., H. Sayar, M. Juckett, M. Lahn, V. Andre, S. Callies, S. Schmidt, S. Kadam, J.T. Brandt, D. Van Bockstaele & M. Andreeff, *Safety and pharmacokinetics of the antisense oligonucleotide (ASO) LY2181308 as a single-agent or in combination with idarubicin and cytarabine in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia (AML)*. *Invest New Drugs*, 2013. **31**(4): p. 1023-34.
119. Russell, N.H., *Biology of acute leukaemia*. *Lancet*, 1997. **349**(9045): p. 118-22.

120. Schimmer, A.D., D.W. Hedley, L.Z. Penn & M.D. Minden, *Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view*. *Blood*, 2001. **98**(13): p. 3541-53.
121. Wolter, K.G., Y.T. Hsu, C.L. Smith, A. Nechushtan, X.G. Xi & R.J. Youle, *Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis*. *J Cell Biol*, 1997. **139**(5): p. 1281-92.
122. Harris, M.H., M.G. Vander Heiden, S.J. Kron & C.B. Thompson, *Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(10): p. 3590-6.
123. Altieri, D.C., *Validating survivin as a cancer therapeutic target*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(1): p. 46-54.
124. Bonnet, D. & J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. *Nat Med*, 1997. **3**(7): p. 730-7.
125. Raimondi, S.C., M.N. Chang, Y. Ravindranath, F.G. Behm, M.V. Gresik, C.P. Steuber, H.J. Weinstein & A.J. Carroll, *Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821*. *Blood*, 1999. **94**(11): p. 3707-16.
126. Leblanc, T. & R. Berger, *Molecular cytogenetics of childhood acute myelogenous leukaemias*. *Eur J Haematol*, 1997. **59**(1): p. 1-13.
127. Grimwade, D., H. Walker, G. Harrison, F. Oliver, S. Chatters, C.J. Harrison, K. Wheatley, A.K. Burnett & A.H. Goldstone, *The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial*. *Blood*, 2001. **98**(5): p. 1312-20.
128. Schoch, C., W. Kern, P. Krawitz, M. Dugas, S. Schnittger, T. Haferlach & W. Hiddemann, *Dependence of age-specific incidence of acute myeloid leukemia on karyotype*. *Blood*, 2001. **98**(12): p. 3500.
129. Bacher, U., W. Kern, S. Schnittger, W. Hiddemann, T. Haferlach & C. Schoch, *Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia*. *Haematologica*, 2005. **90**(11): p. 1502-10.
130. Schoch, C., W. Kern, S. Schnittger, T. Buchner, W. Hiddemann & T. Haferlach, *The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups*. *Haematologica*, 2004. **89**(9): p. 1082-90.
131. Rao, A.V., P.J. Valk, K.H. Metzeler, C.R. Acharya, S.A. Tuchman, M.M. Stevenson, D.A. Rizzieri, R. Delwel, C. Buske, S.K. Bohlander, A. Potti & B. Lowenberg, *Age-specific differences in oncogenic pathway dysregulation and anthracycline sensitivity in patients with acute myeloid leukemia*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(33): p. 5580-6.

6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stephan Richter versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Expression und klinische Bedeutung von Apoptose-Proteinen bei akuten myeloischen Leukämien des Kindes- und Erwachsenenalters

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Stephan Richter hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Tamm I, Richter S, Scholz F, Schmelz K, Oltersdorf D, Karawajew L, Schoch C, Haferlach T, Ludwig WD, Wuchter C.,
XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis, Hematol J. 2004;5(6):489-95

Beitrag im Einzelnen: experimentelle Arbeiten zur Expression von XIAP bei AML

Publikation 2: Tamm I, Richter S, Oltersdorf D, Creutzig U, Harbott J, Scholz F, Karawajew L, Ludwig WD, Wuchter C.,
High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia, Clin Cancer Res. 2004 Jun 1;10(11):3737-44

Beitrag im Einzelnen: Expression von IAPs bei denovo AML

Publikation 3: Wuchter C, Richter S, Oltersdorf D, Karawajew L, Ludwig WD, Tamm I.,
Differences in the expression pattern of apoptosis-related molecules between
childhood and adult de novo acute myeloid leukemia, Haematologica. 2004
Mar;89(3):363-4,
Beitrag im Einzelnen: Expression von Bcl- und IAP-Familienmitgliedern bei der AML

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der
betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8 Publikationsliste

1. Tamm I, Richter S, Scholz F, Schmelz K, Oltersdorf D, Karawajew L, Schoch C, Haferlach T, Ludwig WD, Wuchter C.

XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis, *Hematol J.* 2004;5(6):489-95

2. Tamm I, Richter S, Oltersdorf D, Creutzig U, Harbott J, Scholz F, Karawajew L, Ludwig WD, Wuchter C.,

High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia, *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 1;10(11):3737-44

3. Wuchter C, Richter S, Oltersdorf D, Karawajew L, Ludwig WD, Tamm I. Differences in the expression pattern of apoptosis-related molecules between childhood and adult de novo acute myeloid leukemia, *Haematologica.* 2004 Mar;89(3):363-4

4. Schuler MK, Richter S, Platzek I, Beuthien-Baumann B, Wieczorek K, Hamann C, Mohm J, Ehninger G.

Trabectedin in the neoadjuvant treatment of high-grade pleomorphic sarcoma: report of a rare case and literature review, *Case Rep Oncol Med.* 2013;2013:320797. doi: 10.1155/2013/320797. Epub 2013 Jan 16.

5. Schuler MK, Richter S, Beuthien-Baumann B, Platzek I, Kotzerke J, van den Hoff J, Ehninger G, Reichardt P.

PET/MRI Imaging in High-Risk Sarcoma: First Findings and Solving Clinical Problems, *Case Rep Oncol Med.* 2013;2013:793927. doi: 10.1155/2013/793927. Epub 2013 Jul

6. Parmentier S, Richter S.

Bone marrow metastases by alveolar rhabdomyosarcoma in a 31-year-old patient. *Blood.* 2013 Sep 19;122(12):2000

9 Danksagung

Herrn PD Dr. med. Ingo Tamm danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, die umfassende Hilfe und Ratschläge bei der Konzeption der Arbeit und Abfassung der Dissertation sowie das lange Durchhaltevermögen. Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. med. Christian Wuchter für die umfassende Unterstützung bei der Konzeption der Expressionsanalysen mittels Durchflusszytometrie. Ferner gilt mein Dank allen technischen Assistentinnen in den Arbeitsgruppen von Dr. Tamm und Dr. Christian Wuchter für die vielen guten Ratschläge und die Unterstützung bei der Probenaufbereitung.

Herrn Professor Wolf-Dieter Ludwig (Chefarzt der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie, Helios Klinikum Berlin Buch) danke ich für die Möglichkeit die durchflusszytometrischen Messungen im immunologischen Zellmarkerlabor der ehemaligen Robert-Rössle-Klinik, Charité Campus Buch durchführen zu können und im Besonderen für die Bereitstellung der Zellproben, die Grundlage dieser Arbeit sind, sowie die zur Verfügung gestellten Befunde zur Immunphänotypisierung.

Herrn Professor Dörken (Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie, Campus Virchow-Klinikum) danke ich für die Möglichkeit in seiner Klinik, in der Arbeitsgruppe von Dr. Tamm, die Expressionsanalysen mittels Immunoblot durchführen zu können.

Danken möchte ich auch allen Kollegen, welche bereits im Teil Material und Methoden genannt sind, für die unkomplizierte und zeitnahe Bereitstellung der Daten, die eine wesentliche Grundlage dieser Arbeit darstellen.