

**Entwicklungen von PCR-Methoden zur sensitiven  
Quantifizierung des mit der chronisch myeloischen Leukämie  
assoziierten *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes**

**Entwicklungen von PCR-Methoden zur sensitiven  
Quantifizierung des mit der chronisch myeloischen  
Leukämie assoziierten *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes**

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

- Dr. rer. nat. -

des Fachbereiches Biologie, Chemie und Geowissenschaften, FB 08

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Dipl.-Biol. Annette Freist**

geboren am 08.10.1966 in Gummersbach

Gießen 2000

*Phantasie ist wichtiger als Wissen!*

ALBERT EINSTEIN

1879-1955

*FÜR MEINEN LIEBEN THOMAS*

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs "Molekulare Biologie und Pharmakologie" am Institut für Biochemie (FB 08), der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit vom 01.01.1997 bis 21.12.2000 unter Leitung von Prof. Dr. A. M. Pingoud angefertigt.

Dekan: PROF. DR. RAINER RENKAWITZ  
Institut für Genetik, FB 08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Referent: PROF. DR. ALFRED M. PINGOUD  
Institut für Biochemie, FB 08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Korreferent: PROF. DR. RAINER RENKAWITZ  
Institut für Genetik, FB 08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

# I. Publikationen, Poster und Tagungsbeiträge

## 2000

FREIST, A., PINGOUD, A. & HAHN, M. (2000): Quantification of *bcr-abl* transcript in chronic myelogenous leukemia using real-time reverse transcription polymerase chain reaction. XIV. Wilsede Meeting, *Modern Trends in Human Leukemia*, 17. – 21. Juni 2000, Wilsede.

ELMAAGACLI, A.H., FREIST, A., HAHN, M., OPALKA, B., SEEBER, S., SCHAEFER, U.W. & BEELEN, D.W. (2000): Estimating the relapse Stage in Patients with Philadelphia Chromosome Positive Chronic Myeloid Leukemia After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation By the Amount of BCR/ABL Fusion Transcripts as Detected by a New Real-Time Polymerase Chain Reaction Method. eingereicht bei *Blood*, September 2000.

## 1999

FREIST, A., PINGOUD, A. & HAHN, M. (1999): Quantification of *bcr-abl* transcript in chronic myelogenous leukemia. LightCycler-Symposium und Anwenderworkshop, Justus-Liebig-Universität Gießen / Roche Diagnostics, 9. – 10. Dezember 1999, Gießen.

FREIST, A., PINGOUD, A. & HAHN, M. (1999): LightCycler-Real-Time-RT-PCR zur Quantifizierung des *cr-abl*-Transkriptes bei Chronisch-Myeloischer Leukämie. *Onkologie* **22** (Suppl. 1), 50. [Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, 3. - 6. Oktober 1999, Jena.]

FREIST, A., PINGOUD, A. & HAHN, M. (1999): Quantification of BCR/ABL transcript in chronic myelogenous leukemia using LightCycler real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin, 3. - 5. Oktober 1999, Regensburg.

FREIST, A., HAHN, M., & PINGOUD, A. (1999): Quantification of *bcr-abl* transcript in chronic myelogenous leukemia using real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Biol. Chem.*, 380, S149. [Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 5. – 8. September 1999, Hamburg]

FREIST, A., HAHN, M. & PINGOUD, A. (1999): Quantification of *bcr-abl* transcript in chronic myelogenous leukemia using real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *5. Werkstattberichte aus Natur- und Lebenswissenschaften*. Justus-Liebig-Universität Gießen, 9. - 10. Juli 1999.

## 1998

HAHN, M., FREIST, A. & PINGOUD, A. (1998): Allelic imbalances of tumor suppressor genes in renal cell carcinoma analyzed using fluorescent PCR of microsatellite repeat polymorphisms. 25<sup>th</sup> Silver Jubilee FEBS Meeting, 5. – 10. Juli 1998, Kopenhagen, Dänemark.

**1997**

HAHN, M., FREIST, A. & PINGOUD, A. (1997): Allelic imbalances of the tumor suppressor genes *p53*, *p16*, *hMSH2*, *APC*, *DCC*, *VHL*, *PTEN*, and microsatellite instability in renal cell carcinoma analyzed using fluorescent PCR of microsatellite repeat polymorphisms. *Genes, Chromosomes, Genomes*, 5, 43. [Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik, 22. – 25. September 1997, Gießen]

HAHN, M., FREIST, A. & PINGOUD, A. (1997): Allelic imbalances of the tumor suppressor genes *p53*, *p16*, *hMSH2*, *APC*, *DCC*, *VHL* and microsatellite instability in renal cell carcinoma analyzed using fluorescent PCR of microsatellite repeat polymorphisms. Congress of Molecular Medicine, 3. - 5. Mai 1997, Berlin.

**1996**

SPIES, A., HAHN, M., SERTH, J. & PINGOUD, A. (1996): Semiautomated mutation profiling for the tumor suppressor genes *p53*, *VHL*, *p16*, *hMSH2*, *APC/MCC* and *DCC* in renal cell carcinoma. *Biol. Chem.*, 377, S198. [Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, 16. – 18. September 1995, Leipzig]

HAHN, M., SPIES, A., SERTH, J. & PINGOUD, A. (1996): Semiautomated mutation profiling for the tumor suppressor genes *p53*, *VHL*, *p16*, *hMSH2*, *APC/MCC*, and *DCC* in renal cell carcinoma. 24<sup>th</sup> FEBS Meeting, 7. – 12. Juli 1996, Barcelona, Spanien.

---

## II. Danksagungen

- Zuallererst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Alfred M. Pingoud für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Er stand mir stets mit Rat zur Seite und hat mich davor bewahrt die "Flinte ins Korn zu werfen".
- Herrn Prof. Dr. Rainer Renkawitz möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.
- Bei Dr. Meinhard Hahn möchte ich mich für die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit bedanken.
- Für die großartige Unterstützung in der Mikrobiologie sowie im Umgang mit RNA möchte ich mich ganz herzlich bei Ute Konradi und Dr. Gregor Meiß bedanken, die auch sonst immer ein offenes Ohr für mich hatten.
- Bei Dr. Volker Dörsam bedanke ich mich herzlich für die Korrektur dieser Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft nicht nur im Bezug auf diese Arbeit!
- Dem "feministischen Forum" in wechselnder Zusammensetzung danke ich für die ausgefüllten Mittagspausen ("Lästern ist gut für die Seele!").
- Meinem Mitstreiter Dipl.-Biol. Jochen Wilhelm danke ich für das LC-32 Programm und nette Diskussionen.
- Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Hans Pralle, Dr. Andreas Käbisch und Ulrike Seay, der Universitäts-Klinik Gießen, sowie Dr. Ahmet Elmaagacli und Melanie Kroll, der Universitätsklinik Essen, für die Unterstützung dieser Arbeit.
- Des Weiteren ein großer Dank an die Deutsche Forschungsgemeinschaft und das Graduiertenkolleg "Molekulare Biologie und Pharmakologie" unter der Leitung von Prof. Dr. Manfred Kröger für die Gewährung eines Doktorandenstipendiums.
- Bei Dr. Rudolf Seibl und Dr. Karim Tabiti der Firma Roche Diagnostics möchte ich mich für die Unterstützung dieser Arbeit und das Setzen neuer Impulse im Rahmen einer BMBF-Kooperation bedanken.
- Bei Ralf, Bettina und Jörn Haberland möchte ich mich für die schöne Zeit in Gießen bedanken, die es mir deutlich leichter gemacht hat mitten im Hessenland zu wohnen.
- Ein besonderer Dank auch an Heike Thielen und Michael Röhrich, die mir für die letzten Monate dieser Arbeit ihr Arbeitszimmer und Felix als moralische Stütze zur Verfügung gestellt haben.
- Ein großer Dank an meine Eltern, die mir während meines Studiums zur Seite standen und immer da waren, wenn ich sie brauchte.
- Mein größter Dank geht aber an meinen Mann Thomas, der immer ein offenes Ohr für alle meine Probleme hatte, mich mit Geduld und viel Liebe unterstützte und es immer wieder schaffte mich neu zu motivieren ("Ohne Doktor kommst Du mir nicht nach Hause!").

### III. Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
[1...]	Internet-Adressen im Literaturverzeichnis
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
$\Omega$	Ohm
A	Ampère
a	atto ( $10^{-18}$ )
AAP	Agarosegel-Auftragspuffer
Abb.	Abbildung
ABD	ABL-Bindungs-Domäne
(c-)ABL	(cellular) Abelson-Protooncogene
ALP	alkalische Leukozytenphosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ara-C	Arabinosyl-Cytidin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCL	<i>B-cell chronic lymphatic leukemia/lymphoma</i>
BCR	<i>break point cluster region</i>
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
BU	Busulfan
°C	Grad Celsius
CCD	<i>charge coupled device</i>
CE	Kapillarelektrophorese ( <i>capillary electrophoresis</i> )
Ci	Curie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CT	<i>threshhold cycle</i>
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
ds	doppelsträngig
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz-Dihydrat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f	femto ( $10^{-15}$ )
FAM	5-Carboxyfluorescein
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer



---

g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G6PDH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GRB	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GvHD	<i>graft-versus-Host</i> -Erkrankung
h	Stunde(n)
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPSF	<i>highly purified salt-free</i>
HU	Hydroxyurea
IFN- $\alpha$	Interferon-alpha
IS	(Interner) Standard
k	kilo
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmark-Transplantation
l	Liter
LB	Luria Bertani
LDH	Lactatdehydrogenase
LED	Licht emittierende Diode
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	molar
M- <i>bcr</i>	<i>major breakpoint cluster region</i>
m- <i>bcr</i>	<i>minor breakpoint cluster region</i>
$\mu$ - <i>bcr</i>	<i>micro breakpoint cluster region</i>
mcs	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
mrd	minimale Resterkrankung ( <i>minimal residual disease</i> )
mRNA	<i>messenger RNA</i>
M <sub>w</sub>	relatives Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
MYC	<i>myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
n	nano ( $10^{-9}$ )
NaAc	Natriumacetat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
p	piko ( $10^{-12}$ )
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PBGD	Porphobilinogendeaminase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBST	PBS-Tween-Lösung
Ph	Philadelphia-Chromosom
POP	<i>performance optimized polymer</i>

---

QC-(RT-) PCR	quantitative kompetitive (RT-) PCR
RAC	<i>RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAF	RAS-aktivierter Faktor
RAS	<i>rat sarcoma viral oncogene</i>
RIN	<i>RAS-like protein expressed in neurons</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
s	Sekunde(n)
SRC	<i>sarcoma viral oncogene</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SH	SRC-homologe Domäne
SHP	<i>small heterodimer partner</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	Tetramethyl-6-carboxyrhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt, Schmelztemperatur
TPE	Tris-Phosphat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
TSS	<i>transformation storage solution</i>
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaureat
U	Aktivitätseinheit für Enzyme ( <i>unit</i> )
UV	Ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
w	Gewicht
W	Watt
WT	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>PUBLIKATIONEN, POSTER UND TAGUNGSBEITRÄGE</b>	<b>V</b>
<b>II.</b>	<b>DANKSAGUNGEN</b>	<b>VII</b>
<b>III.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VIII</b>
<b>IV.</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>XI</b>
<hr/>		
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<hr/>		
	<b>CHRONISCH MYELOISCHE LEUKÄMIE</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>HÄUFIGKEIT UND ÄTIOLOGIE</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>DIAGNOSTIK UND VERLAUF</b>	<b>2</b>
1.2.1	CHRONISCHE PHASE	3
1.2.2	AKZELERATIONSPHASE	4
1.2.3	BLASTENKRISE	4
<b>1.3</b>	<b>THERAPIE</b>	<b>5</b>
1.3.1	CHEMOTHERAPEUTIKA	6
1.3.1.1	Busulfan (Myleran)	6
1.3.1.2	Hydroxyurea (HU)	6
1.3.1.3	Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ )	6
1.3.1.4	Arabinosyl-Cytosin (Ara-C)	7
1.3.1.5	Intensive Chemotherapie	7
1.3.2	KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION (KMT)	7
1.3.2.1	Allogene KMT bzw. Stammzelltransplantation	8
1.3.2.2	Hochdosistherapie und autologe KMT bzw. Stammzelltransplantation	9
1.3.3	NEUE THERAPEUTISCHE STRATEGIEN	9
1.3.3.1	<i>Antisense</i> -Oligonukleotide	9
1.3.3.2	Tyrosinkinaseinhibitoren	10
1.3.3.3	Antibiotika	10
1.3.4	PROGNOSE	11
1.3.4.1	Minimal residuelle Erkrankung ( <i>minimal residual disease</i> )	12
<b>1.4</b>	<b>MOLEKULARGENETIK UND BIOLOGIE DER CML</b>	<b>13</b>
1.4.1	GESCHICHTLICHER HINTERGRUND	13
1.4.2	<i>ABL</i> -GEN	13
1.4.3	<i>BCR</i> -GEN	15
1.4.4	PHILADELPHIA-CHROMOSOM	16
1.4.5	<i>BCR/ABL</i> -FUSIONSGEN	17
<b>1.5</b>	<b>MOLEKULARE DIAGNOSTIK</b>	<b>18</b>
1.5.1	ZYTOGENETIK	18
1.5.2	FISH-TECHNIK (FLUORESCENZ- <i>IN-SITU</i> -HYBRIDISIERUNG)	18
1.5.3	SOUTHERN-BLOT-ANALYSE	19
1.5.4	WESTERN-BLOT-ANALYSE	19

1.5.5	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	19
<b>1.6</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>20</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>		<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>21</b>
2.1.1	GERÄTE	21
2.1.2	CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKALIEN	21
2.1.3	ENZYME UND SYSTEME	22
<b>2.2</b>	<b>MIKROBIOLOGISCHE ARBEITEN</b>	<b>22</b>
2.2.1	NÄHRMEDIEN	22
2.2.2	BAKTERIENSTÄMME	23
2.2.3	HUMANE ZELLINIEN	24
2.2.4	PLASMIDE UND VEKTOREN	26
2.2.5	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN	26
2.2.5.1	Elektrokompetente <i>E.coli</i> -Zellen	26
2.2.5.2	TSS-kompetente <i>E.coli</i> -Zellen	27
2.2.6	TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN	27
2.2.6.1	Transformation elektrokompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	27
2.2.6.2	Transformation TSS-kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	28
<b>2.3</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN</b>	<b>28</b>
2.3.1	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	28
2.3.2	ANALYTISCHE POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	29
2.3.3	PRÄPARATIVE POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	29
2.3.4	PLASMID-PRÄPARATIONEN	30
2.3.4.1	Plasmid-Präparationen im kleinen Maßstab	30
2.3.4.2	Plasmid-Präparationen im großen Maßstab	30
2.3.5	RNA-ISOLIERUNG	32
2.3.5.1	Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von Ribonukleasen	32
2.3.5.2	Verwendete Ribonuklease-Inhibitoren	33
2.3.5.3	RNA-Isolierung aus Kultur-Zellen	33
2.3.5.4	RNA-Isolierung aus Patientenblut	34
2.3.5.5	RNA-Isolierung aus tiefgefrorenen vitalen Zellen	34
2.3.6	BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON NUKLEINSÄUREN	34
2.3.7	OLIGONUKLEOTIDE	35
2.3.7.1	Datenbankrecherche	35
2.3.7.2	Planungskriterien für Oligonukleotide	35
2.3.7.3	Verwendete PCR-Primer	36
2.3.7.4	Hybridisierungssonden	37
<b>2.4</b>	<b>GENERIERUNG VON STANDARD-RNA</b>	<b>37</b>
2.4.1	ERSTELLUNG EINES <i>BCR/ABL</i> -STANDARDS DURCH INVERSE PCR-MUTAGENESE	37
2.4.2	ERSTELLUNG VON STANDARDS FÜR KONTROLLGENE	39
2.4.3	RESTRIKTIONSSPALTUNG VON VEKTOREN UND PCR-PRODUKTEN	40
2.4.4	VERKNÜPFUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT T4 DNA LIGASE	40
2.4.5	<i>SCREENING</i> AUF POSITIVE KLONE	41
2.4.6	DNA-SEQUENZIERUNG	42
2.4.7	<i>IN-VITRO</i> -TRANSKRIPTION	43
2.4.8	RADIOAKTIVE MARKIERUNG DES <i>IN-VITRO</i> -TRANSKRIPTES	44

<b>2.5</b>	<b>QUANTITATIVE, KOMPETITIVE RT-PCR</b>	<b>44</b>
2.5.1	VERMEIDUNG VON KONTAMINATION	45
2.5.2	AMPLIFIKATION VON RNA	45
2.5.2.1	RT-PCR mit <i>Tth</i> DNA-Polymerase	46
2.5.2.2	RT-PCR mit Titan One Tube RT-PCR System	47
2.5.3	QUANTIFIZIERUNG NACH QC-RT-PCR	49
2.5.3.1	Analytische Restriktionsspaltung der QC-RT-PCR-Produkte	49
2.5.3.2	Quantifizierung der Spaltprodukte mittels analytischer Polyacrylamidgel- elektrophorese	49
2.5.3.3	Quantifizierung der Spaltprodukte mit der ABI PRISM 310 <i>Genetic Analyzer</i> Kapillarelektrophorese-Apparatur	50
2.5.3.3.1	Probenvorbereitung für die Kapillarelektrophorese	50
2.5.3.3.2	Elektrophoresebedingungen der Kapillarelektrophorese	50
<b>2.6</b>	<b>QUANTIFIZIERUNG MITTELS <i>REAL-TIME-PCR</i></b>	<b>52</b>
2.6.1	QUANTIFIZIERUNG MIT SYBR GREEN I	53
2.6.1.1	Zwei-Schritt-Protokoll	54
2.6.1.1.1	Reverse Transkription mit AMV	54
2.6.1.1.2	Amplifikation mit <i>Taq</i> DNA-Polymerase	54
2.6.1.2	Ein-Schritt-Protokoll	56
2.6.1.2.1	Amplifikation mit der <i>Tth</i> DNA-Polymerase	56
2.6.1.2.2	Amplifikation mit dem Titan One tube RT-PCR System	57
2.6.1.2.3	Amplifikation mit dem SuperScript One-Step RT-PCR System	58
2.6.1.2.4	Amplifikation mit dem LightCycler-RNA Amplification Kit SYBR Green I	60
2.6.2	QUANTIFIZIERUNG MIT FLUORESCENZ-MARKIERTEN SONDEN	61
2.6.2.1	Amplifikation mit dem Titan One tube RT-PCR System	62
2.6.2.2	Amplifikation mit dem SuperScript One-step RT-PCR System	63
2.6.2.3	Amplifikation mit dem LightCycler-RNA Amplification Kit Hybridization Probes	63
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>65</b>
<b>3.1.</b>	<b>QUANTITATIVE KOMPETITIVE RT-PCR ZUM NACHWEIS DES <i>BCR/ABL</i>-FUSIONSTRANSKRIPTES</b>	<b>65</b>
3.1.1.	GENERIERUNG EINES INTERNEN RNA-STANDARDS	66
3.1.1.1.	Zielgerichtete PCR-Mutagenese	67
3.1.1.2.	Generierung von Standard- und Wildtyp-RNA	69
3.1.2.	AUSWAHL EINES GEEIGNETEN PRIMER-SYSTEMS FÜR DIE ANALYSE DES <i>BCR/ABL</i> -FUSIONSTRANSKRIPTES	71
3.1.3.	AUSWAHL EINES GEEIGNETEN AMPLIFIKATIONS-SYSTEMS	72
3.1.3.1.	Amplifikation mit <i>Tth</i> DNA-Polymerase	73
3.1.3.2.	Amplifikation mit dem Titan One Tube RT-PCR System	76
3.1.3.3.	Sensitivitätsvergleich zwischen <i>Tth</i> DNA-Polymerase und dem Titan One Tube RT-PCR System	77
3.1.3.4.	Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen für das Titan One Tube RT-PCR-System	78
3.1.4.	TITRATIONSEXPERIMENTE	79
3.1.4.1.	Heteroduplex-Bildung	81
3.1.4.2.	Titration mit gegenläufigen <i>BCR/ABL</i> -Wildtyp- und Standard- RNA-Konzentrationen	83
3.1.4.2.1.	Densitometrische Auswertung analytischer Polyacrylamidgele	85
3.1.4.2.2.	Quantifizierung mittels Kapillarelektrophorese	86
3.1.4.3.	Titration mit variabler Standard- und konstanter Proben-RNA	92

<b>3.2.</b>	<b>QUANTIFIZIERUNG MITTELS <i>REAL-TIME</i>-RT-PCR</b>	<b>95</b>
3.2.1.	DER LIGHTCYCLER UND SEINE DETEKTIONSMETHODEN	96
3.2.1.1.	Quantifizierung mit SYBR Green I	98
3.2.1.2.	Quantifizierung mit Fluorophor-markierten Hybridisierungssonden	100
3.2.2.	QUANTIFIZIERUNG DES <i>BCR/ABL</i> -FUSIONSGENS MIT SYBR GREEN I	101
3.2.2.1.	Vergleich zwischen Ein-Schritt und Zwei-Schritt RT-PCR-Protokoll	103
3.2.2.2.	Design neuer Primer für die Quantifizierung des <i>BCR/ABL</i> -Fusionstranskriptes	105
3.2.2.3.	Vergleich verschiedener Ein-Schritt RT-PCR-Systeme zur Quantifizierung des <i>BCR/ABL</i> -Transkriptes mit SYBR Green I	108
3.2.2.4.	Quantifizierung des <i>BCR/ABL</i> -Transkriptes in verschiedenen Zelllinien	115
3.2.3.	QUANTIFIZIERUNG DES <i>BCR/ABL</i> -FUSIONSTRANSKRIPTES MIT FLUOROPHOR-MARKIERTEN HYBRIDISIERUNGSSONDEN	119
3.2.3.1.	Vergleich verschiedener Ein-Schritt Amplifikations-Systeme	121
3.2.3.2.	Quantifizierung des <i>BCR/ABL</i> -Transkriptes in verschiedenen Leukämie-spezifischen Zelllinien	126
3.2.4.	VERGLEICH DER QUANTIFIZIERUNG DES <i>BCR/ABL</i> -TRANSKRIPTES BEI EINSATZ VON HYBRIDISIERUNGSSONDEN ODER SYBR GREEN I	129
3.2.5.	AMPLIFIKATIONSEIGENSCHAFTEN EINER DNA-STANDARDREIHE IM VERGLEICH ZUR BISHER VERWENDETEN RNA-STANDARDREIHE	132
3.2.6.	QUANTIFIZIERUNGSVERGLEICH ZWISCHEN QC-RT-PCR UND LIGHTCYCLER-RT-PCR	137
3.2.7.	ROUTINEFÄHIGKEIT DER METHODE	141
3.2.7.1.	Spiking-Experimente	142
3.2.7.2.	Reproduzierbarkeit	146
<b>3.3.</b>	<b>QUANTITATIVE ANALYSE KLINISCHER PROBENMATERIALIEN</b>	<b>151</b>
3.3.1.	KONTROLLGENE	151
3.3.1.1.	Verwendung von <i>GAPDH</i> als Kontrolltranskript	153
3.3.1.2.	Verwendung von <i>PBGD</i> als Kontrollgen	155
3.3.2.	QUANTITATIVE ANALYSE DER PATIENTEN-PROBEN	157
3.3.2.1.	Patientenproben aus Giessen	158
3.3.2.2.	Patientenproben aus Essen	160
<b>4 DISKUSSION</b>		<b>164</b>
<b>4.1</b>	<b>BISHER VERWENDETE METHODEN ZUM NACHWEIS DES PHILADELPHIA-CHROMOSOMS</b>	<b>165</b>
<b>4.2</b>	<b>QUANTITATIVE KOMPETITIVE RT-PCR</b>	<b>167</b>
<b>4.3</b>	<b>REAL-TIME PCR</b>	<b>177</b>
<b>4.4</b>	<b>UNTERSUCHUNG VON PATIENTENPROBEN</b>	<b>185</b>
<b>4.5</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>189</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>		<b>191</b>
<b>6 LITERATUR</b>		<b>193</b>

---

<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>214</b>
<b>7.1</b>	<b>SEQUENZEN</b>	<b>214</b>
7.1.1	SEQUENZ DES <i>BCR/ABL</i> -INSERTS IN PBSBA7	214
7.1.2	SEQUENZ DES <i>GAPDH</i> -GENS	215
7.1.3	SEQUENZ DES <i>PBGD</i> -GENS	216
<b>7.2</b>	<b>ERGEBNISSE UND DATEN DES ANALYSIERTEN KLINISCHEN PROBENMATERIALS</b>	<b>217</b>
7.2.1	PATIENTEN-PROBEN DER UNIVERSITÄTSKLINIK GIESSEN	217
7.2.2	PATIENTEN-PROBEN DER UNIVERSITÄTSKLINIK ESSEN	218

# 1 Einleitung

## Chronisch myeloische Leukämie

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist eine klonale myeloproliferative Erkrankung der haematopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Der Begriff Leukämie stammt aus dem griechischen und bedeutet übersetzt "weißes Blut" (Virchow, 1843), was auf die z. T. sehr hohen Leukozytenzahlen im Blut zurückzuführen ist.

### 1.1 Häufigkeit und Ätiologie

Die Inzidenz der CML beträgt ca. 1 : 100 000 Einwohner pro Jahr und ist somit die häufigste myeloproliferative Erkrankung. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei Philadelphia-Chromosom positiver Leukämie bei 67 Jahren (Lee *et al.*, 1998). Prinzipiell kann die Erkrankung jedoch in jedem Lebensalter, auch in der Kindheit auftreten (Sawyers, 1999). Bei Vorhandensein des Philadelphia-Chromosoms ist die Prognose bei Kindern jedoch deutlich besser als bei Erwachsenen (Castro-Malaspina *et al.*, 1983). Bei Leukämien im Erwachsenenalter erkranken Männer mit einer Wahrscheinlichkeit von 1.4 : 1 geringfügig häufiger als Frauen (Hoffbrand & Pettit, 1993). Die mediane Überlebenszeit nach Erstdiagnose beträgt ca. 36 Monate. Dieser Zeitraum kann aber stark variieren, da der exakte Zeitpunkt des Beginns der Erkrankung nicht bestimmbar ist.

Die genauen Ursachen der CML sind bis heute nicht bekannt und können auch im Einzelfall nur selten bestimmt werden. Die Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen sowie bestimmten chemischen Substanzen (z.B. Benzol, Insektizide, 2-3-Benzpyren) kann die Inzidenz erhöhen (Fitzgerald, 1976; Jacobs, 1989), wie z. B. nach dem Atombombenabwurf von Hiroshima beobachtet werden konnte. Mit einer Latenzzeit von 3 Jahren nach Exposition stieg die Leukämieinzidenz stetig an und erreichte nach ca. 7 Jahren ihren Höhepunkt. Selbst 15 Jahre nach dem Abwurf bestand für strahlenexponierte Personen gegenüber der Normalbevölkerung ein 15fach höheres Risiko, an Leukämie zu erkranken. Weitere Ursachen sind z.B. die Schwächung des Immunsystems, wie sie im fortgeschrittenen Stadium der Immunschwäche Aids oder nach jahrelanger Einnahme von Medikamenten zur Unterdrückung der körpereigenen Abwehr gegeben ist [1].



## 1.2 Diagnostik und Verlauf

Die CML beginnt meist schleichend und relativ symptomarm (mäßiges Fieber, Anämie, leichter Gewichtsabfall, etc.), daher stellt die Diagnose meist einen Zufallsbefund anlässlich einer Routineuntersuchung dar. In Tabelle 1-1 sind die typischen Symptome und Befunde der Erstdiagnostik bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie aufgeführt.

Leukozytose	98 %
M- <i>BCR</i> -Rearrangement	93 %
Philadelphia-Chromosom	90 %
ALP-Index	86 %
Splenomegalie	72 %
LDH erhöht	71 %
Anämie	62 %
Leistungsabfall	61 %
Thrombozytose	48 %
Abdominalbeschwerden	30 %
Myelofibrose	28 %
Gewichtsverlust	21 %
Thrombozytopenie	9 %
Extramedulläre Infiltrate	7 %
Fieber	6 %

**Tab. 1-1: Symptome und Befunde bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie aufgetragen nach der Häufigkeit ihres Auftretens in %** (nach Hehlmann *et al.*, 1994); ALP: Alkalische Leukozytenphosphatase, LDH: Lactatdehydrogenase.

Hierbei erkennt man deutlich, daß in fast allen Fällen zunächst eine starke Leukozytose Anlaß zu weiteren Untersuchungen gab.

Der Verlauf der Krankheit läßt sich typischerweise in drei Phasen gliedern:

- ◆ **Chronische Phase**
- ◆ **Akzelerationsphase**
- ◆ **Blastenkrise.**

### 1.2.1 Chronische Phase

In dieser Phase der Krankheit, auch als stabile Phase bezeichnet, wird die CML meist als Zufallsbefund diagnostiziert, da die zuvor genannten Symptome (s. 1.2) schleichend beginnen. Die Leukozytenzahlen sind in der Regel stark erhöht. Werte zwischen 50 000 und 100 000/ $\mu\text{l}$  sind typisch, gelegentlich werden Extremwerte bis zu 500 000/ $\mu\text{l}$  beobachtet. Häufig bestätigt dann die Differenzierung des Blutausstriches den Verdacht auf Leukämie, da meist alle Reifungsstadien der Granulozytopoese vorhanden sind. In der Regel überwiegen die Myelozyten und Metamyelozyten. Charakteristisch und diagnostisch bedeutsam ist die Vermehrung der eosinophilen und basophilen Granulozyten. Eine Vermehrung der Thrombozyten ist ebenfalls häufig nachweisbar. Im Differentialblutbild zeigt sich eine typische pathologische Linksverschiebung. Hierunter versteht man die Verschiebung zu den unreifen, noch nicht völlig differenzierten Vorläuferzellen. Das Knochenmark ist aufgrund der gesteigerten Myelopoese hyperzellulär, der Fettanteil ist vermindert. Das Verhältnis von Granulopoese zu Erythropoese beträgt 10 : 1 im Gegensatz zu 2-5 : 1 bei Gesunden. Der erhöhte Leukozytenumsatz kann zu einer Erhöhung von LDH und Harnsäure führen. Weitere diagnostisch bedeutsame Charakteristika sind einerseits physisch eine Splenomegalie (Sawyers, 1999) sowie biochemisch die Verminderung der alkalischen Leukozytenphosphatase (ALP). Die sicherste Bestätigung der Diagnose besteht aber im Nachweis des Philadelphia-Chromosoms (s. Kapitel 1.4.4). Mehr als 95 % der Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie zeigen diese typische Chromosomen-Aberration (Sokal *et al.*, 1984; Kurzrock *et al.*, 1988).

Durch Behandlung mit Chemotherapeutika (s. Kapitel 1.3.1) wird das Wachstum des malignen Klons in dieser Phase der Krankheit unterdrückt, diese Präparaten sind aber nicht in der Lage, eine Heilung zu bewirken. Therapieziel ist die Absenkung der Leukozyten auf Werte von 20 000/ $\mu\text{l}$  bzw. der Thrombozyten auf Normalwerte. Dies gelingt in der Regel mit einer niedrigdosierten Dauertherapie (Eckstein *et al.*, 1991).

Die chronische Phase hat in Abhängigkeit von Status, Prognoseprofil und Therapie eine mediane Dauer von ca. 5 Jahren, wobei bei günstiger Prognose auch 8 - 10 Jahre erreicht werden können (Hehlmann & Hochhaus, 1998).

### 1.2.2 Akzelerationsphase

Diese Phase stellt nur eine kurze Übergangsperiode zwischen chronischer Phase und Blastenkrise dar. Sie ist nicht exakt definiert, da sich dieser Übergang kontinuierlich vollzieht. Die Leukozytenzahl steigt in dieser Phase trotz Intensivierung der Chemotherapie weiter an, da die Zellverdopplungszeit abnimmt. Die Anzahl an unreifen Vorläuferzellen (Blasten), eosinophilen und basophilen Granulozyten (mehr als 20 % im peripheren Blut) nimmt zu. Häufig treten weitere Chromosomenaberrationen wie Trisomie 8 oder 19, Isochromosom 17 oder ein zweites Philadelphia-Chromosom auf. Die Akzelerationsphase tritt nicht bei allen Patienten auf und kann häufig erst aus dem Verlauf diagnostiziert werden.

### 1.2.3 Blastenkrise

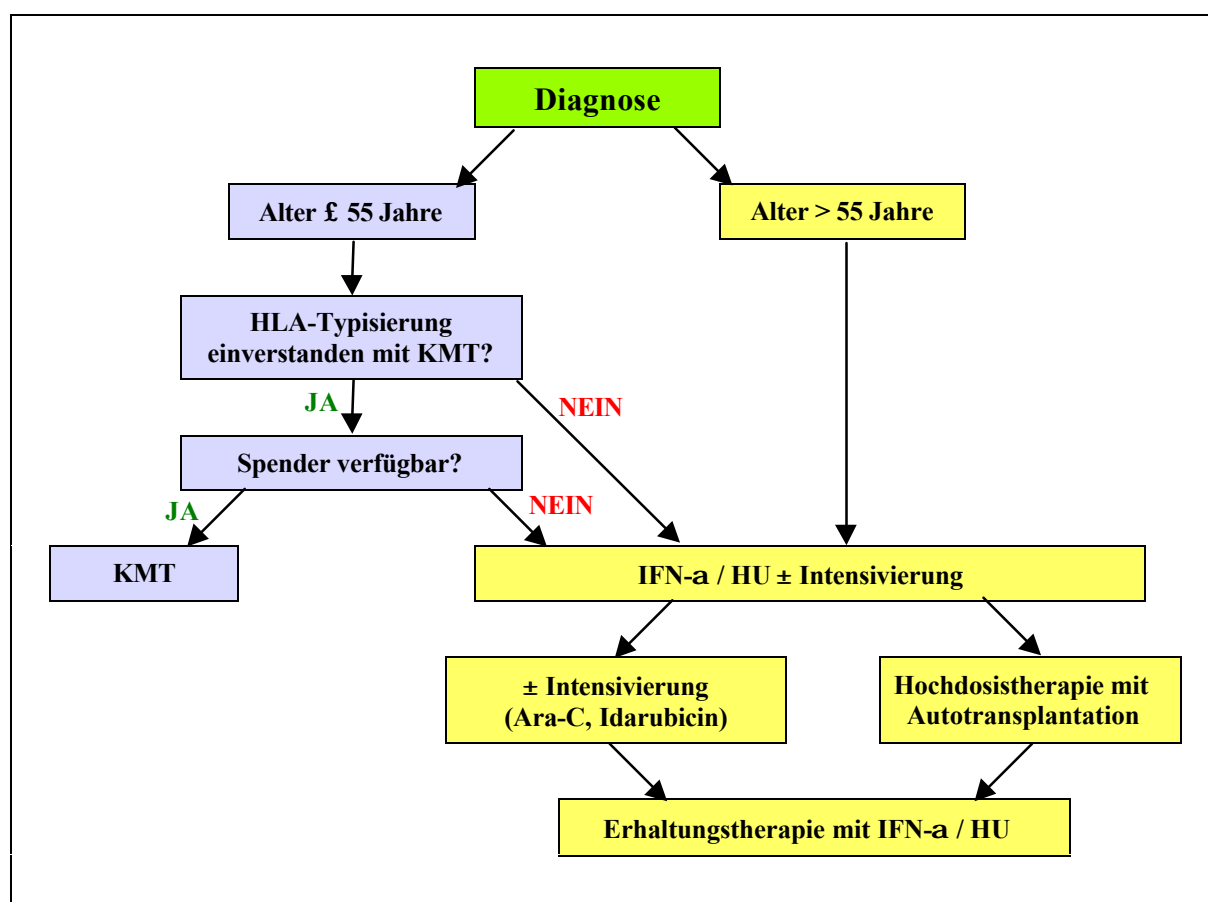
Die terminale Blastenkrise, die auch als Blastenschub bezeichnet wird, zeichnet sich durch eine starke Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Patienten aus. Dies können unter anderem folgende Symptome sein: starker Leistungsabfall, Gewichtsabnahme, erhöhtes Fieber, Anämie. Zudem findet man im Blutbild eine ausgeprägte Leukozytose mit einer Vermehrung von Blasten, eine Thrombozytopenie und Anämie. Im Knochenmark findet man eine Durchsetzung der Myelo-, Erythro- und Megakaryopoese mit unreifen Blasten. Da diese Erscheinungsformen und der Zeitpunkt ihres Auftretens vielfältiger Art sein können, wurden von der Deutschen CML-Studiengruppe spezifische Kriterien für die Definition der Blastenkrise aufgestellt (Hehlmann & Hochhaus, 1998):

- ◆ Anteil der Blasten und Promyelozyten  $\geq 30$  % der Leukozyten im peripheren Blut oder
- ◆ Blasten und Promyelozyten  $\geq 50$  % der kernhaltigen Zellen im Knochenmark oder
- ◆ zytologisch oder histologisch gesicherte extramedulläre blastäre Infiltrate.

Die mediane Überlebenszeit nach Eintritt der Blastenkrise beträgt mit Therapie ca. 3 - 9 Monate. Der Übergang von der chronischen Phase bis hin zur Blastenkrise betrifft in den ersten zwei Jahren nach Diagnose ca. 5 - 10 % aller Patienten, in den folgenden Jahren jährlich ca. 20 % der Patienten (Sokal *et al.*, 1988).

## 1.3 Therapie

Die Behandlung eines CML-Patienten sollte sofort nach Feststehen der Diagnose eingeleitet werden. Patienten, die nicht älter als 55 Jahre sind, sollten, falls ein HLA-kompatibler Spender zur Verfügung steht, zu einer curativen Therapie an Knochenmark-Transplantationszentren überwiesen werden. Jene Patienten, die entweder diese Altersgrenze überschritten haben oder nicht gesund genug sind, um eine solche Transplantation zu tolerieren, werden konventionell mit Chemotherapeutika behandelt. Eine Übersicht über die allgemeinen Therapierichtlinien gibt das in Abbildung 1-1 dargestellte Schema.



**Abb. 1-1: Therapieschema für CML-Patienten in chronischer Phase**, nach gesicherter Erstdiagnose (KMT: Knochenmark-Transplantation, IFN- $\alpha$ : Interferon-alpha, HU: Hydroxyurea, Ara-C: Arabinosyl-Cytosin). Weitere Erläuterungen im Text (verändert nach Hehlmann & Hochhaus, 1998).

---

## 1.3.1 Chemotherapeutika

Chemotherapeutika können keine Heilung der CML sondern lediglich eine Senkung der Leukozytenzahl im peripheren Blut auf Normwerte von ca. 10 000 pro  $\mu\text{l}$  Blut bewirken. In den nachfolgenden Kapiteln werden die in der Behandlung der CML angewandten Chemotherapeutika näher beschrieben.

### 1.3.1.1 Busulfan (Myleran)

- ◆ Busulfan ist ein Alkylanz und wirkt auf die primitiven Stammzellen;
- ◆ wird nicht mehr zur Primärtherapie, sondern nur bei Therapieresistenz auf Hydroxyurea oder Unverträglichkeit von Hydroxyurea und Interferon- $\alpha$  eingesetzt;
- ◆ hat gravierende Nebenwirkungen, die teilweise lebensbedrohlich sind (Knochenmark-aplasie, Lungenfibrosen, etc.).

### 1.3.1.2 Hydroxyurea (HU)

- ◆ Hemmt die Ribonukleotidreduktase und somit die DNA-Synthese;
- ◆ hat eine antiproliferative Wirkung, die Leukozyten- und Thrombozytenanzahl sinkt nach wenigen Tagen;
- ◆ Wirkung ist nach Absetzen vollständig reversibel, hat geringe, nicht lebensbedrohliche Nebenwirkungen;
- ◆ im Vergleich mit Busulfan-behandelten Patienten hatten HU-behandelte Patienten einen Überlebensvorteil von etwa einem Jahr (Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group, 1997; Hehlmann *et al.*, 1993).

### 1.3.1.3 Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ )

- ◆ Wirkt antiproliferativ, antiinflammatorisch und immunregulierend;
- ◆ Dauertherapie zur Reduktion der Leukozytenzahlen auf subnormale Werte (2000-4000/ $\mu\text{l}$ ) auch nach kompletter zytogenetischer Remission, Absetzen von IFN- $\alpha$  nur unter regelmäßiger molekulargenetischer Überwachung;
- ◆ der maligne Klon unterliegt zum Teil der natürlichen Regulation, das bedeutet, daß nach Apoptose gesunde Stammzellen wieder die Hämatopoese übernehmen können;

- 
- ◆ 80 % der Patienten sprechen positiv auf eine Behandlung mit IFN- $\alpha$  an, bei 5 - 10 % der Patienten kann eine dauerhafte komplette zytogenetische Remission erreicht werden (Allan *et al.*, 1995; The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia, 1994);
  - ◆ IFN- $\alpha$ -behandelte Patienten haben einen Überlebensvorteil gegenüber Busulfan- bzw. Hydroxyurea-behandelten Patienten (Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group, 1997);
  - ◆ höhere Nebenwirkungsrate (grippeähnliche Symptome) als bei Busulfan oder Hydroxyurea, aber nicht lebensbedrohlich;
  - ◆ Medikamentenwirkung ist nach Absetzen der Therapie vollständig reversibel.

#### 1.3.1.4 Arabinosyl-Cytosin (Ara-C)

- ◆ Induziert eine Differenzierung der Blasten;
- ◆ hat sich vor allem für intensive Kombinationstherapie mit Hydroxyurea oder Interferon-alpha (Guilhot *et al.*, 1997) bewährt;
- ◆ kann auch noch mit Erfolg in der Akzelerationsphase oder Blastenkrise eingesetzt werden.

#### 1.3.1.5 Intensive Chemotherapie

- ◆ Kombinationen von verschiedenen Chemotherapeutika;
- ◆ bei bis zu 70 % der Patienten konnte eine zytogenetische Remission beobachtet werden, diese umfaßte aber nur eine kurze Zeitspanne von 6 - 8 Monaten (Lengfelder & Hehlmann, 1996);
- ◆ erhebliche Sterberate der Patienten, daher wurden keine größeren Studien durchgeführt.

### 1.3.2 Knochenmarktransplantation (KMT)

Die einzige kurative Methode der CML ist die Hochdosistherapie mit anschließender allogener KMT (Fefer *et al.*, 1979; Gratwohl & Hermans, 1996). Daher sollte bei Patienten unter 55 Jahren sofort nach Diagnosestellung die HLA-Typisierung und die Spendersuche erfolgen. Ist kein passender Familienspender verfügbar, sollte bei Patienten unter 50 Jahren eine Fremdspendersuche erfolgen. Diese kann über nationale und internationale

Spenderdateien erfolgen, wobei die Wahrscheinlichkeit einen HLA-kompatiblen Spender zu finden, inzwischen ca. 80 % innerhalb von 80 Tagen beträgt (Hochhaus & Hehlmann, 1998). Es konnten unterschiedliche prognostisch relevante Merkmale identifiziert werden, die eine frühzeitige KMT des Patienten nahelegen, da sie zu einer Verkürzung der chronischen Phase der CML führen. Dazu gehören: Alter der Patienten (>45 Jahre), männliches Geschlecht, Zunahme der Splenomegalie, Erhöhung der Serum-Lactatdehydrogenase, zusätzlich zum Philadelphia-Chromosom auftretende zytogenetische Aberrationen, eine höhere Rate an Blasten, Basophilen, Eosinophilen im Knochenmark oder peripheren Blut, Thrombozytose und Anämie (Sokal *et al.*, 1984; Sokal *et al.*, 1988; Kantarjian *et al.*, 1985; Sacchi *et al.*, 1998; Hasford *et al.*, 1998).

Auf den Erfolg der KMT hat auch die Wahl des Transplantationszentrums einen Einfluß. So hatten Patienten, die in Transplantationszentren mit weniger als 5 KMT pro Jahr transplantiert wurden, eine schlechtere Prognose als Patienten, die in großen Transplantations-Zentren behandelt wurden (Horowitz *et al.*, 1992).

### 1.3.2.1 Allogene KMT bzw. Stammzelltransplantation

- ◆ KMT nach myeloablativer Chemotherapie zur Eradikation des malignen Klons, möglichst im 1. Jahr nach Diagnose und während der chronischen Phase der CML (Goldman *et al.*, 1993);
- ◆ Die myeloablative Konditionierung ist zwar essentiell um, die CML durch die Transplantation zu heilen, eine bedeutende Rolle spielt aber auch der "*Graft-versus-leukemia*"-Effekt (Kolb *et al.*, 1995; Hehlmann & Hochhaus, 1998).
- ◆ Voraussetzung: Spender, der die gleichen Histokompatibilitäts- (HLA-) Merkmale aufweist;
- ◆ Alter des Patienten < 55 Jahre bei verwandtem Spender, < 50 Jahre bei Fremdspender, da mit einer höheren Komplikationsrate gerechnet werden muß (McGlave *et al.*, 1993);
- ◆ hohe kurative Potenz: 40 - 80 % langfristiges leukämiefreies Überleben, d.h. es ist auch im Langzeitverlauf kein Philadelphia-Chromosom nachweisbar, und es finden sich keine residuellen *BCR/ABL*-Transkripte im peripheren Blut (van Rhee *et al.*, 1997);
- ◆ Bei 20 - 40 % der Patienten kommt es durch immunologische Komplikationen (Histoinkompatibilitäten) zur *Graft-versus-Host*-Erkrankung (GvHD), die in 10 % der Fälle tödlich verläuft;

- ◆ Bei Vortherapie mit IFN- $\alpha$  über mehr als 12 Monate wurde beobachtet, daß es zu höheren Infektions- und Abstoßungsraten nach allogener KMT kommt (Giralt *et al.*, 1993; Beelen *et al.*, 1995), neuere Studien konnten dies jedoch nicht belegen (Hehlmann *et al.*, 1999; Giralt *et al.*, 2000);

### 1.3.2.2 Hochdosistherapie und autologe KMT bzw.

#### Stammzelltransplantation

- ◆ Bei Patienten ohne passenden Spender oder bei denen das Risiko einer allogenen KMT zu hoch ist;
- ◆ Philadelphia Chromosom-negative Stammzellen i.d.R. in früher chronischer Phase vorhanden, daher wurde früher von den Patienten eine Knochenmarkskonserven vor Therapie-Beginn entnommen, um die Möglichkeit einer autologen Stammzelltransplantation offenzuhalten;
- ◆ heute erfolgt die Gewinnung von Philadelphia-Chromosom-negativen Stammzellen üblicherweise aus dem peripheren Blut, entweder durch mäßig intensive Chemotherapie und Gabe von Wachstumsfaktoren, z.B. den Granulozyten-Koloniestimulierenden Faktor (G-CSF) (Socinski *et al.*, 1988), oder durch *in-vivo-Purging*, d.h. Gewinnung der Stammzellen in einem bestimmten Zeitabschnitt der Regeneration, in der vor allem Philadelphia-Chromosom-negative Stammzellen ins periphere Blut geschwemmt werden (O'Brian & Goldman, 1995);
- ◆ es handelt sich hierbei um eine relativ neue Methode, behandelte Patienten zeigten in ersten unkontrollierten Studien gute Überlebenszeiten (Carella *et al.*, 1993, 1998; Fischer *et al.*, 1998), größere multizentrische Studien sind zur Zeit in Arbeit;
- ◆ geringe Letalität (< 2 %) an erfahrenen Zentren (Kanz, 1997).

### 1.3.3 Neue therapeutische Strategien

#### 1.3.3.1 Antisense-Oligonukleotide

*Antisense*-Oligonukleotide binden sequenzspezifisch an DNA oder mRNA, wodurch die genetische Information nicht mehr abgelesen werden kann. Sie können mit Hilfe von Liposomen oder viralen Vektoren in die Zelle geschleust werden und dort einen wichtigen Faktor für die Regulation der Genexpression darstellen. Um sie vor dem Abbau in der Zelle zu schützen, werden entweder modifizierte Oligonukleotide verwendet oder man schleust gezielt unmodifizierte Oligonukleotide in die Zelle, die dadurch eine Wirkung erzielen, daß



---

sie die RNaseH aktivieren. Der Einsatz von modifizierten Oligonukleotiden in der CML-Therapie, die spezifisch an die *BCR/ABL*-Sequenz binden, brachte bislang allerdings nur sehr widersprüchliche Ergebnisse und hatten keine Relevanz für die Therapie (Taj *et al.*, 1990; Kabisch *et al.*, 1995, 1996).

### 1.3.3.2 Tyrosinkinaseinhibitoren

#### ◆ STI-571

Das neue Medikament STI-571 (Novartis, Basel) wirkt als selektiver Inhibitor auf die BCR/ABL-Tyrosinkinase (Druker *et al.*, 1996). STI-571 befindet sich noch in der Erprobungsphase und wird zur Zeit ausschließlich im Rahmen von kontrollierten klinischen Studien zur Therapie der CML eingesetzt. Es wird nur bei erwachsenen Patienten verwendet, die auf eine Therapie mit IFN- $\alpha$  nicht ansprechen. Erste klinische Daten weisen auf eine gute Wirksamkeit des Medikamentes (Tablette 1x täglich) ohne größere Nebenwirkungen (Übelkeit, Muskelschmerzen) hin (Le Coutre *et al.*, 1999; Druker & Lydon, 2000; Goldman, 2000). Kürzlich wurde die Kristallstruktur der katalytischen Domäne der ABL-Tyrosinkinase im Komplex mit STI-571 gelöst (Schindler *et al.*, 2000).

#### ◆ ABD/SHP1c-Fusionsprotein

Einen ganz neuen Ansatz stellt die Inhibition der BCR/ABL-Tyrosinkinase mittels eines Fusionsproteins dar. Das Fusionsprotein ABD/SHP1c ist durch Fusion der katalytischen Domäne von SHP1 und der ABL-Bindungs-Domäne von RIN1 generiert worden. Dieses Fusionsprotein bindet spezifisch an das BCR/ABL-Protein und unterdrückt somit seine Aktivität. Die Wirksamkeit konnte bereits an Kulturzellen nachgewiesen werden (Lim *et al.*, 2000).

### 1.3.3.3 Antibiotika

Anhand von Modelluntersuchungen an Mäusen, die das *BCR/ABL*-Gen tragen, konnte gezeigt werden, daß das Antibiotikum Tetrazyklin in entsprechender Dosierung bewirkt, daß das *BCR/ABL*-Gen nicht abgelesen werden kann. Wurde das Antibiotikum aus dem Trinkwasser entfernt, erkrankten die Mäuse mit leukämischen Symptomen, wurde es wieder zugesetzt, verschwanden die Symptome erneut (Tenen *et al.*, 2000). Weitere Studien über die Wirksamkeit des Antibiotikums müssen allerdings noch folgen.

### 1.3.4 Prognose

Die medianen Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der Therapie sind in Tabelle 1-2 zusammengefasst.

Therapie	Monate
Keine	31
Milzbestrahlung	28
Busulfan	35 - 48
Hydroxyurea	48 - 67
Intensive Chemotherapie	45 - 55
Interferon-alpha	55 - 89
Allogene KMT *	40 - 80 %
Autotransplantation *	> 50 %

**Tab. 1-2: Mediane Überlebenszeiten bei CML in Abhängigkeit von der Therapie**

\* selektierte Patienten unter 55 Jahren, Angabe in % der 5-Jahres-Überlebensrate (aus Hochhaus & Hehlmann, 1997).

Sofern eine potentiell kurative Knochenmarktransplantation nicht möglich ist, wird die Prognose eines CML-Patienten mehr vom Risikoprofil als von der medikamentösen Therapie bestimmt. Zur Erstellung eines individuellen Risikoprofils hat sich der Prognoseindex von Sokal *et al.* (1984) bewährt. Dieser bezieht das Alter bei Diagnose, die Milzgröße in cm unter dem Rippenbogen, die Thrombozytenzahl und den Anteil von Blasten im peripheren Blut in die Berechnung des prognostischen Wertes mit ein. Ein Index  $< 0.8$  spricht für eine günstige Prognose, ein Index zwischen 0.8 und 1.2 für eine intermediäre Prognose und ein Index  $> 1.2$  für eine ungünstige Prognose. Die Klassifizierung der Patienten erfolgt entsprechend in Niedrig-, Intermediär- und Hochrisiko-Patienten. Neuere optimierte Indices beziehen zusätzliche Variablen, wie den Prozentsatz Eosinophiler und Basophiler im peripheren Blut, in die Berechnung des Prognosefaktors mit ein. Wichtigster verlaufsabhängiger Prognosefaktor unter medikamentöser Therapie ist die komplette hämatologische Remission mit Normalisierung aller typischen CML-Symptome, wie Blutbild, Milzgröße, etc. (Hehlmann & Hochhaus, 1998). Patienten, die unter IFN- $\alpha$ -Therapie eine komplette oder partielle zytogenetische Remission erreichten, hatten deutlich längere mediane Überlebenszeiten (Talpa *et al.*, 1991). Zudem scheint die Prognose eines Patienten um so besser, je früher mit einer Therapie begonnen wird und je früher die CML-typischen Symptome auf ein Minimum reduziert werden (Hehlmann & Heimpel, 1996).

Die einzige curative Methode in allen drei Phasen der CML ist die allogene KMT. Je früher die gesicherte Diagnose erfolgt, desto besser sind die Heilungschancen. Allerdings sind diese Heilungschancen durch die allogene KMT in der Akzelerierten Phase und in der Blastenkrise nur sehr gering (s. Tabelle 1-3), da es häufig zu großen Komplikationen während der Transplantation kommt. Zudem ist ein Rezidiv nach erfolgter Transplantation sehr wahrscheinlich (Martin *et al.*, 1988; Copelan *et al.*, 1989).

CML-Phase	verwandter Spender	nicht verwandter Spender
chronische Phase	57 - 85 %	37 - 74 %
akzelerierte Phase	48 %	20 %
Blastenkrise	18 %	10 %

**Tab. 1-3: Krankheitsfreies Überleben von mehr als 4 Jahren bei CML-Patienten nach allogener Stammzelltransplantation** (nach Kranz, 1999).

#### 1.3.4.1 Minimal residuelle Erkrankung (*minimal residual disease*)

In der Regel ist eine hochdosierte Chemotherapie nicht in der Lage, sämtliche Tumorzellen im Patienten zu zerstören. Persistierende residuelle Tumorzellen sind jedoch potentieller Ausgangspunkt für einen Relaps der Erkrankung. Aus diesem Grund wird der Patient einer Verlaufsdagnostik unterzogen, um expandierende Klone sofort zu erfassen und eine erneute Therapie einleiten zu können.

Kommt es nach allogener KMT zu einem zytogenetischen oder hämatologischen Rezidiv, so kann durch Transfusion von Spenderlymphozyten eine erneute Remission erreicht werden. Dieser Erfolg kann durch eine frühzeitige Gabe der Spenderlymphozyten verbessert werden (Kolb *et al.*, 1990).

Ein neuerer, noch in der Forschung befindlicher Ansatz zur Therapie von *minimal residual disease* ist der Einsatz monoklonaler Antikörper und insbesondere der Einsatz spezifischer Immuneffektorzellen Dendritische Zellen, die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen, lassen sich *ex vivo* entweder aus Monozyten des peripheren Blutes (Sallusto & Lanzavecchia, 1994) oder aber aus CD34+ hämatopoetischen Progenitorzellen unter Einsatz von Zytokin-Kombinationen generieren (Young *et al.*, 1995; Fisch *et al.*, 1996).

---

## 1.4 Molekulargenetik und Biologie der CML

### 1.4.1 Geschichtlicher Hintergrund

- ◆ 1960 beschrieben Novell und Hungerford ein außergewöhnlich kleines Chromosom, das sie nach der Stadt, in der es entdeckt wurde, als Philadelphia-Chromosom bezeichneten;
- ◆ 1973 war es Rowley, der nach Einführung der chromosomalen Bandentechnik nachwies, daß das Philadelphia-Chromosom durch die reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 entsteht;
- ◆ 1983 konnten Bartram *et al.* zeigen, daß durch diese reziproke Translokation t(9;22)(q34;q11) das *c-ABL*-Gen auf das Philadelphia-Chromosom transloziert wird;
- ◆ 1984 fanden Groffen *et al.*, daß der Bereich, in den die Translokation auf Chromosom 22 erfolgt, nur eine kleine Region von 5.8 kB umfaßt, und bezeichneten diese als *breakpoint cluster region (bcr)*;
- ◆ 1985 wurden die Endstücke der beteiligten Chromosomen kloniert und die Bruchstellen auf molekularer Ebene charakterisiert (Heisterkamp *et al.*, 1985).

### 1.4.2 *ABL*-Gen

Auf Chromosom 9q34, der Bruchstelle von Chromosom 9 bei der chronisch myeloischen Leukämie, wurde ein zelluläres Onkogen kartiert, welches dem Onkogen des Abelson-Maus-Leukämie-Virus (*v-ABL*) homolog ist (de Klein *et al.*, 1982). Das *c-ABL*-Gen ist in der Evolution hochkonserviert, was auf seine große Bedeutung bei der Regulation von zellulären Wachstums- und Differenzierungsvorgängen hinweist (Kurzrock *et al.*, 1988). Das *ABL*-Gen umfaßt 255 kB. Da zwei alternative unterschiedliche erste Exone (1a und 1b) vorhanden sind, werden zwei unterschiedlich große mRNA-Transkripte von 6 bzw. 7 kb Größe exprimiert (Heisterkamp *et al.*, 1983), die alternativ an die Exone 2-11 gespleißt werden. Das 5'-Ende des Exon 2 ist in der Lage, entweder die Verbindung zu den genannten Exonen 1a oder 1b herzustellen oder aber es ermöglicht die Verknüpfung von *c-ABL* mit anderen Sequenzen (Ben Neriah *et al.*, 1986; Shtivelman *et al.*, 1986). Das ubiquitär exprimierte *c-ABL*-Protoonkogen kodiert für ein 145 kDa großes Protein (p145), welches eine Tyrosinkinase-Aktivität besitzt. Am aminoterminalen Ende besitzt *c-ABL* zwei Regionen, die signifikante Homologien zu anderen Tyrosinkinasen aufweisen, die sogenannten SH2- und SH3-Domänen (*src homology region 2* bzw. 3). Die SH3-Domäne von *c-ABL* ist an der Regulation der Kinase-Aktivität beteiligt, da Deletion oder Mutation der SH3-Domäne zur Aktivierung des

---

onkogenen Potentials und somit zur Deregulation der c-ABL-Tyrosinkinase führt (Fainstein *et al.*, 1989; Koch *et al.*, 1991; Pendergast *et al.*, 1991).

Die SH2-Domäne umfaßt einen in Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen hochkonservierten Bereich von ca. 100 Aminosäureresten. Diese Domäne ist für Protein-Protein-Wechselwirkungen und somit für die Substratspezifität der Tyrosinkinase essentiell. Dadurch sind Proteine, die eine SH2-Domäne besitzen, in der Lage, tyrosinphosphorylierte Proteine zu binden und so bestimmte spezifische Signaltransduktionskaskaden auszulösen.

Am carboxy-terminalen Ende finden sich das Kernlokalisationsignal (van Etten *et al.*, 1989) sowie eine DNA- und Aktinbindungs-Domäne (Kipreos & Wang, 1992; McWhirter & Wang 1993).

c-ABL ist eine Zellzyklus-regulierte Tyrosinkinase, die durch Bindung an das Retinoblastoma Protein (RB1) inhibiert und während der S-Phase des Zellzyklus aktiviert wird (Welch & Wang, 1993). Weiterhin wird sowohl das nukleäre als auch das zytoplasmatische c-ABL durch Adhäsion von Zellen an Integrinen reguliert (Lewis *et al.* 1996). DNA-schädigende Agentien, wie Zytostatika oder UV-Strahlung, führen zur c-ABL-Aktivierung (Baskaran *et al.*, 1997; Nehme *et al.*, 1997; Wang, 1998). c-ABL ist in der Lage, DNA zu binden, die RNA-Polymerase II *in vitro* spezifisch zu phosphorylieren (Baskaran *et al.*, 1993) und zusammen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren die Transkription bestimmter Zielgene zu aktivieren (Welch & Wang, 1993).

*c-ABL-knock-out*-Mäuse sterben entweder 1 - 2 Wochen nach der Geburt und weisen eine Atrophie von Milz und Thymus auf oder zeigen eine Verminderung von T- und B-Zellen (Schwartzberg *et al.*, 1991; Tybulewicz *et al.*, 1991). Zudem konnte in früheren Untersuchungen nachgewiesen werden, daß die Expression von *c-ABL* in unreifen Lymphozyten deutlich höher ist als in reifen Lymphozyten (Wang & Baltimore, 1983). Zusammengenommen deuten diese Befunde daraufhin, daß die Funktion von c-ABL darin besteht, die Transkription solcher Gene zu regulieren, die für DNA-Reparatur, Entwicklung und Differenzierung von Bedeutung sind.

### 1.4.3 *BCR*-Gen

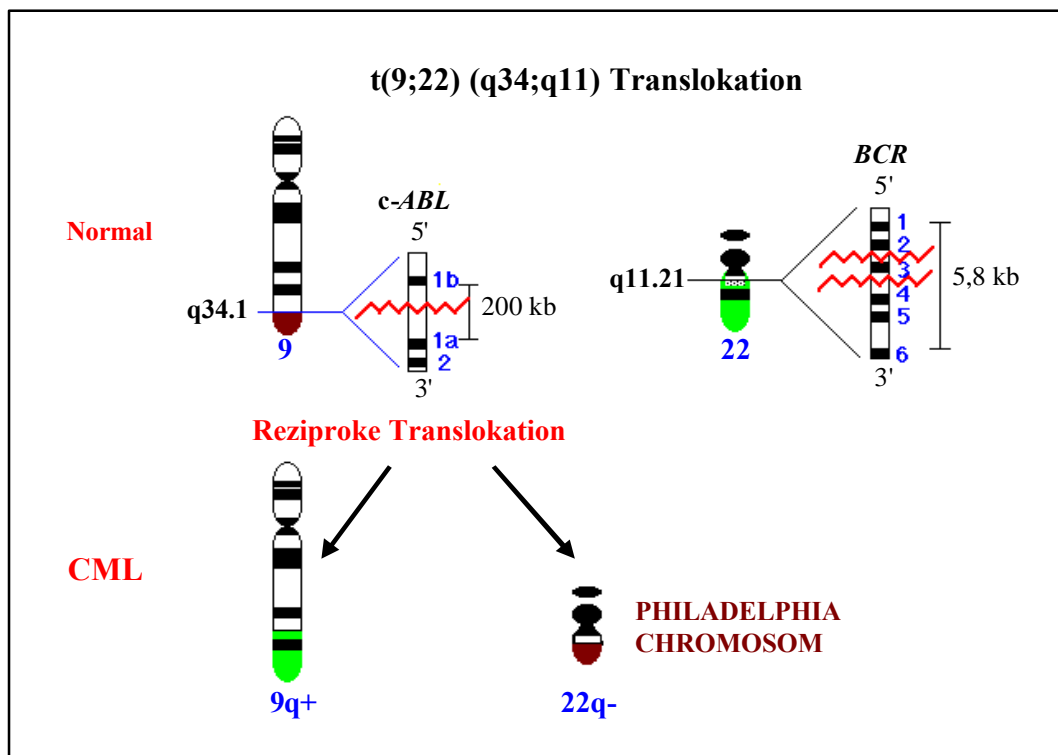
Im Rahmen der Translokation wird das *c-ABL*-Gen von Chromosom 9 auf Chromosom 22 übertragen. Da bei chronisch-myeloischen Leukämien zunächst nur eng umschriebene Bruchstellen auf Chromosom 22 gefunden wurden, wurde der Ort, in den das *c-ABL*-Onkogen integriert wurde, als "*break point cluster region*" (*bcr*) bezeichnet (Groffen *et al.*, 1984). Aus dem Vorkommen von Exons mit offenem Leserahmen läßt sich schließen, daß die *bcr*-Region Teil eines Gens ist, welches dementsprechend als *BCR*-Gen bezeichnet wurde. Durch die Analyse zusätzlicher Leukämie-Fälle wurde deutlich, daß die Integrationsstelle des *c-ABL*-Gens auch flankierende Exons der ursprünglich 5.8 kB umfassenden *BCR*-Region betrafen, daher wird diese Stelle als "*major breakpoint region*" bezeichnet. Diese Genregion wird von einer zweiten Region unterschieden, der sogenannten "*minor breakpoint region*", in die das *ABL*-Gen hauptsächlich bei einigen Fällen von akuten lymphatischen Leukämien integriert wird (Rabbitts & Rabbitts, 1989; de Klein *et al.*, 1986). Die *bcr*-Region ist Teil eines Gens, welches sich über ca. 90 kB ausdehnt und aus 20 Exonen besteht. Da ursprünglich eine geringere Anzahl von Exonen gefunden und somit das Startcodon an einer falschen Stelle plaziert wurde, wurden die Exone 10 - 14 auch als *BCR*-Exone b1 - b5 bezeichnet. Da sich aus dieser "falschen" Nomenklatur auch die Bezeichnungen der *BCR/ABL*-Transkript-Varianten herleiten, wurde sie mit der Bezeichnung b1 bis b5 beibehalten.

Das *BCR*-Gen hat eine Größe von 135 kB mit 23 Exonen und führt zur Transkription einer 4.5 kB und eine 6.7 kB mRNA (Heisterkamp *et al.*, 1985, 1988; Campell & Arlinghaus, 1991). Beide mRNAs kodieren für dasselbe 160 kDa große, im Cytoplasma lokalisierte Protein (p160), welches eine Serin-/Threoninkinase-Aktivität besitzt, wobei seine Funktion noch nicht genau geklärt ist (Stam *et al.*, 1987; Lifshitz *et al.*, 1988; Maru & Witte, 1991; Arlinghaus, 1992).

Innerhalb der N-terminalen Domäne besitzt das p160-Protein zwei SH2-bindende Regionen, die wahrscheinlich die nicht-kovalente Bindung zur SH2-Domäne des ABL-Proteins ermöglichen (Arlinghaus, 1992). Die C-terminale Domäne fungiert als GTPase aktivierendes Protein und beeinflusst so die Aktivität von p21<sup>rac</sup> (Dieckmann *et al.*, 1991), sie wird vom *BCR/ABL*-Fusionsgen nicht exprimiert.

### 1.4.4 Philadelphia-Chromosom

Bei über 95 % der Patienten mit CML läßt sich das durch Translokation entstandene verkürzte Chromosom 22, das sogenannte Philadelphia-Chromosom (s. 1.4.1) nachweisen. Es handelt sich hierbei um das eine Produkt einer reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22  $t(9;22)$  an den Bruchstellen 9q34.1 und 22.q11.21 (s. Abb. 1-2). Hierdurch kommt es zu einer Fusion des *c-ABL*-Protoonkogens von Chromosom 9q34 mit dem auf 22q11 lokalisierten *BCR*-Gen, wobei nur das auf dem Chromosom 22 lokalisierte *BCR/ABL*-Fusionsgen eine funktionelle Bedeutung besitzt (de Klein *et al.*, 1982; Bartram *et al.*, 1983; Heisterkamp *et al.*, 1983, 1985).



**Abb. 1-2:** Schematische Darstellung der Entstehung des Philadelphia-Chromosoms durch reziproke Translokation zwischen den beiden langen Armen von Chromosom 9 und 22. Die Haupt-Bruchpunkte (*M-bcr*) innerhalb der jeweiligen Gensequenzen des *c-ABL*- und *BCR*-Gens (*major breakpoint region*) sind durch die roten Linien angedeutet. Nähere Erläuterungen im Text.

Die exakte Lage der Bruchpunkte variiert zwar von Patient zu Patient, aber in 98 % der CML-Patienten liegt er jeweils innerhalb eines 5,8 kB großen Bereiches des *BCR*-Gens, der als *M-bcr* (*major breakpoint cluster region*) bezeichnet wird. Er umfaßt die Exone 10 - 14, die auch als b1 bis b5 bezeichnet werden (s. 1.4.3). Alle distal des jeweiligen Bruchpunktes gelegenen Genregionen werden auf das Chromosom 9 transloziert, die proximal gelegenen verbleiben

auf Chromosom 22 (Heisterkamp *et al.*, 1983, 1985). Der Bruch innerhalb des *c-ABL*-Gens erfolgt üblicherweise proximal von Exon 2 in einer 200 kB großen Region (Ramakrishnan & Rosenberg, 1989). Üblicherweise liegt der Bruchpunkt im Intron zwischen Exon 1A und Exon 1B, selten zwischen den Exonen 1A und 2. Auch wenn das *ABL*-Exon 1A auf das Chromosom 22 transloziert wird, so wird es dennoch nicht transkribiert (Kurzrock *et al.*, 1988). Je nachdem, ob das Exon b3 in dem Hybridgen erhalten ist oder auf Chromosom 9 transloziert wurde, unterscheidet man zwei verschiedene mRNA-Transkriptvarianten b3a2 bzw. b2a2, die sich in ihrer Länge um 75 Bp unterscheiden. Diese ca. 8.5 kB großen mRNAs kodieren beide für ein 210 kDa großes Protein. Weitere Bruchpunkt-Regionen innerhalb des *BCR*-Gens, die als "*minor breakpoint cluster region*" (*m-bcr*: Bruchpunkt im *BCR*-Intron 1, Transkript: e1a2, Protein: p190) oder "*micro breakpoint cluster region*" (*μ-bcr*, Bruchpunkt im Intron 18, Transkript: e19a2, Protein: p230) bezeichnet werden, spielen bei der CML nur eine untergeordnete Rolle (< 3 % der Philadelphia-Chromosom-positiven Fälle).

### 1.4.5 *BCR/ABL*-Fusionsgen

Durch die reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 und der damit einhergehenden Fusion zwischen *BCR*- und *c-ABL*-Gensequenzen auf Chromosom 22 kommt es zur Bildung des 210 kDa großen Fusionsproteins. Dieses besteht aus den ersten 927 (b3a2) bzw. 852 (b2a2) Aminosäuren des *BCR*-Gens und den carboxyterminalen 1097 Aminosäuren des *c-ABL*-Gens (Exone 2 - 11) (Mes-Masson *et al.*, 1986). *BCR/ABL* kann myeloide Zellen transformieren und in Mäusen CML-ähnliche Krankheitsbilder hervorrufen (McLaughlin *et al.*, 1987; Daley *et al.*, 1990). Unterschiedliche Regionen der beiden fusionierten Gene tragen zur Aktivierung des onkogenen Potentials des *c-ABL*-Proteins bei:

- ◆ die aminoterminalen Domäne des *BCR*-Proteins (AS 1 - 63) kodiert für ein Oligomerisierungssignal und induziert die Bildung von *BCR/ABL*-Dimeren und -Tetrameren (McWhirter *et al.*, 1993);
- ◆ eine zweite *BCR*-Domäne (AS 176 - 242), die eine Autophosphorylierungsstelle (Tyrosin 177) enthält, bindet an die SH2-Domäne von *c-ABL*, wodurch die Tyrosinkinaseaktivität deutlich gesteigert wird (Faderl *et al.*, 1999);
- ◆ neben der Bindung an *ABL* bindet die aminoterminalen Domäne des *BCR*-Gens aber auch an weitere Proteine, die eine SH2-Domäne besitzen. Besondere Auswirkungen hat die Bindung des Adaptor-Proteins *GRB2*, welches *BCR/ABL* über *SOS*, als Aktivator, mit der *RAS-RAF1* vermittelten Signalkaskade verbindet und diese somit dereguliert (Pendergast *et al.*, 1993; Puil *et al.*, 1994);



- ◆ eine N-terminale BCR-Region aktiviert zudem eine C-terminale Region von ABL, die zu einer Bindung an F-Aktin führt, wodurch das Protein an das Cytoskelett gekoppelt und somit nicht mehr in den Zellkern transportiert wird, wo c-ABL in gesunden Zellen an der Zellzykluskontrolle beteiligt ist (McWhirter & Wang, 1991, 1993);
- ◆ BCR/ABL aktiviert pathologisch zwei essentielle Regulatoren des Zellzyklus, Cyclin D1 und MYC, und induziert BCL2, welches eine Apoptose der betreffenden Leukämiezellen verhindert (Byrne & Marshall, 1998; Faderl *et al.*, 1999).

## 1.5 Molekulare Diagnostik

Die *BCR/ABL*-Rekombination kann durch verschiedene Techniken auf DNA-, RNA- und Proteinebene nachgewiesen werden.

### 1.5.1 Zytogenetik

In der zytogenetischen Diagnostik werden vornehmlich Mikroskopische Chromosomen-Analysen durchgeführt, d.h. es wird von einer Anzahl präparierter Metaphasezellen der Chromosomensatz (Karyotyp) untersucht. Dies erfolgt durch Anordnen der Chromosomen nach Größe, Form und mittels spezieller Färbetechniken hervorgerufener typischer Bandenmuster (Karyogramm). Auf diese Weise kann die Translokation t(9;22) und somit das Philadelphia-Chromosom nachgewiesen werden. Nach den Bestimmungen des *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (Handen & Klinger, 1985) müssen pro Fall mindestens 10 gut ausgebreitete Metaphasen ausgewertet werden.

### 1.5.2 FISH-Technik (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung)

Die FISH-Technik ermöglicht den Nachweis von Genumlagerungen direkt an den Chromosomen. Sie erlaubt eine verfeinerte Analyse von Metaphasezellen, ist aber auch an Interphasezellen anwendbar. Zum Nachweis bestimmter Rearrangements werden Sondengemische verwendet, die für die jeweiligen Genorte spezifisch sind. Diese Sonden binden direkt an die komplementären DNA-Bereiche der gespreiteten Chromosomen. Durch mikroskopische Auswertung können fluoreszierende Chromosomen- oder Genabschnitte ermittelt sowie numerisch bestimmt und darüber quantifiziert werden. Das Philadelphia Chromosom läßt sich z.B. durch verschiedenfarbig markierte Sonden für das *BCR*- bzw. *ABL*-Gen nachweisen, wenn diese nebeneinander auf dem Chromosom 22 hybridisieren (Ayscue *et al.*, 1990; Werner *et al.*, 1995).

---

### 1.5.3 Southern-Blot-Analyse

Mittels der Southern-Blot-Analyse (Southern, 1975) können klonale Genumlagerungen nachgewiesen werden, indem isolierte DNA mittels bestimmter spezifischer Restriktionsenzyme gespalten, die Restriktionsfragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt und anschliessend auf eine Membran geblottet werden. Mit Hilfe von spezifischen markierten Sonden lassen sich anschließend die z. B. durch Translokation veränderten Spaltmuster nachweisen. Die Southern-Blot-Analyse erlaubt eine semiquantitative Abschätzung der Zu- oder Abnahme eines Genmarker-tragenden Klons.

### 1.5.4 Western-Blot-Analyse

Durch die Western-Blot-Analyse ist der Nachweis des spezifischen BCR/ABL-Proteins direkt in Zellextrakten möglich. Zunächst wird das durch Zelllyse unter Verwendung von Proteaseinhibitoren erhaltene Proteingemisch auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran und anschliessender Detektion mit einem spezifischen ABL-Antikörper können im Proteingemisch die spezifischen BCR/ABL-Banden (p190, p210, p230, etc.) detektiert werden (Guo *et al.*, 1994; Hochhaus *et al.*, 1996).

### 1.5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (Mullis *et al.*, 1986) stellt eine hochsensitive Methode zur selektiven Vervielfältigung definierter DNA- oder RNA-Abschnitte dar. Zwar wäre aufgrund des potentiellen, für die Analyse unerwünschten Abbaus von RNA durch RNasen der Nachweis von Translokationen auf DNA-Ebene von Vorteil, allerdings sind die Bruchpunkte im Fall der t(9;22)-Translokation sehr variabel und kommen in einem weiten Bereich gestreut vor. Andererseits wird ein definiertes Transkript gebildet wird (s. 1.4), deshalb ist über PCR ein eindeutiger Nachweis des *BCR/ABL*-Fusionsgens nur auf RNA-Ebene möglich (Kawasaki *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1988). Zu diesem Zweck muß die RNA vor Durchführung der PCR-Reaktion durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die Methode ist hochsensitiv, bereits geringe Mengen an Blut sind ausreichend, um den Nachweis des Philadelphia-Chromosoms zu erbringen (Hanson *et al.*, 1990). Da aber allein die Detektion, also der Nachweis des Philadelphia-Chromosoms, nicht ausreicht, um Aussagen über "*minimal residual disease*" (s. 1.3.4.1) treffen zu können, wurden semiquantitative PCR-Methoden entwickelt, um den Krankheitsverlauf von CML-Patienten zu belegen (Malinge *et al.*, 1992; Cross, *et al.*, 1993; Lion *et al.*, 1993).

---

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Detektion und exakten Quantifizierung der Transkripte des mit der chronisch myeloischen Leukämie assoziierten *BCR/ABL*-Fusionsgens zu entwickeln. Das *BCR/ABL*-Fusionsgen findet man ausschliesslich in leukämischen Zellen, weshalb es einen idealen Tumormarker für die Analytik darstellt. Die neu zu entwickelnde Methode sollte sich für die Routineanalytik eignen und somit automatisierbar, wenig zeitaufwendig und möglichst sensitiv sein. Der wichtigste Grund für die Entwicklung eines neuen Testsystems war aber, daß die bisher verwendeten Methoden keine oder nur semi-quantitative Aussagen zuließen. Gerade im Fall der chronisch myeloischen Leukämie ist aber eine exakte Quantifizierung notwendig, weil nach erfolgter Therapie in den Patienten weiterhin überprüft werden muß, ob und wieviele Philadelphia-Chromosom-positive Zellen verblieben sind oder neu auftreten (*minimal residual disease*, s. 1.3.4.1). Ein auf der Polymerasekettenreaktion basierendes Testsystem zur möglichst exakten Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes bietet sich hier an, da es zeitsparender, kostengünstiger, vor allem aber sehr viel sensitiver ist, als die bisher verwendeten Methoden (s. 1.5). Die zu konzipierende Methode soll in der klinischen Anwendung helfen, die Frage zu klären, ob es therapeutisch günstig ist, eine erneute Behandlung des Patienten aufgrund eines molekular nachgewiesenen Rezidivs wiedereinzuleiten, obwohl noch keine äußeren Symptome auf ein erneutes Ausbrechen der Krankheit hindeuten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Neben der üblichen Laborausstattung wurden folgende besondere Geräte zur Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet:

Zur Auswertung und Dokumentation ethidiumbromidgefärbter Polyacrylamid- und Agarose-Gele wurde nach Sichtbarmachung der DNA- bzw. RNA-Banden mittels eines UV-Transilluminators (Bachhofer, Reutlingen) ein Videodokumentationssystem mit angeschlossenem Thermoprinter (Intas, Göttingen) verwendet. Die Dokumentation radioaktiver Gele erfolgte mit einem Instant Imager der Firma Canberra Packard. PCR-Reaktionen wurden in einem Perkin Elmer GeneAmp PCR-System 2400 (Applied Biosystems, Weiterstadt) sowie in einem LightCycler der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) durchgeführt. Zur UV-spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA-haltigen Lösungen wurde ein Hitachi-U3000 UV-Spektrometer verwendet. DNA-Sequenzierungen wurden mit einem ABI 373A DNA-Sequencer sowie der Kapillarelektrophorese-Apparatur ABI PRISM 310 Genetic Analyzer durchgeführt. Für die GeneScan-Analysen wurde ebenfalls der ABI PRISM 310 Genetic Analyzer verwendet. Zum Autoklavieren von Gegenständen, Medien und DEPC-haltigen Lösungen wurde ein Autoklav der Firma Tecnomara/Integra Biosciences benutzt. Die Kultur von *E.coli*-Zellen erfolgte in Schüttelwasserbädern der Firmen Labor-und Analysentechnik (Hannover) und New Brunswick Scientific (Nürtingen). Die Elektrotransformation von *E.coli*-Zellen erfolgte mit einem Elektroporator II der Firma Invitrogen (San Diego, USA).

#### 2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Zur Durchführung dieser Arbeit wurden wenn nicht anders angegeben Chemikalien des Reinheitsgrades *pro analysi* von den Firmen Merck, Darmstadt, Sigma, Deisenhofen und Gibco-BRL, Eggenstein eingesetzt. Das verwendete Reinstwasser wurde über ein PRO 90 CN Reinstwasser-System (Seralpur, Ransbach-Baumbach) gewonnen.

### 2.1.3 Enzyme und Systeme

AMV Reverse Transkriptase	Roche Diagnostics
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Roche Diagnostics
<i>Tth</i> DNA-Polymerase	Roche Diagnostics
T4 DNA-Ligase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
T7 RNA-Polymerase	Roche Diagnostic
RNaseA	SERVA, Heidelberg
DNaseI	Promega, Mannheim
SuperScript One-step RT-PCR System	Gibco-BRL, Eggenstein
Titan One Tube RT-PCR System	Roche Diagnostics
Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics
LightCycler - RNA Amplification Kit SYBR Green I	Roche Diagnostics
LightCycler - RNA Amplification Kit Hybridization Probes	Roche Diagnostics
LightCycler - Control Kit RNA	Roche Diagnostics
Restriktionsendonukleasen: <i>HindIII, KspI, NsiI, SalI, StuI</i>	Roche Diagnostics
<i>BamHI, XhoI</i>	MBI Fermentas

## 2.2 Mikrobiologische Arbeiten

Alle für die mikrobiologischen Arbeiten verwendeten Geräte und Lösungen wurden wenn möglich für 30 min bei 121 °C autoklaviert und die Arbeiten unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Nicht näher erläuterte mikrobiologische Standardmethoden können in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1987-1989) nachgelesen werden.

### 2.2.1 Nährmedien

LB-Vollmedium:	10.0	g	Caseinhydrolysat
	5.0	g	Hefeextrakt
	10.0	g	NaCl
	ad 1.0	l	mit Reinstwasser pH 7.5
Festmedien in Petrischalen:	1.0	l	LB-Vollmedium
	15	g	Bacto-Agar (1.5 % (w/v))

Zusatz von Antibiotika für Selektivmedien in entsprechenden Konzentrationen:

Flüssigmedien: 75 µg/ml Ampicillin, 10 µg/ml Tetracyclin

Festmedien: 100 µg/ml Ampicillin, 10 µg/ml Tetracyclin.

---

SOC:	20.0	g	Caseinhydrolysat
	5.0	g	Hefeextrakt
	7.4	g	NaCl
	2.0	g	KCl
	3.6	g	Glucose
	1.27	ml	40 % (w/v) Phytinsäure
ad 1.0	1		mit Reinstwasser pH 7.0
TSS-Medium:	10	% (w/v)	PEG 3300 oder PEG 8000
	5	% (v/v)	DMSO
	50	mM	MgCl <sub>2</sub> oder MgSO <sub>4</sub> pH 6.0 - 6.5

### 2.2.2 Bakterienstämme

#### LK111λ

[*rk<sup>+</sup>mk<sup>+</sup>*, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *tonA21*, *supE44*, *lacI<sup>q</sup>YZΔM15*, Hfr, λ<sup>+</sup>] (Zabeau & Stanley, 1982). Es handelt sich um eine λ-lysogene Variante des Stammes LK111, die eine ins Bakterienchromosom integrierte Kopie des λ-Genoms enthält. Die Expression von Genen, die durch den P<sub>L</sub>-Promotor kontrolliert werden, wird bei diesem Stamm obligat reprimiert.

#### XL1-Blue MRF' strain

[Δ(*mcrA*)183, Δ(*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*)173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac* [F' pro AB *lacI<sup>q</sup>ZΔM15* Tn10 (Tet<sup>r</sup> Amy Cam<sup>r</sup>)]]. Es handelt sich hierbei um einen Stamm ohne funktionsfähiger Endonuklease A (*endA1*), aufgrund dessen er sich gut zur Isolierung von Plasmid-DNA mit hohem Anteil an *supercoiled* DNA eignet. Ausserdem beinhaltet XL1-Blue MRF' ein tetracyclinresistentes F'-Episom, wodurch eine zusätzliche Selektion auf tetracylinhaltigen Medien möglich ist.

### 2.2.3 Humane Zelllinien

Alle hier verwendeten humanen Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Abt. Menschliche und Tierische Zellkulturen der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig bezogen. Sie wurden uns freundlicherweise von der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Gießen (Leukämie-Zelllinien) und dem Institut für Genetik des Fachbereiches Biologie (Hela-Zellen) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der hier aufgeführten Zellen erfolgte in RPMI-1640 und 10 % FCS, bei 37 °C in 8%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

RPMI-1640:	0.85 mg/ml	Na-Bicarbonat
	0.20 mg/ml	PSN-Antibiotika-Mix
	0.08 mg/ml	nicht essentielle Aminosäuren
	0.094 mg/ml	Vitamine
	1.0 mM	Na-Pyruvat
	2.0 mM	L-Glutamin
	10.0 % (v/v)	FCS
	(mit 25 mM HEPES und 0.3 mg/ml L-Glutamin)	

#### K-562

DSM ACC 10

Zell-Typ: humane chronisch myeloische Leukämie-Zelllinie in der Blastenkrise, Zellen tragen das Philadelphia Chromosom mit der b3a2-Fusionsgen-Variante.

Dieser Zelltyp wurde 1970 aus dem Blut einer 53-jährigen Patientin mit CML in der Blastenkrise gewonnen.

in Suspension: große, runde, einzelne Zellen, Zellen produzieren Hämoglobin

hinterlegt von: Dr. J. Minowada, Fujisaki Cell Center, Okayama, Japan

Referenzen: Lozzio *et al.*, 1975; Drexler, 1994.

#### CML-T1

DSM ACC 7

Zell-Typ: humane T-Zell Leukämie-Zelllinie, Zellen tragen die b2a2 Variante des Philadelphia Chromosoms.

Dieser Zelltyp wurde 1987 aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Patientin mit CML in der Blastenkrise gewonnen.

in Suspension: einzelne, runde Zellen

hinterlegt von: Dr. K. Kuriyama, Nagasaki University School of Medicine, Japan

Referenzen: Kuriyama *et al.*, 1989; Drexler, 1994.

**BV-173**

DSM ACC 20

Zell-Typ: humane prä B-Zell Leukämie-Zelllinie, enthält t(9;22) mit der b2a2-Fusionsgen-Variante.

Dieser Zelltyp wurde 1980 aus dem peripheren Blut eines 45-jährigen Patienten mit CML in der Blastenkrise gewonnen.

in Suspension: große, runde, einzelne Zellen

hinterlegt von: Dr. J. Minowada, Fujisaki Cell Center, Okayama, Japan

Referenzen: Pegoraro *et al.*, 1983; Drexler *et al.*, 2000.

**HL-60**

DSM ACC 3

Zell-Typ: humane akute myeloide Leukämie-Zelllinie

Dieser Zelltyp wurde 1976 aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Patientin mit AML (FAB M2) gewonnen.

in Suspension: runde, einzelne Zellen

hinterlegt von: Dr. E. Porfiri, The Royal Free Hospital, Department of Haematology, London, United Kingdom

Referenzen: Collins *et al.*, 1977; Dalton *et al.*, 1988.

**HELA**

DSMZ ACC 57

Zell-Typ: humane Cervix-Karzinom-Zelllinie

Dieser Zelltyp wurde 1951 aus dem epitheloiden Cervix-Karzinom einer 31-jährigen Patientin gewonnen; spätere Diagnose: Adenokarzinom.

Morphologie: epithelial-ähnliche Zellen, wachsen in Monolayern

hinterlegt von: Dr. W. F. Scherer

Referenzen: Scherer, *et al.*, 1953.



## 2.2.4 Plasmide und Vektoren

**pBluescript SK(+)** (Stratagene) ist ein Vektor von ca. 2.9 kb Größe, der ein *lacZ*-Genfragment, den *lac*-Promotor, den Replikationsursprung des f1-Phagen und eine Kopie des Ampicillin-Resistenzgens enthält. Über eine *multiple cloning site (mcs)* mit diversen Restriktionsschnittstellen können DNA-Fragmente eingefügt werden. Da diese *mcs* innerhalb des *lacZ*-Genfragmentes liegt, kann in einem geeigneten *E.coli*-Stamm, z.B. XL1-Blue MRF' strain (s. 2.1.2), ein  $\alpha$ -Komplementationsassay (*blue-white screening*) durchgeführt werden. Dies erleichtert die Suche positiver Klone nach Transformation des Vektors in die entsprechenden *E.coli*-Zellen. Ausserdem wird durch verschiedene Phagenpromotoren (T3, T7, Sp6), die direkt benachbart zur *mcs* angeordnet sind, eine *in-vitro*-Transkription ermöglicht.

Das Plasmid **pBSBA7** wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. G. Sczakiel vom Deutschen Krebsforschungs-Zentrum in Heidelberg überlassen. Es handelt sich hierbei um den Vektor **pBlueScript M13-** (Stratagene), in den an der *SmaI*-Restriktionsschnittstelle der *multiple cloning site* ein 601 Bp umfassendes b3a2-Genfragment des *BCR/ABL*-Fusionsgens kloniert wurde. Auch bei diesem Vektor wird durch verschiedene Phagenpromotoren (T3, T7, Sp6), die direkt benachbart zur *mcs* angeordnet sind, eine *in-vitro*-Transkription ermöglicht.

## 2.2.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

### 2.2.5.1 Elektrokompente *E.coli*-Zellen

Für eine Elektrotransformation von *E.coli*-Zellen müssen sowohl die zu transformierende DNA als auch die eingesetzte Zellesuspension möglichst salzfrei sein. Dies wird bei den Zellen durch wiederholtes Waschen mit Wasser erreicht. Die Zelldichte der Hauptkultur sollte nicht höher als  $10^6$ /ml sein, da ansonsten Zellfusion statt Elektroporation im Hochspannungsfeld erfolgt.

Durchführung:

- 50 ml Vorkultur im Selektivmedium über Nacht bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubieren
- anschliessend 10 ml dieser Vorkultur in 500 ml LB-Medium bis zu einer Zelldichte von  $1 \text{ OD}^{600 \text{ nm}}$  wachsen lassen
- Kultur in einen vorgekühlten 500ml-Zentrifugenbecher überführen und 30 Minuten auf Eis inkubieren (0 °C)
- 15 min bei 4000 rpm, 0 °C zentrifugieren

- Zellen in 500 ml eiskühlem sterilen Wasser resuspendieren
- zentrifugieren: 15 min, 4000 rpm, 0 °C
- Zellen in 40 ml eiskalter, steriler 10%iger Glycerinlösung resuspendieren und erneut zentrifugieren (15 min, 4000 rpm, 0 °C)
- Zellen erneut in 2 ml 10%iger steriler Glycerinlösung resuspendieren
- in 80µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- anschliessend bei -70 °C lagern

### 2.2.5.2 TSS-kompetente *E.coli*-Zellen

Die TSS-Methode (*transformation storage solution*, Chung *et al.*, 1989) zeichnet sich durch einfache Handhabung und eine hohe Transformationseffizienz aus. Mit TSS behandelte Zellen sind sofort zur Transformation einsetzbar.

Durchführung:

- 25 ml Vorkultur über Nacht bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubieren
- anschliessend 1 ml dieser Vorkultur in 100 ml LB-Medium bis zu einer Zelldichte von 0.5 OD<sup>600 nm</sup> wachsen lassen
- 10 min bei 3500 rpm (3480 x g), 4 °C zentrifugieren (Beckmann 36 HC, Rotor Ty-3s-4.2)
- auf Eis lagern
- Zellpellet in 10 ml 4 °C kaltem TSS (s. 2.2.1) resuspendieren
- Zellsuspension aliquotieren à 200 µl und in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- anschliessend bei -70 °C lagern, TSS-kompetente Zellen behalten ihre Kompetenz für ca. 3 bis 6 Monate.

## 2.2.6 Transformation kompetenter Bakterienzellen

### 2.2.6.1 Transformation elektrokompeter *E.coli*-Zellen

- 80µl-Aliquot elektrokompeter Zellen auf Eis auftauen
- mit 10 pg - 200 ng salz- und proteinfreier Plasmid-DNA mischen, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführen und diese verschliessen
- zur Transformation werden die Zellen bei einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 1700 V für 5 ms ausgesetzt
- Zugabe von 1 ml SOC-Medium (s. 2.2.1) in die Elektroporationsküvette, mischen und die Mischung in ein frisches Eppendorfgefäß überführen
- 1 h bei 37 °C inkubieren

- 1 min bei 12 000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren, überstehendes Medium dekantieren
- Zellen im restlichen Medium (ca. 100 µl) resuspendieren und auf einer Selektivplatte ausstreichen.

### 2.2.6.2 Transformation TSS-kompetenter *E.coli*-Zellen

- 200µl-Aliquot TSS-kompetenter Zellen auf Eis auftauen
- mit 10 ng - 2 µg gelöster Plasmid-DNA mischen
- 1 h auf Eis inkubieren (0 °C)
- 3 min Hitzeschock bei 42 °C zur Verbesserung der Transformationseffizienz
- Zugabe von 800 µl sterilem LB-Vollmedium (s. 2.2.1)
- 1 h bei 37 °C inkubieren
- 1 min max. rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren, überstehendes Medium dekantieren
- Zellen im restlichen Medium (ca. 100 µl) resuspendieren und auf einer Selektivplatte ausstreichen

## 2.3 Molekularbiologische Arbeiten

### 2.3.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle von Plasmidpräparationen und Restriktionsspaltungen wurden die Proben mit 0.2 Vol. Agaroseauftragspuffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch Elektrophorese in 0.8 – 1.5%igen Agarosegelen in TBE-Puffer bei RT und maximal 10 V/cm. Die Gele wurden in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und die DNA-Banden mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Bachofer) durch Anregung bei 312 nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Videosystems (INTAS) als Thermoausdruck oder Datenfile.

Agaroseauftragspuffer:	250	mM	EDTA
	0.2	% (w/v)	SDS
	25	% (w/v)	Saccharose
	0.1	% (w/v)	Bromphenolblau
	0.1	% (w/v)	Xylencyanol FF
			pH 8.0
TBE-Puffer:	100	mM	Tris
	100	mM	Borsäure
	2.5	mM	EDTA
			pH 8.3

### 2.3.2 Analytische Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse von PCR-Produkten bzw. Restriktionsfragmenten < 1100 Bp wurden 6- 15%ige (w/v) Polyacrylamidgele (Acrylamid : Bisacrylamid 29 : 1, 0.2 % (v/v) TEMED, 0.08 % (w/v) APS) im Format 10 x 10 x 0.1 cm angefertigt. Die Elektrophorese erfolgte in TPE-Puffer bei einer Stromstärke von 45 mA. Die Auswertung erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben.

TPE-Puffer:	80	mM	Tris-Phosphat
	2	mM	EDTA
			pH 8.2

### 2.3.3 Präparative Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse von *in vitro* generierten RNA-Transkripten im Größenbereich von 600 bis 800 Basen wurden 20 x 20 x 0.1 cm große denaturierende (7 M Harnstoff) 10%ige (w/v) Polyacrylamidgele (Acrylamid : Bisacrylamid 19 : 1, 0.2 % (v/v)TEMED, 0.08 % (w/v) APS) eingesetzt. Das Gel wurde für ca. 1h einem Vorlauf bei 27 W unterzogen, als Laufpuffer wurde 1x TBE (s. 2.2.1) verwendet. Die Proben, ca. 500 ng RNA-Transkript, wurden mit 0.5 Vol. RNA-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 3 Minuten denaturiert, anschliessend auf Eis abgeschreckt und sofort auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte dann ebenfalls bei 27 W für 3 h. Die Sichtbarmachung der Banden erfolgte dabei entweder durch Ethidiumbromidfärbung und Dokumentation wie unter 2.2.1 beschrieben oder über *shadow-casting*. Hierzu werden die Gele nach dem Lauf direkt auf eine unter UV-Auflicht (325 nm) fluoreszierende Dünnschichtplatte gelegt, wobei Nukleinsäurebereiche als Schatten sichtbar werden. Die Präparation der Fragmente erfolgte durch Ausschneiden und Eluieren der gewünschten Banden über Nacht in 1 ml RNA-SDS-Elutionspuffer, die Dokumentation mit Hilfe des Videodokumentationssystems (s. 2.2.1).

RNA-Ladepuffer:	5	mM	Tris
	5	mM	Borsäure
	1	mM	EDTA
	0.01	% (w/v)	Xylencyanol FF
	0.01	% (w/v)	Bromphenolblau
	10	M	Harnstoff
			pH 8.0

RNA-SDS-Elutionspuffer:	0.5	M	Ammoniumacetat
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	0.1	mM	EDTA
	0.1	% (w/v)	SDS

## 2.3.4 Plasmid-Präparationen

### 2.3.4.1 Plasmid-Präparationen im kleinen Maßstab

Ausgehend von einer 3ml-Kultur wurden Mini-Plasmid-Präparationen mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN, Hilden oder Nucleo Spin Plus von Macherey/Nagel, Düren nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die Elution erfolgte jeweils in 100 µl Reinstwasser.

### 2.3.4.2 Plasmid-Präparationen im großen Maßstab

Zur Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA mit einem hohen Reinheitsgrad wurde eine Plasmid-Maxi-Präparation durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979; Ish-Horowitz & Burke, 1981), differentieller Nukleinsäure-Präzipitation und anschließender Polyethylenglycol 8000-Fällung (Sambrook *et al.*, 1989). Das nachfolgende Protokoll bezieht sich auf die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 500ml-Kultur:

- Vorkultur: 25 ml Selektivmedium animpfen und 8 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad wachsen lassen
- Hauptkultur: 500 ml Selektivmedium mit 10 ml der Vorkultur animpfen und über Nacht im Schüttelwasserbad bei 37 °C wachsen lassen
- Zellernte: 500ml-Kultur in einen Zentrifugenbecher überführen und 15 min bei 3000 rpm, JS-4.2-Rotor, 4 °C zentrifugieren
- Waschen: Überstand verwerfen, Pellet in 40 ml eiskaltem STE resuspendieren
- Zentrifugieren: wie oben 15 min, 3000 rpm, 4 °C
- Lysieren: Pellet in 20 ml Lösung I mit 80 mg Lysozym resuspendieren, in einen 100ml-Erlenmeyerkolben überführen und 15 min bei RT inkubieren, 40 ml Lösung II (frisch aus 8 ml 1 N NaOH, 4 ml 10 % (w/v) SDS und 28 ml H<sub>2</sub>O) zufügen, schütteln, 10 min auf Eis inkubieren, 30 ml Lösung III zufügen, schütteln und 30 min auf Eis inkubieren
- Zentrifugieren: 20 min, 20 000 rpm, 4 °C, JA 20-Rotor
- 1. Fällung: Überstand durch einen Faltenfilter filtrieren, 0.6 Vol. (54 ml) 2-Propanol zufügen und 10 min bei RT inkubieren
- Zentrifugieren: 30 min, 5000 rpm, RT, JA 14-Rotor, Überstand vollständig abziehen und Pellet im Vakuum trocknen
- Aufnehmen: Pellet in 3 ml TE aufnehmen
- RNA-Präzipitation: 1 Vol. (3 ml) 5 M LiCl zufügen und gut mischen
- Zentrifugieren: 10 min, 10 000 rpm, 4 °C, JA 20-Rotor

- 2. Fällung: 1 Vol (6 ml) 2-Propanol zufügen
- Zentrifugieren: 10 min, 10 000 rpm, RT, JA 20-Rotor
- Waschen: Überstand verwerfen und 10 ml 70 % EtOH zufügen
- Zentrifugieren: 5 min, 10 000 rpm, RT, JA 20-Rotor, Überstand vollständig abziehen und Pellet im Vakuum trocknen
- Aufnehmen: Pellet in 500 µl TERNase aufnehmen und in ein 2ml-Eppendorfgefäß überführen, 30 min bei RT inkubieren
- 3. Fällung: 500 µl PEGS zufügen und gut mischen
- Zentrifugieren: Tischzentrifuge 5 min, max. rpm, 4 °C
- Extraktion: Überstand vollständig abziehen, Pellet trocknen, in 400 µl TE aufnehmen und extrahieren mit
  - a) 1 Vol. (400 µl) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1)
  - b) 1 Vol. (400 µl) Chloroform
 die wässrige Phase jeweils in ein frisches Eppendorfgefäß überführen
- 4. Fällung: mit 100 µl 10 M NH<sub>4</sub>Ac (125 µl 8 M) versetzen, mischen, 2 Vol (ca. 1 ml) 100 % EtOH zusetzen, 10 min bei RT inkubieren
- Zentrifugieren: Tischzentrifuge 5 min, max. rpm, 4 °C
- Waschen: Überstand verwerfen, 200 µl 70 % EtOH zufügen, vortexen
- Zentrifugieren: Tischzentrifuge 5 min, max. rpm, 4 °C
- Aufnehmen: Überstand vollständig abziehen, Pellet trocknen, in 200 - 500 µl Reinstwasser aufnehmen, aliquotiert bei -20 °C lagern.

Erforderliche Puffer und Lösungen für die Plasmid-Präparation im großen Maßstab:

STE	100 mM NaCl	
	10 mM Tris-HCl, pH 8.0	
	1.0 mM EDTA	
Lösung I	50 mM Glucose	
	25 mM Tris-HCl, pH 8.0	
	10 mM EDTA	
	Lagerung bei 4 °C	
Lösung II	0.2 N NaOH	
	1 % (w/v) SDS	
	20 ml / 500 ml Kultur frisch ansetzen	
Lösung III	3 M KAc	36.0 ml
	100 % HAc	11.5 ml
	H <sub>2</sub> O	28.5 ml

---

TE	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
5 mM LiCl	21.2 g LiCl ad 100 ml H <sub>2</sub> O
TERNase	RNaseA (10 mg/ml in TE) mit TE 1/500 verdünnen
PEGS	1.6 M NaCl 13 % (w/v) PEG 8000
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Chloroform	im Volumenverhältnis 24/24/1

## 2.3.5 RNA-Isolierung

### 2.3.5.1 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von Ribonukleasen

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die meist keinen Cofaktor zur Ausübung ihrer Funktion benötigen. Da es sehr schwierig ist, RNasen zu inaktivieren und bereits geringste Mengen ausreichen, um RNA zu zerstören, sollten stets folgende allgemeine Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden:

- ◆ nur RNase-freie Glas- und Plastikbehältnisse verwenden
  - Plastikbehälter mit 0.1 M NaOH, 1 mM EDTA und RNase-freiem Wasser spülen
  - Glasbehältnisse können mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) (0.1 % (v/v)) behandelt und anschliessend autoklaviert werden
- ◆ Handschuhe verwenden und häufig wechseln
- ◆ sterile Reaktionsgefässe (Eppendorf, Sarstedt) verwenden
- ◆ Elektrophorese-Behälter können mit Detergentien, z.B. 0.5 % (w/v) SDS, behandelt und mit Ethanol getrocknet werden. Anschliessend werden sie mit einer 3%igen (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung gefüllt, 10 min bei RT inkubiert und abschließend mit RNase-freiem Wasser gespült.
- ◆ Alle zu verwendenden Lösungen werden mit 0.1 % (v/v) DEPC versetzt und nach kräftigem Schütteln autoklaviert. Puffer, die TRIS enthalten, können nicht direkt mit DEPC versetzt werden, da DEPC mit primären Aminen reagiert. Daher müssen diese Puffer mit bereits autoklaviertem DEPC-behandeltem Wasser angesetzt werden.

- ♦ Quarzküvetten, die zur Konzentrationsbestimmung der RNA verwendet werden, sollten mit 0.1 M NaOH, 1 mM EDTA und anschliessend mit RNase-freiem Wasser gespült werden, speziell dann, wenn die RNA nach spektrophotometrischer Konzentrationsbestimmung weiter verwendet wird.
- ♦ Das Pipettieren erfolgt mit einem separaten Pipettensatz unter Verwendung von Sterilfilter-Pipettenspitzen (ART Sterilfiltertips, Fisher Scientific).

### 2.3.5.2 Verwendete Ribonuklease-Inhibitoren

- ♦ RNAGuard RNase Inhibitor (Pharmacia): Protein aus humaner Placenta, bildet nichtkovalente äquimolare Komplexe mit RNAsen, ist allerdings nicht unter denaturierenden Bedingungen einsetzbar;
- ♦ Diethylpyrocarbonat: Behandlung der Puffer, inaktiviert RNAsen durch kovalente Modifikationen, muss durch Autoklavieren inaktiviert werden;
- ♦  $\beta$ -Mercaptoethanol: hat eine reduzierende Wirkung;
- ♦ Guanidiniumisothiocyanat: in Verbindung mit dem Zellaufschluss, denaturiert RNAsen (meist reversibel).

### 2.3.5.3 RNA-Isolierung aus Kultur-Zellen

Die Gewinnung von RNA aus verschiedenen humanen Zelllinien (s. 2.1.3) erfolgte aus  $1 \times 10^6$  (CML-Zelllinien) bis  $7 \times 10^7$  (Hela-Zellen) Zellen. Die Zellen wurden in ihrem entsprechenden Kultur-Medium (s. 2.1.3) für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Medium restlos entfernt, die sedimentierten Zellen mit 1 bzw. 4 ml PBS (s.u.) gewaschen und nochmals w.o. zentrifugiert.

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den sedimentierten Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden, dem High Pure RNA Isolation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, oder dem Nucleo Spin RNA Kit der Firma Macherey/Nagel, Düren für die CML-Zelllinien. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Hela-Zellen erfolgte mit dem RNeasy Midi Kit der Firma Qiagen, Hilden. Die Isolierungen erfolgten nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Das RNeasy Mini bzw. Midi Kit (Qiagen, Hilden) unterscheidet sich insofern von den anderen Protokollen, als daß hier kein obligatorischer DNase I-Verdau durchgeführt wird. Es besteht aber die Möglichkeit, diesen Schritt mit Hilfe des RNase free DNase Sets (Qiagen, Hilden) zusätzlich durchzuführen.

Die Gewinnung von mRNA aus Kulturzellen wurde mit dem mRNA Isolation Kit von Roche Diagnostics nach Angaben des Herstellers durchgeführt.



Die Elution der RNA erfolgte für die CML-Zelllinien in 30 bis 50 µl RNase freiem Wasser, für die HELA-Zellen in 250 µl RNase freiem Wasser.

PBS: 137.0 mM NaCl  
2.7 mM KCl  
8.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7.4

#### 2.3.5.4 RNA-Isolierung aus Patientenblut

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus EDTA-Blut erfolgte mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden. Es wurde jeweils 1 ml Blut eingesetzt und die RNA nach Angaben des Herstellers präpariert, wobei ein zusätzlicher DNase I Verdau auf der Säule mit dem RNase free DNase Set (Qiagen, Hilden) durchgeführt wurde. Die Elution erfolgte jeweils in 50 µl RNase freiem Wasser.

#### 2.3.5.5 RNA-Isolierung aus tiefgefrorenen vitalen Zellen

Die in RPMI-1640 (s. 2.1.3) + 20 % FTS +20 % DMSO bei -70 °C gelagerten Zellen wurden nach Auftauen für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit 200 µl PBS (s. 2.2.5.3) gewaschen und nochmals w.o. zentrifugiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte anschliessend mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden nach Angaben des Herstellers.

### 2.3.6 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die DNA- und RNA-Konzentration von Lösungen wurde UV-spektroskopisch mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Hitachi U3000 UV-VIS Spektrophotometer). Hierzu wurde ein UV-Spektrum im Bereich zwischen 220 und 320 nm aufgenommen. Die Konzentrationsberechnung beruht auf der Annahme, daß eine Nukleinsäure-Lösung bei 1 OD<sub>260</sub> 50 µg/ml doppelsträngige DNA enthält. Nicht basengepaarte Nukleinsäuren besitzen eine höhere Absorption (Hyperchromie-Effekt), daher beträgt der OD-Wert für nur partiell doppelsträngige RNA 40 µg/ml (Ausubel *et al.*, 1987-89). Zur Beurteilung der Güte einer Nukleinsäure-Präparation kann das Verhältnis von E<sub>260</sub> : E<sub>280</sub> herangezogen werden. Dies sollte für eine DNA-Präparation idealerweise zwischen 1.6 und 1.9 liegen und bei einer RNA-Präparation bei 2.0. Kleinere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

## 2.3.7 Oligonukleotide

### 2.3.7.1 Datenbankrecherche

Um die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide zu planen, benötigt man zunächst die Sequenzen der betreffenden Gene. Die entsprechenden Gensequenzen wurden mit Hilfe des Internets in der Gendatenbank des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, [2]) gesucht. Diese gut organisierte Datenbank läßt gleichzeitig die Suche nach Pseudogenen zu, welches ein wichtiges Kriterium für die Auswahl der Kontrollgene darstellt. Unter den folgenden Zugangs Nummern sind die hier verwendeten Gensequenzen in der NCBI-Datenbank abgespeichert: *ABL*-Gen Acc. Nr. U07563 und M14752, *BCR*-Gen Acc. Nr. U07000 und X02596, *PBGD*-Gen Acc. Nr. M95623, *GAPDH*-Gen Acc. Nr. M002046.

Mit Hilfe des Programmes SEMAP (Dr. C. Urbanke, Medizinische Hochschule Hannover) wurden Restriktionsschnittstellen-Analysen der entsprechenden Gen- und Vektor-Sequenzen durchgeführt, zu erwartende Restriktionsfragmente berechnet sowie Klonierungsexperimente geplant.

### 2.3.7.2 Planungskriterien für Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer und Hybridisierungssonden wurden mit Hilfe des Programmes Oligo (National Biosciences) geplant. Bei der Planung wurden folgende Kriterien beachtet:

- ♦ PCR-Primer und Sonden sollten keine selbst- und miteinander komplementären Sequenzbereiche aufweisen;
- ♦ es sollten keine weiteren Primer- bzw. Sonden-Bindungsstellen in dem zu analysierenden *template* vorhanden sein;
- ♦ es sollten keine stabilen *hairpin*- oder *stem-loop*-Strukturen ausgebildet werden können;
- ♦ das 3'-Ende sollte möglichst eine geringere Stabilität aufweisen, um eine optimale Spezifität während des Annealing zu gewährleisten;
- ♦ die Primer eines Primerpaares sollten möglichst gleiche  $T_m$ -Werte aufweisen

### 2.3.7.3 Verwendete PCR-Primer

Die in dieser Arbeit für die PCR-Reaktionen als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Diese Oligonukleotide waren HPSF-gereinigt und wurden aliquotiert bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Primer für die inverse PCR-Mutagenese:

Mut-s	5'-ATA GGC CTC TCC CTG ACA TCC GTG GA-3'
Mut-as	5'-ATA GGC CTC TGA AAC ACT TCT TCT GCT G-3'

Primer zur Amplifikation des *BCR/ABL*-Fusionsgens:

bcr(1)	5'-AAC GGC AAG AGT TAC ACG TT-3'
abl(2)	5'-AGA CCC TGA GGC TCA AAG TC-3'
abl(2)-FAM	5'-FAM-AGA CCC TGA GGC TCA AAG TC-3'
bcr(2)	5'-ACG TTC CTG ATC TCC TCT GA-3'
abl(1)	5'-AGA TGC TAC TGG CCG CTG AA-3'
abl(1)-FAM	5'-FAM-AGA TGC TAC TGG CCG CTG AA-3'

Primer zur Amplifikation des *PBGD*-Gens:

pbgd-H-XhoI	5'-CCG CTC GAG ATG TCT GGT AAC GGC AAT G-3'
pbgd-R-BamHI	5'-GCG GGA TCC TTA ATG GGC ATC GTT AAG CT-3'
pbgd3*	5'-GGC TGC AAC GGC GGA AGA AAA C-3'
pbgd8*	5'-TTG CAG ATG GCT CCG ATG GTG AAG-3'

\*Nagel *et al.*, 1996

Primer zur Amplifikation des *GAPDH*-Gens:

GAP-H-XhoI	5'-CCG CTC GAG ATG GGG AAG GTG AAG GTC G-3'
GAP-R-BamHI	5'-GCG GGA TCC TTA CTC CTT GGA GGC CAT GT-3'
GAP-for*	5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GCT-3'
GAP-rev*	5'-ATG GCA TGG ACT GAG GTC ATG-3'

\*Dr. Ahmet Elmaagacli, pers. Mitteilung

Primer spezifisch für die Vektoren pBluescript SK(+) und pBluescript M13- (Stratagene)

pBS-T3	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'
pBS-T7	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'

### 2.3.7.4 Hybridisierungssonden

Die verwendeten Hybridisierungssonden für die Detektion der entstandenen PCR-Produkte mittels des LightCyclers wurden in HPLC-gereinigter Form von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen und in Aliquots bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

LightCycler-Sonden für das *BCR/ABL*-Gen:

LC(1)-up	5'-GCA GAG TGG AGG GAG AAC ATC CGG GAG CAG CAG AA-Fluo-3'
LC(2)-WT-down	5'-LC Red640-AAG TGT TTC AGA AGC TTC TCC CTG AC-P-3'

LightCycler-Sonden für das *PBGD*-Gen:

pbgd(1)-up	5'-GCA ACA TTG AAA GCC TCG TAC CCT GGC CTG CAG TTT-Fluo-3'
pbgd(2)-down	5'-LC Red640-AAA TCA TTG CTA TGT CCA CCA CAG GG-P-3'

LightCycler-Sonden für das *GAPDH*-Gen:

GAP-up*	5'-ATC ATC AGC AAT GCC TCC TGC ACC ACC AAC TGC T-Fluo-3'
GAP-down*	5'-LC Red640-AGC ACC CCT GGC CAA GGT CAT CCA T-P-3'

\*Dr. Ahmet Elmaagacli, pers. Mitteilung

## 2.4 Generierung von Standard-RNA

### 2.4.1 Erstellung eines *BCR/ABL*-Standards durch inverse PCR-Mutagenese

Für die quantitative kompetitive PCR wurde ein Standard benötigt, der mit denselben Primern wie die Zielsequenz coamplifiziert werden kann. Im Idealfall sollte der interne Standard (IS) die gleiche Größe und eine in nur wenigen Nukleotiden abweichende Sequenz wie das Zielgen besitzen. Der hier benötigte interne *BCR/ABL*-Standard wurde durch inverse PCR-Mutagenese (Blum *et al.*, 1994; Meiss *et al.*, 1998) erzeugt. Eine schematische Darstellung dieses Verfahrens wird in Abbildung 3-1 im Kapitel Ergebnisse gezeigt. Bei diesem Verfahren wird mit zwei Primern ein komplettes Plasmid in seiner ursprünglichen Länge amplifiziert. Als *template* für die inverse PCR-Mutagenese diente das Plasmid pBSBA7 (s. 2.1.4). Durch zwei Primer, die jeweils in ihrem 5'-Überhang eine neue Restriktionsschnittstelle tragen, wurde eine im Zielgen singuläre *HindIII*-Restriktionsschnittstelle in eine ebenfalls singuläre *StuI*-Schnittstelle umgewandelt.

Ansatz für die inverse PCR:	80	ng	pBSBA7-DNA
	0.1	Vol	10x Puffer2, Expand Long Template
	500	µM	eines jeden dNTPs
	0.3	µM	Primer Mut-s
	0.3	µM	Primer Mut-as
	5	U	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
ad	50	µl	Reinstwasser

Die Amplifikation erfolgte in einem Perkin Elmer GeneAmp 2400 System unter folgenden Bedingungen:

Segment	Wiederholung	Prozeß	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	1	Denaturierung	94	120
2	10	Denaturierung	94	15
		Hybridisierung	60	30
		Primerextension	68	240
3	12	Denaturierung	94	15
		Hybridisierung	60	30
		Primerextension	68	240*
4	1	Primerextension	68	420
5	1	Abkühlung	4	∞

\* Zeitinkrement von 20 s pro Zyklus

Die PCR-Produkte wurden mittels des QIAquick Spin PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und die Länge der Amplifikate auf einem analytischen Agarosegel (s. 2.2.1) kontrolliert.

## 2.4.2 Erstellung von Standards für Kontrollgene

Um die nach Datenbankrecherche (s. 2.2.7.1) ausgewählten Kontrollgene (*PBGD* und *GAPDH*) in geeignete Vektoren klonieren zu können, wurden die kompletten cDNA-Sequenzen amplifiziert. Die Amplifikation beider cDNAs erfolgte mit den unter 2.2.7.3 aufgeführten Primern, die jeweils als Überhang eine *XhoI* bzw. *BamHI*-Restriktionsschnittstelle für die Klonierung in den Vektor pBluescript SK(+) enthalten. Als *template* für die PCR wurde isolierte Gesamt-RNA aus K562-Zellen (s. 2.1.3) verwendet, die RT-PCR wurde mit dem SuperScript One-Step RT-PCR System (s. 2.5.1.2.3), Gibco BRL, durchgeführt.

100 µl PCR-Ansatz:	100 ng	<i>template</i> , K562-Gesamt-RNA
	50 µl	2x Reaction Mix*, Gibco BRL
	10 µl	Primer pbgd- bzw. GAP-H- <i>XhoI</i> , 4 µM
	10 µl	Primer pbgd- bzw. GAP-R- <i>BamHI</i> , 4µM
	5 µl	RNAguard RNase Inhibitor, 36 U/µl, Pharmacia
	1 µl	SuperScript II RT/ <i>Taq</i> -Mix, Gibco BRL
ad	100 µl	Reinstwasser

\*Puffer mit 0.4 mM jedes dNTPs, sowie 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>

Die Amplifikation erfolgte in einem Perkin Elmer GeneAmp 2400 System unter folgenden Bedingungen:

Segment	Wiederholung	Prozeß	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	1	Reverse Transkription	55	1200
2	1	Denaturierung	94	180
3	40	Denaturierung	94	30
		Hybridisierung	52	30
		Primerextension	72	90
4	1	Primerextension	72	420
5	1	Abkühlung	4	∞

Die PCR-Produkte der jeweiligen Kontrollgene wurden auf 6%ige (w/v) analytische Polyacrylamidgele (s. 2.2.2) aufgetragen, um die Länge der Amplifikate zu kontrollieren.

Nach Detektion der richtigen Genlängen wurden die PCR-Produkte über das QIAquick Spin PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

### 2.4.3 Restriktionsspaltung von Vektoren und PCR-Produkten

Restriktionsspaltungen wurden nach Angaben der Hersteller mit verschiedenen Restriktionsenzymen (s. 2.1.3) in den mitgelieferten 10fach Puffern durchgeführt. Die Spaltung erfolgte in einem Aluminium-Wärmeblock bei 37 °C für 1-2 h.

Die durch inverse PCR-Mutagenese generierten linearen Amplifikate (s. 2.3.1) wurden mit Hilfe der neu eingeführten Restriktionsschnittstelle einer Spaltung mit *StuI* (Roche Diagnostics) unterzogen, um kohäsive Enden zu erzeugen. Nach Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen wurden sie einer Zirkularisierungsreaktion zugeführt.

Der Vektor pBluescript SK(+) (s. 2.1.4) und die einzufügenden DNA-Fragmente in Form von PCR-Produkten aus 2.3.2 wurden gleichzeitig mit *BamHI* und *XhoI* (MBI-Fermentas) gespalten. Der Doppelverdau mit beiden Enzymen ist durch Zugabe des Puffers Y+Tango, MBI-Fermentas (1x Puffer: 33 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesium-Acetat, 66 mM Kalium-Acetat, 0.1 mg/ml BSA, pH 7.9 bei 37 °C) möglich. Diese Spaltansätze wurden ebenfalls über das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, in 50 µl Reinstwasser eluiert und anschliessend in die Ligationsreaktion eingesetzt.

### 2.4.4 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4 DNA Ligase

Zur Verknüpfung von doppelsträngiger DNA wurde die DNA-Ligase aus dem *E.coli*-Phagen T4 eingesetzt. Die T4 DNA-Ligase verbindet 3'-OH und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA kovalent miteinander. Je nachdem, ob DNA-Fragmente mit einem Vektor verknüpft werden sollten oder die Zirkularisierung von Plasmiden nach erfolgter inverser PCR-Mutagenese angestrebt wurde, wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen gewählt:

DNA/Vektor Ligationsreaktion: 1.0 µl Vektor [ca. 100 ng]  
50.0 µl PCR-Produkt  
6.0 µl 10x Ligationspuffer, MBI-Fermentas  
ad 60.0 µl Reinstwasser  
5 min 45 °C, dann auf Eis abschrecken  
0.5 µl T4 DNA-Ligase, 2.5 U/µl, MBI-Fermentas

---

Zirkularisierungs-Reaktion:	1.0 $\mu$ l	Vektor [ca. 50 - 100 ng]
	10.0 $\mu$ l	10x Ligationspuffer, Roche Diagnostics
	2.0 $\mu$ l	T4 DNA-Ligase, 5 U/ $\mu$ l, Roche Diagnostics
	ad 100.0 $\mu$ l	Reinstwasser

Die Ligation erfolgte in beiden Fällen über Nacht bei 16 °C. Anschließend wurde die Ligase durch Erhitzen für 20 min auf 65 °C denaturiert. Die ligierte DNA wurde mit 1  $\mu$ g Glykogen als Fällungshilfe mit EtOH und Ammoniumacetat präzipitiert. Das Pellet wurde dann in 4  $\mu$ l Reinstwasser aufgenommen, wovon 2  $\mu$ l für die Elektrotransformation verwendet wurden.

### 2.4.5 *Screening* auf positive Klone

Von den nach der Transformation erhaltenen Klonen wurden ca. 10 Klone gepickt, auf neue Platten ausgestrichen sowie anschliessend in 30  $\mu$ l Reinstwasser aufgenommen. Diese Lösung wurde nach Erhitzen auf 95 °C als *template* in eine *Screening*-PCR eingesetzt. Die PCR wurde mit den Primern pBS-T3 und pBS-T7 (s. 2.2.7.3) durchgeführt. Mit diesen vektorspezifischen Primern wird der gesamte Insertionsbereich des Vektors amplifiziert.

PCR-Ansatz:	2.0 $\mu$ l	<i>template</i> (s.o.)
	3.0 $\mu$ l	10x <i>Taq</i> DNA-Polymerase Puffer, Roche Diagnostics
	3.0 $\mu$ l	dNTPs à 2 mM
	3.0 $\mu$ l	pBS-T3-Primer, 4 $\mu$ M
	3.0 $\mu$ l	pBS-T7-Primer, 4 $\mu$ M
	0.5 $\mu$ l	<i>Taq</i> DNA-Polymerase, 10 U/ $\mu$ l, Roche Diagnostics
	ad 30.0 $\mu$ l	Reinstwasser



Die Amplifikation erfolgte in einem Perkin Elmer GeneAmp 2400 System unter folgenden Bedingungen:

Segment	Wiederholung	Prozeß	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	1	Denaturierung	94	180
2	20	Denaturierung	94	30
		Hybridisierung	55	30
		Primerextension	72	60
3	1	Primerextension	72	420
4	1	Abkühlung	4	∞

Nach Auftrennung auf einem analytischen Polyacrylamidgel (s. 2.2.2) kann anhand der Länge der PCR-Produkte bestimmt werden, ob jeweils die kompletten codierenden Gensequenzen für *PBGD* bzw. *GAPDH* in die Vektoren integriert wurde. Im Fall des *BCR/ABL*-Gens, mit einem in den Vektor integrierten 601 Bp b3a2-Genfragment, besteht aber die Möglichkeit, daß ein Klon bei gleicher PCR-Produktlänge entweder die Wildtyp-Sequenz des *BCR/ABL*-Gens oder die mutierte *BCR/ABL*-Sequenz trägt. Daher wurde im Fall des *BCR/ABL*-Gens jeweils ein Aliquot der PCR-Produkte richtiger Länge einer Spaltung mit dem für den Standard spezifischen Restriktionsenzym *StuI* unterzogen. Die Spaltprodukte wurden dann ebenfalls auf einem analytischen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

## 2.4.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der verwendeten Plasmide erfolgte mit dem ABI PRISM DyeDideoxy Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) mit *AmpliTaq* DNA Polymerase FS auf einem ABI 373A DNA *Sequencer* oder einer ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* Kapillarelektrophorese. Diese Methode basiert auf der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger & Coulson, 1975). Die Markierung der Abbruchprodukte wird durch fluorophormarkierte Didesoxyribonukleosidtriphosphate erreicht. Die Probenvorbereitung und Durchführung der Sequenzierung erfolgten nach Angaben des Herstellers. Als *template* für die Sequenzierreaktion wurden die mit pBS-T3- und pBS-T7-Primern amplifizierte PCR-Produkte der *Screening*-PCR (s. 2.3.5) eingesetzt.

### 2.4.7 *In-vitro*-Transkription

Zur Generierung von RNA-Standards der jeweiligen Gene wurden *in-vitro*-Transkripte erzeugt. Die verwendeten Vektoren pBluescript SK(+) und pBluescript M13(-) enthalten vor der Gen-Insertionsstelle, der *multiple cloning site*, entsprechende Phagenpromotoren, unter anderem für die T7 RNA-Polymerase. Als *template* für die Transkription mit T7 RNA-Polymerase dienten Maxipräparationen der jeweiligen Plasmide. Um eine über den eigentlichen Genbereich hinausgehende Transkription zu verhindern und längeneinheitliche RNA-Transkripte zu erhalten, wurde auf der promotorfernen Seite des *templates* ein Restriktionsschnitt gesetzt, der somit zum Abbruch der Transkription an dieser Stelle führt. Dieser Reaktionsschnitt erfolgte entweder singulär intragenisch oder durch eine Spaltung in der *multiple cloning site* jenseits der vom T7-Promotor aus gesehenen Geninsertion.

100µl-Transkriptionsansatz:

50 µl	<i>template</i> [10 µg], linearisiertes Plasmid
10 µl	T7 RNA-Polymerase Puffer 10x, Roche Diagnostics
10 µl	rNTPs, je 25 mM
5 µl	RNAguard RNase Inhibitor, 36 U/µl, Pharmacia
10 µl	T7 RNA-Polymerase, 20 U/µl, Roche Diagnostics
15 µl	DEPC-Wasser

Dieser Transkriptionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschliessend wurde durch Zugabe von RQ1 DNase (Promega) die amplifizierbare Plasmid-DNA abgebaut. Die Aufreinigung der RNA erfolgte anfänglich über ein denaturierendes Polyacrylamidgel (s. 2.2.3), später, um eine höhere Ausbeute an Transkript zu erhalten, über das High Pure RNA Isolation Kit der Firma Roche Diagnostics. Die einheitliche Länge der *in-vitro*-Transkripte wurde auch in diesem Fall auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel überprüft. Auf das Gel wurde jedoch nur ein Aliquot (ca. 500 ng) des erhaltenen Transkriptes aufgetragen und dieses mittels Ethidiumbromid-Färbung, wie unter 2.2.3 beschrieben, dokumentiert. Die Lagerung der jeweiligen Standard-RNA erfolgte aliquotiert bei -20 °C.

### 2.4.8 Radioaktive Markierung des *in-vitro*-Transkriptes

Zur Kontrolle der einheitlichen Länge des *in-vitro* generierten *BCR/ABL*-Transkriptes wurde die RNA in einem kleinen Ansatz mit zusätzlichem [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-UTP im Transkriptionsansatz radioaktiv markiert.

Transkriptionsansatz:	3.5 $\mu$ l	<i>template</i> T3/T7-PCR-Produkt (s. 2.3.5)
	2.0 $\mu$ l	Transkriptionspuffer 10x, Roche Diagnostics
	2.0 $\mu$ l	rNTPs 10x, A,C,G je 5 mM, U 1 mM
	1.0 $\mu$ l	RNAguard RNase Inhibitor, 36 U/ $\mu$ l, Pharmacia
	1.0 $\mu$ l	T7 RNA-Polymerase, Roche Diagnostics
	1.0 $\mu$ l	[ $\alpha$ - $^{32}$ P]-UTP, 250 $\mu$ Ci/ $\mu$ l
	ad 20.0 $\mu$ l	DEPC-Wasser

Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 2 h. Anschliessend wurden die Proben mit Formamid-Ladepuffer versetzt, kurz auf 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und anschliessend auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (s. 2.2.3) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese erfolgte die Detektion der radioaktiv markierten RNA mittels eines Instant-Imagers der Firma Canberra Packard.

Formamid-Ladepuffer:	80 %	Formamid
	1.00 mM	EDTA
	0.01 % (w/v)	Xylencyanol FF
	0.01 % (w/v)	Bromphenolblau

### 2.5 Quantitative, kompetitive RT-PCR

Für die Durchführung einer quantitativen kompetitiven RT-PCR wurden dem PCR-Ansatz die interne Standard-RNA in bekannten Konzentrationen in Form einer Verdünnungsreihe zugesetzt und in Konkurrenz mit der zu quantifizierenden Wildtyp- bzw. Proben-RNA amplifiziert. Als interner Standard für das zu quantifizierende *BCR/ABL*-Transkript wurde die in 2.3 generierte *BCR/ABL*-Standard-RNA verwendet. Als simulierte Probe für die Modellstudien wurde eine ebenfalls *in vitro* generierte *BCR/ABL*-RNA, die jedoch die Wildtyp-Sequenz aufwies, verwendet.

### 2.5.1 Vermeidung von Kontamination

Die PCR ist natürlich durch ihre hohe Sensitivität gegenüber anderen Quantifizierungsmethoden im Vorteil, aber sie beinhaltet auch die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen. Dieses Problem ist insbesondere bei Arbeiten mit den gleichen Primersystemen über einen längeren Zeitraum vorhanden, da jedes amplifizierte Produkt wiederum ein optimales *template* für weitere Amplifikationen darstellt. Es wurden daher entsprechende Vorsichtsmaßnahmen getroffen, um Kontaminationen durch z.B. Aerosolbildung zu vermeiden:

- ♦ häufig verwendete Reagenzien, Reinstwasser bzw. DEPC-Wasser und *template*-RNAs wurden unter einer sterilen Werkbank aliquotiert;
- ♦ alle Einwegmaterialien, wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, etc. wurden autoklaviert verwendet;
- ♦ es wurden getrennte Pipettensätze für das Pipettieren der PCR-Reaktionsansätze und die spätere Analyse der PCR-Produkte verwendet;
- ♦ es erfolgte eine räumliche Trennung zwischen Ansetzen des Amplifikationsansatzes und Detektion bzw. Quantifizierung der PCR-Produkte;
- ♦ in jeder PCR wurde eine Negativ-Probe (i.d.R. Reinst- oder DEPC-Wasser) als Kontrolle der Abwesenheit von Kontaminationen mitamplifiziert;
- ♦ des Weiteren wurden alle unter Kapitel 2.2.5.1 aufgeführten Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von Ribonukleasen für das Ansetzen von RT-PCRs beachtet.

### 2.5.2 Amplifikation von RNA

Da RNA nicht direkt als *template* von der *Taq* DNA-Polymerase genutzt werden kann, ist es für die Amplifikation von RNA nötig, diese zunächst mittels Reverser Transkription (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Die Gesamtreaktion von RT und Amplifikation wird als RT-PCR bezeichnet. Für die RT-PCR hat man nun die Wahl zwischen einem Ein-Schritt-Protokoll, bei dem RT und Amplifikation in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden und einem Zwei-Schritt-Protokoll, in dem der RT-Schritt getrennt von der Amplifikation durchgeführt wird. Da ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit war, ein möglichst routinefähiges Testsystem für die *BCR/ABL*-Analytik zu entwickeln, wurden zunächst Ein-Schritt-Protokolle bevorzugt verwendet. Da hierbei sowohl der RT-Schritt, als auch die Amplifikation in dem gleichen Reaktionsgefäß nacheinander durchgeführt werden, müssen der Puffer, in dem die Reaktion abläuft, sowie die Reaktionsbedingungen für beide Schritte

der RT-PCR optimale Bedingungen schaffen. Im Folgenden sind die Protokolle aufgeführt wie sie zur Amplifikation in einem handelsüblichen Thermocycler, z.B. dem Perkin Elmer GeneAmp 2400, verwendet wurden. Das Zwei-Schritt-Protokoll der RT-PCR wurde im Vergleich zu den verwendeten Ein-Schritt-Reaktionen auf einem *real-time*-PCR-Gerät durchgeführt. Da sich die Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen auf einem *real-time*-PCR-Gerät, wie dem in dieser Arbeit verwendeten LightCycler der Firma Roche Diagnostics, wesentlich von den hier aufgeführten Protokollen unterscheiden, werden diese im Kapitel 2.5.1.1 beschrieben.

### 2.5.2.1 RT-PCR mit *Tth* DNA-Polymerase

Die *Tth* DNA-Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* und besitzt zweierlei Aktivitäten: In Gegenwart von Mangan Ionen zeigt sie sowohl eine Reverse-Transkriptase-Aktivität als auch eine DNA-Polymerisations-Aktivität, wobei das Temperaturoptimum zwischen 60 und 75 °C liegt. Sie ist als einziges Enzym in der Lage, beide Schritte einer RT-PCR unter denselben Pufferbedingungen durchzuführen.

PCR-Ansatz: Mix 1:	10.0	µl	RNA- <i>template</i> , <i>in-vitro</i> -Transkript
	7.5	µl	dNTPs à 2 mM
	5.6	µl	bcr(1)-Primer, 4 µM
	5.6	µl	abl(2) bzw. abl(2)-FAM-Primer, 4 µM
ad	25.0	µl	DEPC-Wasser (0.2 % (v/v) DEPC)
Mix 2:	10.0	µl	5x RT-PCR Puffer, Roche Diagnostics
	5.0	µl	Mn(OAc) <sub>2</sub> , 25 mM, Roche Diagnostics
	0.5	µl	RNAguard RNase Inhibitor, 36 U/µl, Pharmacia
	1.0	µl	<i>Tth</i> DNA-Polymerase, 5 U/µl, Roche Diagnostics
ad	25.0	µl	DEPC-Wasser (0.2 % (v/v) DEPC)

Die beiden PCR-Mixe wurden zu einem 50µl-PCR-Ansatz in einem entsprechenden PCR-Reaktionsgefäß vereinigt und gut gemischt. Anschließend wurde die PCR-Reaktion in einem Perkin Elmer GeneAmp 2400 Gerät unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Segment	Wdh.	Prozeß	Temp. [°C]	Zeit [s]	Inkrement [s]
1	1	Reverse Transkription	60	1800	
2	1	Denaturierung	94	60	
3	8	Denaturierung	94	30	
		Annealing	56	30	
		Extension	72	45	
4	22	Denaturierung	94	30	
		Annealing	56	30	
		Extension	72	45	+ 5 je Zyklus
5	1	finale Extension	72	420	
6	1	Abkühlung	4	∞	

Ein Aliquot der PCR-Ansätze wurde anschließend zur Kontrolle der exakten PCR-Produktlänge auf ein analytisches Polyacrylamidgel (s. 2.2.2) aufgetragen. Die Dokumentation der Gele erfolgte nach Ethidiumbromid-Färbung mittels eines Videodokumentations-Systems (INTAS).

### 2.5.2.2 RT-PCR mit Titan One Tube RT-PCR System

Bei dem Titan One tube RT-PCR System handelt es sich um eine optimierte Enzym-Mischung aus der Reversen Transkriptase AMV, isoliert aus dem Avian-Myeloblastosis-Virus von Vögeln (AMV), für die Erststrangsynthese sowie *Pwo* und *Taq* DNA-Polymerase für die Amplifikation. Die Verwendung von *Pwo* DNA-Polymerase, die eine 3'-5' *proofreading*-Aktivität besitzt, soll laut Herstellerangaben (Roche Diagnostics) zu einer deutlich geringeren Fehlerrate der PCR führen als bei ausschliesslicher Verwendung von *Taq* DNA-Polymerase für die Amplifikation. In einem für die RT-PCR optimierten Puffer können beide Reaktionen im gleichen Reaktionsgefäß nacheinander durchgeführt werden.

PCR-Ansatz: Mix 1:	10.0 µl	RNA- <i>template</i> , <i>in-vitro</i> -Transkript
	5.0 µl	dNTPs à 2 mM
	5.0 µl	bcr(1)-Primer, 4 µM
	5.0 µl	abl(2) bzw. abl(2)-FAM-Primer, 4 µM
	2.5 µl	DTT, 100 mM, Roche Diagnostics
	0.5 µl	RNAguard RNase Inhibitor, 36 U/µl, Pharmacia
ad	30.0 µl	DEPC-Wasser (0.2 % (v/v)DEPC)
Mix 2:	10.0 µl	5x RT-PCR Puffer, Roche Diagnostics
	1.0 µl	Titan Enzym-Mix, Roche Diagnostics
ad	20.0 µl	DEPC-Wasser (0.2 % (v/v) DEPC)

Die beiden Reaktions-Mixe wurden zu einem 50µl-PCR-Ansatz in einem entsprechenden PCR-Reaktionsgefäß vereinigt und gut gemischt. Die PCR-Reaktion wurde anschliessend in einem Perkin Elmer GeneAmp 2400 Gerät unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Segment	Wdh.	Prozeß	Temp. [°C]	Zeit [s]	Inkrement [s]
1	1	Reverse Transkription	55	1800	
2	1	Denaturierung	94	120	
3	8	Denaturierung	94	30	
		Annealing	56	30	
		Extension	68	45	
4	22	Denaturierung	94	30	
		Annealing	56	30	
		Extension	68	45	+5 je Zyklus
5	1	finale Extension	68	420	
6	1	Abkühlung	4	∞	

Die Kontrolle der PCR-Produktlänge erfolgte anschliessend auf 10%igen ethidiumbromid-gefärbten Polyacrylamidgelen (s. 2.2.2), die mit Hilfe eines Videodokumentations-Systems ausgewertet und dokumentiert wurden.

### 2.5.3 Quantifizierung nach QC-RT-PCR

Durch inverse PCR-Mutagenese (s. 2.3.1) wurde eine im *BCR/ABL*-Wildtyp-Gen singuläre *HindIII*-Restriktionsschnittstelle in eine ebenfalls singuläre *StuI*-Restriktionsschnittstelle im internen Standard umgewandelt. Durch spezifische Restriktionsspaltung ist dadurch eine Unterscheidung von Standard- und Wildtyp- bzw. Proben-PCR-Produkt möglich. Dies erlaubt eine Quantifizierung der verschiedenen RT-PCR-Produkte nach spezifischer Restriktionsspaltung einerseits mit einer herkömmlichen analytischen Polyacrylamid-gelelektrophorese und Quantifizierung mittels densitometrischer Auswertung, andererseits durch eine kapillarelektrophoretische Auftrennung der Spaltfragmente und automatische Fragmentmengen-Quantifizierung mit einer entsprechenden Software.

#### 2.5.3.1 Analytische Restriktionsspaltung der QC-RT-PCR-Produkte

Zur Unterscheidung der durch quantitative, kompetitive RT-PCR (s. 2.4) generierten Amplifikations-Produkte von Wildtyp- bzw. Proben-RNA und interner Standard-RNA wurden diese einer spezifischen Restriktionsspaltung mit *HindIII*, spezifisch für die Wildtyp-Sequenz, bzw. *StuI*, spezifisch für den internen Standard, unterzogen.

10µl-Spaltansätze: 3.0 µl RT-PCR-Produkt  
1.0 µl 10x Puffer B, Roche Diagnostics  
1.0 µl *HindIII* bzw. *StuI*, 10 U/µl, Roche Diagnostics  
5.0 µl Reinstwasser

Die Spaltung erfolgte bei 37 °C für 3 h in einem Aluminium-Wärmeblock.

#### 2.5.3.2 Quantifizierung der Spaltprodukte mittels analytischer Polyacrylamidgelelektrophorese

Die aus 2.4.3.1 gewonnenen Spaltfragmente wurden auf einem analytischen Polyacrylamidgel (s. 2.2.2) aufgetrennt und die Banden nach Färbung mit Ethidiumbromid auf einem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht. Anschliessend erfolgte die Dokumentation der Gele durch eine Videodokumentationsanlage der Firma INTAS in Form eines Thermoausdruckes oder in Form einer TIF-Datei auf Diskette. Die so abgespeicherten Bilddateien wurden anschliessend unter Verwendung der Bildverarbeitungssoftware TINA der Firma Raytest Isotopenmessgeräte quantitativ ausgewertet.



### 2.5.3.3 Quantifizierung der Spaltprodukte mit der ABI PRISM 310

#### *Genetic Analyzer* Kapillarelektrophorese-Apparatur

Nach Amplifikation der Zielsequenz mit *BCR/ABL*-spezifischen Primern, mit am 5'-Ende 6-FAM Fluoreszenz-markiertem *abl*-Primer und unmarkiertem *bcr*-Primer (s. 2.2.7.3), wurden Aliquots der fluorophormarkierten PCR-Produkte zunächst auf ein analytisches Polyacrylamidgel (s. 2.2.2) aufgetragen, um eine Produktmengenabschätzung durchzuführen. Anschliessend wurde jeweils ein Aliquot der PCR-Produkte mit den spezifischen Restriktionsenzymen gespalten (s. 2.4.3.1). Die so erhaltenen Spaltfragmente wurden auf einer ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* Kapillarelektrophorese-Apparatur der Firma Applied Biosystems/Perkin Elmer zur automatischen Längenbestimmung und Mengenquantifizierung aufgetrennt. Eine ausführliche Beschreibung der Methode wird im Kapitel Ergebnisse gegeben.

#### 2.5.3.3.1 Probenvorbereitung für die Kapillarelektrophorese

Die fluorophormarkierten Spaltfragmente wurden mit Reinstwasser so verdünnt (i.d.R. 10 - 20fach), daß die Fluoreszenzsignale im linearen Meßbereich der Kapillarelektrophorese liegen (zwischen 100 und 10 000 relativen Fluoreszenz-Einheiten).

Die automatische DNA-Fragmentlängen-Bestimmung erfolgte mit Hilfe des internen Längenstandards GeneScan-500 TAMRA. Die bekannten Fragmentlängen des Standards (s. 2.4.3.3.2) dienen zur Erzeugung einer Kalibrierungskurve, mit deren Hilfe durch Extrapolation Längen unbekannter DNA-Fragmente bestimmt werden.

Analyse-Ansatz:     1.0 µl     verdünnte Spaltfragmente, 6-FAM-markiert  
                      12.0 µl     Formamid  
                      0.5 µl     GeneScan-500 TAMRA

Dieser Analyse-Ansatz wurde anschliessend in einem Aluminium-Heizblock 2 min auf 90 °C erhitzt, dann auf Eis abgeschreckt. Die denaturierten Proben werden anschliessend zur Analyse mit der ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* Kapillarelektrophorese in einen Proben-Ständer (*sample tray* für max. 48 Proben) überführt.

#### 2.5.3.3.2 Elektrophoresebedingungen der Kapillarelektrophorese

Die Quantifizierung der spezifischen Restriktionsfragmente der *BCR/ABL*-RT-PCR-Produkte mittels der ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* Kapillarelektrophorese der Firma Applied Biosystems wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Kapillare:** 47 cm Gesamt-Länge  
36 cm Trennstrecke bis zum Detektor  
50 µm Kapillar-Innendurchmesser
- Trennsystem:** *Performance Optimized Polymer (POP) 4* mit 8 M Harnstoff  
Es handelt sich hierbei um ein lineares Polymer, welches speziell für eine gute Auflösung unter denaturierenden Bedingungen entwickelt wurde.
- Puffer:** 1x *Genetic Analyzer (GA)*-Puffer mit EDTA, wurde als Anoden- und Kathoden-Puffer verwendet (ohne Angaben des Herstellers Applied Biosystems/Perkin Elmer über die Puffer-Zusammensetzung).
- Trennbedingungen:**  
elektrokinetische Injektion: 5 s bei 15 kV  
Elektrophorese: 30 min bei 15 kV und konstant 60 °C  
Modul: GS STR (1ml) POP4C (*GeneScan, Short Tandem Repeat, 1 ml Syringe, Performance Optimized Polymer 4, Filterset C*)  
Matrix: GS STR POP4 C (s.o.)
- Standard:** GeneScan 500 TAMRA (s. auch 2.4.3.3.1) wurde als interner Längenstandard für die Fragmentanalyse verwendet, er beinhaltet Fragmente folgender Größen:  
35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250\*, 300, 340\*, 350, 400, 450, 490, 500.  
\*Diese Fragmente werden bei der automatischen Längenberechnung nicht berücksichtigt, da sie im linearen Polymer ein abnormes Laufverhalten aufweisen.

GeneScan-Analyse-Parameter:

<p><b>Analysis Range</b></p> <p><input checked="" type="radio"/> Full Range <input type="radio"/> This Range (Data Points)</p> <p>Start: <input type="text" value="0"/> Stop: <input type="text" value="6000"/></p>	<p><b>Size Call Range</b></p> <p><input checked="" type="radio"/> All Sizes <input type="radio"/> This Range (Base Pairs)</p> <p>Min: <input type="text" value="0"/> Max: <input type="text" value="300"/></p>
<p><b>Data Processing</b></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Baseline <input checked="" type="checkbox"/> MultiComponent</p> <p><b>Smooth Options</b></p> <p><input checked="" type="radio"/> None <input type="radio"/> Light <input type="radio"/> Heavy</p>	<p><b>Size Calling Method</b></p> <p><input type="radio"/> 2nd Order Least Squares <input type="radio"/> 3rd Order Least Squares <input type="radio"/> Cubic Spline Interpolation <input checked="" type="radio"/> Local Southern Method <input type="radio"/> Global Southern Method</p>
<p><b>Peak Detection</b></p> <p>Peak Amplitude Thresholds</p> <p>B: <input type="text" value="40"/> Y: <input type="text" value="40"/> G: <input type="text" value="40"/> R: <input type="text" value="60"/></p> <p>Min. Peak Half Width: <input type="text" value="3"/> Pts</p>	<p><b>Split Peak Correction</b></p> <p><input checked="" type="radio"/> None <input type="radio"/> GENESCAN 2500 <input type="radio"/> LeftMost Peak <input type="radio"/> RightMost Peak</p> <p>Correction Limit: <input type="text" value="30"/> Data Pts</p>

**Abb. 2-1:** Fenster der GeneScan-Software zur Eingabe der Analyse-Parameter, mit den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen.

Der zur mathematischen Berechnung der Fragmentlänge verwendete Algorithmus ("*Local Southern Method*") bezieht die drei Standard-Fragmente, die dem unbekanntem Fragment am nächsten liegen, für die Berechnung der Kalibrierungskurve mit ein.

- Laser: 10 Milliwatt Argon-Ionen-Laser mit Emissionswellenlängen von 488 nm und 514.5 nm zur Anregung der Fluoreszenz.
- Detektion: CCD-Kamera mit einem Wellenlängenbereich von 525-650 nm und entsprechenden Filtersets.
- Software: - *Data Collection*-Software 1.1 zur Speicherung der übertragenen Rohdaten.  
- GeneScan<sup>®</sup> Analysis-Software 2.1 zur Längenbestimmung und Quantifizierung der Fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente.
- Hardware: - Apple G3 Power Macintosh

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die mit der *Collection*-Software aufgezeichneten Rohdaten jeder Probe mit Hilfe der GeneScan-Software unter den oben genannten Bedingungen analysiert. Die Darstellung der automatischen Fragmentanalyse erfolgte in Form von Elektropherogrammen mit dazugehörigen Fragmentlängen und Peakflächen, anhand derer zunächst die Zuordnung der Genescan 500 Standard-Peaks kontrolliert wurde. Die abschliessende Quantifizierung erfolgte durch Auswertung der Peakflächendaten mit Hilfe des Programmes *Microsoft Excel*.

## 2.6 Quantifizierung mittels *real-time-PCR*

Die Quantifizierung mittels *real-time-PCR* erfolgte auf einem LightCycler der Firma Roche Diagnostics (vormals Boehringer Mannheim). Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein Prototyp (LightCycler LC-24, Idaho Technology Inc.) des später von Roche Diagnostics vertriebenen LightCycler LC-32 verwendet. Eine ausführliche Beschreibung der Funktionsweise des LightCyclers sowie der in dieser Arbeit verwendeten Detektionsmethoden erfolgt im Kapitel Ergebnisse. Dort werden die endgültig zur Quantifizierung verwendeten Protokolle aufgeführt.

Für die Amplifikation auf dem LightCycler wurden i.d.R. 10µl-PCR-Ansätze pipettiert, die jeweils in Form eines Mastermixes angesetzt wurden, wobei auch hier die in Kapitel 2.4.1 aufgeführten Maßnahmen zur Vermeidung von Kontamination beachtet wurden. Die Verwendung von BSA (*Bovine Serum Albumin*) in den PCR-Ansätzen beruht auf den Protokollen von Wittwer *et al.* (1997) und verhindert eine Absorption von RNA- bzw. DNA-Molekülen an die Wand der Glaskapillare. Der jeweilige Anteil des Mastermixes wurde in die

Vorratsbehälter der Kapillaren vorpipettiert, anschliessend wurde das entsprechende *template* (DNA oder RNA) zupipettiert und die Kapillare mit einem Deckel verschlossen. Durch Zentrifugation der Kapillaren in entsprechenden Adaptern bei maximal 2500 rpm in einer Tischzentrifuge wurden die Komponenten gemischt und blasenfrei in die Glaskapillare überführt. Anschliessend erfolgte die Amplifikation auf dem LightCycler.

### 2.6.1 Quantifizierung mit SYBR Green I

Bei dem Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I handelt es sich um einen Doppelstrang-bindenden Farbstoff, ähnlich wie Ethidiumbromid, wobei SYBR Green I sensitiver und weniger mutagen ist (Ririe *et al.*, 1997). Durch Bindung an die neugebildete doppelsträngige DNA wird die Fluoreszenz stark erhöht, wobei das generierte Fluoreszenzsignal proportional zur DNA-Konzentration ist. Dieses Fluoreszenzsignal wird jeweils einmal pro Zyklus detektiert und zwar jeweils am Ende der Extensions-Phase. Zu diesem Zeitpunkt haben die meisten SYBR Green-Moleküle an die doppelsträngige DNA gebunden und das Fluoreszenzsignal ist somit am höchsten. Zur spezifischen Kontrolle der Amplifikationsreaktion ist es erforderlich, am Ende der PCR eine Schmelzkurven-Analyse durchzuführen, da SYBR-Green I grundsätzlich an jede doppelsträngige DNA bindet, egal ob es sich dabei um das gewünschte spezifische Produkt oder z. B. um Primerdimere handelt. Eine detaillierte Beschreibung der Methode wird im Kapitel Ergebnisse gegeben.

Für den LightCycler LC-32 (Roche Diagnostics) können verschiedene Fluoreszenz-Parameter für die Analyse der generierten Fluoreszenz-Daten sowie die *on-line*-Darstellung gewählt werden. Es wurden hierbei die vom Hersteller empfohlenen Parameter für eine Quantifizierung mit SYBR Green I gewählt:

Display Mode:	Fluoreszenz-Kanal 1/1 (Ch.1/1)
Fluorimeter Gain:	Channel 1 (Ch. 1): 5
	Channel 2 (Ch. 2): 10
	Channel 3 (Ch. 3): 10.

### 2.6.1.1 Zwei-Schritt-Protokoll

Bei dieser Reaktionsführung wird im Gegensatz zum Ein-Schritt-Protokoll die RT-PCR in zwei Reaktionsgefäßen getrennt voneinander durchgeführt zunächst der RT-Schritt in einem relativ kleinen Volumen und anschliessend eine Polymerasekettenreaktion mit *Taq* DNA-Polymerase.

#### 2.6.1.1.1 Reverse Transkription mit AMV

Zur Erststrang-Synthese wurde die aus dem Avian-Myeloblastosis-Virus von Vögeln (AMV) isolierte Reverse Transkriptase verwendet. Sie ist durch eine hohe Prozessivität in der Lage, cDNA bis zu einer Länge von 10 kb zu synthetisieren. Die Reverse Transkription erfolgte unter Verwendung des sequenzspezifischen Primers bcr(1) (s 2.2.7).

cDNA-Synthese:	20.0 ng	K562-RNA, bzw. 10 µl <i>in-vitro</i> -Transkript, 1 nM
	4.0 µl	5x AMV-Puffer, Roche Diagnostics
	2.0 µl	Primer bcr(1), 4 µM
	0.5 µl	RNAGuard RNase Inhibitor, 36 U/µl, Pharmacia
	2.0 µl	dNTPs à 2 mM
	1.5 µl	AMV Reverse Transkriptase, Roche Diagnostics
	ad 20.0 µl	DEPC-Wasser

Die Reverse Transkription erfolgte bei 42 °C (Temperaturoptimum der AMV-Reverse Transkriptase) für 1 h in einem Aluminium-Wärmeblock.

#### 2.6.1.1.2 Amplifikation mit *Taq* DNA-Polymerase

Jeweils Aliquots der aus Kapitel 2.5.1.1.1 erhaltenen cDNAs wurden mit Reinstwasser in der Weise verdünnt, daß die Konzentrationen im Bereich der üblichen Standard-RNA-Konzentrationen lagen. Diese Verdünnungen wurden als *template* für die nachfolgende PCR mit *Taq* DNA-Polymerase eingesetzt. Des Weiteren wurden Verdünnungen von *supercoiled* und linearisiertem Plasmid pBSBA7-WT sowie mit T3/T7-Primern generierte PCR-Produkte nach dem folgenden Protokoll mit *Taq* DNA-Polymerase amplifiziert:

10µl-PCR-Ansatz:	2.00	µl	cDNA- <i>template</i>
	1.00	µl	10x PCR-Puffer, Roche Diagnostics
	0.60	µl	MgCl <sub>2</sub> , 25 mM, Roche Diagnostics
	0.25	µl	BSA, 20 mg/ml, Roche Diagnostics
	1.00	µl	dNTPs à 2 mM
	0.05	µl	Primer bcr(1) bzw. bcr(2), 100 µM
	0.05	µl	Primer abl(2) bzw. abl(1), 100 µM
	0.25	µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase, 10 U/µl, Roche Diagnostics
	0.16	µl	SYBR-Green I, 1:1000, Roche Diagnostics
	ad 10.00	µl	Reinstwasser

Die Amplifikation der DNA-*templates* erfolgte zunächst in einem LightCycler LC-24 (Idaho Technology Inc.) später in einem LightCycler LC-32 (Roche Diagnostics) unter folgenden Bedingungen:

Segment	Wdh.	Prozeß	Temp. [°C]	Zeit [s]	Rampe [°C/s]	Meßpunkt
1	1	Denaturierung	95	30	20	-
2	45	Denaturierung	95	1	20	-
		Hybridisierung	56	15	20	-
		Primerextension	72	18	2	-
		Detektion	84	0	2	einfach
3	1	Denaturierung	95	0	20	-
		Hybridisierung	56	5	20	-
		Primerextension	68	30	20	-
		Schmelzkurve	94	0	0.1	kontinuierlich
4	1	Abkühlung	40	60	20	-

Gegebenenfalls wurden zur Kontrolle der richtigen Produkt-Länge Aliquots der entstandenen PCR-Produkte auf analytische Polyacrylamidgele aufgetragen und die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.2).

### 2.6.1.2 Ein-Schritt-Protokoll

Bei dieser Art der Reaktionsführung werden beide Schritte der RT-PCR, also Reverse Transkription und anschließende Amplifikation in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Besondere Anforderungen werden daher an Puffer und Reaktionsbedingungen gestellt, die für beide Schritte der RT-PCR optimiert sein müssen.

#### 2.6.1.2.1 Amplifikation mit der *Tth* DNA-Polymerase

Die *Tth* DNA-Polymerase besitzt sowohl eine Reverse Transkriptase-, als auch eine DNA-Polymerase-Aktivität (s. 2.4.2.1). Sie wurde auf dem LightCycler unter folgenden Bedingungen verwendet:

10µl-PCR-Ansatz:	2.00	µl	RNA- <i>template</i>
	2.00	µl	5x RT-PCR Puffer, Roche Diagnostics
	0.60	µl	MgCl <sub>2</sub> , 25 mM, Roche Diagnostics
	0.25	µl	BSA, 20 mg/ml, Roche Diagnostics
	1.00	µl	Mn(OAc) <sub>2</sub> , 25 mM, Roche Diagnostics
	1.00	µl	dNTPs à 2 mM
	0.05	µl	Primer bcr(2), 100 µM
	0.05	µl	Primer abl(1), 100 µM
	0.25	µl	RNAguard RNase Inhibitor, 36 U/µl, Pharmacia
	0.25	µl	<i>Tth</i> DNA-Polymerase, 5 U/µl, Roche Diagnostics
	0.16	µl	SYBR-Green I, 1:1000, Roche Diagnostics
ad 10.00	µl		DEPC-Wasser (0.2 % (v/v) DEPC)

Die Amplifikation erfolgte in einem LightCycler LC-24 (Idaho Technology Inc.) unter folgenden Bedingungen:

Segment	Wdh.	Prozeß	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Rampe [°C/s]	Messpunkt
1	1	Reverse Transkription	58	1800	20	-
2	1	Denaturierung	95	120	20	-
3	45	Denaturierung	94	0	20	-
		Hybridisierung	56	10	20	-
		Primerextension	72	15	3	einfach
4	1	Denaturierung	94	0	20	-
		Hybridisierung	56	10	20	-
		Schmelzkurve	94	0	0.2	kontinuierlich
5	1	Abkühlung	40	60	20	-

#### 2.6.1.2.2 Amplifikation mit dem Titan One tube RT-PCR System

Das bereits unter Kapitel 2.4.2.2 erläuterte Titan One tube RT-PCR System wurde auch für die Amplifikation von RNA auf dem LightCycler verwendet:

10µl-PCR-Ansatz:	2.00	µl	RNA- <i>template</i>
	2.00	µl	5x RT-PCR Puffer*, Roche Diagnostics
	0.60	µl	MgCl <sub>2</sub> , 25 mM, Roche Diagnostics
	0.25	µl	BSA, 20 mg/ml, Roche Diagnostics
	0.50	µl	DTT, 100 mM, Roche Diagnostics
	1.00	µl	dNTPs à 2 mM
	0.05	µl	Primer, 100 µM
	0.05	µl	Primer, 100 µM
	0.50	µl	RNAguard RNase Inhibitor, 36 U/µl, Pharmacia
	0.25	µl	Titan Enzym-Mix, Roche Diagnostics
	0.16	µl	SYBR-Green I, 1:1000, Roche Diagnostics
	ad 10.00	µl	DEPC-Wasser (0.2 % (v/v) DEPC)

\* 5x RT-PCR Puffer mit 7.5 mM MgCl<sub>2</sub> [1x: 1.5 mM]



Die Amplifikation erfolgte zunächst in einem LightCycler LC-24 (Idaho Technology Inc.), später in einem LightCycler LC-32 (Roche Diagnostics) unter folgenden Bedingungen:

Segment	Wdh.	Prozeß	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Rampe [°C/s]	Meßpunkt
1	1	Reverse Transkription	55	1200	20	-
2	1	Denaturierung	95	30	20	-
3	45	Denaturierung	95	1	20	-
		Hybridisierung	56	15	20	-
		Primerextension	72	18	2	einfach
4	1	Denaturierung	95	0	20	-
		Hybridisierung	56	5	20	-
		Primerextension	68	30	20	-
		Schmelzkurve	94	0	0.1	kontinuierlich
5	1	Abkühlung	40	60	20	-

Nach Amplifikation wurden teilweise zur Kontrolle der generierten PCR-Produkte Aliquots der Amplifikate auf analytische Polyacrylamidgele aufgetragen, die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung analysiert (s. 2.2.2).

### 2.6.1.2.3 Amplifikation mit dem SuperScript One-Step RT-PCR System

Bei dem SuperScript One-Step RT-PCR System handelt es sich um ein optimiertes Enzym-Gemisch aus SuperScript II für die reverse Transkription und *Taq* DNA-Polymerase für die nachfolgende Amplifikation. Bei der SuperScript II Reversen Transkriptase handelt es sich um ein Derivat der M-MLV-Reversen Transkriptase aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus mit einem Temperatur-Optimum zwischen 45 und 55 °C für die cDNA-Synthese. Bei der SuperScript II Reverse Transkriptase wurde die RNase H-Aktivität deletiert. Diese strukturelle Modifikation verhindert die Degradation der RNA, da RNase H DNA/RNA-Hybride erkennt und die RNA abbaut. Der mitgelieferte 2fach-Puffer (2x *Reaction Mix*), über dessen genaue Zusammensetzung keine Angaben gemacht werden, beinhaltet aber bereits 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>, sowie 0.4 mM jeden dNTPs.

10µl-RT-PCR-Ansatz:	2.00 µl	RNA- <i>template</i>
	5.00 µl	2x <i>Reaction Mix</i> , Gibco BRL®
	0.32 µl	MgSO <sub>4</sub> , 25 mM, Roche Diagnostics
	0.25 µl	BSA, 20 mg/ml, Roche Diagnostics
	0.05 µl	Primer, 100 µM
	0.05 µl	Primer, 100 µM
	0.50 µl	RNAguard RNase Inhibitor, 36 U/µl, Pharmacia
	0.25 µl	SuperScript II RT/ <i>Taq</i> -Mix, Gibco BRL®
	0.16 µl	SYBR-Green I, 1:1000, Roche Diagnostics
	ad 10.00 µl	DEPC-Wasser (0.2 % (v/v) DEPC)

Die RT-PCR wurde in einem LightCycler LC-32 (Roche Diagnostics) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Segment	Wdh.	Prozeß	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Rampe [°C/s]	Meßpunkt
1	1	Reverse Transkription	55	1200	20	-
2	1	Denaturierung	95	30	20	-
3	45	Denaturierung	95	1	20	-
		Hybridisierung	56	15	20	-
		Primerextension	72	18	2	-
		Detektion	84	0	2	einfach
4	1	Denaturierung	95	0	20	-
		Hybridisierung	56	5	20	-
		Primerextension	68	30	20	-
		Schmelzkurve	94	0	0.1	kontinuierlich
5	1	Abkühlung	40	60	20	-

Gegebenenfalls wurden zur Kontrolle der spezifischen PCR-Produkt-Länge Aliquots der generierten Amplifikate auf analytische Polyacrylamidgele aufgetragen, die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung analysiert (s. 2.2.2).

#### 2.6.1.2.4 Amplifikation mit dem LightCycler-RNA Amplification Kit SYBR Green I

Bei dem LightCycler-RNA Amplification Kit SYBR Green I handelt es sich um ein für den LightCycler LC-32 vom Hersteller Roche Diagnostics optimiertes Ein-Schritt-RNA-Amplifikations-Kit zur Detektion von RNA mittels SYBR Green I. Dieses Kit beinhaltet neben einem RT-PCR-Enzym-Mix (ohne Angaben über die verwendeten Enzyme) einen 10x Reaktionspuffer, der bereits dNTPs (mit dUTP anstelle von dTTP), SYBR Green I und 30 mM MgCl<sub>2</sub> beinhaltet, sowie eine 25 mM MgCl<sub>2</sub> Stammlösung und steriles Wasser (*PCR grade*).

10µl-RT-PCR-Ansatz:	2.00 µl	RNA- <i>template</i>
	1.00 µl	10x LightCycler-RT-PCR Reaction Mix SYBR Green I, Roche Diagnostics
	0.80 µl	MgSO <sub>4</sub> , 25 mM, Roche Diagnostics
	0.05 µl	Primer, 100 µM
	0.05 µl	Primer, 100 µM
	0.50 µl	RNAguard RNase Inhibitor, 36 U/µl, Pharmacia
	0.40 µl	LightCycler RT-PCR Enzym-Mix, Roche Diagnostics
	ad 10.00 µl	steriles Wasser ( <i>PCR grade</i> ), Roche Diagnostics

Die Amplifikation erfolgte in einem LightCycler LC-32 (Roche Diagnostics) unter den vom Hersteller empfohlenen RT-PCR-Bedingungen für das LightCycler-RNA Amplification Kit SYBR Green I. Nach Amplifikation wurden gegebenenfalls Aliquots der Amplifikate auf analytische Polyacrylamidgele aufgetragen und mittels Ethidiumbromid-Färbung analysiert (s. 2.2.2).

## 2.6.2 Quantifizierung mit Fluoreszenz-markierten Sonden

Neben dem Doppelstrang-DNA-bindenden Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I wurden in dieser Arbeit zur Quantifizierung mittels eines LightCycler auch fluoreszenzmarkierte Hybridisierungs-Sonden (*Hybridization Probes*), kurz HybProbes genannt, verwendet. Diese HybProbes bestehen aus zwei unterschiedlichen kurzen Oligonukleotiden, die während der Annealing-Phase der PCR an eine interne Sequenz des amplifizierten Produktes binden. Eine Sonde trägt an ihrem 5'-Ende einen Fluorophor, LightCycler-RED-640 (LC-RED-640), und am 3'-Ende einen Phosphatrest, um eine Elongation durch die DNA-Polymerase zu verhindern. Die zweite Sonde trägt an ihrem 3'-Ende eine Fluoreszenz-Markierung in Form eines Fluoresceins. Nur wenn beide Sonden nebeneinander an die *target*-Sequenz binden, kommt es zu einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen den beiden Fluorophoren. Fluorescein wird durch die Licht-emittierende Diode (LED) des LightCyclers angeregt und dient während des FRET als Donor-Fluorophor, der seine Energie strahlungslos auf den Akzeptor-Fluorophor LC-RED 640 überträgt. Die emittierte Fluoreszenz des LC-RED 640 wird dann zur Quantifizierung gemessen. Der Zeitpunkt der Fluoreszenz-Messung liegt am Ende der Annealing-Phase, da dort die zu messenden Fluoreszenz-Intensitäten durch möglichst vollständige Hybridisierung der Sonden an die gebildeten Amplifikate am größten sind. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methode wird im Kapitel Ergebnisse gegeben, die in dieser Arbeit verwendeten Hybridisierungs-Sonden sind in Kapitel 2.2.7.4 aufgeführt.

Für den LightCycler LC-32 (Roche Diagnostics) können verschiedene Fluoreszenz-Parameter für die Analyse der generierten Fluoreszenz-Daten sowie die *on-line*-Darstellung gewählt werden. Es wurden hierbei die vom Hersteller empfohlenen Parameter für eine Quantifizierung mit *Hybridization Probes* gewählt:

Display Mode:	Fluoreszenz-Kanal 2 / Fluoreszenz-Kanal 1 (Ch.2/Ch.1)		
Fluorimeter Gain:	Channel 1 (Ch. 1):	1	
	Channel 2 (Ch. 2):	10	
	Channel 3 (Ch. 3):	10.	

### 2.6.2.1 Amplifikation mit dem Titan One tube RT-PCR System

Die Amplifikation und Quantifizierung mittels fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonden wurde mit dem Titan One tube RT-PCR System (s. 2.4.2.2) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

10µl-PCR-Ansatz:	2.00	µl	RNA- <i>template</i>
	2.00	µl	5x RT-PCR Puffer*, Roche Diagnostics
	1.00	µl	MgCl <sub>2</sub> , 25 mM, Roche Diagnostics
	0.25	µl	BSA, 20 mg/ml, Roche Diagnostics
	0.50	µl	DTT, 100 mM, Roche Diagnostics
	1.00	µl	dNTPs à 2 mM
	0.05	µl	Primer bcr(2), 100 µM
	0.05	µl	Primer abl(1), 100 µM
	0.10	µl	Donor-Sonde LC(1)-up, 20 µM
	0.20	µl	Akzeptor-Sonde LC(2)-WT-down, 20 µM
	0.50	µl	RNAguard RNase Inhibitor, 36 U/µl, Pharmacia
	0.25	µl	Titan Enzym-Mix, Roche Diagnostics
ad 10.00	µl		DEPC-Wasser (0.2 % (v/v) DEPC)

\* 5x RT-PCR Puffer mit 7.5 mM MgCl<sub>2</sub> [1x: 1.5 mM]

Nach Überführen der RT-PCR-Ansätze in die Glaskapillaren erfolgte die Amplifikation in einem LightCycler LC-32 (Roche Diagnostics) unter folgenden Bedingungen:

Segment	Wdh.	Prozeß	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Rampe [°C/s]	Meßpunkt
1	1	Reverse Transkription	55	1200	20	-
2	1	Denaturierung	95	30	20	-
3	45	Denaturierung	95	1	20	-
		Hybridisierung	56	15	20	einfach
		Primerextension	72	18	2	-
4	1	Abkühlung	40	60	20	-

### 2.6.2.2 Amplifikation mit dem SuperScript One-step RT-PCR System

Das bereits in Kapitel 2.5.1.2.3 vorgestellte SuperScript One-step RT-PCR System wurde auch für die Detektion mit Fluoreszenz-markierten Hybridisierungssonden unter folgenden Bedingungen verwendet:

10µl-RT-PCR-Ansatz:	2.00 µl	RNA- <i>template</i>
	5.00 µl	2x <i>Reaction Mix</i> , Gibco BRL®
	0.32 µl	MgSO <sub>4</sub> , 25 mM, Roche Diagnostics
	0.25 µl	BSA, 20 mg/ml, Roche Diagnostics
	0.05 µl	Primer, 100 µM
	0.05 µl	Primer, 100 µM
	0.10 µl	Donor-Sonde, 20 µM
	0.20 µl	Akzeptor-Sonde, 20 µM
	0.50 µl	RNAguard RNase Inhibitor, 36 U/µl, Pharmacia
	0.25 µl	SuperScript II RT/ <i>Taq</i> -Mix, Gibco BRL®
	ad 10.00 µl	DEPC-Wasser (0.2 % (v/v) DEPC)

Nach Überführen der RT-PCR-Ansätze in die Glaskapillaren erfolgte die Amplifikation auf einem LightCycler LC-32 (Roche Diagnostics) unter den in 2.5.2.1 beschriebenen Bedingungen. Die weitere Analyse der entstandenen RT-PCR-Produkte erfolgte auf analytischen Polyacrylamidgelen (s. 2.2.2), einerseits zur Kontrolle von eventuell entstandenen Nebenprodukten, andererseits bei Amplifikation von Patienten-RNA zur Bestimmung der *BCR/ABL*-Fusions-Variante.

### 2.6.2.3 Amplifikation mit dem LightCycler-RNA Amplification Kit Hybridization Probes

Bei dem LightCycler-RNA Amplification Kit Hybridization Probes handelt es sich um ein für den LightCycler LC-32 vom Hersteller Roche Diagnostics optimiertes Ein-Schritt-RNA-Amplifikations-Kit zur Detektion von RNA mittels sequenzspezifischer, fluoreszenzmarkierter Sonden (HybProbes). Dieses Kit beinhaltet neben einem LightCycler-RT-PCR Enzym-Mix (ohne Angaben über die verwendeten Enzyme) einen 10x Reaktionspuffer, der bereits dNTPs (mit dUTP anstelle von dTTP) und 30 mM MgCl<sub>2</sub> beinhaltet, sowie eine 25 mM MgCl<sub>2</sub> Stammlösung und steriles Wasser (*PCR grade*).

Es wurden in diesem Fall 20µl-PCR-Ansätze pipettiert, da dies vom Hersteller für dieses Kit empfohlen wird:

20µl-RT-PCR-Ansatz:	2.00 µl	RNA- <i>template</i>
	2.00 µl	10x LightCycler-RT-PCR Reaction Mix Hybridization Probes, Roche Diagnostics
	2.40 µl	MgCl <sub>2</sub> , 25 mM, Roche Diagnostics
	0.10 µl	Primer bcr(2), 100 µM
	0.10 µl	Primer abl(1), 100 µM
	0.20 µl	LC(1)-up, 20 µM
	0.20 µl	LC(2)-WT-down, 20 µM
	0.40 µl	LightCycler RT-PCR Enzym-Mix, Roche Diagnostics
	ad 20.00 µl	steriles Wasser ( <i>PCR grade</i> ), Roche Diagnostics

Als Quantifizierungskontrolle wurde das LightCycler-Control Kit RNA verwendet. Dieses Kit beinhaltet *in vitro* transkribierte Cytokin-RNA in verschiedenen Konzentrationen ( $10^6$ - $10^3$  Kopien/µl) als *template* sowie spezifische Cytokin-Primer (17mere) als Mix (10x, je Primer 5 µM) für die RT-PCR. Des Weiteren beinhaltet dieses Kit einen Hybridisierungssonden-Mix (10x, je Sonde 2 µM) zur Detektion des 322 Bp großen Cytokin-RT-PCR-Produktes.

20µl-RT-PCR-Ansatz:	1.00 µl	Cytokin-RNA- <i>template</i>
	2.00 µl	10x LightCycler-RT-PCR Reaction Mix Hybridization Probes, Roche Diagnostics
	2.40 µl	MgCl <sub>2</sub> , 25 mM, Roche Diagnostics
	2.00 µl	Cytokin Primer-Mix, je 5µM
	2.00 µl	Cytokin HybProbe-Mix, je 2 µM
	0.40 µl	LightCycler RT-PCR Enzym-Mix, Roche Diagnostics
	ad 20.00 µl	steriles Wasser ( <i>PCR grade</i> ), Roche Diagnostics

Die Amplifikation erfolgte in einem LightCycler LC-32 (Roche Diagnostics) unter den vom Hersteller für das LightCycler-RNA Amplification Kit Hybridization Probes empfohlenen Bedingungen.

### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, ein quantitatives automatisierbares Testsystem für die Routineanalytik der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zu entwickeln. Die charakteristische Veränderung der CML ist das Auftreten des durch reziproke Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$  entstandenen Philadelphia-Chromosoms. Zwar variiert die exakte Position der Bruchpunkte auf DNA-Ebene von Patient zu Patient, doch wurden für die CML in 98 % aller Fälle nur zwei alternative Varianten des Fusionsgen-Transkriptes identifiziert. Diese beiden *BCR/ABL*-Transkript-Varianten werden als b3/a2 und b2/a2 bezeichnet. Sie findet man ausschließlich in den leukämischen Zellen, wodurch das Fusionstranskript einen idealen Tumormarker für die CML darstellt. Das Vorhandensein eines spezifischen Tumormarkers ist im Fall der CML besonders wichtig, weil so nach erfolgter Therapie in den Patienten weiterhin überprüft werden kann, ob und wieviele Philadelphia-Chromosom-positive ( $Ph^+$ ) Leukämie-Zellen verblieben sind oder neu auftreten. Dieses Phänomen des Auftretens geringer Restmengen leukämischer Zellen bezeichnet man als *minimal residual disease* (MRD). Die Überprüfung der MRD-Rate erfolgt nicht nur einmalig, sondern muß in gewissen Zeitabständen wiederholt werden, da sich aus einzelnen „ruhenden“ bzw. zunächst nicht-teilungsaktiven  $Ph^+$ -Zellen später stark proliferierende Klone entwickeln können. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die quantitative und empfindliche Analyse der Patientenproben, damit expandierende Klone sofort erfaßt werden und eine erneute Therapie eingeleitet werden kann. Methoden, die auf einer quantitativen PCR basieren, bieten sich hier an, da sie zeitsparender, kostengünstiger, vor allem aber sehr viel sensitiver sind als die bisher verwendeten Methoden.

#### 3.1. Quantitative kompetitive RT-PCR zum Nachweis des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes

Für die exakte Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels PCR bzw. einer PCR nach reverser Transkription (RT-PCR) wird ein interner Standard benötigt, um absolute und nicht nur relative Werte zu erhalten. Diese PCR-Variante wird als quantitative kompetitive PCR bezeichnet, da der interne Standard, der sogenannte Kompetitor, der zu quantifizierenden Zielsequenz zugesetzt wird und es somit zu einer Konkurrenz beider Targets um die Primer, die Nukleotide und die Enzyme kommt. Um aus dem Produktverhältnis zwischen Standard



und Zielsequenz (im Weiteren auch als Probe oder WT-target bezeichnet) die exakte Kopienzahl der initialen *template*-Menge der Zielsequenz bestimmen zu können, muss dieser Standard mit der gleichen Amplifikationseffizienz der Zielsequenz amplifiziert werden, damit das Verhältnis von Standard zu Probe am Ende der PCR gleich dem zu Beginn der PCR ist. Im Idealfall sollte sich dieser Standard also so wenig wie möglich vom nachzuweisenden *template* unterscheiden (Raeymakers, 1993, 1995). Um diese Anforderung zu erfüllen, muss der zu verwendende interne Standard folgende Eigenschaften aufweisen (McCulloch *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 1995):

- a) der zu amplifizierende Abschnitt des internen Standards muss die gleiche Länge wie die zu amplifizierende Proben-DNA bzw. -RNA besitzen;
- b) die zu amplifizierende Sequenz des internen Standards muss mit der der Probe nahezu identisch sein; der Unterschied sollte sich auf nur wenige Nukleotide beschränken;
- c) für die Amplifikation sollten dieselben Primer wie für das Ziel-*target* verwendet werden.

### 3.1.1. Generierung eines internen RNA-Standards

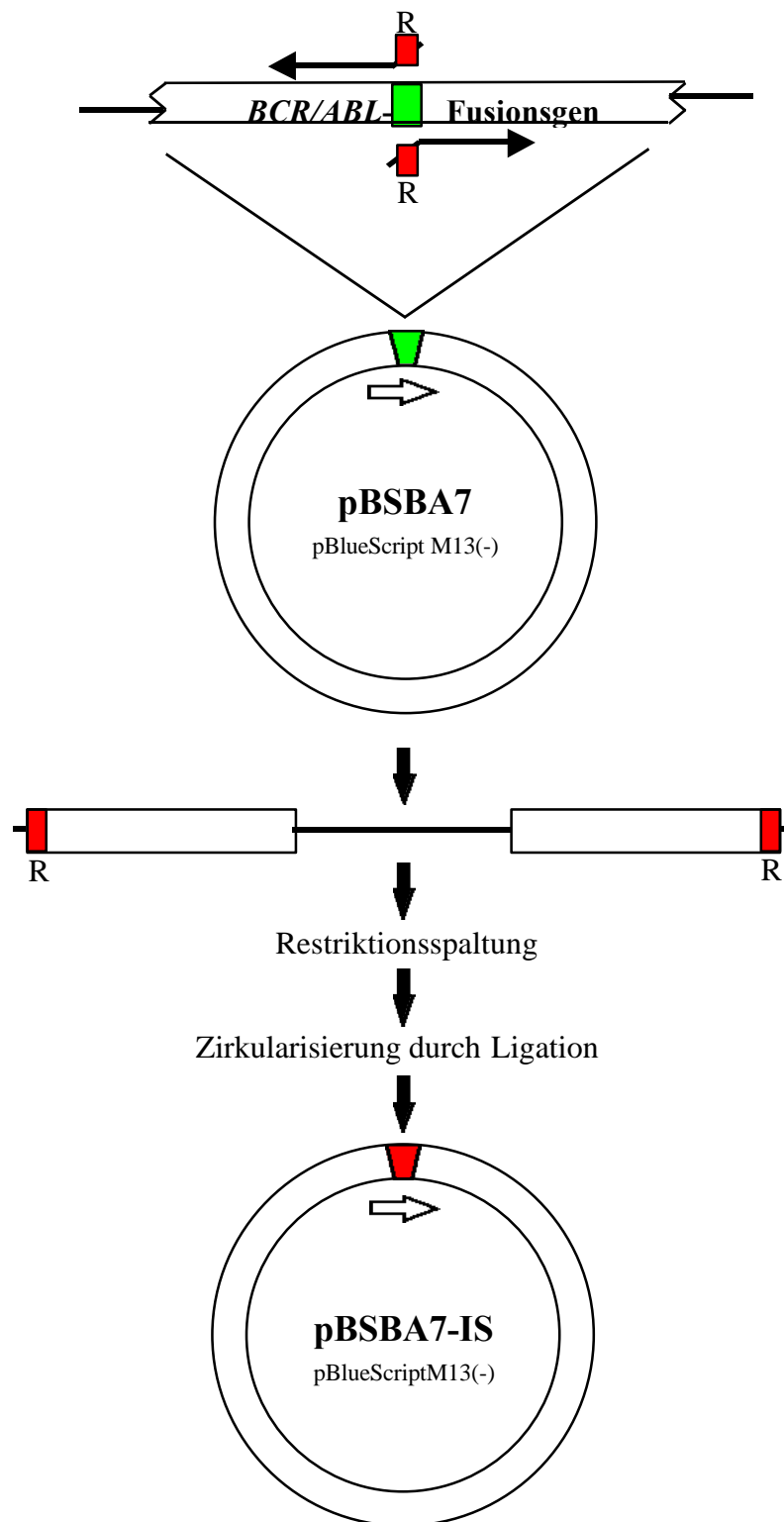
Zur internen Standardisierung einer quantitativen kompetitiven RT-PCR kann ein *in vitro* generiertes RNA-*template* dienen, das die gleichen Primerbindungsstellen wie das Ziel-*target* besitzt, sich jedoch von diesem in der Sequenz in wenigen Basenpaaren unterscheidet. Für die Generierung der internen Standard-RNA für die CML-Analytik wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. G. Sczakiel vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg das Plasmid pBSBA7 (s. 2.2.4) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich bei diesem Plasmid um einen BlueScript-Vektor M13(-) der Firma Stratagene, in den ein den Fusionsbereich des *BCR/ABL*-Fusionsgens umfassendes Genfragment kloniert wurde. Das Plasmid wurde in *E.coli* Zellen des Stammes LK111 $\lambda$  transformiert und mittels einer Plasmidpräparation in größerer Menge isoliert. Mit den vektorspezifischen Primern T3 und T7 wurde sodann der einklonierte *BCR/ABL*-Fusionsgenbereich des Plasmides amplifiziert und anschließend, um Informationen über die Insertionsstelle innerhalb der *multiple cloning site* und die exakte Größe und Sequenz des Inserts zu erhalten, sequenziert. Es handelt sich hierbei um ein 601 Bp großes Fragment des *BCR/ABL*-Fusionsgens der Variante b3a2, das an der *Sma*I-Schnittstelle in den Vektor pBlueScript M13(-) integriert wurde. Die Exone 1 - 3 des *BCR*-Gens sind komplett vorhanden, ebenso das komplette Exon 2 und die ersten 126 Bp des Exons 3 des *ABL*-Gens.

Da das Plasmid pBSBA7 jedoch die Wildtyp-Sequenz des *BCR/ABL*-Gens enthält, ist es erforderlich, das Plasmid zielgerichtet zu mutieren, um einen Sequenzunterschied einzufügen,

durch den eine Diskriminierung von Standard- und Wildtypsequenz nach der PCR möglich wird.

### 3.1.1.1. Zielgerichtete PCR-Mutagenese

Eine Möglichkeit, die Anforderungen an einen idealen, kompetitiven PCR-Standard zu erfüllen, ist, eine Substitution, also einen Austausch von Nukleotidsequenzen, durchzuführen. Hierdurch kann eine im Wildtypgen singulär vorhandene Restriktionsschnittstelle in eine neue, ebenfalls singuläre Restriktionsschnittstelle im Standard umgewandelt werden. Diese Substitution wurde nach der Methode der Inversen PCR-Mutagenese (Blum *et al.*, 1994; Meiss *et al.*, 1998) durchgeführt. Voraussetzung für dieses Verfahren ist eine im inserierten Genfragment singulär vorkommende Restriktionsschnittstelle, die durch Austausch von maximal 2 Basenpaaren in eine andere Restriktionsschnittstelle umgewandelt werden kann. Außerdem darf die für die neu zu generierende Restriktionsschnittstelle spezifische Restriktionsendonuklease auf dem gesamten Plasmid, d.h. also inklusive integriertem Genfragment, keine weitere Spaltstelle besitzen. Im Falle des Plasmides pBSBA7 mit integriertem 601Bp-*BCR/ABL*-Genfragment wurde im Exon 2 des *BCR*-Gens eine singuläre *HindIII*-Restriktionsschnittstelle (AAGCTT) in eine *StuI*-Restriktionsschnittstelle (AGGCCT) durch Substitution von zwei Basenpaaren mittels Inverser PCR-Mutagenese umgewandelt. Bei diesem Verfahren wurde mit zwei Primern, die jeweils an ihrem 5'-Überhang die neu einzuführende Restriktionsschnittstelle tragen, ein komplettes Plasmid in seiner ursprünglichen Länge als lineares Fragment amplifiziert. Das resultierende PCR-Produkt wurde dann mit der Restriktionsendonuklease, deren Schnittstelle neu eingefügt wurde, gespalten und anschließend mit T4 DNA-Ligase zirkularisiert (s.2.4.4). Der Ligationsansatz wurde dann in *E.coli*-Zellen des Stammes LK111λ transformiert. Zum Screening der erhaltenen Klone wird das *BCR/ABL*-Fusionsgen mit dem vektorspezifischen Primerpaar T3/T7 amplifiziert und anschließend mit der für die neu einzuführenden Restriktionsschnittstelle spezifischen Restriktionsendonuklease *StuI* verdaut. Von 10 analysierten Klonen enthielten 7 die neue Restriktionsschnittstelle. Von den positiven Klonen wurden von 4 Klonen Minipräparationen hergestellt und beide Stränge sequenziert. Bei allen war in der Plasmid-DNA die neue Restriktionsschnittstelle vorhanden, und es konnten keine Sekundärmutationen im integrierten *BCR/ABL*-Fusionsgenfragment gefunden werden.

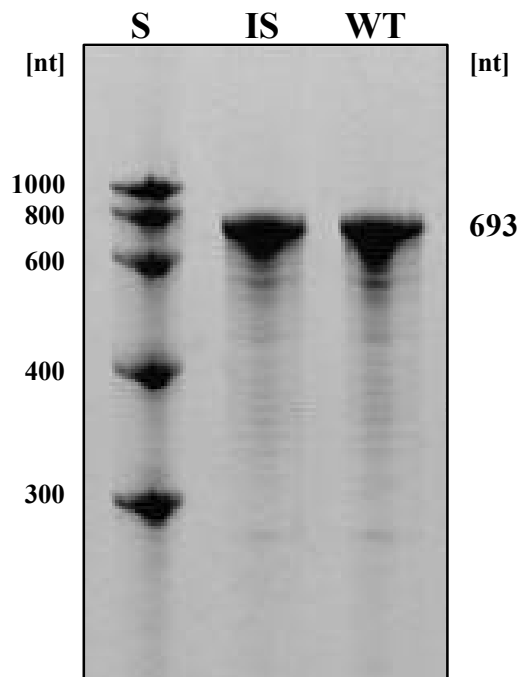


**Abb. 3-1: Schema zur inversen PCR-Mutagenese.** Mit Hilfe von zwei Primern, die jeweils in ihren 5'-Überhängen die neu zu generierende Restriktionsschnittstelle tragen, wird die vorhandene *HindIII*-Schnittstelle in eine *StuI*-Schnittstelle umgewandelt. Nach Spaltung mit dieser Restriktionsendonuklease sowie anschließender Zirkularisierung mit T4 DNA-Ligase erhält man ein Plasmid mit neuer Restriktionsschnittstelle.

### 3.1.1.2. Generierung von Standard- und Wildtyp-RNA

Da die größten Schwankungen bezüglich der Ausbeute einer RT-PCR (zwischen 5 und 90 %) innerhalb der RT-Reaktion auftreten, ist es erforderlich einen Standard zu generieren, der wie die Wildtypsequenz mit den gleichen Primern revers transkribiert und anschließend amplifiziert wird. DNA-Standards sind nicht geeignet, da sie nicht revers transkribiert werden und somit der Einfluss des RT-Schrittes nicht in die Quantifizierung eingeht. Aus diesem Grund ist es erforderlich, einen RNA-Standard zu generieren, durch den der Einfluß des RT-Schrittes und ein möglicher Abbau durch Ribonukleasen in der quantitativen Auswertung berücksichtigt wird. Der Vektor pBlueScript M13(-) ermöglichte durch den T7-Phagenpromotor, der direkt vor der Geninsertionsstelle, der *multiple cloning site*, angeordnet ist, eine *in-vitro*-Transkription. Um eine über den eigentlichen Genbereich hinausgehende Transkription zu verhindern und längeneinheitliche Transkripte zu erhalten, war es erforderlich, auf der promotorfernen Seite der Geninsertionsstelle einen Restriktionsschnitt zu setzen, der somit an dieser Stelle zu einem Abbruch der Transkription führt. Für diesen Restriktionsschnitt wurde die Restriktionsendonuklease *SaII* verwendet, da dieses Enzym innerhalb der *multiple cloning site* nach der Geninsertionsstelle spaltet. Des Weiteren besitzt *SaII* keine Restriktionsschnittstelle innerhalb des inserierten *BCR/ABL*-Genfragmentes, somit war gewährleistet, daß *SaII* das Plasmid nur linearisiert. Zur Kontrolle der einheitlichen Länge des *in-vitro*-generierten *BCR/ABL*-Transkriptes wurde in einem kleinen Ansatz die RNA mittels [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-UTP radioaktiv markiert. Nach Auftrennung auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel und Sichtbarmachung mit einem Instant-Imager zeigte sich eine prominente, singuläre Bande mit nur mäßigen Mengen an Abbauprodukten. Um eine möglichst große Ausbeute an *in-vitro*-Transkript nach der Transkription mit T7 RNA-Polymerase zu erhalten, wurden zunächst Präparationen der Plasmide pBSBA7 und pBSBA7-IS im großen Maßstab durchgeführt, die anschließend einer präparativen Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *SaII* unterzogen wurden. Die vollständig durchgespaltenen Plasmide wurden dann in eine nicht radioaktive Transkriptions-Reaktion mit T7 RNA-Polymerase eingesetzt. Die Aufreinigung der RNA erfolgte anfänglich nach Phenol/Chloroform-Extraktion über ein Shadow-Casting Gel, um Plasmide und *in-vitro*-Transkripte voneinander zu trennen. Im Gel wurde der gesamte Transkriptionsansatz aufgetrennt, anschließend die RNA-Produktbande aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Nachteil dieser Methode war jedoch eine geringe Ausbeute an *in-vitro*-Transkript sowie ein amplifizierbarer Hintergrund von Plasmid-DNA, welcher über PCR nachweisbar war. Daher wurden in späteren Versuchen die *in-vitro*-generierten RNAs nach erfolgter Transkription

einem rigiden DNaseI-Verdau unterzogen und anschließend über das High Pure RNA Isolation Kit der Firma Roche Diagnostics aufgereinigt. Dadurch wurde einerseits eine höhere Ausbeute an Transkript erzielt, andererseits störende Plasmid-DNA wirkungsvoll entfernt, wie das Fehlen eines Plasmid-Hintergrundes nach Amplifikation mit *Taq*-DNA Polymerase belegt. Die Produkthomogenität der *in-vitro*-Transkripte wurde anschließend auf einem denaturierenden, ethidiumbromid-gefärbten Polyacrylamidgel überprüft, in welchem ein Aliquot des erhaltenen Transkriptes aufgetrennt wurde (s. Abb. 3-2).



**Abb. 3-2: Elektrophoretische Analyse der aufgereinigten *in-vitro*-Transkripte der *BCR/ABL*-Wildtyp (WT)- und internen Standard (IS)-Sequenz.** Aufgetrennt wurden jeweils 500 ng des generierten Transkriptes, als Standard diente eine RNA-Leiter (MBI Fermentas) mit den angegebenen Größen. 10%iges Harnstoff-Polyacrylamidgel; EtBr-Färbung; inverse Bildarstellung.

Die Konzentrationsbestimmung der generierten *in-vitro*-Transkripte erfolgte spektrophotometrisch. Durch die Berechnung des spezifischen Molekulargewichtes der *in-vitro*-Transkripte zu 232 330 g/Mol konnten diese auf eine Stammlösungskonzentration von 1 nM eingestellt werden. Für den Einsatz in der RT-PCR wurde diese Stammlösung, entsprechend der jeweiligen Versuchsanordnung nach Verdünnung mit DEPC-behandeltem Reinstwasser eingesetzt.

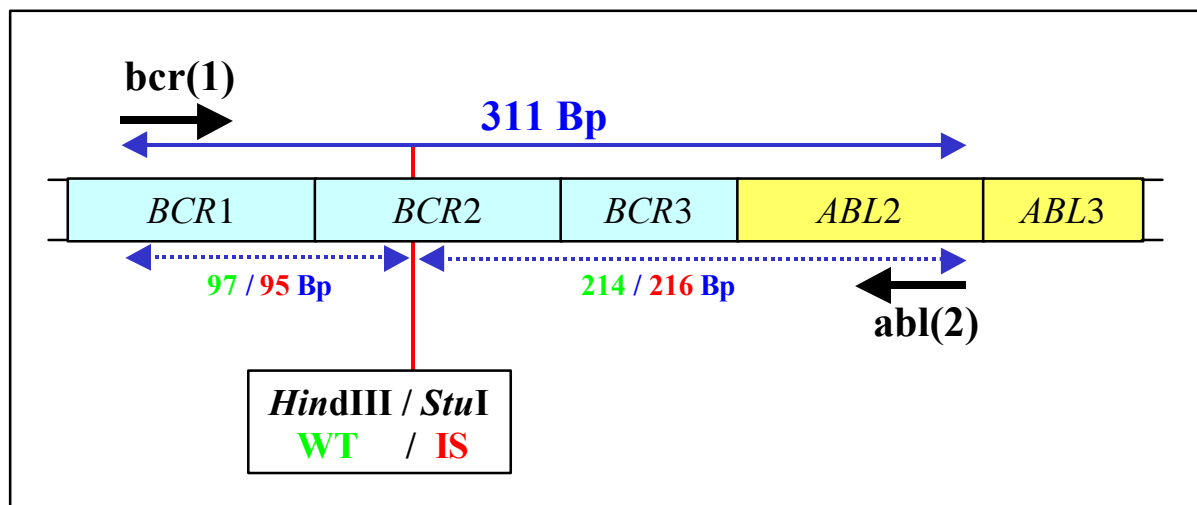
### 3.1.2. Auswahl eines geeigneten Primer-Systems für die Analyse des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes

Für die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes mittels quantitativer kompetitiver RT-PCR müssen die Primer bestimmte Voraussetzungen erfüllen:

- das zu amplifizierende PCR-Produkt sollte den Translokationsbereich zwischen Chromosom 9 (*BCR*-Gen) und Chromosom 22 (*ABL*-Gen) überspannen und somit nur zur Amplifikation des *BCR/ABL*-Fusionsgens führen;
- die PCR-Primer sollten zur Amplifikation der beiden Hauptvarianten des *BCR/ABL*-Fusionsgens, b3/a2 und b2/a2, geeignet sein. Der Unterschied zwischen diesen beiden Varianten ist das Vorhandensein des Exons 3 des *BCR*-Gens bei der Variante b3a2 bzw. das Fehlen dieses Exons bei der Variante b2a2;
- die Primerbindungsstellen müssen innerhalb des Genbereiches liegen, der in das Plasmid pBSBA7 integriert wurde, damit dieses Plasmid bzw. die von ihm generierten *in-vitro*-Transkripte als Probe bzw. Standard eingesetzt werden können;
- die zur Unterscheidung der PCR-Produkte nach erfolgter Amplifikation benötigten Restriktionsschnittstellen *Hind*III für den Wildtyp bzw. *Stu*I für den Standard müssen innerhalb des zu amplifizierenden Bereiches liegen;
- das primäre PCR-Produkt und die daraus hervorgehenden Restriktionsspaltprodukte müssen nach Länge einfach und eindeutig auftrennbar sein.

Außer diesen gen- bzw. plasmidspezifischen Voraussetzungen gelten für das auszuwählende Primer-System natürlich auch die üblichen in Kapitel 2.3.7.2 aufgeführten Kriterien für die Planung von Oligonukleotiden.

Unter Berücksichtigung dieser Parameter wurden die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer bcr(1) und abl(2) für die quantitative kompetitive RT-PCR des *BCR/ABL*-Fusionsgens mit Hilfe des Programmes Oligo konstruiert. Der Primer bcr(1) liegt im Exon 1 des *BCR*-Gens, der Primer abl(2) im Exon 2 des *ABL*-Gens. Aus der Lage der Primer ergibt sich ein 311 Bp langes PCR-Produkt für die Fusionsgen-Variante b3a2 und ein 236 Bp langes PCR-Produkt für die Variante b2a2, in der das Exon 3 des *BCR*-Gens fehlt. Eine schematische Darstellung der Lage der Primer ist in Abbildung 3-3 gezeigt.



**Abb. 3-3: Schematische Darstellung des QC-RT-PCR-Primersystems für die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionsgens.** Dargestellt ist die relative Position der Primer innerhalb des in das Plasmid pBSBA7 integrierten 601 Bp großen b3a2 spezifischen *BCR/ABL*-Genfragmentes, sowie die zur Unterscheidung von Wildtyp (WT) und internem Standard (IS) verwendete Restriktionsschnittstelle.

Beide Primer besitzen eine Länge von 20 Bp, einen vergleichbaren GC-Gehalt von ca. 50 % und somit auch fast identische Schmelztemperaturen. Als theoretisch optimale Annealing-Temperatur der Primer innerhalb der PCR wurde 56 °C ermittelt. Die exakte Sequenz und Lage der Primer ist im Anhang 7.1.1 ersichtlich. Ein erster Test dieses Primerpaares unter Standardbedingungen mit *Taq* DNA-Polymerase und 56 °C Annealing-Temperatur der Primer, bei dem Plasmid-Minipräparationen von pBSBA7-WT und pBSBA7-IS als *template* dienten, ergab nach Analyse mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) eine eindeutige, singuläre Produktbande bei 311 Bp und keinerlei Nebenprodukte.

### 3.1.3. Auswahl eines geeigneten Amplifikations-Systems

Da RNA von der *Taq* DNA-Polymerase nicht direkt als *template* für die Amplifikation genutzt werden kann, ist es erforderlich, diese zuvor in DNA umzuschreiben. Dies erfolgt mit Hilfe von Reversen Transkriptasen, die zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisieren. Üblicherweise werden zwei verschiedene Techniken für die RT-PCR eingesetzt:

1. eine Zwei-Schritt RT-PCR:

In einem ersten Schritt wird die cDNA-Synthese mit Hilfe von Reversen Transkriptasen, z. B. M-MuLV oder AMV, durchgeführt. Anschließend wird die cDNA mit einer

thermostabilen DNA-Polymerase amplifiziert. Dies bedeutet, daß die RT-PCR in zwei Reaktionsgefäßen stattfindet und somit ein Umpipettieren der cDNA erforderlich ist.

## 2. eine Ein-Schritt RT-PCR:

Die Synthese der cDNA und die Amplifikation werden nacheinander in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt, so daß kein Umpipettieren erforderlich ist. Für diese Methode gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten:

- der Einsatz von *Tth* DNA-Polymerase, die sowohl eine Reverse Transkriptase- als auch eine DNA-Polymerase-Aktivität besitzt.
- der Einsatz einer optimierten Mischung aus Reverser Transkriptase und DNA-Polymerase in einem ebenfalls für beide Reaktionen optimierten Puffer, z. B. das Titan One Tube RT-PCR-System.

Da das vorrangige Ziel für die Entwicklung eines neuen Testsystems für die *BCR/ABL*-Analytik darin lag, eine quantitative Methode für die Routineanalyse zu entwickeln, welche schnell und einfach durchführbar sein sollte, wurde in dieser Arbeit die Ein-Schritt-RT-PCR bevorzugt. Dieses hat unter anderem den Vorteil, daß ein zusätzliches Umpipettieren nach dem RT-Schritt unterbleibt und somit das Kontaminationsrisiko erheblich reduziert.

### 3.1.3.1. Amplifikation mit *Tth* DNA-Polymerase

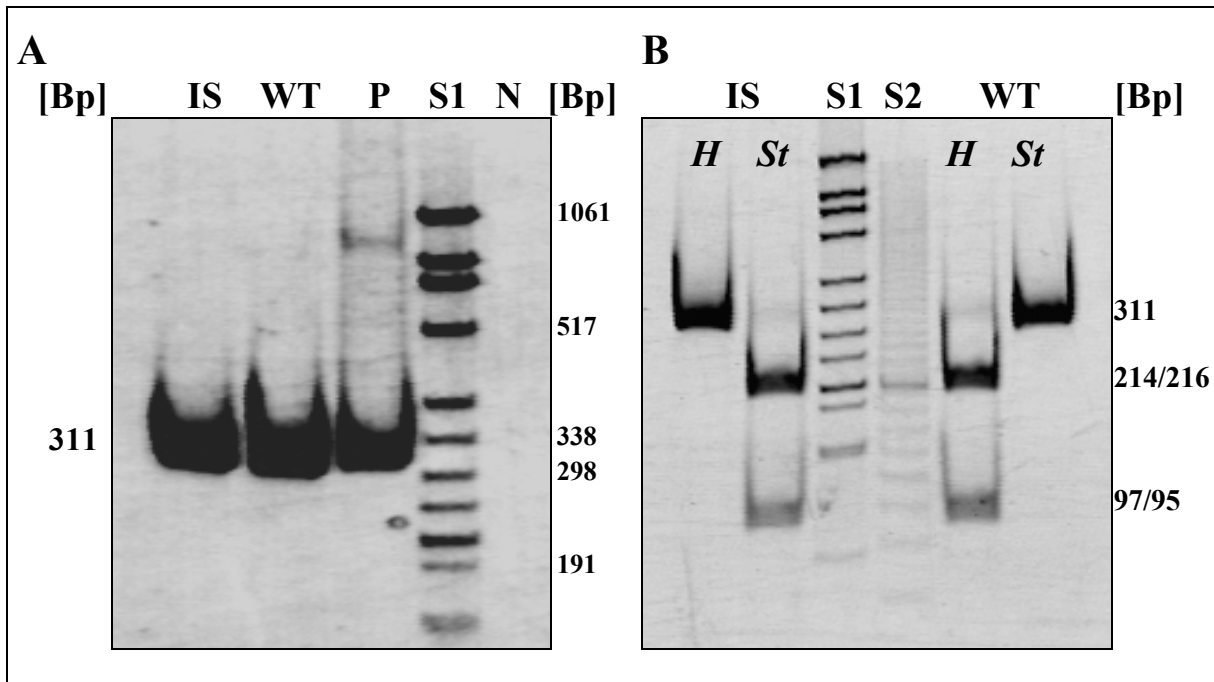
Die *Tth* DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus thermophilus*. Die *Tth* DNA-Polymerase ist eine hochprozessive 5'-3' DNA-Polymerase. Die *Tth* Polymerase ist als einziges Enzym in der Lage, beide Schritte einer RT-PCR durchzuführen, da sie in Gegenwart von Mangan-Ionen sowohl eine effiziente intrinsische Reverse Transkriptase-Aktivität (Loeb *et al.*, 1973) als auch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität besitzt. Da sie ebenso wie die *Taq* DNA-Polymerase aus einem thermophilen Organismus stammt, besitzt sie ein Temperatur-Optimum von 60 - 75 °C, ist beständig gegen längere Inkubationszeiten bei 95 °C und somit sehr gut für die Durchführung einer PCR geeignet (Saiki *et al.*, 1985, 1988). Ein Nachteil der *Tth*-Polymerase ist, daß die benötigten hohen Mangan-Ionenkonzentrationen zwar optimal für die Reverse Transkription sind, aber inhibierend auf die DNA-Polymerisation wirken. Man ist somit gezwungen, einen Kompromiss einzugehen und eine mittlere Konzentration an Mangan-Ionen zu wählen. Dieses wirkt sich zwar negativ auf die Prozessivität der Reversen Transkription aus - die *Tth* DNA-Polymerase kann daher nur cDNA von ca. 1-2 kb Länge synthetisieren -, kann aber toleriert werden, da die Länge des zu synthetisierenden *BCR/ABL*-cDNA-Abschnitts weit unter 1 kb



liegt. Ein wesentlicher Vorteil der *Tth*-Polymerase ist in ihrem hohen Temperatur-Optimum zu sehen. Hierdurch erhält man die Möglichkeit, die reverse Transkription bei Temperaturen durchzuführen, die ein vollständiges Aufschmelzen von Sekundärstrukturen in der RNA ermöglichen (Innis, 1988), welches sich positiv auf die Effizienz der RT-Reaktion auswirkt. Ein weiterer Vorteil ist, wie bereits oben erwähnt, die Durchführung von reverser Transkription und PCR in einem einzigen Reaktionsgefäß, wodurch die Anzahl der Pipettierschritte und somit die Kontaminationsgefahr bei der RT-PCR erheblich vermindert wird (Young *et al.*, 1993; Mulder *et al.*, 1994).

Die RT-PCR mit *Tth* DNA-Polymerase wurde nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics) mit den spezifischen Primern bcr(1) und abl(2) auf einem Perkin Elmer GeneAmp 2400 Thermocycler durchgeführt. Als *template* wurde die *in-vitro*-transkribierte Wildtyp- und Standard-RNA verwendet. Auf Abbildung 3-4 A) ist das PCR-Produkt nach Auftrennung in einem Polyacrylamidgel dargestellt. Die RT-PCR mit *Tth* DNA-Polymerase lieferte ebenfalls, wie auch bereits zuvor die PCR mit DNA-*template* und *Taq* DNA-Polymerase, ein spezifisches Amplifikations-Produkt von 311 Bp.

Für die Quantifizierung mittels einer kompetitiven RT-PCR ist es erforderlich, eine Diskriminierung von Wildtyp- und Standard-DNA nach der PCR durchzuführen. Diese wird durch den minimalen Sequenzunterschied gewährleistet, der zu unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen innerhalb des amplifizierten Bereiches führt. Somit ist eine Unterscheidung der PCR-Produkte nach Restriktionsspaltung mit wildtyp- bzw. standardspezifischer Restriktionsendonuklease und elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte gewährleistet. Der Restriktionsverdau der mit *Tth* DNA-Polymerase amplifizierten PCR-Produkte ergab die erwarteten Spaltfragmente von 214 und 97 Bp nach Spaltung mit *HindIII* bzw. 95 und 216 Bp mit *StuI* (siehe Abb. 3-4 B). Zudem konnte nachgewiesen werden, daß das Standard-Amplifikationsprodukt mit der WT-spezifischen Restriktionsendonuklease *HindIII*, genauso wie das WT-PCR-Produkt mit der standardspezifischen Restriktionsendonuklease *StuI*, nicht gespalten wird.



**Abb.3-4: Gelelektrophoretische Analyse der mittels RT-PCR mit *Tth* DNA-Polymerase generierten Amplifikate.**

- A:** Amplifikation von Standard- (IS) und Wildtyp-RNA (WT) durch RT-PCR mit *Tth* DNA-Polymerase, sowie des Plasmides pBSBA7 als Positivkontrolle (P), Wasser als Negativkontrolle (N). Als Standard diente pTR54HinfI (S1). Es zeigt sich das mit den Primern bcr(1) und abl(2) erwartete spezifische Produkt von 311 Bp.
- B:** Restriktionsspaltung der RT-PCR-Produkte mit der für den Wildtyp spezifischen Restriktionsendonuklease *Hind*III (*H*) und der für den Standard spezifischen Restriktionsendonuklease *Stu*I (*St*). Als Standards dienten pTR54HinfI (S1) und eine 20 Bp-Leiter (S2).

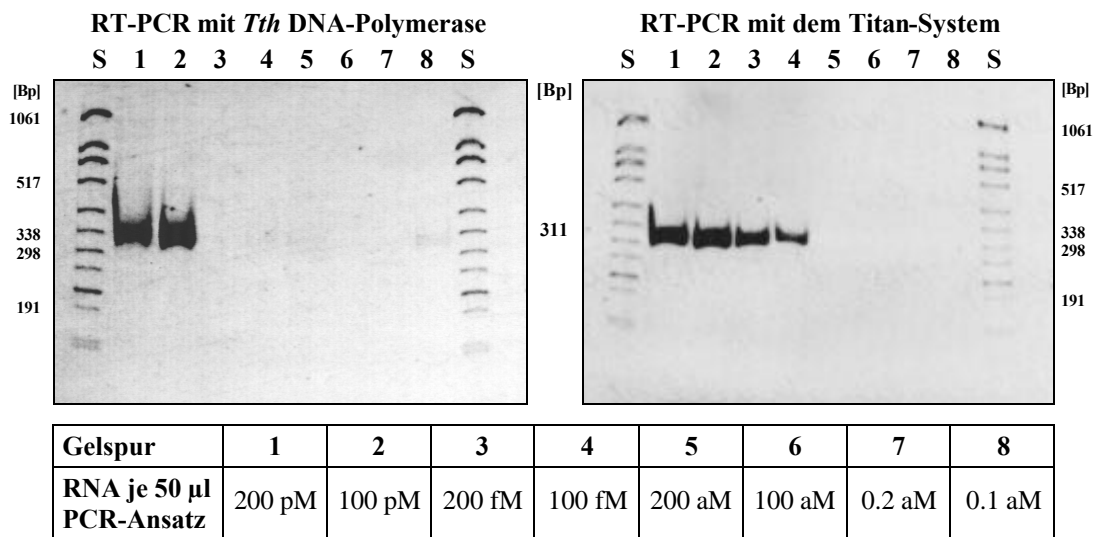
Auf dem Gel ist ein sehr geringer Anteil nicht-spaltbarer PCR-Produkte detektierbar, der auch durch Nachspaltung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verblieb. Ein Grund für diese Nicht-Spaltbarkeit kann in dem zur RT-PCR verwendeten Puffer zu sehen sein, da die PCR-Produkte vor der Spaltreaktion nicht aufgereinigt wurden. Der zur RT-PCR verwendete Puffer enthält eine hohe Manganionen-Konzentration sowie 40 % Glycerin und könnte somit inhibierend auf die Aktivität der Restriktionsenzyme gewirkt haben. Der Versuch wurde nach Aufreinigung der PCR-Produkte mittels des QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen) wiederholt, wodurch eine vollständige Durchspaltung mit beiden Restriktionsendonukleasen erreicht wurde, was für eine Inhibition durch den verwendeten RT-PCR-Puffer der *Tth* DNA-Polymerase sprach. Da aber eine Aufreinigung der PCR-Produkte zu einer hohen Kostenbelastung führen würde und zudem sehr zeit- und arbeitsaufwendig wäre, sollte in dem zu entwickelnden Verfahren zum *BCR/ABL*-Fusionsnachweis hierauf möglichst verzichtet werden.

### 3.1.3.2. Amplifikation mit dem Titan One Tube RT-PCR System

Eine weitere Möglichkeit, die RT-PCR in einem Schritt durchzuführen, besteht darin, statt der *Tth* DNA-Polymerase ein Enzymgemisch zu verwenden, das sowohl eine Reverse Transkriptase als auch eine DNA-Polymerase beinhaltet. Eine solche Kombination stellt das Titan One Tube RT-PCR System von Roche Diagnostics dar, welches die Reverse Transkriptase AMV sowie das Expand High Fidelity Polymerase-Gemisch für die Amplifikation verwendet. Das Expand High Fidelity Polymerase-Gemisch besteht aus der thermostabilen *Taq* DNA-Polymerase sowie der *Pwo* DNA-Polymerase, die eine 3'-5' *proofreading*-Aktivität besitzt, wodurch nach Angaben des Herstellers die Fehlerrate in der PCR dreifach geringer ist als bei alleiniger Verwendung von *Taq* DNA-Polymerase. Durch einen optimierten Puffer können beide Prozesse, Reverse Transkription und PCR, in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. RNA-Sekundärstrukturen können einerseits durch Temperaturen von 42 - 60 °C während der Reversen Transkription aufgeschmolzen werden, andererseits enthält der RT-PCR Puffer zusätzlich DMSO, welches ebenfalls die Stabilität von RNA-Haarnadel-Strukturen reduziert. Eine Amplifikation mit dem Titan-System ergab wie auch schon zuvor mit *Taq* und *Tth* DNA-Polymerase ein spezifisches b3a2 PCR-Produkt von 311 Bp. Nach Spaltung mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen *Hind*III (Wildtyp) und *Stu*I (Standard) konnten nach Auftrennung auf einem analytischen Polyacrylamid die erwarteten Spaltfragmente von 214 bzw. 216 Bp sowie 97 bzw. 95 Bp detektiert werden. Im Gegensatz zur Spaltung nach Amplifikation mit *Tth* DNA-Polymerase (s. 3.1.3.1) konnte ohne vorherige Aufreinigung der mit dem Titan-System generierten RT-PCR-Produkte eine vollständige Durchspaltung mit beiden Restriktionsendonukleasen erreicht werden.

### 3.1.3.3. Sensitivitätsvergleich zwischen *Tth* DNA-Polymerase und dem Titan One Tube RT-PCR System

Für die Verlaufskontrolle und die Therapie der Patienten mit chronisch myeloischen Leukämie ist es wichtig, eine Zunahme *BCR/ABL*-exprimierender residueller leukämischer Zellen nach erfolgter Knochenmarktransplantation sowohl schnell als auch sensitiv erfassen zu können. Daher wurde ein Sensitivitätsvergleich zwischen *Tth* DNA-Polymerase und dem Titan One Tube RT-PCR-System mit absteigenden Gesamt-*template*-Konzentrationen durchgeführt. Es wurden dabei für beide Amplifikationssysteme die vom Hersteller (Roche Diagnostics) empfohlenen Reaktionsansätze und -bedingungen gewählt.

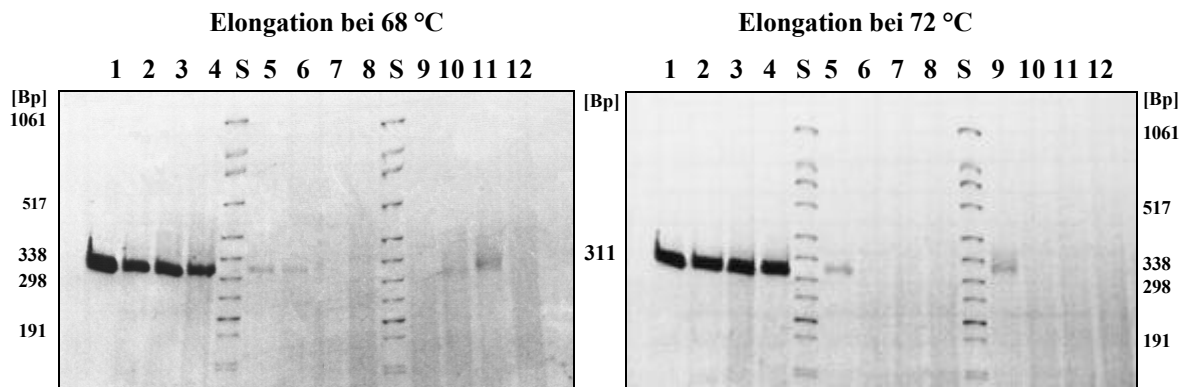


**Abb. 3-5: Elektrophoretische Analyse zum Nachweis der Sensitivität bei Amplifikation mit *Tth* DNA-Polymerase und Titan One Tube RT-PCR System.** Als Standard (S) diente pTR54\**Hinf*I. In der Tabelle ist jeweils die Gesamt-*template*-Konzentration der 50µl-RT-PCR-Ansätze aufgeführt.

Hierbei zeigte sich deutlich die Überlegenheit des Titan-Systems, mit dem noch ein RT-PCR-Produkt bei 100 fM *template*-RNA gegenüber 100 pM *template*-RNA bei Verwendung der *Tth* DNA-Polymerase nachweisbar war. Dies bedeutet, daß das Titan-System deutlich sensitiver und somit viel besser für den Nachweis von *minimal residual disease* geeignet ist als die *Tth* DNA-Polymerase.

### 3.1.3.4. Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen für das Titan One Tube RT-PCR-System

Um die Sensitivität des Titan-Systems möglicherweise noch steigern zu können, wurde einerseits die Magnesiumkonzentration und andererseits die Elongationstemperatur während der PCR variiert. Es wurde zwischen der vom Hersteller empfohlenen Elongationstemperatur von 68 °C und der ansonsten für PCR mit *Taq* DNA-Polymerase üblichen Temperatur von 72 °C verglichen. Als *template* wurden 100 fM, 200 aM und 100 aM Gesamt-RNA in die RT-PCR eingesetzt. Die Analyse der RT-PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese auf analytischen Polyacrylamidgelen, deren Ergebnis ist in Abbildung 3-6 dargestellt.



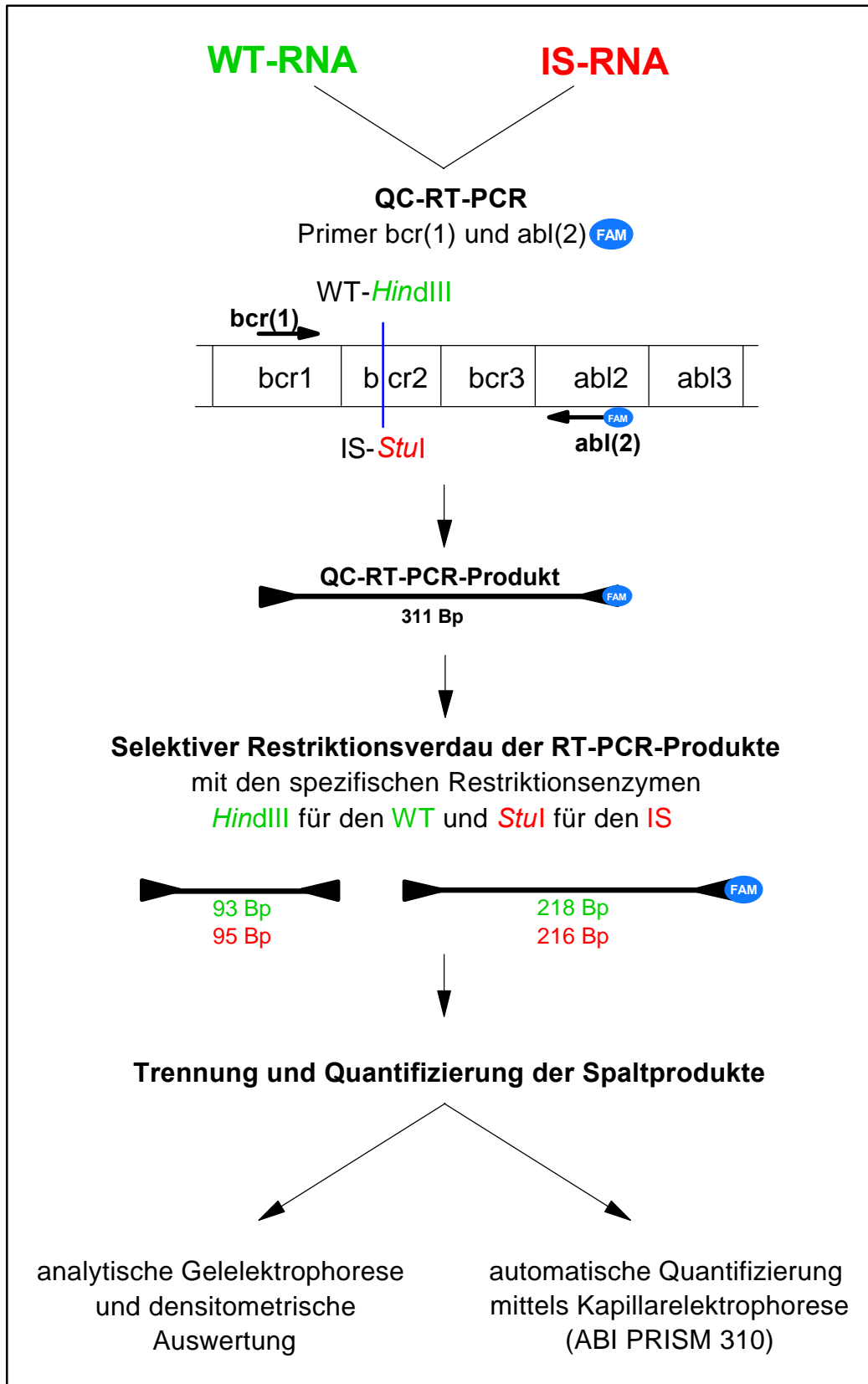
Gelspur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RNA-Konzentration je 50 µl PCR-Ansatz	100 fM				200 aM				100 aM			
[mM MgCl <sub>2</sub> ]	1.5	2.0	2.5	3.0	1.5	2.0	2.5	3.0	1.5	2.0	2.5	3.0

**Abb. 3-6: Optimierung des Titan One Tube RT-PCR Systems.** Variiert wurden die Elongationstemperatur sowie die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration im Bereich von 1.5 – 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>. Als Standard (S) diente pTR54\**Hinfl*.

Es zeigte sich, daß die optimale Konzentration an Magnesium 1.5 mM beträgt, da hier auch noch PCR-Produkte bei 200 bzw. 100 aM detektierbar sind. Insgesamt handelt es sich jedoch um ein sehr stabiles System, so daß die Variation sowohl der Elongationstemperatur als auch der Magnesium-Konzentration nur einen minimalen Einfluß auf die Amplifikationseffizienz hat. Für die nachfolgenden Experimente mit dem Titan One Tube RT-PCR-System wurde eine Magnesiumkonzentration von 1.5 mM gewählt sowie eine Elongationstemperatur von 68 °C; diese entspricht auch den Empfehlungen des Herstellers.

### 3.1.4. Titrationsexperimente

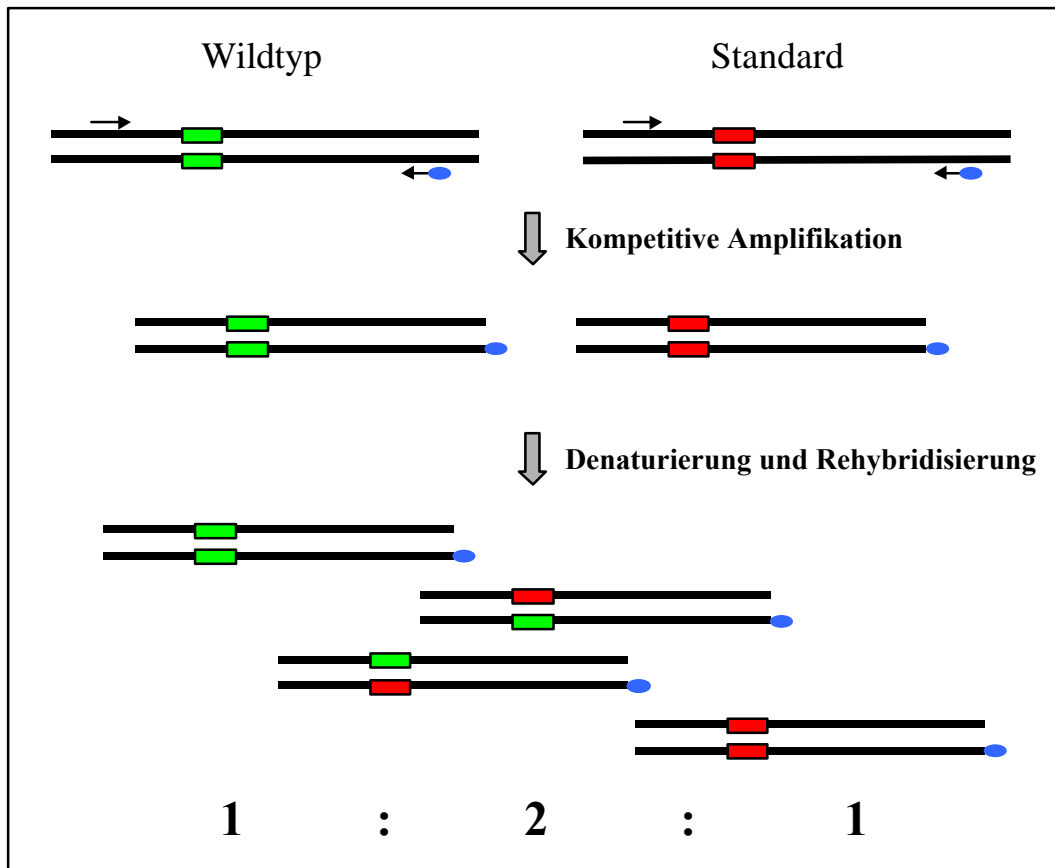
Zur Validierung der QC-RT-PCR-Methode für die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionstranskripts wurden zunächst Modelluntersuchungen mit *in-vitro*-generierten Standard- und Wildtyp-RNAs durchgeführt, wobei die Wildtyp-RNA die Probe eines an CML erkrankten Patienten simulierte. In einer ersten Versuchsreihe wurden Wildtyp- und Standard-RNA bei einer konstanten Gesamt-*template*-Konzentration gegenläufig titriert, anschließend wurden Titrationsen mit konstanter Menge Wildtyp-RNA und variabler Standard-RNA-Menge durchgeführt. Letztere Vorgehensweise entspricht dem Verfahren mit einer unbekanntem Patienten-Probe, die in konstanten Mengen in eine RT-PCR eingesetzt wird, wobei der Standard gegentitriert wird. Das Verfahren zur exakten Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionsgens ist in Abbildung 3-7 dargestellt. Ausgehend von bekannten Konzentrationen an Standard- und Wildtyp-RNA werden beide *templates* mit den Primern *bcr*(1) und *abl*(2) kompetitiv amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt von 311 Bp wird anschließend einer Spaltung mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen *Hind*III für den Wildtyp bzw. *Stu*I für den Standard unterzogen. Die fluorophor-markierten Spaltfragmente des unteren Stranges des PCR-Produktes haben eine Länge von 216 Bp nach Spaltung mit *Stu*I (AGG↓CCT) bzw. 214 Bp nach Spaltung mit *Hind*III (A↓AGCTT). Die Quantifizierung der so entstandenen Spaltfragmentmengen kann einerseits durch Elektrophorese auf analytischen Polyacrylamidgelen mit anschließender densitometrischer Auswertung erfolgen. Andererseits besteht die Möglichkeit, eine automatische Längenbestimmung und Mengenquantifizierung mittels einer ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* Kapillarelektrophorese durchzuführen. Dies ist aber nur möglich, wenn einer der für die QC-RT-PCR verwendeten Primer einen Fluorophor trägt, der mit der LIF-Detektion der Kapillarelektrophorese erfaßt werden kann. Einzelheiten zu den jeweiligen Quantifizierungs-Methoden werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.



**Abb. 3-7: Schematische Darstellung der Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionsgens mittels quantitativer kompetitiver RT-PCR:** Wildtyp- (WT) und Standard-RNA (IS) werden in bekannten Konzentrationen gemischt, amplifiziert und nach Spaltung der PCR-Produkte mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen quantifiziert. Die einzelnen Schritte des Verfahrens werden im Text näher erläutert.

**3.1.4.1. Heteroduplex-Bildung**

Ein Problem der exakten Quantifizierung mit einem idealen kompetitiven Standard besteht darin, daß die Unterscheidung zwischen interner Standard- und Proben-RNA bzw. deren DNA-PCR-Produkte auf einer einzigen Restriktionsschnittstelle basiert. Durch die große Übereinstimmung zwischen Standard- und Wildtyp-RNA in der Sequenz (2 Bp Abweichung) und der exakt gleichen Länge der in der kompetitiven RT-PCR entstehenden Amplifikate können in der Plateauphase der PCR Heteroduplexe gebildet werden (Becker-André *et al.*, 1989; Hahn *et al.*, 1995). Innerhalb der Plateauphase der PCR kommt es durch Denaturierung und nachfolgende Rehybridisierung der PCR-Produkte zur Ausbildung von nicht-spaltbaren Heteroduplexen (s. Abb. 3-8). Im Idealfall kommt es dabei zu einer Binomialverteilung von Homo- und Heteroduplex-Produkten.



**Abb. 3-8: Schematische Darstellung der Heteroduplex-Bildung in der Plateauphase der quantitativen, kompetitiven RT-PCR.** Durch Denaturierung und Rehybridisierung der PCR-Produkte kommt es idealerweise zu einer Binomialverteilung von Homo- und Heteroduplex-Produkten. Jeweils 25 % der entstandenen PCR-Produkte sind spaltbar mit der Wildtyp-■ bzw. Standard-■ spezifischen Restriktionsendonuklease, 50 % sind nicht spaltbar.



Zur Quantifizierung werden jeweils Aliquots der mittels quantitativer kompetitiver (RT-) PCR erhaltenen PCR-Produkte spezifischen Restriktionsspaltungen mit Wildtyp- oder Standard-spezifischen bzw. einem Doppelverdau mit beiden Restriktionsendonukleasen unterzogen. Anschließend werden die Restriktionsfragmente analysiert und die relativen Produktmengen an Standard, Wildtyp und Heteroduplex gegen die Ausgangskonzentration des internen Standards aufgetragen. Am Schnittpunkt der Kurven von Wildtyp und Standard (d. h. bei gleicher Menge des Endproduktes) wird dann auf der X-Achse der Anteil der Probe an der Ausgangsmenge abgelesen. Der theoretische Verlauf der Produktbildung einer gegenläufigen Titrationsreihe mit gleichen Gesamt-*template*-Konzentrationen nach kompetitiver PCR ist in Abbildung 3-9 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die zuvor erläuterte Binomial-Verteilung der PCR-Produkte (Abb. 3-8), die sich aus spaltbaren Wildtyp- und Standard-Homoduplices, mit einem Schnittpunkt der Kurven bei jeweils 50 %, sowie nicht-spaltbaren Heteroduplices ergibt.

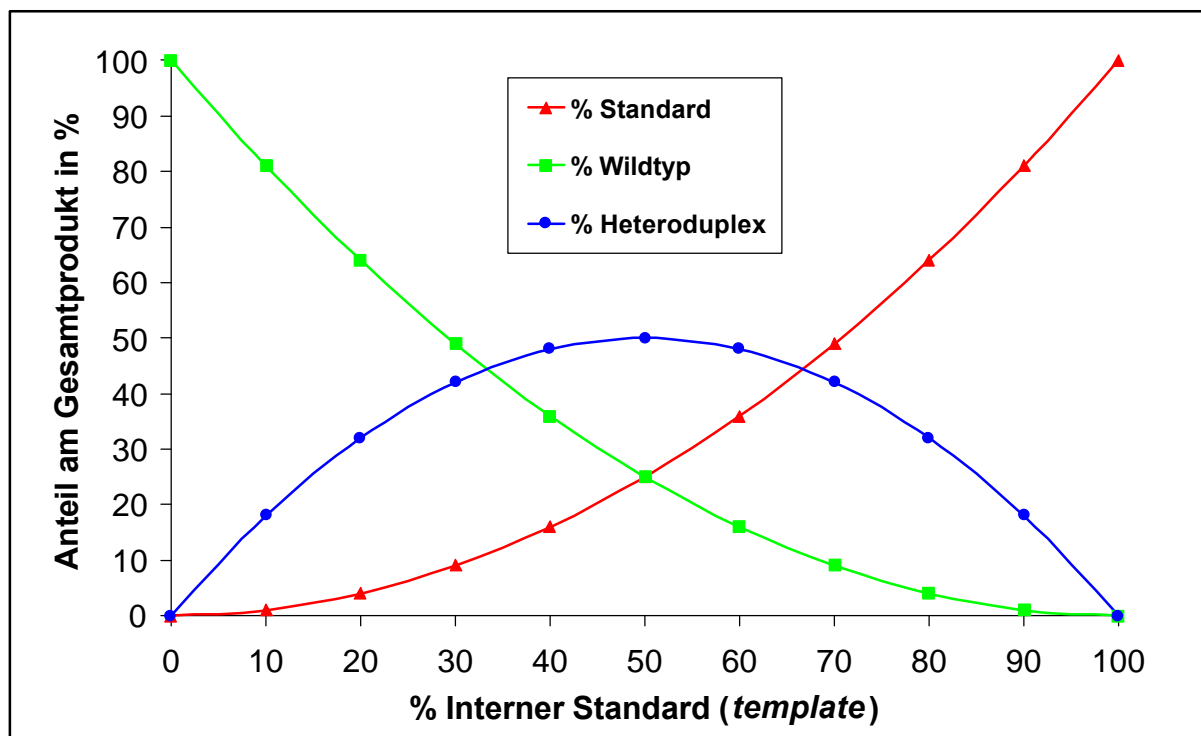
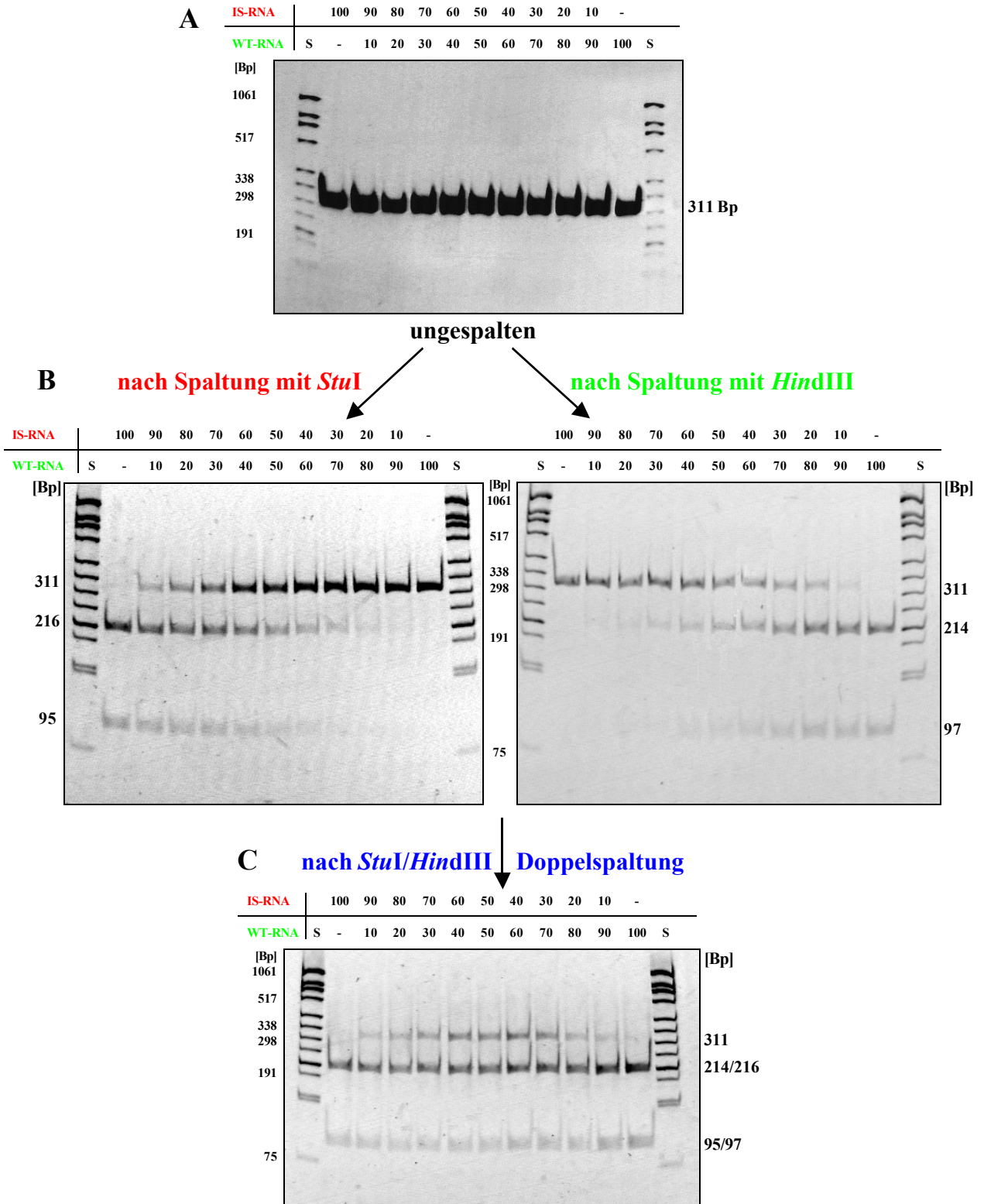


Abb. 3-9: Theoretischer Verlauf der Produktverteilung einer gegenläufigen Titrationsreihe mit Wildtyp- und Standard-RNA, bei zunehmender Konzentration an Standard-RNA von 0 auf 100 %.

### 3.1.4.2. Titration mit gegenläufigen *BCR/ABL*-Wildtyp- und Standard-RNA-Konzentrationen

Die Titrationsexperimente wurden mit gegenläufigen Konzentrationen an Wildtyp- und Standard-RNA, aber bei konstanter Gesamt-*template*-Konzentration von 200 fM, 100 fM und 40 fM durchgeführt. Ausgehend von einer 100%igen Standard-RNA-Konzentration wurde die Konzentration an Wildtyp-RNA in 10 %-Schritten bis auf 100 % gesteigert. Die RNA einer Titrationsreihe, die 11 Meßpunkte umfaßt, wurde in den entsprechenden Mischungsverhältnissen bei konstanter Gesamt-Konzentration gemischt und anschließend als *template* in die RT-PCR mit dem Titan One Tube RT-PCR System eingesetzt. Nach der PCR wurden die PCR-Produkte zur Kontrolle auf einheitliche Länge und Kontaminationsfreiheit in durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden Aliquots der PCR-Produkte einer Restriktionsspaltung mit Standard- oder Wildtyp-spezifischer Restriktionsendonukleasen unterzogen. Beispielhaft ist dieses Verfahren in Abbildung 3-10 anhand einer Titrationsreihe mit einer Gesamt-*template*-Konzentration von 100 fM RNA dargestellt. Die vorgemischten RNAs wurden mit dem Titan One Tube RT-PCR-System unter optimierten Bedingungen amplifiziert. Die anschließende Analyse der entstandenen PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel (s. Abb. 3-10 A). Es ist eine einheitliche Produktbande von 311 Bp Länge für alle Titrationspunkte detektierbar. Trotz Verwendung gleicher Ausgangsmengen an RNA-*template* pro Titrationspunkt sind Variationen in der Bandenintensität des 311Bp-Produktes erkennbar. Dies bedeutet, daß allein aufgrund der Bandenintensitäten keine quantitativen Aussagen über die Ausgangsmengen möglich sind und daher zur exakten Quantifizierung der Ausgangskopienzahl andere Quantifizierungsverfahren benötigt werden. Zu diesem Zweck wurden Aliquots der PCR-Produkte einer spezifischen Restriktionsspaltung mit der Wildtyp-spezifischen Restriktionsendonuklease *HindIII* und mit der Standard-spezifischen Restriktionsendonuklease *StuI* unterzogen. Die spezifischen Spaltmuster sind in Abb. 3-10 B nach elektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsfragmente mittels 10%iger PAGE gezeigt. Deutlich zu erkennen ist, daß reine Standard- bzw. Wildtyp-RNA mit den jeweiligen spezifischen Restriktionsenzymen vollständig durchgespalten wurden, wohingegen in allen anderen Gelspuren eine Aufteilung in spaltbare und nicht-spaltbare PCR-Produkte, entsprechend dem Mischungsverhältnis von Standard- zu Wildtyp-RNA, erfolgte. Eine Doppelspaltung mit *HindIII* und *StuI* zeigt die in Kapitel 3.1.4.1 erläuterte Binomialverteilung aus spaltbaren und nicht-spaltbaren (Heteroduplices) PCR-Produkten (Abb. 3-10 C).



**Abb. 3-10: Gegenläufige Titration von Standard-RNA (IS) und Wildtyp-RNA (WT) bei einer konstanten Gesamt-template-Konzentration von 100 fM RNA.**

- A: Die Amplifikation mit dem Titan One Tube RT-PCR System ergibt nach Auftrennung auf einem 10%igen Polyacrylamidgel eine Produktbande bei 311 Bp.
- B: Nach Spaltung mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen sind die Spaltprodukte von 95/97 und 216/214 Bp detektierbar.
- C: Nach Doppelspaltung mit *StuI/HindIII* sind die nicht-spaltbaren Heteroduplices mit einer Länge von 311 Bp detektierbar.

3.1.4.2.1. Densitometrische Auswertung analytischer Polyacrylamidgele

Zur quantitativen Bestimmung der spezifischen Restriktionsfragment-Mengen wurden die Fragmente auf 10%igen analytischen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid gefärbt (s. Abb. 3-10 B, C). Die so erhaltenen Gelbilder wurden mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage als Datei abgespeichert und anschließend densitometrisch über die Bildverarbeitungs-Software TINA ausgewertet. Zur Quantifizierung wurde jede Gelspur und somit jeder Titrationspunkt einzeln ausgewertet. Die Summe der Bandenintensitäten einer Gelspur (Banden: 311 Bp und 214/216 Bp) wurde auf 100 % normiert und anschließend der relative Anteil jeder Bande bestimmt. Diese ermittelten Prozentwerte wurden dann gegen die Ausgangskonzentration des internen Standards aufgetragen. In Abbildung 3-11 ist die densitometrische Auswertung für die in Abbildung 3-10 gezeigte Titrationsreihe mit gegenläufigen Standard- bzw. Wildtyp-RNA-Konzentrationen bei einer Gesamt-*template*-Konzentration von 100 fM RNA im PCR-Ansatz gezeigt.

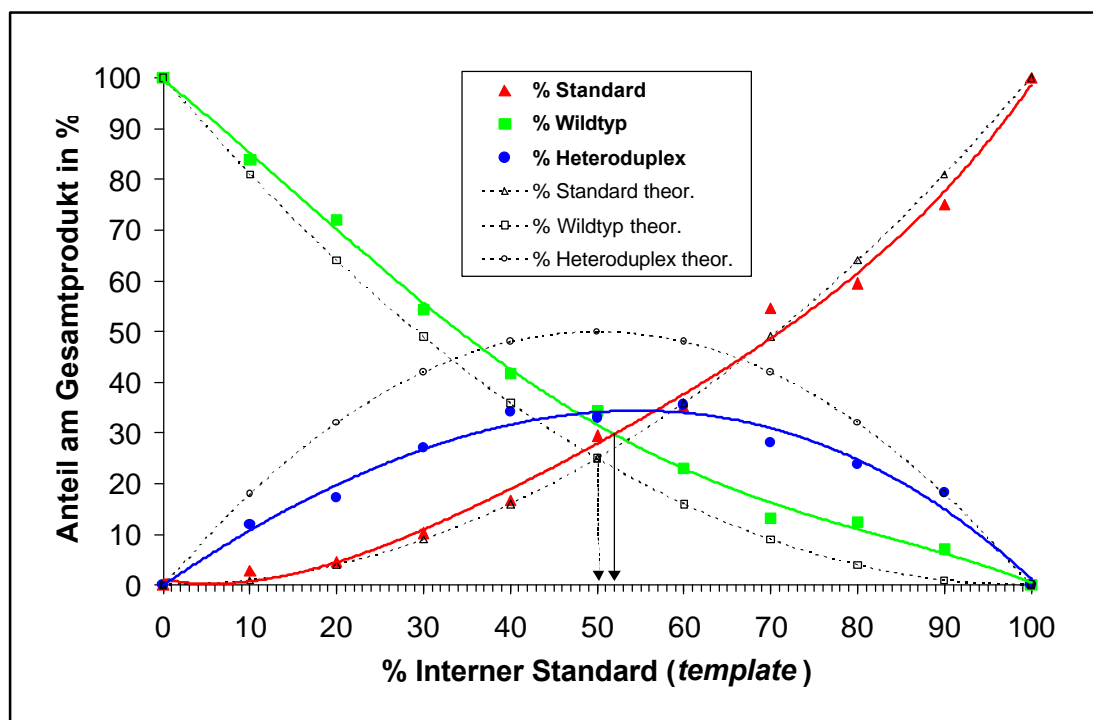


Abb. 3-11: Titration mit gegenläufiger Standard- und Wildtyp-RNA bei einer konstanten Gesamt-*template*-Konzentration von 100 fM RNA. Die dargestellten Daten wurden erhalten, indem die spezifisch mit *StuI* bzw. *HindIII* gespaltenen PCR-Fragmente in analytischen Polyacrylamidgelen aufgetrennt, mit EtBr gefärbt und densitometrisch in ihren relativen Mengen quantifiziert wurden. Zum Vergleich sind die theoretisch erwarteten Ergebnisse gestrichelt dargestellt. Die Äquivalenzpunkte sind jeweils mit einem Pfeil markiert.

Die densitometrische Auswertung zeigt deutlich, daß bei Amplifikation von reiner Standard- bzw. reiner Wildtyp-RNA jeweils das gesamte PCR-Produkt mit den jeweiligen spezifischen Restriktionsenzymen vollständig spaltbar ist. Die jeweiligen Mischungsverhältnisse von Standard- und Wildtyp-RNA zeigen ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit den theoretisch erwarteten Werten und somit am Äquivalenzpunkt einen Anteil des internen Standards von 52 %. Die Menge an Heteroduplices liegt zwar insgesamt etwas niedriger als theoretisch berechnet, die Kurve zeigt aber den erwarteten Verlauf mit der größten Menge an Heteroduplices am Äquivalenzpunkt.

#### **3.1.4.2.2. Quantifizierung mittels Kapillarelektrophorese**

Eine weitere Möglichkeit, neben der klassischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die durch QC-RT-PCR generierten PCR-Produkte zu analysieren, stellt die automatische Quantifizierung der kapillarelektrophoretisch separierten Fragmente durch LIF-Detektion dar. In dieser Arbeit wurde die ABI PRISM *Genetic Analyzer* Kapillarelektrophorese der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Detektion und Quantifizierung der in der PCR generierten DNA-Fragmente erfolgt hierbei über Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF) nach Anregung durch einen Argonionen-Laser, nachdem die PCR-Produkte zuvor durch Einsatz eines mit 6-FAM 5'-gekoppelten Rückprimers (abl(1)- bzw. abl(2)-FAM) bereits während der PCR mit einem Fluorophor markiert wurden. Der Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM (6-Carboxyfluorescein) schien hierfür besonders geeignet, da er aufgrund seines Absorptionsmaximums von 495 nm optimal vom Argonionen-Laser (Emissionsmaximum: 488 nm) angeregt wird und eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute zeigt, so daß eine hohe Nachweisempfindlichkeit für die 6-FAM-markierten Fragmente gewährleistet ist.

Die für die Analyse verwendeten Kapillaren haben einen sehr geringen Durchmesser (50 µm) und besitzen somit eine effiziente Wärmeableitung. Außerdem besitzt dieses System eine Temperaturkontrolle, so daß das gesamte Trennsystem auf einer konstanten Temperatur gehalten werden kann. Dies stellt eine Grundvoraussetzung für die gute Trennleistung der Kapillarelektrophorese dar. Die Kapillaren sind UV-transparent und ermöglichen eine *online*-Detektion der injizierten Proben.

Die Injektion der Proben erfolgte elektrokinetisch, das heißt durch Anlegen einer Hochspannung an das Probengefäß. Hierdurch werden die Probenkomponenten elektrophoretisch in die Kapillare transportiert. Da das Gesamtvolumen der Kapillare nur wenige µl beträgt, darf für eine hohe Trenneffizienz das Injektionsvolumen nur einige nl betragen, um nicht zu einer Bandenverbreiterung beizutragen. Die elektrokinetische Injektion

führt zu einer hohen Reproduzierbarkeit bei gleicher Probenzusammensetzung und gleicher Trenn-Matrix, was einen Einsatz der Kapillarelektrophorese in der Routineanalytik ermöglicht.

Die Datenaufnahme erfolgt durch Detektion des Fluoreszenzlichtes mit einer CCD-Kamera (Detektionsbereich von 525-650 nm) nach laserinduzierter Anregung des Fluorophormarkierten DNA-Fragmentes. Die Signalintensität ist hierbei direkt proportional der Intensität der eingestrahlten Photonenmenge. Insgesamt zeichnet sich dieses Detektions-System durch eine sehr hohe Empfindlichkeit und Selektivität aus. Die so gewonnenen Rohdaten wurden anschließend mit der *GeneScan*-Software analysiert.

Für die Elektrophorese wurden lineare Polymere verwendet. Diese sind nicht quervernetzt, sondern bestehen aus einem losen Geflecht linearer Polymerketten, die nur durch physikalische Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Für den ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* werden sogenannte *Performance Optimized Polymers* (POP) angeboten, die bereits gebrauchsfertig als flüssige Polymerlösung vorliegen. Die Verwendung dieser Polymere ist einerseits zeitsparend und garantiert andererseits eine hohe Reproduzierbarkeit von Lauf zu Lauf. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Gel-Puffer-Lösungen ist, daß sie durch Druck austauschbar sind, so daß nach jeder Trennung ein neues Gel in der Kapillare vorliegt. Da somit für jede zu analysierende Probe ein neues Gel verwendet wird, ist es trotz hoher Reproduzierbarkeit wichtig, einen internen Längenstandard mitanzulysieren zu lassen (Grossmann & Colburn 1996; Kuhn & Hofstetter 1993). Dieser sollte, um Schwankungen der Trennmatrixeigenschaften auszugleichen, eine ähnliche Mobilität aufweisen wie die zu analysierenden DNA-Fragmente.

Für die *BCR/ABL*-Fragmentanalyse wurden die mittels quantitativer kompetitiver RT-PCR generierten FAM-markierten PCR-Produkte zunächst zur Mengenabschätzung auf ein analytisches Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach spezifischer Restriktionsspaltung wurden die Proben für die anschließende kapillarelektrophoretische Analyse im Verhältnis 1:15 bis 1:20 mit Reinstwasser verdünnt. Für die Auftrennung der Spaltfragmente wurde das lineare Polymer POP4 verwendet, welches speziell für eine hohe Auflösung unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) entwickelt wurde (Auflösung lt. Herstellerangaben: 1 Bp Unterschied im Bereich bis 250 Bp, 2 Bp im Bereich zwischen 251-350 Bp). Als interner Längenstandard wurde *GeneScan* 500 TAMRA (s. Kapitel 2.4.3.3) verwendet. Anhand dieses Standards war nach Analyse mit der *GeneScan*-Software eine Größenordnung für die zu analysierenden Fragmente möglich.

Bei mehr als 400 einzeln analysierten kapillarelektrophoretischen Auftrennungen der Spaltfragmente ergaben sich folgende Größenordnungen der aufgetrennten Fragmente (Primerpaar: bcr(1), abl(2)-FAM):

- *HindIII*-Spaltung der Wildtyp-Sequenz: 216.89 nt mit einer Standardabweichung von 0.54 nt (theoretisch: 214 nt);
- *StuI*-Spaltung der Standard-Sequenz: 215.93 nt mit einer Standardabweichung von 0.39 nt (theoretisch: 216 nt);
- ungespaltenes PCR-Produkt: 310.69 nt mit einer Standardabweichung von 0.29 nt (theoretisch: 311 nt).

Die experimentell ermittelten Längen der *StuI*-Spaltfragment und des ungespaltenen RT-PCR-Produktes stimmen sehr gut mit den theoretischen Größen überein. Nicht erklärbar ist die abweichende Längenzuordnung des *HindIII*-Spaltfragmentes bei gleicher Fluoreszenzmarkierung, gleicher Trennmatrix und Verwendung des gleichen Längenstandards.

Nach Analyse mit der *GeneScan*-Software erfolgt die Darstellung der automatischen Fragmentanalyse in Form von Elektropherogrammen mit dazugehörigen Fragmentlängen und Peakflächen. Beispielhaft für die Analyse von gegenläufigen Titrationsreihen sind in Abbildung 3-12 die Elektropherogramme der bereits mittels herkömmlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Abb.3-10) analysierten Titrationsreihe mit einer Gesamt-*template*-Konzentration von 100 fM RNA gezeigt. Dargestellt sind die mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennten Fragmente nach Spaltung mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen, wobei durch Fluoreszenzanregung nur die mit einem Fluorophor markierten Fragmente von 311 nt (ungespaltenes PCR-Produkt) und 216/214 nt (Fragmente nach Spaltung mit *StuI/HindIII*) detektiert werden können. Die Spaltfragmente von 95/97 nt sind somit nicht detektierbar.

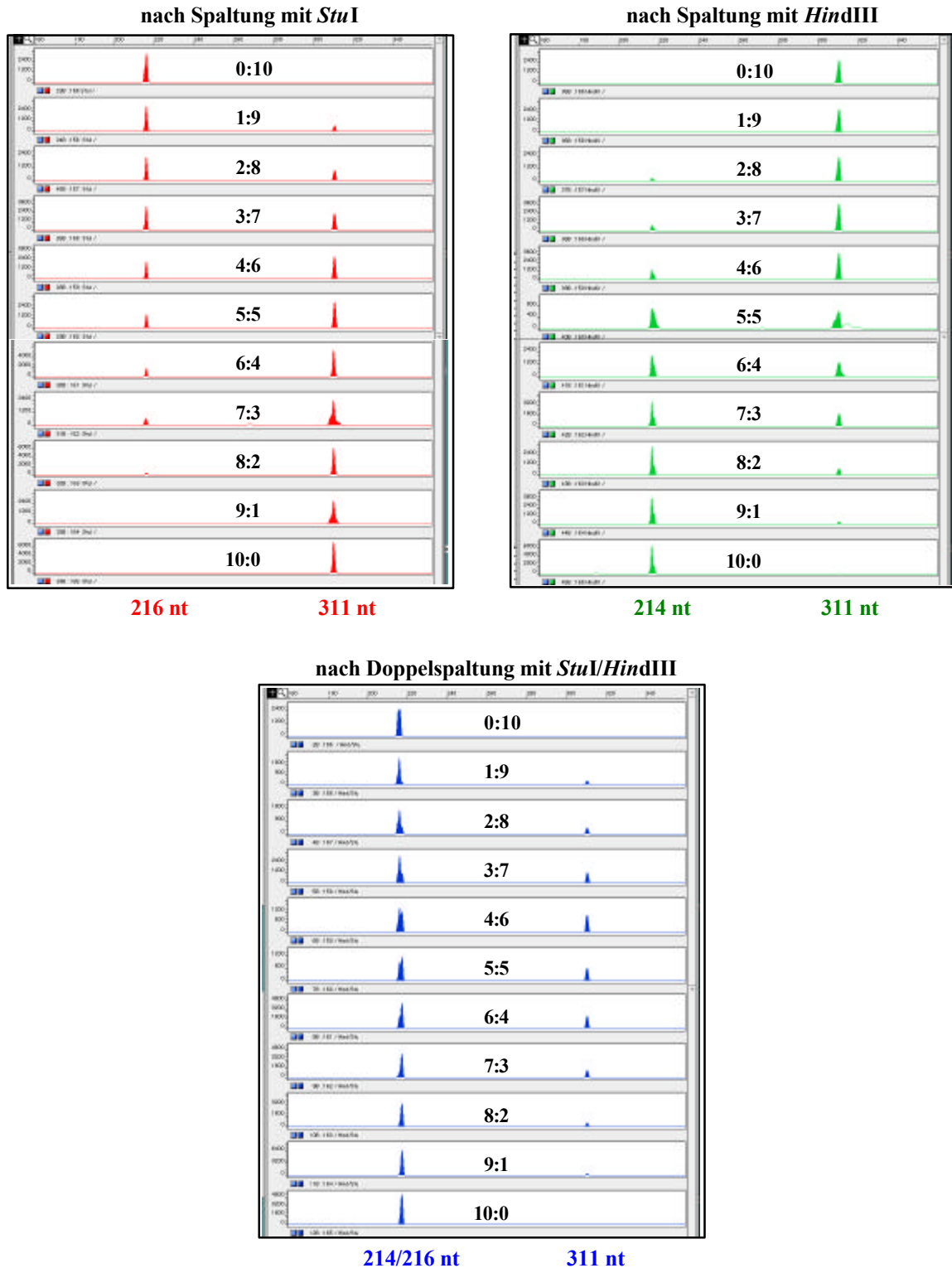
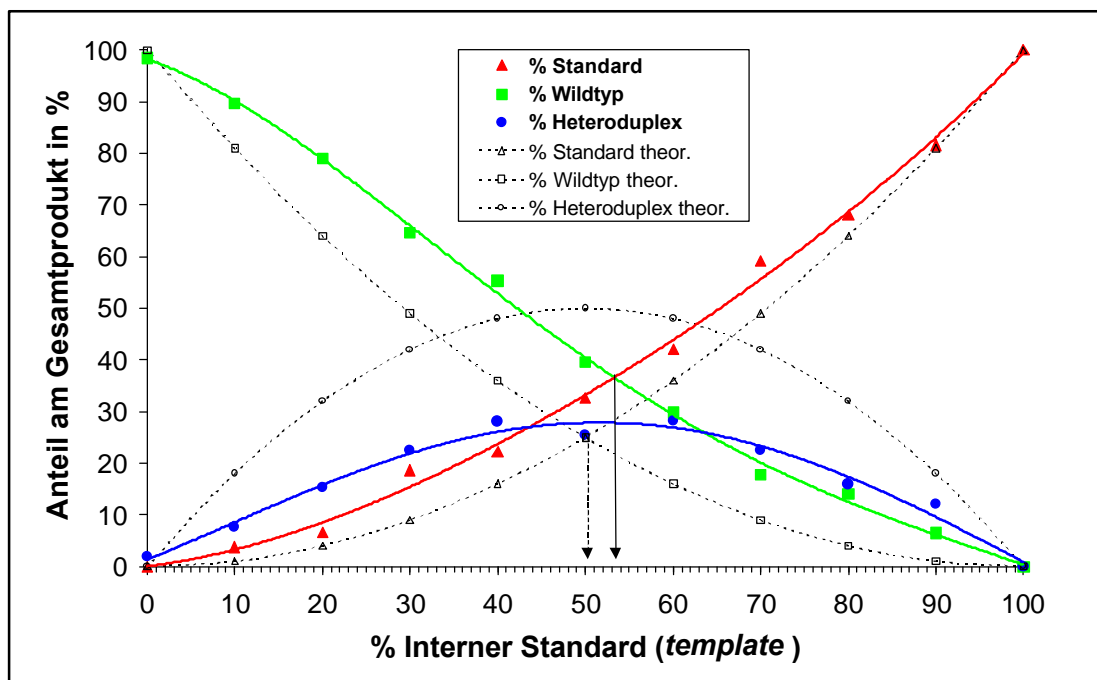


Abb. 3-12: Auswertung einer gegenläufigen Titrationsreihe durch automatische Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese. Dargestellt sind die mit der GeneScan-Software analysierten DNA-Fragmente in Form von Elektropherogrammen nach Spaltung mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen *StuI* für die Standardsequenz ■, *HindIII* für die Wildtypsequenz ■ sowie einer Doppelspaltung mit beiden Restriktionsenzymen ■ zur Ermittlung der nicht-spaltbaren PCR-Produkte in Form von Heteroduplices.



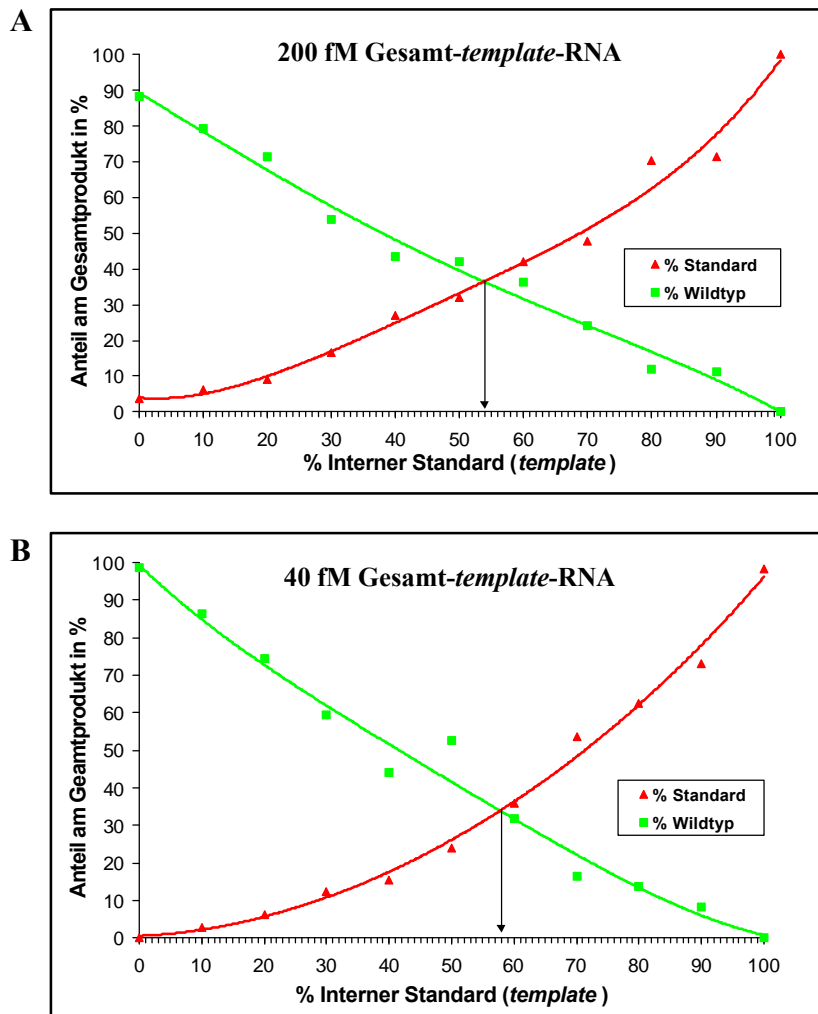
Zur weiteren Auswertung der Titrationsreihe wurden dann die mit der *GeneScan*-Software ermittelten Peakflächen der Elektropherogramme verwendet. Anhand dieser Daten wurden die relativen Fragmentmengen bestimmt, indem die Gesamtheit der Peakflächen einer Auftrennung auf 100 % gesetzt wurde und somit die jeweiligen Anteile an spezifischem Spaltprodukt bzw. ungespaltenem PCR-Produkt ermittelt werden konnten. Die abschliessende Quantifizierung erfolgte durch Auswertung dieser Peakflächendaten mit Hilfe des Programmes *Microsoft Excel* und ist, im Vergleich mit den theoretisch berechneten Werten für ein gegenläufige Titrationsreihe (s. Kapitel 3.1.4.1), in Abbildung 3-13 dargestellt.



**Abb.3-13: Auswertung einer gegenläufigen Titrationsreihe mit einer Gesamt-template-Konzentration von 100 fM RNA** nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung der spezifischen Spaltprodukte (*StuI* für die Standard-Sequenz, *HindIII* für die Wildtyp-Sequenz, Doppelspaltung *StuI/HindIII* zur Ermittlung der Heteroduplices). Die Quantifizierung der relativen Fragmentmengen erfolgte anhand der durch *GeneScan*-Analyse ermittelten Peakflächen der in Abb. 3-12 dargestellten Elektropherogramme. Im Vergleich sind die theoretisch erwarteten Kurvenverläufe gestrichelt dargestellt. Die Äquivalenzpunkte sind jeweils mit einem Pfeil markiert.

Im direkten Vergleich zur densitometrischen Quantifizierung der spezifischen Spaltfragmente der gleichen Titrationsreihe (s. Abb. 3-11) ist der Unterschied im Bezug auf den Äquivalenzpunkt gering (densitometrisch: 52 %, kapillarelektrophoretisch: 53 %). Auch haben die Kurven sehr ähnliche Verläufe bzw. Tendenzen, z.B. ist in beiden Fällen die Anzahl der gebildeten Heteroduplices deutlich geringer als erwartet. Dies bedeutet, daß prinzipiell beide Methoden gleich gut geeignet sind, eine exakte Quantifizierung des

*BCR/ABL*-Fusionsgens durchzuführen. Die Kapillarelektrophorese liefert aber im Gegensatz zur densitometrischen Auswertung objektivere und sensitivere Daten. Für die densitometrische Auswertung war es erforderlich, für jede Gelspur individuell einen zu analysierenden Bereich sowie ein von den jeweiligen Bandenintensitäten abzuziehendes Hintergrundsignal festzulegen, was sehr subjektive Einflüsse bedingt. Im Gegensatz dazu werden bei der kapillarelektrophoretischen Auftrennung der Spaltfragmente die gesammelten Rohdaten mittels einer automatischen Analyse durch die *GeneScan*-Software und somit "reproduzierbaren Kriterien" ausgewertet. Aus diesem Grund wurden die folgenden Titrationsreihen mit Gesamt-*template*-Konzentrationen von 200 fM und 40 fM RNA nur noch kapillarelektrophoretisch analysiert und ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Titrationsreihen sind in den folgenden Abbildungen dargestellt:

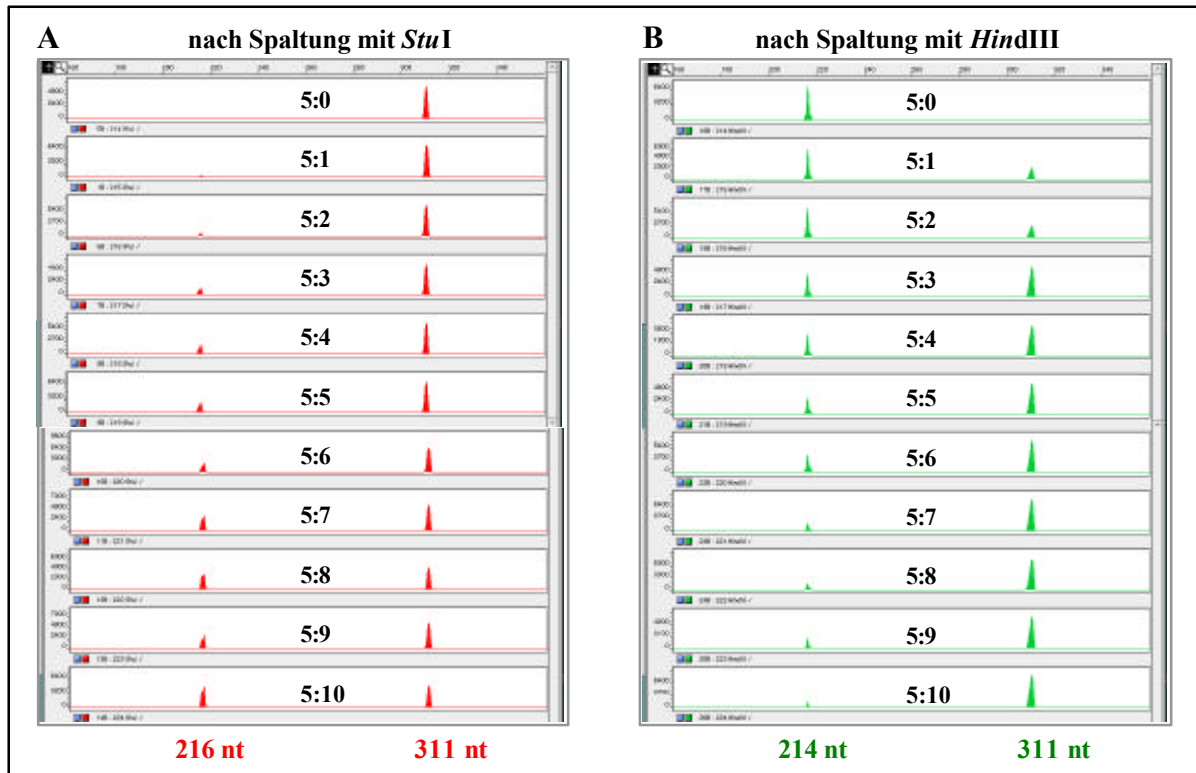


**Abb. 3-14: Quantifizierung gegenläufiger Titrationsreihen nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung der spezifischen Restriktionsfragmente.** Eingesetzt wurden Gesamt-*template*-Konzentrationen von 200 fM RNA (**A**) und 40 fM RNA (**B**). Die Quantifizierung erfolgte durch Auswertung der mit Hilfe der *GeneScan*-Software erhaltenen Peakflächendaten.

Es zeigte sich, daß die Abweichung der experimentell ermittelten Proben-template-Ausgangskonzentrationen von den vorgegebenen Ausgangskonzentrationen für die RT-PCR in allen Titrationsreihen <10 % war. Deutlich erkennt man aber, daß der Äquivalenzpunkt bei geringer Ausgangskonzentration an *template* stärker vom richtigen Wert, der bei 50 % liegen sollte, abweicht, als bei höheren Konzentrationen. Am besten geeignet für die nächsten Simulationen erschien aufgrund der geringsten Abweichung vom theoretischen Äquivalenzpunkt eine Ausgangskonzentration von 100 fM RNA als *template* für eine quantitative kompetitive RT-PCR.

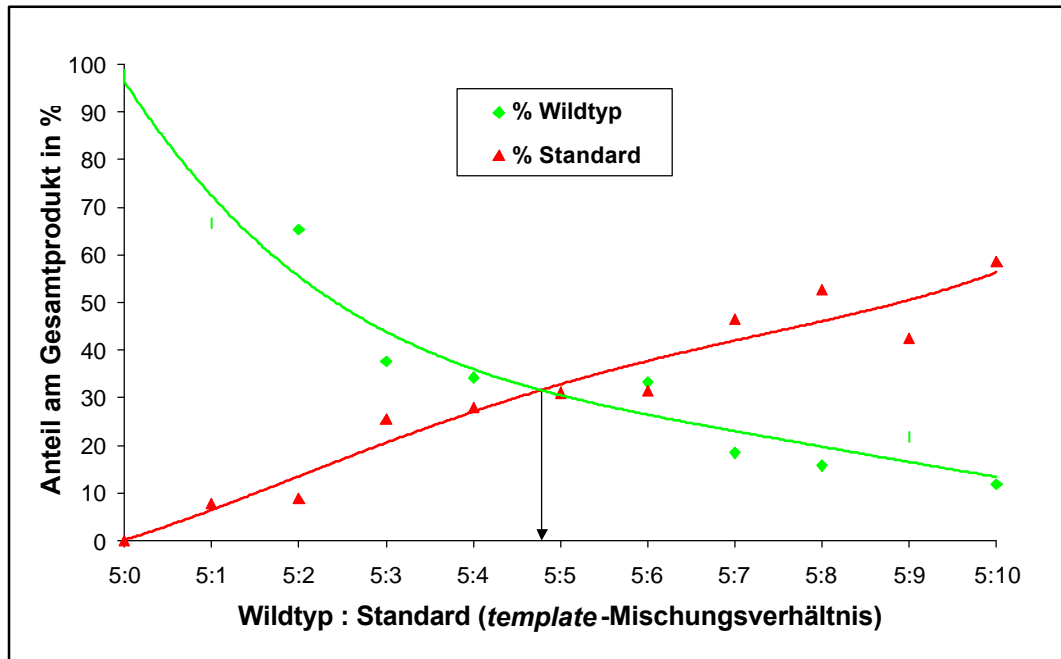
### 3.1.4.3. Titration mit variabler Standard- und konstanter Proben-RNA

Die bisher durchgeführten Titrationsen mit gegenläufigen Konzentrationen an Standard- und Proben-RNA, aber konstanter Gesamtkonzentration eignen sich nur als Modelluntersuchungen zur Etablierung einer Methode bzw. zur exakten Quantifizierung einer ungefähr bekannten *template*-Menge. Sie sind nicht geeignet, um Proben mit einer unbekanntem Ausgangskonzentration eines bestimmten Transkriptes zu quantifizieren. Für die Analyse des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes ist es wichtig eine Methode zu etablieren, die geeignet ist, Patientenproben mit unbekanntem Ausgangsmengen an *BCR/ABL*-Transkript innerhalb eines weiten Konzentrationsbereiches zuverlässig, präzise und sensitiv zu quantifizieren. Daher war es sinnvoll, Versuchsreihen durchzuführen, bei denen eine variierende Menge an Standard-RNA gegen eine konstante Menge an Wildtyp- bzw. Proben-RNA titriert wird. Die *in vitro* generierten RNA-Transkripte wurden in den entsprechenden Konzentrationen im Verhältnis Wildtyp:Standard von 5:0 bis 5:10 vorgemischt und anschließend in eine quantitative kompetitive RT-PCR mit dem Titan One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics) eingesetzt. Die kapillarelektrophoretische Analyse der 6-FAM-markierten RT-PCR-Produkte nach spezifischer Restriktionsspaltung erfolgt wie zuvor beschrieben (s. Kapitel 3.1.4.2.2). Beispielhaft sind in Abbildung 3-15 die nach GeneScan-Analyse erhaltenen Elektropherogramme einer Titrationsreihe mit konstanter Menge Wildtyp-RNA und variierender Menge Standard-RNA nach Spaltung mit den spezifischen Restriktionsenzymen und kapillarelektrophoretischer Auftrennung der Spaltfragmente gezeigt.



**Abb. 3-15:** Elektropherogramme einer Titrationsreihe mit konstanter Menge Wildtyp-RNA und variierender Menge Standard-RNA im Mischungsverhältnis 5:0 bis 5:10 (WT:IS). Kapillarelektrophoretisch aufgetrennt wurden die spezifischen Restriktionsfragmente nach Spaltung mit *StuI* für die Standard-Sequenz (A) und *HindIII* für die Wildtyp-Sequenz (B).

Die Daten-Analyse der mit der GeneScan-Software erhaltenen Peakfläche-Daten erfolgt wie bereits zuvor beschrieben (s. Kapitel 3.1.4.2.2). Für die in Abbildung 3-15 dargestellten Elektropherogramme ist das Ergebnis der Quantifizierung in Abb. 3-16 gezeigt.



**Abb.3-16:** Titrations einer konstanten Menge Wildtyp-RNA mit variierenden Konzentrationen Standard-RNA. Aufgetragen sind die nach RT-PCR und CE-LIF-Analyse aus den Peakflächendaten (s. Abb. 3-15) ermittelten Ergebnisse gegen das initiale *template*-Mischungsverhältnis.

Das Ergebnis der Quantifizierung durch diese Titrationsreihe zeigt, daß sich die beiden Kurven nahe dem theoretischen Äquivalenzpunkt bei einem Mischungsverhältnis von 5:5 schneiden. Die Methode ist also prinzipiell geeignet, das *BCR/ABL*-Fusionstranskript in unbekanntem Proben nachzuweisen und zu quantifizieren.

### 3.2. Quantifizierung mittels *real-time-RT-PCR*

Die quantitative *real-time-PCR* ist eine aktuelle Weiterentwicklung der PCR. Hierbei wird während der PCR im geschlossenen Reaktionsgefäß *online* mittels Fluoreszenzmessung die Menge des gebildeten PCR-Produktes verfolgt. Zur Messung der Produktmengen können verschiedene Fluoreszenztechniken verwendet werden:

1. Eine Möglichkeit stellt die Quantifizierung mit Hilfe von Doppelstrang-DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen dar:
  - ♦ der bekannteste und hierfür zuerst verwendete Farbstoff ist Ethidiumbromid (*Higuchi et al.*, 1992), der von UV-Licht (254 - 366 nm) angeregt werden kann und ein Emissionsmaximum bei 590 nm besitzt.
  - ♦ Dieser Doppelstrang-bindende Farbstoff wurde später durch sensitivere und weniger mutagene Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. SYBR Green I (*Ririe et al.*, 1997; *Wittwer et al.*, 1997A) ersetzt (s. Kapitel 3.2.1.1).
2. Eine Alternative zum Einsatz Doppelstrang-bindender Farbstoffe stellt die Produkt-Detektion mit sequenzspezifischen, Fluorophor-markierten Sonden dar:
  - ♦ Eine Form dieser Sonden sind *Molecular Beacons*, die eine charakteristische *stem-loop*-Struktur besitzen (*Tyagi et al.*, 1996; *Kostrikis et al.*, 1998). Die *loop*-Region ist *target*-sequenzspezifisch, wohingegen die selbstkomplementäre *stem*-Region dazu dient, einen direkten Energietransfer vom 5'-Fluorophor-markierten Sondenbereich zum Quencher am 3'-Ende zu gewährleisten. Erst nach spezifischer Bindung der *loop*-Region an die *target*-Sequenz kommt es zu einer offenen Form der Sonde und somit zu einem Fluoreszenz-Signal. Eine Abwandlung dieser Form der Sonden stellen die sogenannten *Scorpions* dar, bei denen die *stem-loop*-Struktur an das 5'-Ende eines Primers angefügt wird (*Nazarenko et al.*, 1997; *Whitcombe et al.*, 1999).
  - ♦ Eine weitere Form von spezifischen Sonden stellen Hydrolyse-Sonden dar, die besser unter dem Namen *TaqMan*-Sonde bekannt sind. Dieser Sondentyp ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem Farbstoff, der als Quencher funktioniert, am 3'-Ende markiert. Die Fluoreszenz wird dadurch generiert, daß der Fluorophor durch die Exonuklease-Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase aus der Sonde freigesetzt wird (*Holland et al.*, 1991; *Heid et al.*, 1996).
  - ♦ Die Fluoreszenz kann außerdem durch zwei Hybridisierungssonden, sogenannten *hybridization probes*, generiert werden, die nebeneinander in einem geringen Abstand sequenzspezifisch an die DNA binden. Diese Sonden tragen an ihren jeweils benachbarten Enden verschiedene Fluorophore. Die Detektion der Amplifikate basiert

auf einem Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) zwischen diesen Fluorophoren (De Silva *et al.*, 1998; Caplin *et al.*, 1999). Diese Detektions-Methode wird im Kapitel 3.2.1.2 näher erläutert.

In dieser Arbeit wurde als *real-time*-PCR-Gerät ein LightCycler der Firma Roche Diagnostics verwendet. Es wurden die für dieses Gerät vom Hersteller empfohlenen Fluoreszenz-Detektionsmethoden verwendet: SYBR-Green als Doppelstrang-DNA-bindender Fluoreszenz-Farbstoff sowie Fluorophor-markierte Hybridisierungssonden (*hybridization probes*), im Folgenden kurz HybProbes genannt. Diese Methoden werden daher in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

### 3.2.1. Der LightCycler und seine Detektionsmethoden

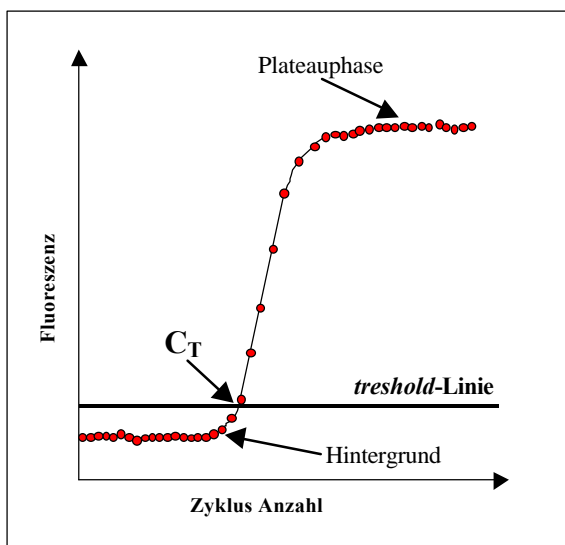
Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *real-time*-PCR-Gerät handelt es sich um einen LightCycler der Firma Roche Diagnostics. Durch Kombination von einem Thermo-Cycler mit einem Fluorimeter ist mit dem LightCycler ein Gerät verfügbar, das die *on-line*- und *real-time*-Detektion der Reaktionskinetik einer PCR ermöglicht.

Die Temperierung erfolgt bei diesem Gerät durch einen Luftstrom. Der Aufheizprozess erfolgt durch Zufuhr von Luft, die mittels einer Heizwendel aufgeheizt wurde, der Abkühlprozess durch Zufuhr von Umgebungsluft mit Raumtemperatur. Durch die geringe Masse der Luft bedingt können sehr schnelle Temperaturwechsel innerhalb der rotationssymmetrischen Reaktionskammer erreicht werden. Durch den Einsatz von Glaskapillaren als Reaktionsgefäße wird ein besonders effizienter Temperaturtransfer ermöglicht, da diese Kapillaren ein besonders günstiges da hohes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis besitzen. Dadurch können extrem kurze Zyklus-Zeiten erreicht werden.

Die Glaskapillaren ermöglichen aber nicht nur den schnellen Temperaturtransfer, sondern dienen gleichzeitig als optisches Element zur Sammlung des Lichtes. Ähnlich einer Glasfaseroptik wird das Fluoreszenzlicht total reflektiert und konzentriert an die Spitze der Kapillare geleitet. Durch das emittierte Licht der LED (Licht-emittierende Diode) des Fluorimeters mit einer Wellenlänge von 470 nm, welches über eine Linse auf die Spitze der Kapillare fokussiert wird, wird ein entsprechender Fluoreszenz-Farbstoff (z. B. SYBR Green I) in der Kapillare angeregt. Die von der Probe ausgesandte Fluoreszenz wird dann von derselben Linse wieder gesammelt, über dichroitische Filter geleitet und an Photohybrid-Detektoren weitergeleitet. Die optische Einheit enthält drei Filtersysteme für 530, 640 und 710 nm, so daß eine Detektion von drei verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen möglich ist.

Die Fluoreszenz kann entweder einmal pro Zyklus zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen werden oder in Form eines kontinuierlichen Messvorgangs, z.B. zum Aufnehmen einer Schmelzkurve (s. 3.2.1.1).

In Abb. 3-17 ist ein typisches Amplifikationssignal einer mittels LightCycler durchgeführten und detektierten PCR-Reaktion dargestellt. Es handelt sich hierbei um eine PCR-Reaktion mit 45 Zyklen, wobei die Fluoreszenz-Messung einmal je Zyklus erfolgte. Die Software stellt die Ergebnisse dieser Messungen in *real-time* nach jedem Zyklus als Datenpunkt dar.



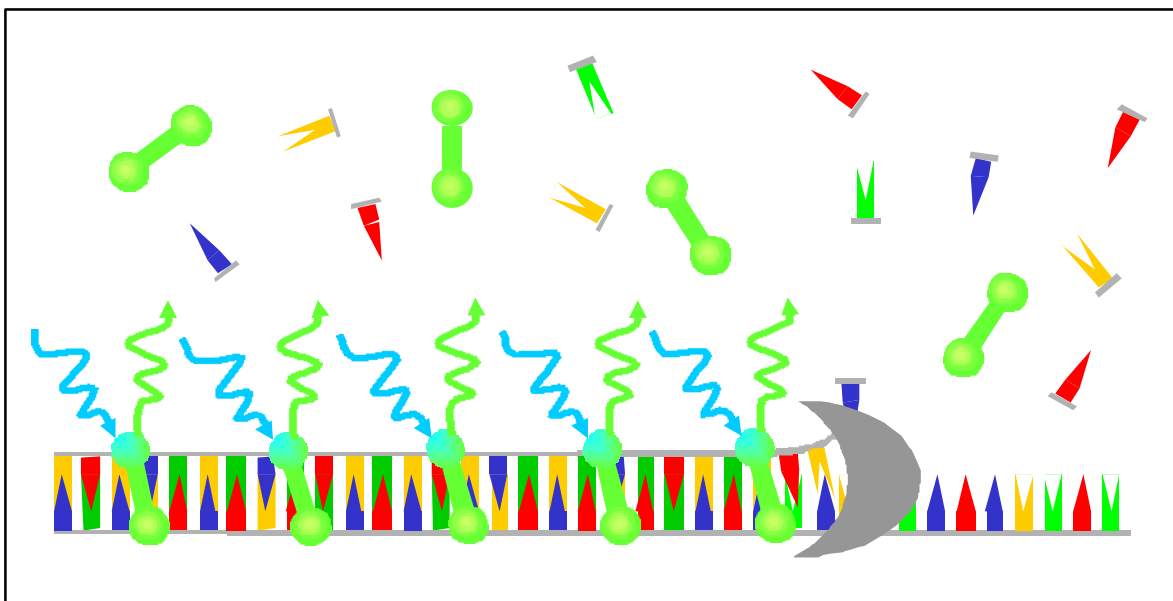
**Abb. 3-17: Typischer Verlauf des Amplifikations-Signals einer mittels Lightcycler durchgeführten PCR-Reaktion.** Das Fluoreszenz-Signal wurde einmal je Zyklus (hier: 45 Zyklen) gemessen und als Datenpunkt dargestellt (●). Deutlich zu sehen ist die Zunahme an Fluoreszenz nach Überschreiten eines Schwellenwertes während der PCR bis hin zur Plateauphase (weitere Erläuterung im Text).

Deutlich zu erkennen ist der Anstieg der Fluoreszenz mit zunehmender Amplifikat-Konzentration, also bei zunehmender Anzahl der Zyklen. Wichtig für die Quantifizierung ist der PCR-Zyklus, an dem das Signal einen definierten Fluoreszenz-Schwellenwert, die sogenannte *threshold-Linie*, überschreitet und die Amplifikation in eine log-lineare Phase übergeht. Der Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dieser *threshold-Linie* wird als  $C_T$  (*Cycle threshold*) bezeichnet. Dieser  $C_T$ -Wert ist umso geringer, je früher die Schwellenwert-Amplifikat-Konzentration überschritten wird. Da die Anzahl der PCR-Zyklen bis zur Bildung einer bestimmten Amplifikat-Konzentration vor allem durch die Konzentration des Ausgangs-*templates* bestimmt wird, stellt der PCR-Zyklus, mit dem dieser Schwellenwert erreicht wird ( $C_T$ ), ein Maß für die Konzentration des Ausgangs-*templates* dar. Mit Hilfe von Proben mit bekannten *template*-Konzentrationen lässt sich deshalb eine Standardkurve erstellen und aus dieser die initiale Kopienzahl einer unbekannt Probe anhand ihres  $C_T$ -Wertes ermitteln (Heid *et al.*, 1996).



### 3.2.1.1. Quantifizierung mit SYBR Green I

Der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I bindet wie Ethidiumbromid auch vorwiegend an doppelsträngige DNA. Ethidiumbromid wird jedoch für den LightCycler nicht verwendet, da es eine zu geringe Spezifität und Sensitivität besitzt. SYBR Green I bindet weitgehend sequenzunspezifisch in die kleine Furche von doppelsträngiger DNA, wodurch sich die Fluoreszenzquantenausbeute nach Anregung stark erhöht (Absorptionsmaximum: 492 nm, Emissionsmaximum: 519 nm). Es wird ein Fluoreszenz-Signal generiert, das direkt proportional zur DNA-Konzentration ist. Verfolgt man die einzelnen Abschnitte der PCR, so bindet nach der Denaturierung kein SYBR Green I, da das DNA-*template* als Einzelstrang vorliegt, wodurch das resultierende Fluoreszenz-Signal sehr gering ist. Während der Annealingphase binden die Primer an ihre *target*-Sequenz und werden durch die DNA-Polymerase verlängert. In dieser Phase kommt es bereits zu einem Anstieg der Fluoreszenz durch Bindung von SYBR Green I an die neu gebildete dsDNA (s. Abb. 3-18). Am Ende der Elongationsphase der PCR, wenn alle DNA in doppelsträngiger Form vorliegt, ist die maximale Menge an SYBR Green I gebunden.



**Abb. 3-18:** Schematische Darstellung der Detektion von SYBR Green I während der PCR. SYBR Green I (■) bindet an die von der DNA-Polymerase (■) neu gebildete dsDNA in der Elongationsphase der PCR, wodurch sich die abgestrahlte Fluoreszenz nach Anregung mit einer LED (470 nm) stark erhöht.

Die Fluoreszenzmessung erfolgt daher am Ende der Elongationsphase eines jeden Zyklus. Durch Anregung bei 470 nm mittels der LED des LightCyclers kommt es zu einer Fluoreszenz-Emission des SYBR Green I, die im Kanal 1 des LightCyclers bei 530 nm

gemessen und ausgewertet wird. Die *online*-Darstellung der Fluoreszenz-Zunahme durch steigende DNA-Konzentration erfolgt wie in Abbildung 3-17 gezeigt.

Ein mögliches Problem bei der Messung mit SYBR Green I ist, daß dieser Farbstoff unspezifisch an jede Form von doppelsträngiger DNA bindet, so auch an Nebenprodukte oder Primerdimere, die sich speziell bei suboptimalem Primerdesign bzw. bei Einsatz von geringen Mengen an *template* bilden können. Eine Verifizierung der Identität des generierten PCR-Produktes kann durch die Aufnahme von Schmelzkurven erreicht werden. Der charakteristische Schmelzpunkt des amplifizierten PCR-Produktes erlaubt eine eindeutige Identifizierung, weil Primerdimere oder andere Amplifikationsartefakte meist bei einer anderen als der für das Amplifikat erwarteten Temperatur schmelzen.

### ***Schmelzpunktanalyse***

Die Schmelzpunktanalyse basiert auf der Tatsache, daß jedes dsDNA-Molekül bei einer charakteristischen Temperatur schmilzt. Diese spezifische Schmelztemperatur ( $T_m$ ) ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte der DNA als Einzelstrang vorliegt und die andere Hälfte in ihrer helikalen Struktur als Doppelstrang verbleibt. Die für die Schmelztemperatur wichtigsten Faktoren sind die Länge und die Basenzusammensetzung des PCR-Produktes. DNAs mit einem hohen GC-Gehalt haben einen höheren  $T_m$ -Wert als dsDNA-Moleküle mit einer überwiegenden AT-Basenzusammensetzung, wobei der Unterschied im  $T_m$ -Wert bis zu 40 °C betragen kann. Die Aussagekraft der Analyse des Schmelzpunktes eines Amplifikates kann daher durchaus mit der einer Kontrolle der PCR-Produktlänge durch analytische Gelelektrophorese verglichen werden. Vorteil der Schmelzkurvenanalyse ist, daß die Kontrolle des PCR-Produktes noch im geschlossenen PCR-Reaktionsgefäß erfolgen kann, was erheblich zur Vermeidung des Kontaminationsrisikos beiträgt.

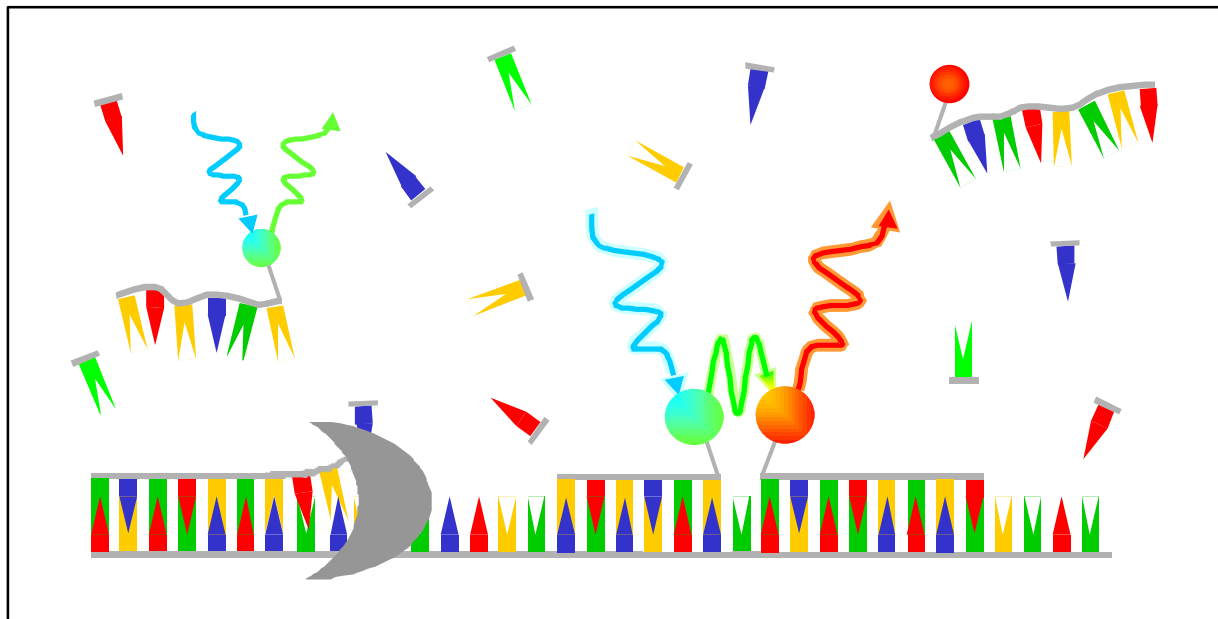
Die Schmelzkurvenanalyse erfolgt nach dem letzten Amplifikations-Zyklus. In dieser Arbeit stellte es sich als vorteilhaft heraus, einen finalen Extensionsschritt durchzuführen, so daß alle DNA-Moleküle als kompletter Doppelstrang vorliegen und die maximale Menge an SYBR Green I-Molekülen gebunden ist. Anschließend wird die Glaskapillare langsam, mit einer Temperatur-Rate von 0.1 °C/sec, auf eine Temperatur von 94 - 99 °C erhitzt, wobei kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wird. Sobald die DNA zu denaturieren beginnt, löst sich das gebundene SYBR Green I und führt somit zu einem starken Abfall der Fluoreszenz (F). Der Punkt des stärksten Fluoreszenzabfalls entspricht dabei dem  $T_m$ -Wert des jeweiligen PCR-Produktes. Zur einfacheren Analyse erstellt die LightCycler-Software die erste negative

Ableitung ( $-dF/dT$ ) und trägt diese gegen die Temperatur ( $T$ ) auf. Da der Wendepunkt der Schmelzkurve in dieser Form der Darstellung als Peak erscheint, ist eine einfache Zuordnung der spezifischen Schmelztemperaturen zu den analysierten Amplifikaten möglich. Beispiele für die Schmelzkurvenanalyse und ihre Darstellung werden in den nachfolgenden Kapiteln gegeben (s. z.B. Abb. 3-20-C u. -D).

### 3.2.1.2. Quantifizierung mit Fluorophor-markierten

#### Hybridisierungssonden

Um ein höheres Maß an Spezifität als mit dem SYBR Green I-System zu erreichen, werden üblicherweise sequenzspezifische Detektionsformate verwendet. Eine Möglichkeit ist die Detektion des PCR-Produktes über spezifische Fluorophor-markierte Hybridisierungssonden. Hierbei handelt es sich um zwei Oligonukleotide, die mit zwei verschiedenen Fluorophoren markiert sind und innerhalb der zu amplifizierenden *target*-Sequenz an denselben Strang binden. Die Sequenz der beiden Sonden wird so gewählt, daß sie direkt benachbart in einer *head-to-tail*-Anordnung auf die zu amplifizierte Sequenz hybridisieren, wodurch die beiden Fluorophore in enge räumliche Nähe gebracht werden. Erst diese enge Nachbarschaft der beiden Fluorophore ermöglicht einen Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET), der für die Quantifizierung genutzt wird. Das 3'-Ende der einen Sonde ist dabei mit einem Donor-Fluorophor (Fluorescein, Absorptionsmaximum 494 nm, Emissionsmaximum 524 nm), das 5'-Ende der anderen Sonde mit einem Akzeptor-Fluorophor (LightCycler-RED 640, Absorptionsmaximum 622 nm, Emissionsmaximum 638 nm) markiert. Zusätzlich ist die zweite Sonde am 3'-Ende phosphoryliert, damit sie von der *Taq*-Polymerase nicht als Primer verwendet wird. Fluorescein kann von der LightCycler LED (470 nm) angeregt werden und emittiert grünes Fluoreszenz-Licht der entsprechenden Wellenlänge, welches bei 520 nm detektiert werden kann. Werden die beiden Fluorophore jedoch durch Hybridisieren der Sonden an die *target*-Sequenz in räumliche Nähe gebracht, so erfolgt ein FRET, indem die Anregungsenergie des Fluoresceins durch strahlungslosen Resonanzenergietransfer auf den Akzeptor-Fluorophor (LC-RED 640) übertragen wird (s. Abb. 3-19). Der Fluorophor LC-RED 640 emittiert die so aufgenommene Energie in Form von energieärmerem, rotem Fluoreszenz-Licht, das spezifisch bei 640 nm detektiert werden kann.



**Abb. 3-19: Detektion der Amplifikate während der PCR mit Sequenz-spezifischen Hybridisierungs-Sonden.** Dargestellt ist die Annealing-Phase der PCR-Reaktion, in der die beiden Sonden, eine Fluorescein- (■), die andere LC-RED640 (■)-markiert, an die *target*-Sequenz gebunden haben und es somit zu einem detektierbaren Fluoreszenz-resonanzenergietransfer kommt (weitere Erläuterungen im Text). Da in dieser Phase der PCR auch die Primerbindung erfolgt, beginnt die *Taq* DNA-Polymerase (■) bereits mit mäßiger Geschwindigkeit die Primer zu verlängern.

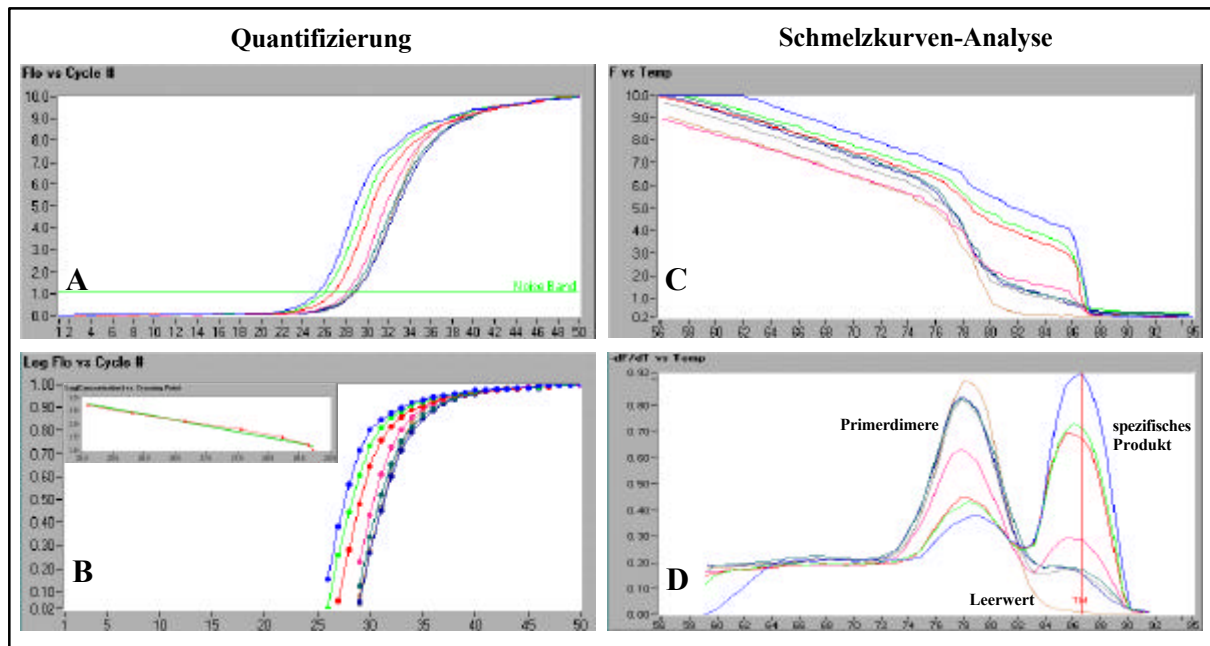
Der optimale Zeitpunkt für die Messung dieses spezifischen FRET-Signales liegt direkt am Ende der Annealing-Phase eines jeden Zyklus, da dort sowohl die Primer als auch die Hybridisierungssonden an die DNA gebunden haben. Die Höhe des FRET-Signals ist proportional zur Menge an spezifischem PCR-Produkt, das heißt, mit zunehmender Zyklenzahl ist ein Anstieg des FRET-Signals zu beobachten (s. Abb. 3-17).

### 3.2.2. Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionsgens mit SYBR

#### Green I

Zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionsgens auf dem LightCycler wurde zur Detektion zunächst SYBR Green I in Kombination mit dem Titan One Tube RT-PCR-System verwendet, das sich bereits bei der Quantifizierung mittels quantitativer kompetitiver RT-PCR als vorteilhaft herausgestellt hatte (s. 3.1.3). Im Gegensatz zu einer QC-RT-PCR wird auf dem LightCycler die Quantifizierung mittels einer externen Standardisierung durchgeführt. In einer ersten Versuchsreihe zur Erstellung einer solchen Standardreihe zeigte sich jedoch das bereits zuvor erläuterte Problem der Bildung und Detektion von Primerdimeren (s. 3.2.1.2). Diese Primerdimere binden ebenfalls SYBR Green-Moleküle und werden daher als entstehendes Amplifikations-Nebenprodukt ebenfalls detektiert. In Abbildung 3-20 ist eine

solche Standardreihe gezeigt. Ausgehend von einer Kopienzahl von  $6.0 \times 10^5$  *in vitro* generiertem *BCR/ABL*-Wildtyp-Transkript (blaue Kurve) wurde diese Ausgangsmenge jeweils um den Faktor 2 bis zu einer Anzahl von  $9.4 \times 10^3$  Kopien (dunkelblaue Kurve) verdünnt in die RT-PCR mit dem Titan One Tube RT-PCR System auf dem LightCycler eingesetzt.



**Abb. 3-20:** Analyse einer *BCR/ABL*-Standardreihe auf dem LightCycler, detektiert mit SYBR Green I. Auf der linken Seite ist die Quantifizierung einer 2fach-Standardverdünnungsreihe mit eingesetzten *template*-Mengen von  $6 \times 10^5$  bis  $9 \times 10^3$  Kopien *in vitro*-Transkript dargestellt (A, B), rechts die Schmelzkurven-Analyse (C, D) der generierten RT-PCR-Produkte und des Leerwerts. Weitere Erläuterungen im Text.

In Abbildung 3-20-A ist die relative Fluoreszenz-Intensität eines jeden Standardwertes gegen die Zyklenzahl aufgetragen (*Flo vs Cycle #*), wohingegen in Abbildung 3-20-B zur Verdeutlichung der log-linearen Phase der PCR die Fluoreszenz-Intensität der Standardwerte logarithmisch dargestellt wird (*Log Flo vs Cycle #*). Die eingefügte lineare Regressionsgerade (*Crossing Point vs Log (Conc.)*) ergibt sich aus den Schnittpunkten der Standard-Kurven mit der *threshol*d-Linie (in der Abbildung 3-20-A als "Noise Band" gekennzeichnet). Die Position dieser Linie wird für jeden PCR-Lauf individuell festgelegt. Für die Positionierung dieser Linie ist jedoch zu beachten, daß sie so niedrig wie möglich, also an den Anfang der log-linearen Phase der PCR gelegt werden sollte. Anhand der bestmöglichen Übereinstimmung zwischen der Regressionsgeraden (grün) und der Lage der einzelnen Standardwerte (rot) zu dieser Geraden sowie einer möglichst kleinen angezeigten Fehlerrate (nicht dargestellt) kann die optimale Position der *threshol*d-Linie für das zu analysierende Experiment ermittelt

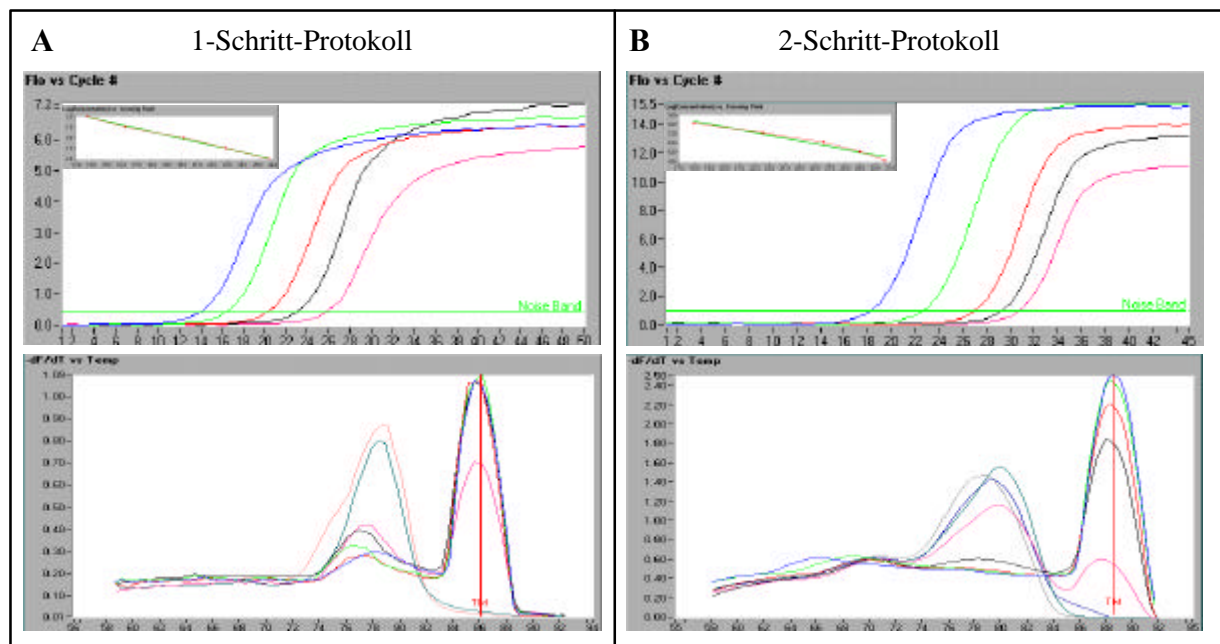
werden. Die Fehlerrate ergibt sich aus der Summe der Abweichungsquadrate dividiert durch die Anzahl der Messpunkte.

Bei hohen Konzentrationen an eingesetztem *in-vitro*-Transkript zeigen die dargestellten Kurven den zu erwartenden Verlauf: die höchste Ausgangsmenge mit  $6.0 \times 10^5$  Kopien RNA (blaue Kurve) zeigt als erste der analysierten PCR-Ansätze einen deutlichen Kurvenanstieg gegenüber dem Hintergrund-Signal bei einem  $C_T$ -Wert (*Cycle threshold*, s. Kapitel 3.2.1) von ca. 25.1 Zyklen, dies entspricht somit der höchsten Menge an eingesetztem *template*. Diese Korrelation zwischen eingesetzter *template*-Ausgangskopienzahl und  $C_T$ -Wert kann bis zu einer Anzahl von  $3.8 \times 10^4$  Kopien eingesetztem *in-vitro*-Transkript (von rechts nach links die Kurven 1 - 5) nachvollzogen werden (s. Abb. 3-20-A u. -B). Deutlich zu erkennen ist dann aber, daß die letzten Verdünnungen der Standardreihe und auch die Negativkontrolle (beige Kurve) einen etwa gleichen  $C_T$ -Wert aufweisen, was gleichen *template*-Ausgangskonzentrationen entsprechen würde. In der nach der RT-PCR durchgeführten Schmelzkurven-Analyse, dargestellt in Abb. 3-20-C und 3-20-D, erkennt man jedoch, daß bei den größten Verdünnungen nur noch eine sehr geringe Menge an spezifischem Produkt zu detektieren ist, mit einer spezifischen Schmelztemperatur ( $T_m$ ) von ca. 87 °C. In der Negativkontrolle (orange Kurve) ist ein solches Produkt nicht zu detektieren, dafür hauptsächlich ein Produkt, welches bei einer deutlich geringeren Temperatur von 78 °C schmilzt. Bei diesem PCR-Produkt handelt es sich um amplifizierte Primerdimere. Durch diese große Anzahl an Primerdimeren kann keine hohe Sensitivität, d.h. der Nachweis einer möglichst geringen initialen *BCR/ABL*-Kopienzahl, erreicht werden. Daher wurden verschiedene Möglichkeiten zur Vermeidung dieser Primerdimere und somit zur Erlangung einer höheren Sensitivität getestet, die in den nächsten Kapiteln beschrieben werden.

### **3.2.2.1. Vergleich zwischen Ein-Schritt und Zwei-Schritt RT-PCR-Protokoll**

Die Bildung von Primerdimeren kann möglicherweise durch den Prozess der reversen Transkription im Ein-Schritt-Protokoll begünstigt werden, da bereits alle Komponenten für den RT-Schritt und die nachfolgende Amplifikation in einem für beide Reaktionen optimierten Puffer vorhanden sind. Bei einer Reversen-Transkriptions-Temperatur zwischen 50 °C und 60 °C zeigt die *Taq* DNA-Polymerase ebenfalls eine, wenn auch verlangsamte, Polymerisations-Aktivität, was die Bildung von Primerdimeren begünstigen könnte. Daher wurde als erster Schritt zur Vermeidung von Primerdimeren ein Zwei-Schritt-Protokoll durchgeführt. Zunächst wurde in einem kleinen Reaktionsvolumen (20 µl) die Reverse

Transkription mit dem Sequenz-spezifischen Primer *bcr(1)* und AMV als Reverser Transkriptase durchgeführt (s. 2.6.1.1). Anschließend wurde die generierte cDNA als *template* für die eigentliche im zweiten Reaktionsschritt erfolgende PCR eingesetzt, wobei, bezogen auf die initiale RNA-Menge, die gleiche RNA-Menge wie für das Ein-Schritt-Protokoll in die PCR auf dem LightCycler eingesetzt wurde. Ausgehend von 100 pM RNA-Konzentration wurden das *in-vitro*-Transkript und die generierte cDNA jeweils im Verhältnis 1:10 mit DEPC-Wasser bis zu einer Konzentration von 1 fM verdünnt. Anschließend wurden jeweils 2 µl dieser Verdünnungsreihen in die Amplifikations-Reaktion auf dem LightCycler eingesetzt. Die Amplifikation des *in-vitro*-Transkriptes erfolgte in Form einer RT-PCR mit dem Titan One Tube RT-PCR System (s. Abb. 3-21-B), die cDNA wurde mit *Taq* DNA-Polymerase amplifiziert (s. Abb. 3-21-A).



**Abb. 3-21: Vergleich zwischen einem Ein-Schritt- und einem Zwei-Schritt RT-PCR-Protokoll.**

**A:** Ein-Schritt-Protokoll: RT-PCR mit dem Titan One Tube RT-PCR-System

**B:** Zwei-Schritt-Protokoll: cDNA-Synthese mit AMV, PCR mit *Taq* DNA-Polymerase.

Dargestellt sind für beide Systeme die quantifizierbaren Amplifikationskurven im Bereich von 100 pM (■) bis 10 fM (■) und die lineare Regressionsgerade, die sich aus der eingesetzten logarithmischen Konzentration der Standards im Verhältnis zu den ermittelten  $C_T$ -Werten der Amplifikationskurven ergibt. In den unteren Abbildungen sind die nach der RT-PCR durchgeführten Schmelzkurven-Analysen aller RT-PCR-Produkte, inklusive Leerwert, zur Unterscheidung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren dargestellt.

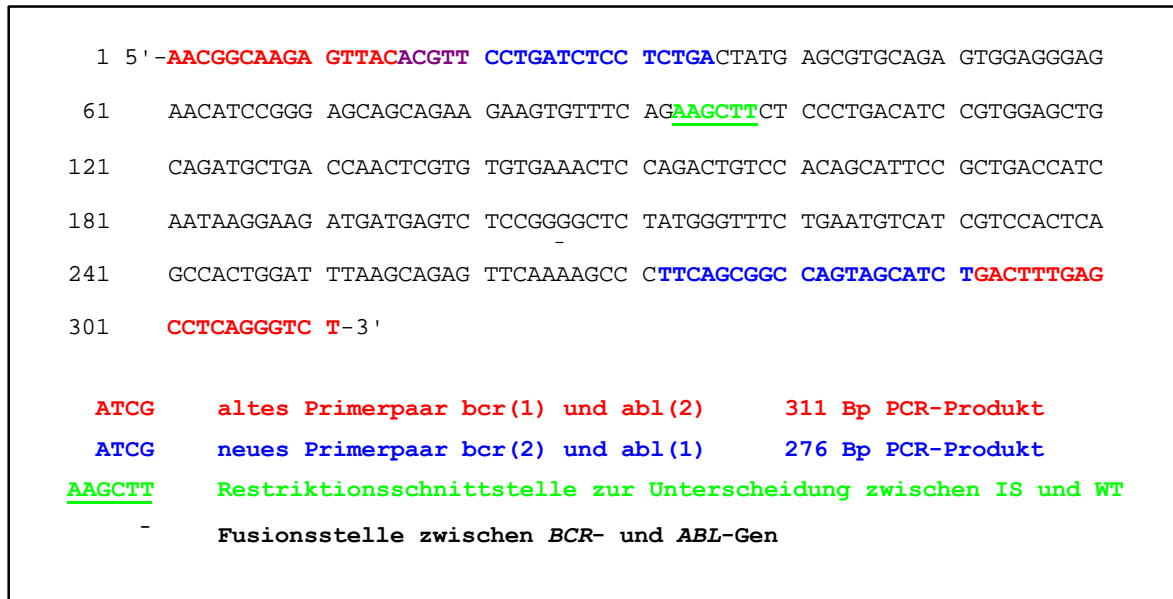
Die Analyse der gewonnenen Daten zeigt, daß bei beiden Reaktionsführungen der PCR-Reaktionsansatz, der noch eine quantifizierbare bzw. in der Schmelzkurve nachweisbare

Menge an spezifischem PCR-Produkt enthält, derjenige mit einer Ausgangskonzentration von 10 fM RNA (magenta-farbene Kurve) war. Dies entspricht einer *template*-Menge von  $1.2 \times 10^4$  Kopien *BCR/ABL*-Transkript. Würde man jedoch von dem analysierten  $C_T$ -Wert auf die Ausgangskonzentration des jeweiligen PCR-Ansatzes schließen (s. 3.2.1), dann müsste theoretisch die Ausgangskonzentration an *template* im Reaktionsansatz des Ein-Schritt-Protokolles deutlich höher gewesen sein als im PCR-Ansatz des Zwei-Schritt-Protokolles. Da jedoch für beide Verdünnungsreihen die gleiche Ausgangskonzentration an *in vitro* generierter RNA eingesetzt wurde, läßt dies den Schluß zu, daß das Ein-Schritt RT-PCR System deutlich effizienter arbeitet, als das Zwei-Schritt-Protokoll. Die Analyse der in Abb. 3-21 dargestellten Schmelzkurven zeigt, daß die Anzahl an Primerdimeren bei einer RT-PCR nach dem Zwei-Schritt-Protokoll nicht geringer ist als nach dem Ein-Schritt Protokoll mit dem Titan System. Da aber, höchstwahrscheinlich aufgrund der hohen Konzentration an Primerdimeren vor allem bei Einsatz von geringen Mengen an Ausgangs-*template*, keine Verbesserung der Sensitivität erreicht werden konnte, erschien es sinnvoll, für die Amplifikation auf dem LightCycler ein neues Primersystem zu etablieren, welches eventuell weniger zur Bildung von Primerdimeren führt

### **3.2.2.2. Design neuer Primer für die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes**

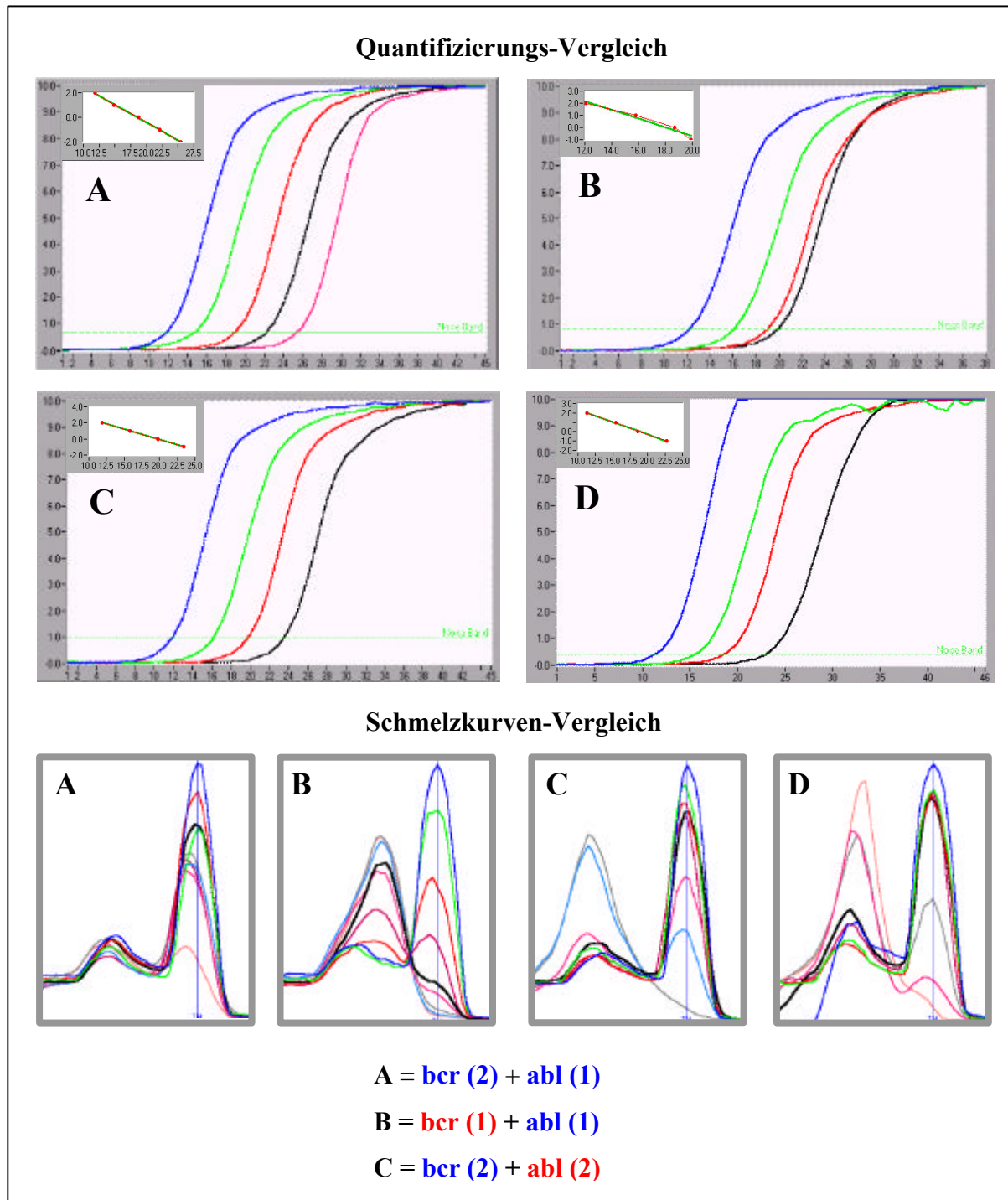
Um die Bildung von Primerdimeren bei der Amplifikation mit einem Ein-Schritt RT-PCR-System zu vermeiden und somit eine höhere Sensitivität der Quantifizierung auf dem LightCycler zu erreichen, wurde ein neues Primerpaar entworfen. Besonders zu beachten war, daß der zu amplifizierende Bereich sowohl die Fusionsstelle zwischen dem *BCR*- und dem *ABL*-Gen als auch die zur Unterscheidung zwischen Standard- und Wildtyp-Sequenz erforderliche Restriktionsschnittstelle umfaßt. Dies ist zwar prinzipiell für eine Quantifizierung auf dem LightCycler nicht erforderlich, da hier keine interne Standardisierung benötigt wird, aber man erhält die Möglichkeit, auch mit dem neuen Primerpaar eine kompetitive PCR durchführen zu können. Weiterhin wurden die unter Kapitel 2.3.7.2 aufgeführten Planungskriterien für Oligonukleotide beachtet. Insbesondere wurde versucht, die Bildung von Primerdimeren durch miteinander- oder selbstkomplementäre Bereichen zu verhindern. In Abbildung 3-22 sind sowohl das bisher verwendete als auch das neu geplante Primerpaar dargestellt.





**Abb. 3-22: Primerdesign für die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionsgen-Transkriptes.** Dargestellt ist das bisher verwendete (■) und das neu geplante Primer-Paar (■), Überlappungsbereiche zwischen altem und neuem Primer sind ■ dargestellt. Außerdem ist die zur Unterscheidung nach QC-RT-PCR verwendete Restriktionsschnittstelle *HindIII* (■) für die Wildtyp-Sequenz farblich hervorgehoben.

Die Primer wurden dann in den vier möglichen Kombinationen der *sense/antisense*-Primer in eine RT-PCR mit dem Titan One Tube RT-PCR-System eingesetzt, wobei als *template* eine serielle 10fach-Verdünnungsreihe der *in vitro* generierten Standard-RNA auf dem LightCycler eingesetzt wurde. Diese serielle Verdünnungsreihe entsprach Ausgangskopienzahlen von  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^2$  Kopien *in-vitro*-Transkript je Reaktionsansatz, die mittels des LightCyclers amplifiziert und analysiert wurden. In Abb. 3-23 sind die für die verschiedenen Primerkombinationen erhaltenen Ergebnisse im Vergleich dargestellt. Gezeigt werden für jede Primer-Kombination die Standardkurven mit den zur Quantifizierung geeigneten Konzentrationen und die Schmelzkurven aller RT-PCR-Produkte und der Negativkontrolle zur Unterscheidung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren.



**Abb. 3-23: Vergleich der verschiedenen Primerpaare (A-D) im Hinblick auf Quantifizierung und Primerdimer-Bildung.** Zur Quantifizierung wurden jeweils die Verdünnungsstufen berücksichtigt, bei denen der  $C_T$ -Wert niedriger war als der  $C_T$ -Wert der Negativkontrolle (eingesetzte Kopienzahlen: ■  $1.2 \times 10^8$ , ■  $1.2 \times 10^7$ , ■  $1.2 \times 10^6$ , ■  $1.2 \times 10^5$ , ■  $1.2 \times 10^4$ ). Die Bildung von Primerdimeren kann aufgrund der jeweils im Anschluß an die RT-PCR durchgeführte Schmelzkurven-Analyse aller RT-PCR-Produkte beurteilt werden, P: Primerdimere, S: Spezifisches Produkt, N: Negativkontrolle.

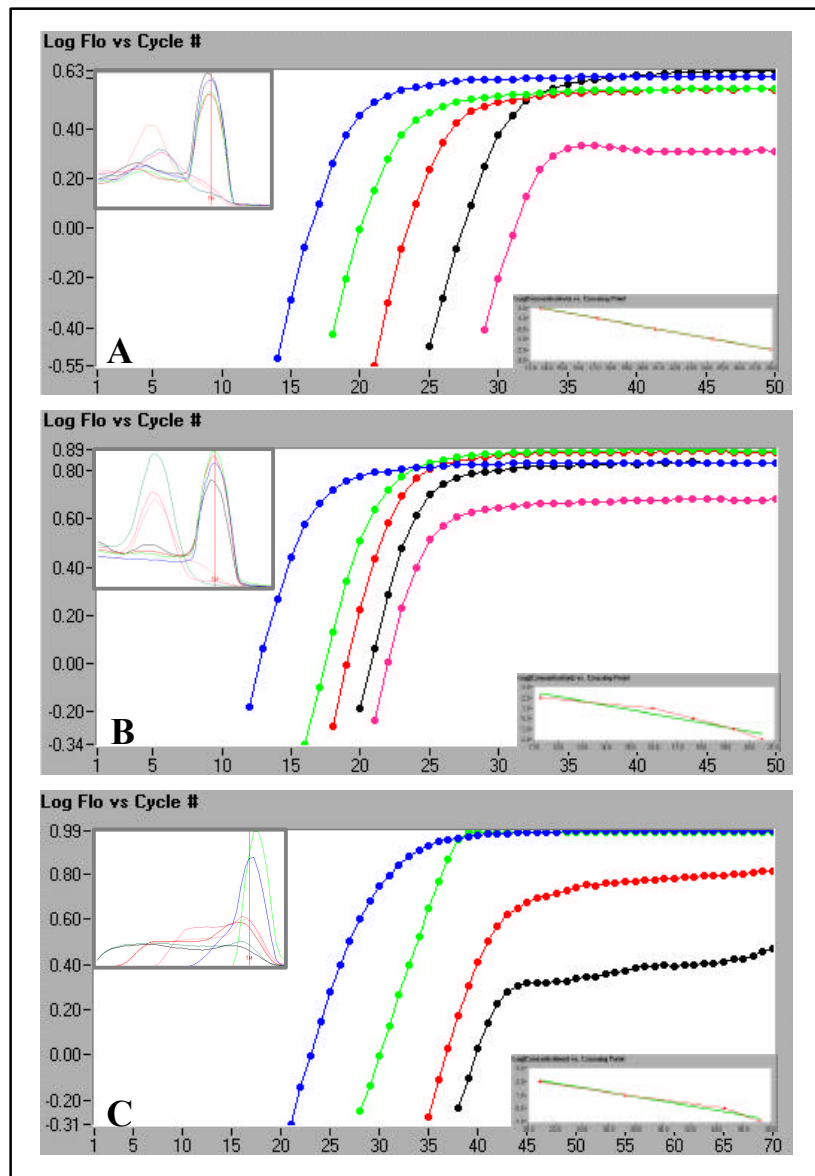
Deutlich zu erkennen ist, daß das neu konzipierte Primerpaar (bcr(2)/abl(1), s. Abb. 3-23A) die geringste Anzahl an Primerdimeren liefert und die beste Quantifizierung im Bereich von  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^4$  Kopien *in vitro* generierter Standard-RNA ermöglicht, abzulesen an der guten Übereinstimmung zwischen der Regressionsgeraden (grün) und der Verbindung zwischen den verschiedenen Standardwerten (rot). Zudem sind die Abstände zwischen den Amplifikationskurven äquidistant, haben einen gleichen Anstieg und ermöglichen somit durch ihren parallelen Verlauf eine Datenanalysen über einen größeren Meßbereich. Zwar kann man feststellen, daß die Schmelzkurven-Analyse der Negativkontrolle des in Abb. 3-23-A dargestellten Versuches minimale Mengen des *BCR/ABL*-spezifischen Produkts mit einem höheren  $T_m$ -Wert aufweist, da aber die Konzentration an Kontamination erheblich unter der Menge an spezifischem Produkt für die geringste Verdünnung der Standard-RNA liegt, kann dies hier für diese Fragestellung unberücksichtigt bleiben. Aufgrund der Ergebnisse dieses Quantifizierungs- und Schmelzkurven-Vergleiches wurden die nachfolgenden Experimente jeweils mit dem neu konstruierten Primerpaar bcr(2) und abl(1) (s. Abb. 3-22) durchgeführt. Es konnte jedoch auch mit dem neuen Primer-Paar keine Verbesserung der Sensitivität, die weiterhin bei einer minimalen Nachweisgrenze von  $1.2 \times 10^4$  Kopien *BCR/ABL*-Transkript je 10µl Reaktionsansatz lag, gegenüber dem bisher verwendeten Primer-Paar erreicht werden.

### 3.2.2.3. Vergleich verschiedener Ein-Schritt RT-PCR-Systeme zur

#### Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes mit SYBR Green I

Um die Empfindlichkeit der Detektion des *BCR/ABL*-Transkriptes mittels Amplifikation auf dem LightCycler zu erhöhen, wurden verschiedene Ein-Schritt RT-PCR-Systeme im Vergleich mit dem zuvor verwendeten Titan-System getestet. Es bot sich an, die bereits zuvor in der QC-RT-PCR eingesetzte *Tth* DNA-Polymerase (s. Kapitel 3.1.3.1) zu untersuchen. Obwohl die *Tth* DNA-Polymerase dem Titan One Tube RT-PCR System auf einem herkömmlichen Thermocycler (GeneAmp 2400, Perkin Elmer) in der Sensitivität unterlegen war, könnte sich die Nachweisempfindlichkeit der *Tth*-Polymerase aufgrund der spezifischen Amplifikationsbedingungen auf einem LightCycler verbessern. Außerdem wurde ein neues, speziell für den LightCycler entwickeltes Amplifikations-Kit (LightCycler-RNA Amplification Kit SYBR Green I, Roche Diagnostics) zur Detektion von RNA mittels SYBR Green I getestet. Dieses Kit beinhaltet bereits alle Komponenten für die RT-PCR, es müssen somit nur noch *target*-spezifische Primer und *template* zugegeben werden. Ein solches Kit wäre daher aufgrund der einfachen Handhabung und der verringerten Kontaminationsgefahr, bedingt durch den Wegfall zahlreicher Verdünnungs- und Pipettierschritte, besonders für

Routine-Analysen in Diagnostik-Laboratorien geeignet. Der Vergleich dieser drei RT-PCR-Systeme wird in Abb. 3-24 dargestellt. Gezeigt ist jeweils die logarithmische Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die Zyklenzahl (*Log Flo vs Cycle #*). Zusätzlich sind die jeweils dazugehörigen Schmelzkurven-Analysen sowie die linearen Regressionsgeraden, die sich durch die Auswertung der Standardkurven ergeben (s. Kapitel 3.2.2), dargestellt.



**Abb. 3-24: Vergleich verschiedener Ein-Schritt RT-PCR Systeme zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes.** Dargestellt sind jeweils die quantifizierbaren Amplifikationskurven der Standardverdünnsreihen im Bereich von  $1.2 \times 10^8$  (■) bis maximal  $1.2 \times 10^4$  (■) als *template* eingesetzten Kopien *in-vitro* Transkript, die resultierenden Standardgeraden, sowie die Schmelzkurven-Analysen aller generierten RT-PCR-Produkte.  
**A:** Amplifikation mit dem Titan One Tube RT-PCR System;  
**B:** Amplifikation mit dem LightCycler RNA Amplification-Kit SYBR Green I;  
**C:** Amplifikation mit *Tth* DNA-Polymerase.

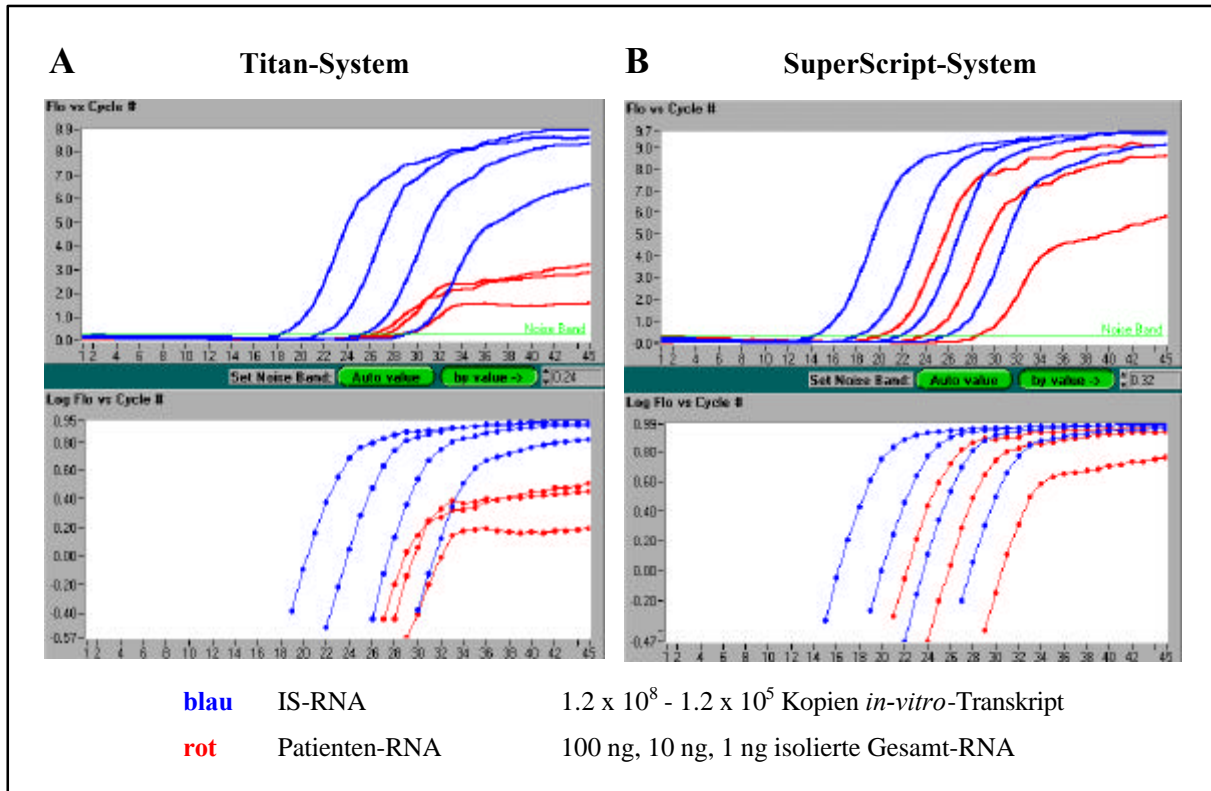
Zur Beurteilung der jeweiligen RT-PCR-Systeme wurden alle diese Auswerte-Kriterien (Amplifikationskurven, Regressionsgerade, Schmelzkurven-Analyse) berücksichtigt, aber mit dem Hauptziel einer Sensitivitätssteigerung gegenüber dem Titan-System (Abb. 3-24-A). Aus diesem Grund ist die *Tth* DNA-Polymerase (Abb. 3.24-C) für den sensitiven Nachweis des *BCR/ABL*-Fusionsgens nicht geeignet. Sie bildet zwar die geringste Menge an Primerdimeren, jedoch wird im Gegenzug mit einer Nachweisgrenze von  $1.2 \times 10^5$  Kopien *in-vitro*-Transkript eine zu geringe Empfindlichkeit erreicht. Vergleicht man jetzt das Titan-System mit dem LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I (Abb. 3-24-B), so ist festzustellen, daß zwar die Nachweisgrenzen mit  $1.2 \times 10^4$  Kopien eingesetztem *in-vitro*-Transkript gleich sind, die Menge an Primerdimeren jedoch bei Amplifikation mit dem Titan-System deutlich geringer ist. Das wichtigste Kriterium ist jedoch in diesem Fall die ermittelte Regressionsgerade, bei der die  $C_T$ -Werte gegen die logarithmische Konzentration der einzelnen analysierten Standards aufgetragen werden. Für das Titan-System ist die Übereinstimmung zwischen der Regressionsgeraden (grün) und den experimentell gewonnenen Daten (rot) sehr viel besser als für das LightCycler-Kit. Außerdem sollten die Kurven bei gleichen Verdünnungsschritten zwischen den einzelnen Standards auch gleiche Abstände in den Zyklenzahlen aufweisen. Theoretisch läßt sich dieser Abstand in Zyklen durch folgende Formel berechnen:  **$\log(X) / \log(Y) = \text{Anzahl in Zyklen}$** .

Der Faktor X stellt hierbei den Verdünnungsfaktor der Standardreihe dar, der Faktor Y ist die Amplifikationseffizienz. Geht man von einer idealen Amplifikationseffizienz unter optimalen Bedingungen aus, so verdoppelt sich pro Zyklus die Menge an Amplifikationsprodukt, und man erhält für die Amplifikationseffizienz einen Faktor von 2. Bezieht man dies auf eine Standardreihe mit einer seriellen Verdünnung der Standards um den Faktor 10, so ergibt sich aus  $\log(10) / \log(2)$  ein Abstand von 3.32 Zyklen zwischen den einzelnen Standardkurven bei idealen Amplifikations-Bedingungen.

Betrachtet man nun die Amplifikationskurven des Titan-Systems im Vergleich zu den Standard-Kurven des LightCycler-Kits, so erkennt man deutlich, daß die Kurven bei dem Titan-System annähernd gleiche Abstände aufweisen, wohingegen die Abstände zwischen den Standards bei Amplifikation mit dem LightCycler-Kit deutlich voneinander abweichen, dasselbe Muster wurde auch bei mehrfacher Wiederholung erhalten. Ein größer werdender Abstand zwischen den Kurven ( $> 3.3$  Zyklen) wäre durch suboptimale Amplifikationsbedingungen zu erklären gewesen, geringere Abstände zwischen den Kurven ( $< 2$  Zyklen) bei gleichen Verdünnungsschritten sind nicht erklärbar, da eine Amplifikations-Effizienz  $> 2$  sehr unwahrscheinlich ist. Deshalb wurde im Weiteren zunächst versucht, das

---

Titan-System zu optimieren. In den vorherigen Versuchen wurden die von Wittwer *et al.* (1997A) angegebenen Konzentrationen der PCR-Reagenzien für die Durchführung einer Amplifikations-Reaktion auf dem LightCycler verwendet. Ein wichtiger Faktor, der die Prozessivität der *Taq* DNA-Polymerase erheblich beeinflusst, ist die Konzentration der Magnesium-Ionen, deren Einfluß nachfolgend untersucht wird.. Standard-Verdünnungsreihen im Bereich von  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^2$  eingesetzter Kopien *in-vitro*-Transkript wurden in Gegenwart von 1.5 mM bis 7 mM  $MgCl_2$  im RT-PCR-Reaktionsansatz amplifiziert. Die bisher verwendete Konzentration von 3 mM  $MgCl_2$  stellte dabei bereits die optimale Konzentration für das Titan One Tube RT-PCR-System dar, so daß keine Verbesserung der Sensitivität erreicht werden konnte. Die nächste Frage war nun, ob der gewählte Konzentrationsbereich zwischen  $1.2 \times 10^8$  und  $1.2 \times 10^5$  Kopien *BCR/ABL*-Transkript je 10 $\mu$ l-Ansatz ausreicht, um in einer Patienten-Probe das *BCR/ABL*-Transkript nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde die isolierte Gesamt-RNA eines Patienten auf Konzentrationen von 50, 5 und 0.5 ng/ $\mu$ l eingestellt, wovon jeweils 2  $\mu$ l als *template* in eine RT-PCR mit dem Titan One Tube RT-PCR-System auf dem LightCycler eingesetzt wurden. Das Ergebnis dieser Amplifikation ist in Abbildung 3-25-A dargestellt.



**Abb. 3-25: Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes einer unbekannt Patienten-Probe mit SYBR Green I auf dem LightCycler.** Quantifizierungs-Vergleich zwischen:  
**A:** dem Titan One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics) und  
**B:** dem SuperScript One-Step RT-PCR System (Gibco BRL).

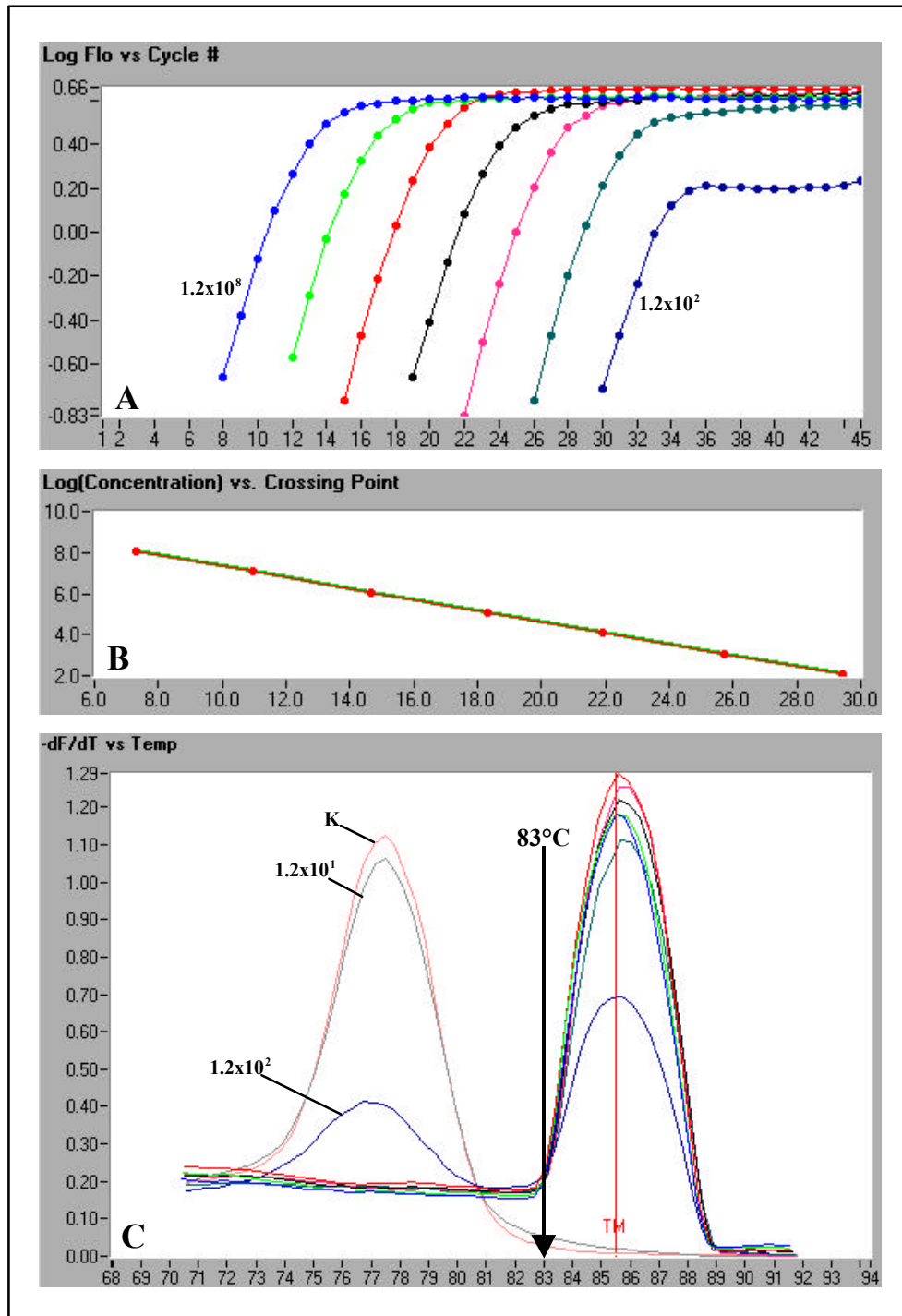
Deutlich zu erkennen ist, daß das Titan-System zur Amplifikation der Patienten-RNA nicht geeignet war, da diese nicht mit der gleichen Effizienz amplifiziert wurde wie die Standard-RNA. Dies kann man einerseits an dem unterschiedlichen Kurvenverlauf erkennen, andererseits an den  $C_T$ -Werten der seriellen Verdünnung der Patienten-RNA, da diese wie bereits zuvor erläutert, keinen definierten Abstand von ca. 3.3 Zyklen aufweisen, im Gegensatz zu den amplifizierten *in-vitro*-Transkripten. Aus diesem Grund wurde ein weiteres Ein-Schritt RT-PCR System, das SuperScript One-Step RT-PCR System der Firma Gibco BRL getestet.

Dieses RT-PCR System beinhaltet ein Enzym-Gemisch aus SuperScript II für die reverse Transkription und *Taq* DNA-Polymerase für die nachfolgende Amplifikation. Die SuperScript II Reverse-Transkriptase ist eine modifizierte M-MLV-Reverse Transkriptase, bei der die RNaseH-Aktivität durch Punktmutation inaktiviert wurde, wodurch eine höhere Effizienz der cDNA-Synthese erreicht wurde.

Der zuvor mit dem Titan One Tube RT-PCR System durchgeführte Versuch (s. Abb. 3-25-A) wurde mit dem SuperScript One-Step RT-PCR System auf dem LightCycler wiederholt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 3-25-B gezeigt. Klar zu erkennen ist, daß Standard- und Patienten-RNA bei Verwendung des SuperScript-Systems mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden, da die Kurven über einen weiten Bereich in der log-linearen Phase der PCR parallel verlaufen und sich zudem auch die Abstände zwischen den Patienten-RNA-Amplifikationskurven dem gewünschten Optimum von 3.3 Zyklen annähern. Ein weiterer Vorteil des SuperScript-Systems gegenüber dem Titan-System ist im Hinblick auf eine Routine-Tauglichkeit der Methode, daß der mitgelieferte Puffer bereits alle Reagenzien, inklusive dNTPs, beinhaltet, so daß nur noch *target*-spezifische Komponenten und SYBR Green I zugegeben werden müssen.

Da das SuperScript-System offensichtlich deutlich bessere Eigenschaften für das vorliegende Quantifizierungsproblem aufweist, wurde dieses nachfolgend detailliert untersucht, um womöglich noch weitere Verbesserungen zu erzielen. Zunächst wurde eine Optimierung der Magnesium-Konzentration für das SuperScript One-Step RT-PCR System durchgeführt, wozu  $\text{MgSO}_4$  im Bereich von 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$  (Magnesium-Konzentration des mitgelieferten Reaktionspuffers) bis 5 mM  $\text{MgSO}_4$  eingesetzt wurden. Als optimale Konzentration an Magnesium-Ionen wurden 2 mM  $\text{MgSO}_4$  ermittelt. Außerdem wurde der Detektionsmeßpunkt innerhalb des PCR-Programmes verschoben. Zunächst erfolgte die Detektion der Fluoreszenz direkt im Anschluß an die Elongationsphase, also bei 72 °C. Führt man die Fluoreszenzmessung jedoch im Anschluß an die 72 °C-Phase bei einer Temperatur von 83 °C durch, so sind bei dieser Temperatur die Primerdimere bereits aufgeschmolzen und tragen nicht mehr zum Fluoreszenz-Signal bei, so daß es sich bei dem gemessenen Signal nur noch um die Fluoreszenz des spezifischen Amplifikationsproduktes handelt. Nach diesen Optimierungen war in der Regel ein Nachweis von  $1.2 \times 10^2$  Kopien *BCR/ABL*-Transkript möglich. Ein typisches Beispiel für eine mit dem SuperScript One-Step RT-PCR System amplifizierte Standardverdünnungsreihe wird in Abbildung 3-26 gezeigt. Als *template* wurden  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^1$  Kopien *in-vitro*-Transkript in die RT-PCR eingesetzt. In der ebenfalls dargestellten Schmelzkurven-Analyse (Abb. 3-26-C) ist durch einen Pfeil die Detektionstemperatur von 83 °C markiert.





**Abb. 3-26: Amplifikation einer Standardverdünnungsreihe mit dem SuperScript One-Step RT-PCR System auf dem LigthCycler.** Eingesetzt wurde eine serielle Verdünnung (10 x) *in-vitro*-Transkript mit einer Ausgangskopienzahl von  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^1$  Kopien RNA sowie Wasser als Negativkontrolle (K). Die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei  $83^\circ\text{C}$ . Weitere Erläuterungen im Text.

In Abbildung 3-26-A ist die logarithmische Darstellung der Amplifikationskurven gezeigt. Anhand dieser Darstellung ist deutlich zu erkennen, daß die Kurven über mehrere Zyklen eine parallele log-lineare Phase haben, innerhalb derer die Quantifizierung erfolgen kann.

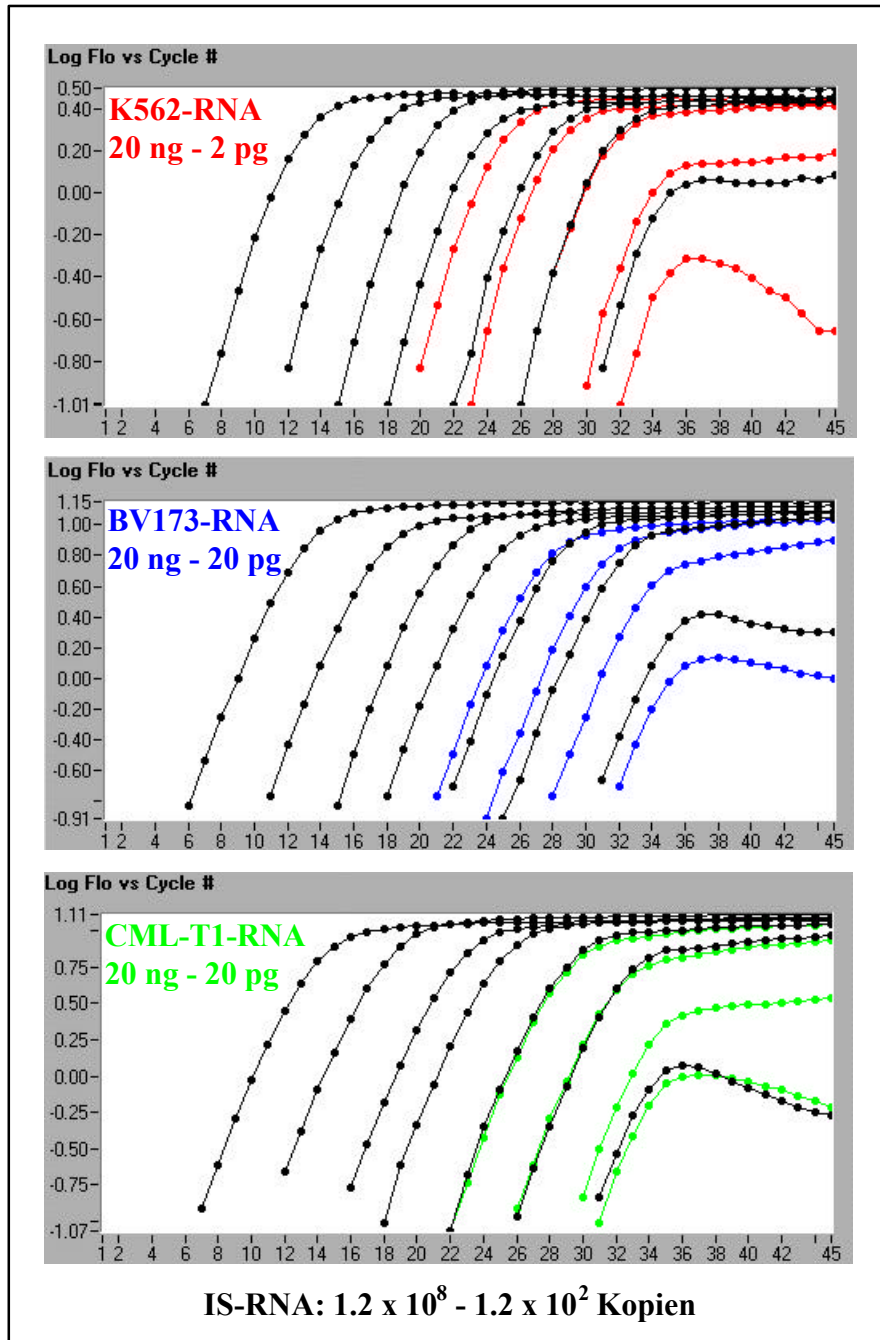
Betrachtet man nun die daraus resultierende Regressionsgerade (grün), so erkennt man, daß alle gemessenen Punkte (rot) exakt auf dieser liegen (Abb. 3-26-B). Bestätigt wird diese gute Übereinstimmung auch durch den berechneten Variationskoeffizienten, mit einer prozentualen Standardabweichung von 2.09 %. In der in Abb. 3-26-C dargestellten Schmelzkurve ist zusätzlich die Detektionstemperatur von 83 °C eingetragen. Hieraus wird deutlich, daß durch diese Variante der Detektion nur noch die Fluoreszenz des spezifischen Produktes gemessen wird, da alle niedriger schmelzenden Produkte (Primerdimere) bereits als Einzelstrang vorliegen und somit kein SYBR Green I mehr gebunden haben. Somit wurde eine Methode entwickelt, die eine Quantifizierung des BCR/ABL-Transkriptes über einen linearen Messbereich von 6 Größenordnungen erlaubt.

#### **3.2.2.4. Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes in verschiedenen Zelllinien**

Zur Überprüfung der Methode wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Leukämie-spezifischen Zelllinien (s. 2.2.3) isoliert und zur Quantifizierung auf dem LightCycler eingesetzt. Hierbei handelte es sich um die folgenden Zelllinien:

- ♦ K562, exprimiert die b3a2-Variante des *BCR/ABL*-Fusionsgens,
- ♦ BV173, exprimiert die b2a2-Variante des *BCR/ABL*-Fusionsgens und
- ♦ CML-T1, die ebenfalls die b2a2-Variante exprimiert.

Die aus den verschiedenen Zelllinien isolierte Gesamt-RNA (s. 2.3.5.3) wurde auf eine Ausgangskonzentration von 10 ng/µl eingestellt und anschließend in einer seriellen 10-fach-Verdünnung bis zu einer Konzentration von 1 pg/µl mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt. Als *template* wurden jeweils 2 µl dieser RNA-Verdünnungsreihe in einer RT-PCR mit dem SuperScript One-Step RT-PCR System eingesetzt. Als Standardreihe fungierte die bereits zuvor eingesetzte Verdünnungsreihe des *in vitro* generierten *BCR/ABL*-Transkriptes mit Ausgangsmengen von  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^2$  Kopien je Ansatz. Die Ergebnisse dieser Quantifizierungen sind in Abb. 3-27 in Form der Amplifikationskurven dargestellt.



**Abb. 3-27: Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes in verschiedenen Leukämie-spezifischen Zelllinien.** Eingesetzt wurden serielle 10-fach-Verdünnungen isolierter Gesamt-RNA aus den Zelllinien K562 (■), BV173 (■) und CML-T1(■) im Bereich von 20 ng bis zu 2 pg, sowie eine Standardverdünnungsreihe des *BCR/ABL*-in-vitro-Transkriptes (■) in den angegebenen Konzentrationen.

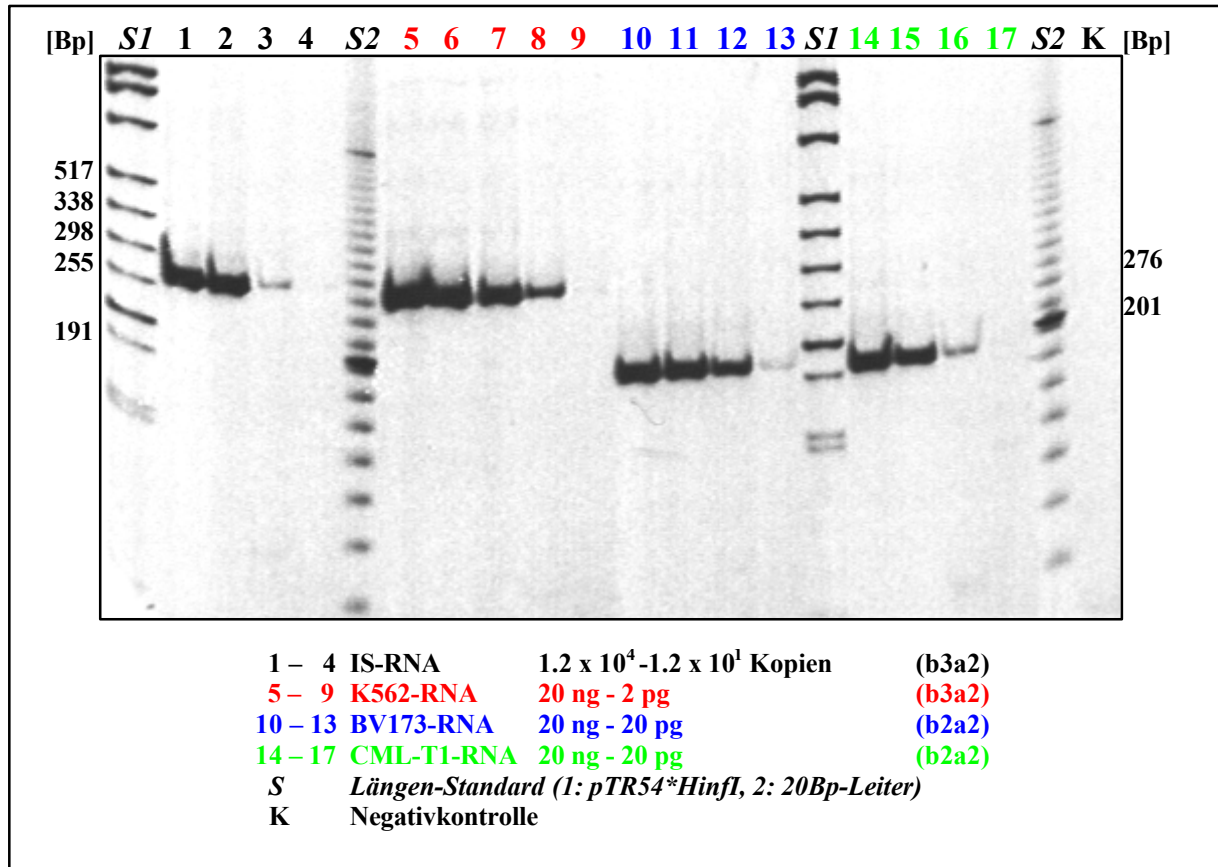
Es zeigt sich deutlich, daß die üblicherweise als *BCR/ABL*-Positivkontrolle verwendete Leukämie-spezifische Zelllinie K562 (Heisterkamp *et al.*, 1983; Liu *et al.*, 1996; Emig *et al.*, 2000) die Zelllinie mit dem größten Anteil *BCR/ABL*-Fusionstranskript in der Gesamt-RNA ist. Eine Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes ist hier bis zu einer Menge von 20 pg eingesetzter Gesamt-RNA ohne weiteres möglich, wohingegen bei der Quantifizierung der

RNA aus BV173- und CML-T1-Zellen die Quantifizierungsgrenze bei 200 pg eingesetzter Gesamt-RNA liegt. In allen Fällen läßt sich aber auch noch ein positives Ergebnis bei geringeren Mengen an Gesamt-RNA ablesen, da die Amplifikationskurven einen deutlichen Anstieg zeigen. Zur Quantifizierung sind diese Kurven jedoch nur bedingt geeignet, da sie im Fall der K562- und BV173-Zellen außerhalb der Standardreihe liegen und im Fall der CML-T1-Zellen einen zu geringen Abstand im  $C_T$ -Wert zur vorherigen Verdünnungsstufe aufweist. Bezieht man die Quantifizierungs-Ergebnisse jeweils auf eine Zelle, indem man 20 pg Gesamt-RNA-Gehalt einer Zelle annimmt, so ergeben sich folgende Kopien-Zahlen je Zelle:

- K562-Zellen: ca.120 Kopien *BCR/ABL*-Transkript je Zelle,
- BV173-Zellen: ca. 40 Kopien *BCR/ABL*-Transkript je Zelle,
- CML-T1-Zellen: ca. 20 Kopien *BCR/ABL*-Transkript je Zelle.

Diese Werte können natürlich nur Anhaltspunkte sein, da die Expressionsrate bzw. spezifische Transkriptmenge einer Zellkultur natürlich von verschiedenen Faktoren, unter anderem von den Wachstumsbedingungen abhängig ist.

Obwohl in der Schmelzkurven-Analyse nur spezifisches Produkt, bei geringen Mengen an eingesetztem Ausgangs-*template* allerdings auch Primerdimere, zu detektieren waren, wurden Aliquots der PCR-Produkte auf einem analytischen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 3-28). Dies diente einerseits der Kontrolle der spezifischen Produktlängen von 276 Bp für das b3/a2-spezifische *BCR/ABL*-RT-PCR-Produkt sowie 201 Bp für das b2a2-spezifische *BCR/ABL*-RT-PCR-Produkt, andererseits der Kontrolle auf An- bzw. Abwesenheit von Nebenprodukten der Amplifikationsreaktion, die möglicherweise die gleiche Schmelztemperatur wie das spezifische Produkt oder die Primerdimere aufweisen könnten. In der Schmelzkurvenanalyse sind z.B. die verschiedenen b3a2- bzw. b2a2-spezifischen RT-PCR-Produkte, obwohl sie einen Längenunterschied von 75 Bp (30 %) aufweisen, nicht voneinander zu trennen.

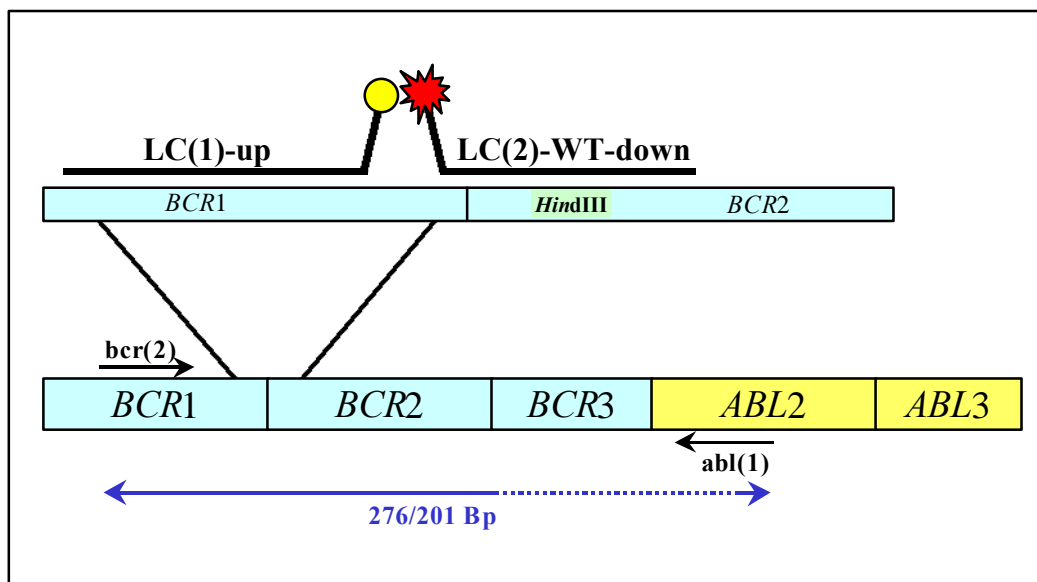


**Abb. 3-28:** Elektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte aus dem bereits in **Abb. 3-27** vorgestellten Quantifizierungsexperiment. Die Länge der Amplifikate beträgt 276 Bp für das b3a2- und 201 Bp für das b2a2-spezifische RT-PCR-Produkt. (6%iges natives TPE-Polyacrylamidgel)

In der elektrophoretischen Auftrennung hingegen sind die beiden *BCR/ABL*-Transkript-Varianten sehr gut voneinander unterscheidbar. Es zeigt sich zudem, daß mit dem gewählten Primer-Paar nur jeweils ein spezifisches Produkt nachweisbar ist und keine weiteren Banden im Gel zu detektieren sind.

### 3.2.3. Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes mit Fluorophor-markierten Hybridisierungssonden

Eine weitere Möglichkeit der *online*- und *real-time*-Detektion von PCR-Produkten auf dem LightCycler neben der Verwendung von SYBR Green I ist der Einsatz Fluorophor-markierter Sonden (s. Kapitel 3.2.1.2). Für die Detektion des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes wurden zwei Hybridisierungssonden, sogenannte HybProbes, konstruiert, die innerhalb des Amplifikationsbereiches des bisher verwendeten Primerpaares *bcr(2)* und *abl(1)* spezifisch an die Sequenz binden. In Abbildung 3-29 ist schematisch die Lage der Sonden innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz dargestellt.



**Abb. 3-29:** Schematische Darstellung der Lage der Hybridisierungssonden innerhalb des Primer-Paares *bcr(2)* und *abl(1)*. Die Donor-Sonde (LC(1)-up) ist am 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (●), die Akzeptor-Sonde (LC(2)-WT-down) am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff LightCycler RED 640 (\*) markiert.

Für die Planung dieser beiden Sonden mußten verschiedene Parameter beachtet werden:

- Um ein FRET-Signal detektieren zu können, müssen die Fluorophor-markierten Oligonukleotid-Sonden in einer *head-to-tail*-Orientierung spezifisch an die *target*-Sequenz binden. Die beiden Fluorophore müssen so gewählt sein, daß das Absorptionsmaximum des Akzeptor-Moleküls einen Überlappungsbereich mit dem Emissionsmaximum des Donor-Fluorophors aufweist. Aus diesem Grund wurde die Sonde LC(1)-up (s. Kapitel 2.3.7.4) an ihrem 3'-Ende mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fluorescein als Donor-Fluorophor, die Sonde LC(2)-WT-down an ihrem 5'-Ende mit dem Akzeptor-Fluorophor LC-RED640 markiert.

- Für einen effizienten Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren müssen sich diese Fluorophore in einer bestimmten räumlichen Nähe zueinander befinden, und zwar innerhalb des sogenannten Förster-Radius (Förster, 1948), der für die meisten Fluorophor-Paare zwischen 40 und 60 Å liegt. Daher wurde ein Abstand von nur 1 Base zwischen den Hybridisierungs-sequenzen der beiden Sonden innerhalb der *BCR/ABL*-Sequenz gewählt.
- Die Akzeptor-Sonde (LC(2)-WT-down) wurde an ihrem 3'-Ende phosphoryliert, damit sie nicht als Primer in der RT-PCR fungiert und somit nicht von der *Taq* DNA-Polymerase verlängert wird.
- Zudem wurden für die Planung der Hybridisierungssonden folgende Bedingungen beachtet, die üblicherweise auch für das Primer-Design gelten:
  - sie dürfen keine selbstkomplementären oder repetitiven Bereiche aufweisen;
  - sie dürfen innerhalb der Sequenz nur eine Bindungsstelle besitzen;
  - sie sollten einen ausgeglichenen A/T- zu G/C-Gehalt haben  
(LC(1)-up: 40 % A/T, 60 % G/C; LC(2)-WT-down: 54 % A/T, 46 % G/C);
  - sie dürfen nicht mit den Primern hybridisieren;
  - zudem muß der Schmelzpunkt des Hybridisierungssonden/*template*-Paar deutlich ( $\geq 10$  °C) über dem des Primer/*template*-Paares liegen.

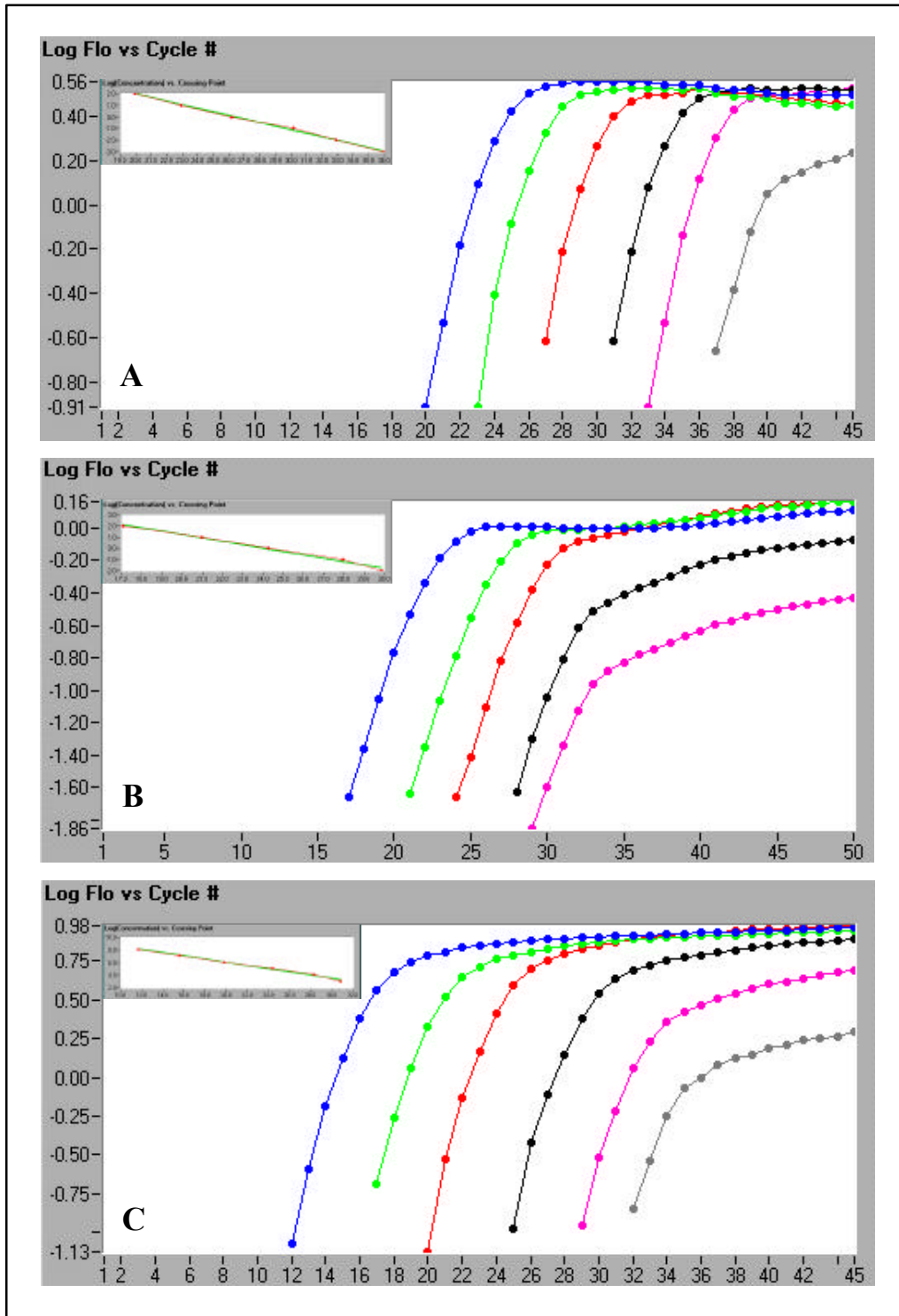
Die exakte Sequenz und Lage der Hybridisierungssonden für die *BCR/ABL*-Analyse wird im Anhang (7.1) gezeigt.

Die Quantifizierung mittels RT-PCR auf dem LightCycler und Detektion mit Hybridisierungssonden erfolgte wie bereits im Kapitel 3.2.2 für SYBR Green I beschrieben. Im Unterschied zum SYBR Green-System ist es aber nicht erforderlich, eine Schmelzkurven-Analyse durchzuführen, da mit den Sequenz-spezifischen Hybridisierungssonden kein unspezifisches Produkt detektiert wird. Eine mögliche Kontamination läßt sich an der jeweils mit-amplifizierten Negativkontrolle ablesen, da diese keinen Anstieg über das Grundfluoreszenz-Signal hinaus zeigen darf. Im Gegensatz zur SYBR Green-Messung erfolgt die Detektion im Anschluss an die Annealingphase, da dort beide Sonden an die *target*-Sequenz gebunden haben und somit das spezifische FRET-Signal messbar ist, welches im Kanal 2 bei einer spezifischen Wellenlänge von 640 nm detektiert wird (s. Kapitel 3.2.1.2). Die Analyse der gewonnenen Amplifikations-Daten erfolgt dann jeweils durch Bildung des Kanalverhältnisses (Ch2/Ch1), da im Kanal 1 die Grundfluoreszenz des Fluoresceins und im Kanal 2 das spezifische FRET-Signal gemessen wird.

### 3.2.3.1. Vergleich verschiedener Ein-Schritt Amplifikations-Systeme

Der Nachweis und die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes auf dem LightCycler mit den ausgewählten Fluorophor-markierten Sonden LC(1)-up und LC(2)-WT-down wurde zunächst mit unterschiedlichen Ein-Schritt RT-PCR Systemen durchgeführt. Im Vergleich wurden das Titan One Tube RT-PCR System, ein speziell für den LightCycler entwickeltes LightCycler - RNA Amplification Kit Hybridization Probes (beide von Roche Diagnostics) sowie das SuperScript One-Step RT-PCR System (Gibco BRL) getestet. Als *template* diente eine 10-fach-Verdünnungsreihe des *in vitro* generierten *BCR/ABL*-Transkriptes, die auch später als Standardreihe für die Quantifizierung von unbekanntem Proben dienen sollte. In die RT-PCR wurden  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^1$  Kopien des *in-vitro*-Transkriptes eingesetzt. Das Volumen des RT-PCR-Reaktionsansatz betrug  $10 \mu\text{l}$ , lediglich für das LightCycler Amplification Kit wurde ein vom Hersteller empfohlenes Volumen von  $20 \mu\text{l}$  verwendet. Das Ergebnis des Vergleiches der verschiedenen RT-PCR Systeme ist in Abbildung 3-30 dargestellt. Für jedes RT-PCR System sind für die Verdünnungsstufen die jeweiligen erhaltenen Amplifikationskurven dargestellt. Für eine exakte Quantifizierung mittels des  $C_T$ -Wertes (s. 3.2.1) ist es erforderlich, daß jede Amplifikationskurve einer Probe einen log-linearen Bereich, der parallel zu den log-linearen Bereichen der Amplifikationskurven der anderen Standardwerte verläuft, aufweist. Im Bereich der Nachweisgrenze ist dies nicht immer der Fall, da die Höhe des FRET-Signales direkt proportional zur Menge an spezifischem Produkt ist, welches für eine Hybridisierung zur Verfügung steht. Daher ist der Fluoreszenzanstieg bei geringen Mengen an Ausgangs-*template*, bei denen erfahrungsgemäß die Bildung erheblicher Primerdimerungen auftritt und die Amplifikation des spezifischen RT-PCR-Produktes reduziert, oftmals niedriger und somit der log-lineare Bereich der Amplifikationskurven kürzer als für die Reaktionsansätze mit höheren *template*-Konzentrationen.





**Abb. 3-30: Vergleich verschiedener Ein-Schritt RT-PCR Systeme zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes mit Fluorophor-markierten Hybridisierungssonden.**

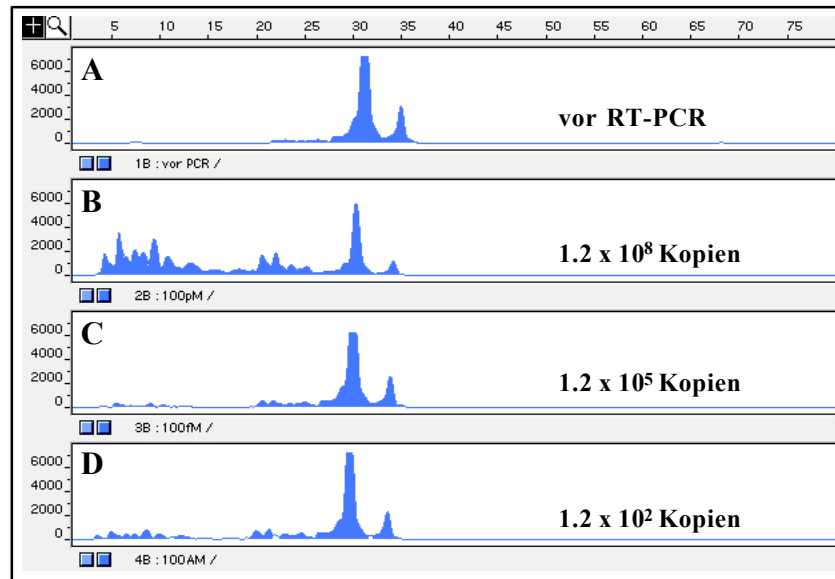
- A: Titan One Tube RT-PCR-System,
- B: LightCycler RNA Amplification Kit Hybridization Probes,
- C: SuperScript One Step RT-PCR System.

Als *template* wurde eine 10-fach Verdünnungsreihe des *in vitro* generierten *BCR/ABL*-Transkriptes eingesetzt. Dargestellt sind die quantifizierbaren Amplifikationskurven, in Form des logarithmischen Plots der Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl, im Bereich von  $1.2 \times 10^8$  (■) bis maximal  $1.2 \times 10^3$  (■) initialen Kopien des *in-vitro*-Transkriptes. Ebenfalls angegeben sind die aus den Quantifizierungen resultierenden Standardgeraden.

Deutlich zu erkennen ist, daß das LightCycler Amplification Kit mit einer Nachweisgrenze von 12000 Kopien *in-vitro*-Transkript eine geringere Sensitivität aufweist als die beiden anderen Ein-Schritt RT-PCR Systeme. Zudem ist diese letzte Amplifikationskurve ( $1.2 \times 10^4$  Kopien) des LightCycler-Kits nur noch bedingt zur Quantifizierung geeignet, da die log-lineare Phase nicht mehr parallel zu denen der Amplifikationskurven der geringeren Verdünnungsstufen verläuft. Titan- und SuperScript weisen zwar eine vergleichbare Sensitivität mit dem Nachweis von  $1.2 \times 10^3$  Kopien *in-vitro*-Transkript auf, da aber die ermittelten  $C_T$ -Werte bei Amplifikation mit dem SuperScript-System bei gleichen eingesetzten *template*-Mengen deutlich niedriger sind, deutet dies auf eine bessere Effizienz der Reverse Transkription hin.

Da sich die Volumina der Reaktionsansätze zwischen LightCycler-Kit (20  $\mu$ l) und den anderen RT-PCR Systemen (10  $\mu$ l) unterscheiden, wurde untersucht, ob das Volumen des PCR-Ansatzes einen Einfluß auf die Nachweisgrenze hat. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Volumina festgestellt werden. Aufgrund der geringeren Kosten pro Reaktionsansatz wurden dann alle weiteren RT-PCR-Reaktionen in einem Volumen von 10  $\mu$ l durchgeführt.

Des Weiteren wurde kontrolliert, ob ein möglicher Sondenabbau während der PCR durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase in der Elongations-Phase zu einer Limitierung der Nachweisgrenze führt. Auf diesem Sondenhydrolyse-Prinzip beruht der Nachweis mittels einer Fluorophor-markierten Hydrolyse-Sonde, besser bekannt als *TaqMan*-Sonde (s. 3.2). Der Sondenabbau kann mit Hilfe der ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Kapillarelektrophorese (s. 2.5.3.3) durch elektrophoretische Auftrennung der Fluorescein-markierten Sonde und anschließende Analyse durch die GeneScan-Software sichtbar gemacht werden. Analysiert wurde der PCR-Mastermix vor Amplifikation mittels des LightCyclers, sowie Aliquots der PCR-Ansätze nach erfolgter Amplifikation mit eingesetzten  $1.2 \times 10^8$ ,  $1.2 \times 10^5$  und  $1.2 \times 10^2$  Kopien *in-vitro*-Transkript nach 45 Zyklen. Die Proben wurden jeweils im Verhältnis 1:10 verdünnt, mit Formamid und GeneScan 500 TAMRA als Längenstandard gemischt und anschließend mit der Kapillarelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Die mittels der GeneScan-Software analysierten Daten werden in Form von Elektropherogrammen in der Abbildung 3-31 gezeigt.



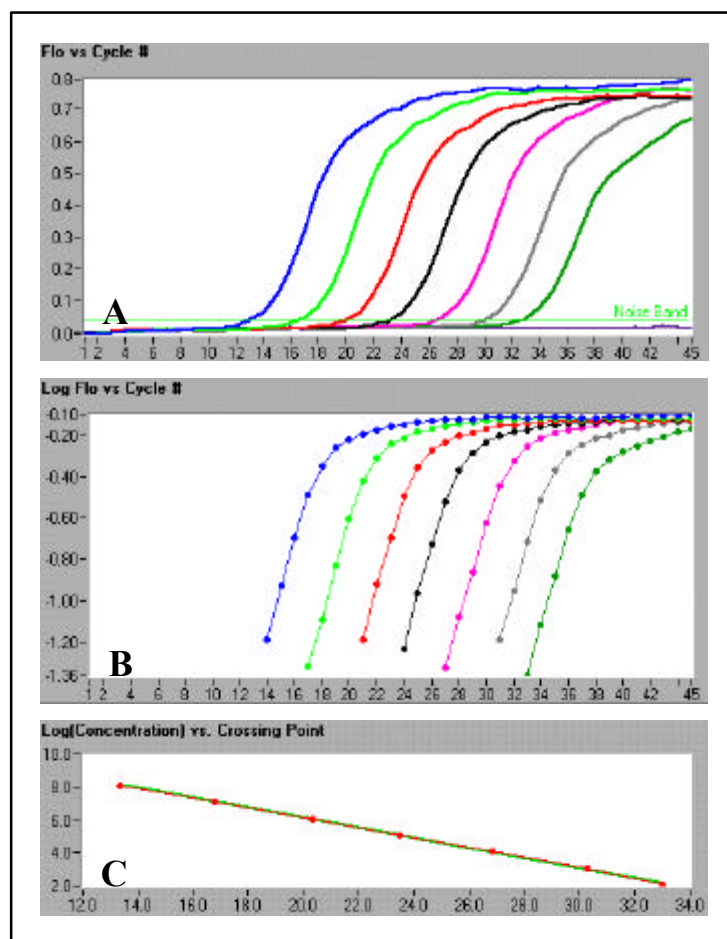
**Abb. 3-31: Analyse der Fluorescein-markierten Hybridisierungssonde mit der ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Kapillarelektrophorese.** Dargestellt sind die nach Analyse mit der GeneScan-Software erhaltenen Elektropherogramme der Hybridisierungssonde vor PCR und nach Amplifikation (45 Zyklen) unterschiedlicher *template*-Mengen auf dem LightCycler.

Anhand der Elektropherogramme ist gut zu erkennen, daß vor Durchführung der RT-PCR (Abb. 3-31-A) die Sonde zwar als Doppel-Peak erscheint, aber prinzipiell keine kleineren Fragmente zu erkennen sind. Der Doppel-Peak entsteht, weil zur Markierung ein Fluorescein-Isomerengemisch aus 5- und 6-Carboxyfluorescein verwendet wurde und diese isomeren Oligonukleotide im Gel ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen (lt. pers. Mitteilung von Herrn Land der Synthesefirma TIB MOLBIOL). Bei hohen Konzentrationen an Ausgangs-*template* stellt sich dies ganz anders dar (Abb. 3-31-B). Berechnet man den prozentualen Anteil der aufgetrennten Fragmente, die kleiner sind als der ursprüngliche Sonden-Peak, so beträgt der Anteil an verkürzten Sonden nach 45 Zyklen ca. 70 %, das heißt am Ende der RT-PCR ist nur noch ca. 1/3 der eingesetzten Sonden mit vollständiger Länge erhalten und steht für die Hybridisierung sowie zur Erzeugung des FRET-Signals zur Verfügung. Allerdings ist dieser Abbau der Sonden bei geringeren Ausgangskopienzahlen (Abb. 3-31-C, -D) kaum noch zu beobachten und da die Sonden zudem in einem großen Überschuß in die RT-PCR-Reaktion eingesetzt werden, sollte dies während der exponentiellen Phase nur einen minimalen, hier vernachlässigbaren Einfluß auf die Nachweisgrenze haben.

Aufgrund der schlechteren Sensitivität und Quantifizierbarkeit wurde das LightCycler RNA Amplification Kit nicht weiter verwendet, sondern versucht, die Sensitivität der beiden anderen Ein-Schritt-Systeme, durch Optimierung folgender RT-PCR-Parameter zu verbessern:

- Variation der Magnesium-Ionen-Konzentration im Bereich von 1.5 - 6 mM MgCl<sub>2</sub> für das Titan-System bzw. 1.2 - 6 mM MgSO<sub>4</sub> für das SuperScript-System;
- Variation der Temperatur des RT-Schrittes (50 - 55 °C);
- Variation der Annealing-Temperatur für Primer und Sonden (50 - 56 °C);
- Variation der Konzentration der Fluorophor-markierten Hybridisierungssonden.

Die für jedes System optimierten Bedingungen zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes sind in Kapitel 2.6.2 aufgeführt. Für das Titan-System konnte trotz intensiver Optimierungsbemühungen keine Verbesserung der Sensitivität in einen Bereich unter 1200 Kopien erreicht werden. Bei Verwendung des SuperScript-Systems war jedoch durch Optimierung der RT-PCR-Bedingungen ein genereller Nachweis von  $1.2 \times 10^2$  Kopien zu erzielen. Ein typisches Beispiel für die Amplifikation einer *BCR/ABL*-Standardreihe mit dem SuperScript One Step RT-PCR-System auf dem LightCycler ist in Abbildung 3-32 gezeigt.

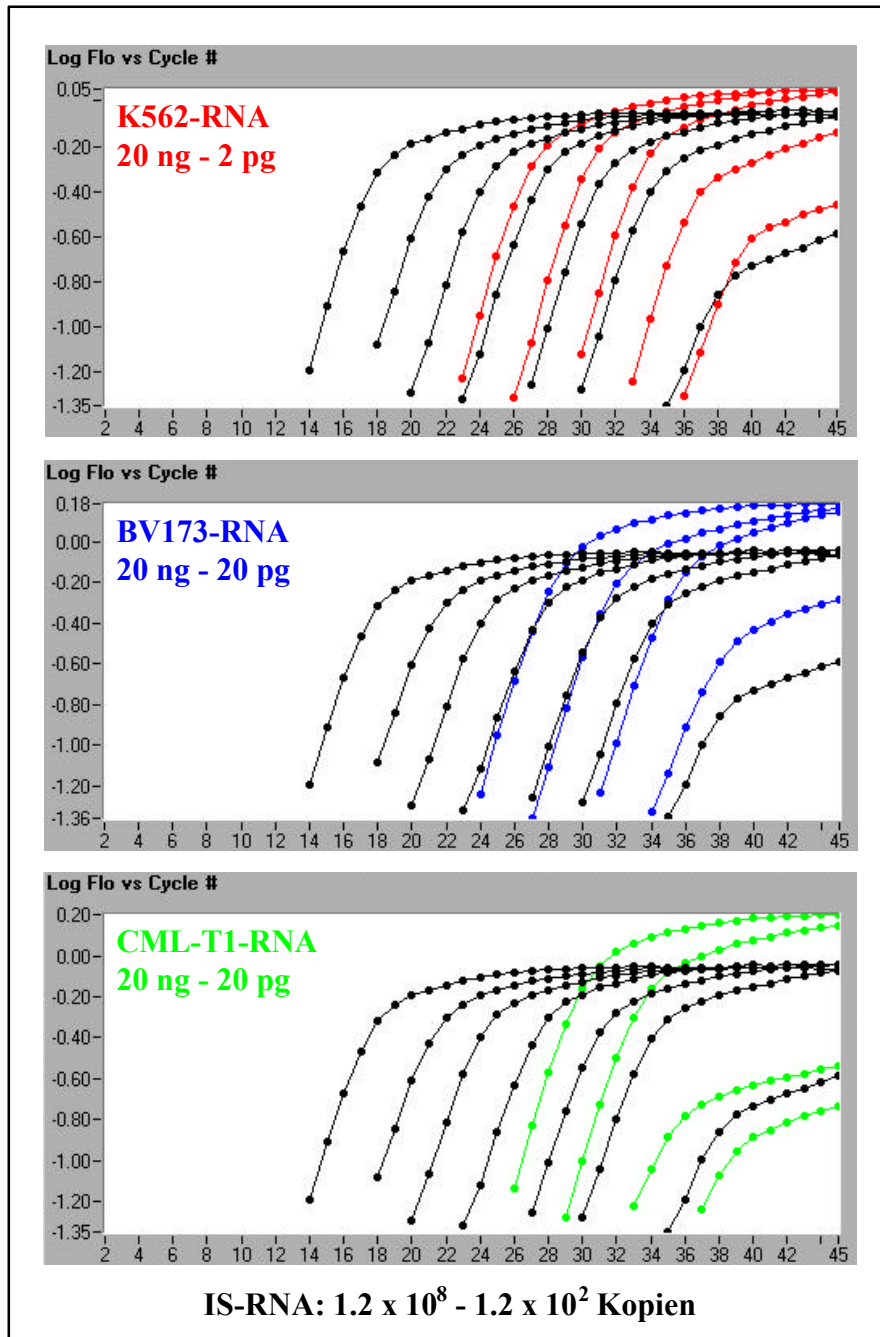


**Abb. 3-32:** Amplifikation einer *BCR/ABL*-Standardreihe mit dem optimierten SuperScript One Step RT-PCR System und HybProbes-Detektion auf dem LightCycler. Die Detektion der spezifischen RT-PCR Produkte erfolgte mittels Fluorophor-markierter Hybridisierungssonden. Als Ausgangs-*template* wurden in einer 10-fach-Verdünnungsreihe  $1.2 \times 10^8$  (■) bis  $1.2 \times 10^2$  (■) Kopien *in-vitro*-Transkript eingesetzt (Negativkontrolle ■). Nähere Erläuterungen im Text.

Deutlich ist in Abb. 3-32-A zu erkennen, daß mit dem optimierten SuperScript-System über einen Bereich von 6 Größenordnungen hinweg ein homogener Anstieg der Fluoreszenz mittels HybProbes erreichen wird. Des Weiteren ist zu erkennen, daß die Negativkontrolle (ohne *template*) keinen Fluoreszenz-Anstieg zeigt. Obwohl davon auszugehen ist, daß auch hier, wie bei der Detektion mit SYBR Green I, Primerdimere gebildet werden, können sie aufgrund des Sequenz-spezifischen Detektionsformates nicht detektiert werden. Zudem verläuft die log-lineare Phase über mehrere Zyklen parallel (Abb.3-32-B), so daß für die exakte Quantifizierung mittels *threshold-line* bzw. *Noise Band* ein weiter Bereich zur Verfügung steht. In der daraus abgeleiteten Regressionsgeraden (Abb. 3-32-C), bei der die logarithmische Ausgangskonzentration der jeweiligen Standards gegen die Schnittpunkte der Amplifikationskurven mit der *Noise Band* aufgetragen wird, sieht man deutlich, daß alle experimentell ermittelten C<sub>T</sub>-Werte (rot) auf der Regressionsgeraden (grün) liegen. Zudem betragen die Abstände zwischen den einzelnen Kurven im Mittel 3.3 Zyklen betragen, was dem idealen Abstand einer 10-fach Verdünnungsreihe entspricht (s. 3.2.2.3). Der berechnete Variationskoeffizient, d.h. die prozentuale Standardabweichung vom Mittelwert, beträgt 11 %. Die stärkste Abweichung von der idealen Quantifizierung zeigt die Amplifikationskurve mit 120 Kopien eingesetztem *in-vitro*-Transkript. Nimmt man diesen Wert aus der Quantifizierung heraus, beträgt der Variationskoeffizient nur noch 2.5 %. Aufgrund dieser überzeugenden Ergebnisse wurde in den nachfolgenden Experimenten die Amplifikation von RNA jeweils mit dem optimierten SuperScript One Step RT-PCR System durchgeführt.

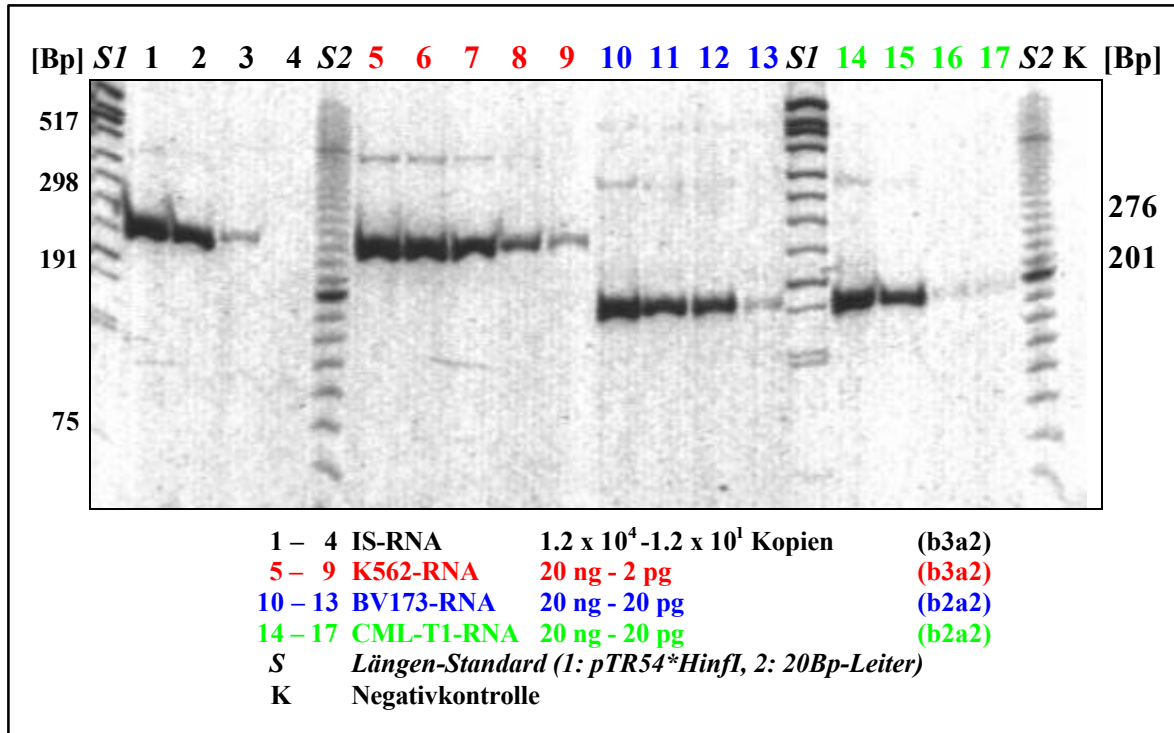
### 3.2.3.2. Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes in verschiedenen Leukämie-spezifischen Zelllinien

Zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes mittels Fluorophor-markierter Sonden wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen humanen Leukämie-Zelllinien verwendet (s. 2.1.3). Hierbei wurden 10-fach Verdünnungen der isolierten Gesamt-RNA mit Ausgangs-Konzentrationen von 10 ng/µl bis zu 1 pg/µl der Zelllinien K562, BV173 und CML-T1 eingesetzt, die bereits zuvor für die Quantifizierung mit SYBR Green I auf dem LightCycler genutzt wurden (s. 3.2.2.4). Als *template* für die RT-PCR wurden jeweils 2 µl dieser Zelllinien-RNA-Verdünnungsreihe sowie als Standard die übliche Verdünnungsreihe mit  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^2$  Kopien *BCR/ABL*-Transkript eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Quantifizierungen werden in Abbildung 3-33 gezeigt.



**Abb. 3-33: Quantifizierung von isolierter Gesamt-RNA aus verschiedenen Leukämie-Zelllinien mit Fluorophor-markierten Hybridisierungssonden.** Als *template* wurde isolierte Gesamt-RNA aus K562- (■), BV173- (■) und CML-T1-Zellen (■) eingesetzt. Als Standard diente eine 10-fach-Verdünnungsreihe des *in vitro* generierten *BCR/ABL*-Transkripts in den angegebenen Mengen (■).

Aliquots der generierten Amplifikate wurden im Anschluß an die RT-PCR zur Kontrolle auf Anwesenheit eines homogenen, spezifischen Produktes auf einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.



**Abb. 3-34: Elektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte aus dem in Abb. 3-33 vorgestellten Quantifizierungsexperiment.** Die Detektion erfolgte mittels Fluorophormarkierter Hybridisierungs-sonden. Die Länge der quantifizierten RT-PCR-Produkte betragen 276 Bp für die b3a2- und 201 Bp für die b2a2-*BCR/ABL*-Translokationsvariante. (6%iges natives TPE-Polyacrylamidgel, EtBr-Färbung, inverse Darstellung)

Abbildung 3-34 zeigt, daß bei der Amplifikation mit HybProbes-Detektion ein Haupt-PCR-Produkt für die amplifizierte Zelllinien-RNA gebildet wird und zwar je nach exprimierter *BCR/ABL*-Transkript-Variante mit 276 Bp (b3/a2-Variante) oder 201 Bp (b2/a2-Variante) Länge. Die in minimaler Menge auftretenden Nebenprodukte werden hier, bedingt durch die hohe Sequenz-Spezifität der Sonden, nicht detektiert und fließen somit in das Quantifizierungsergebnis nicht ein.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der Quantifizierungen der Zelllinien-spezifischen *BCR/ABL*-RNA-Kopienzahlen mit den verschiedenen Detektionsmethoden, so stellt man fest, daß sowohl mit SYBR Green I als auch mit den Fluorophor-markierten Hybridisierungssonden die Sensitivitätsgrenzen vergleichbar sind. Dies bedeutet, daß mit beiden Detektionsformaten jeweils etwa eine Zelle (ca. 10-30 pg Gesamt-RNA) einer jeden Leukämie-Zelllinie nachweisbar war. Vergleicht man allerdings für beide Detektionsformate die exakt ermittelten Kopienzahlen (Tab. 3-1), so weichen diese voneinander ab. Insgesamt gesehen handelt es sich hierbei jedoch um eine Abweichung, die kleiner als der Faktor 3 ist. Ursachen hierfür können sein: Pipettierungenauigkeiten aber auch Geräteungenauigkeiten.



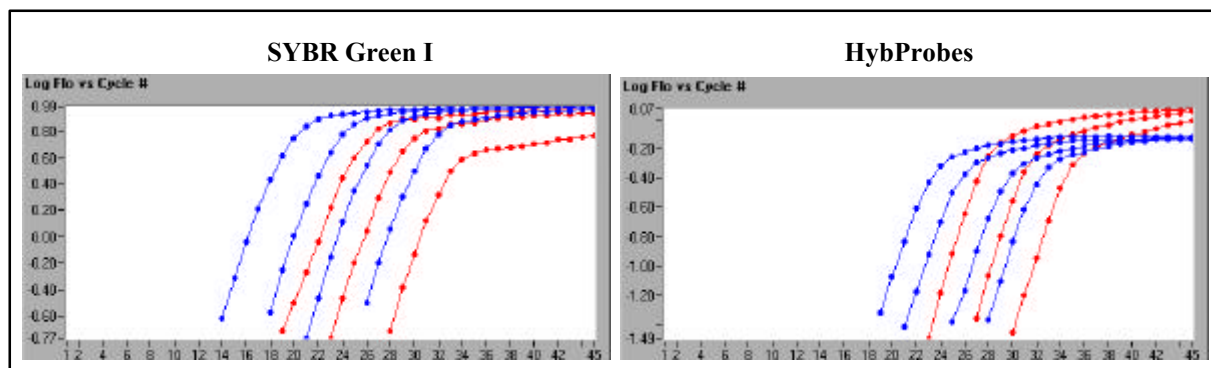
Detektionsformat	SYBR Green I	HybProbes
Zelllinie	[Kopien/20 pg Gesamt RNA]	[Kopien/20 pg Gesamt-RNA]
<b>K562</b>	120	200
<b>BV173</b>	40	110
<b>CML-T1</b>	20	35

**Tab. 3-1: Ergebnisse der Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionsgens in der Gesamt-RNA aus verschiedenen Leukämie-Zelllinien.** Die Ergebnisse an *BCR/ABL*-Transkript wurden bezogen auf eine einheitliche Menge von 20 pg Gesamt-RNA. Dies entspricht bei einem Gesamt-RNA Gehalt von 10 - 30 pg pro Zelle der Anzahl *BCR/ABL*-Transkript einer Zelle.

Um jedoch beurteilen zu können, welches Detektionsformat für die routinemäßige *BCR/ABL*-Analytik besser geeignet ist, wurden weitere Experimente durchgeführt, die im nächsten Kapitel beschrieben sind.

### 3.2.4. Vergleich der Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes bei Einsatz von Hybridisierungs sonden oder SYBR Green I

Zunächst wurde untersucht, ob bei Einsatz von Gesamt-RNA, die aus dem Blut eines Leukämie-Patienten mit CML isoliert wurde, ebenfalls (s. Tab. 3-1) Unterschiede zwischen den beiden Detektionsformaten, SYBR Green I und Fluorophor-markierten Hybridisierungs sonden, festzustellen sind. Die jeweiligen Amplifikationskurven sind in Form des logarithmischen Auftrags der Fluoreszenzintensität gegen die Zyklenzahl in Abb. 3-35 dargestellt.



**Abb. 3-35: Quantitative Analyse der gleichen CML-Patientenprobe mit unterschiedlichen Detektionsmethoden.** Eingesetzt wurden 100, 10 und 1 ng isolierte Gesamt-RNA aus dem Blut des Patienten (■), sowie als Standard  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^5$  Kopien *in vitro* generiertes *BCR/ABL*-Transkript (■).



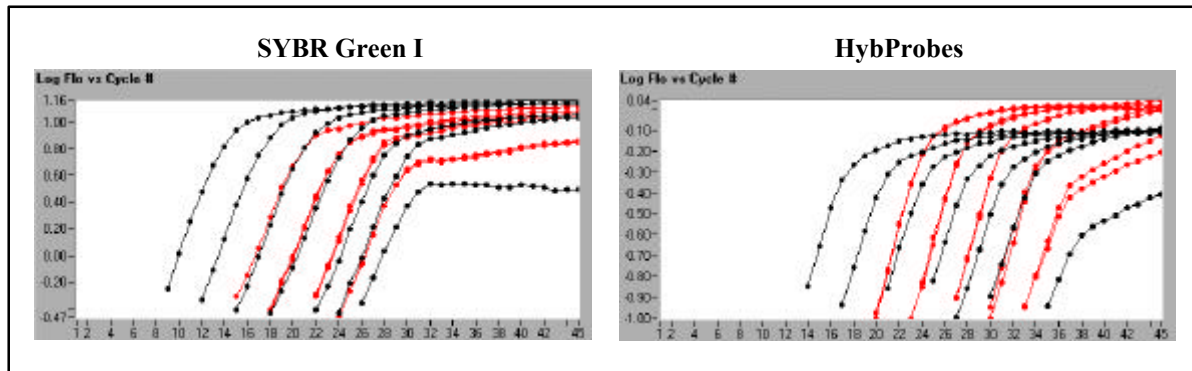
Die Quantifizierungs-Ergebnisse der in Abb. 3-35 dargestellten Amplifikationen sind für beide Detektionsformate in Tabelle 3-2 für die jeweiligen Verdünnungsstufen der Patienten-RNA dargestellt.

Detektionsformat	SYBR Green I	HybProbes	Abweichung
<b>Gesamt-RNA</b>	[Kopien/Zelle*]	[Kopien/Zelle*]	[%]
<b>100 ng</b>	875	806	8.21
<b>10 ng</b>	737	519	34.72
<b>1 ng</b>	436	399	8.86

**Tab. 3-2: Analyse der *BCR/ABL*-Transkript-Quantifizierung in Gesamt-RNA aus Patientenblut nach Amplifikation auf dem LightCycler mit unterschiedlichen Detektionsformaten.**  
 (\*bezogen auf eine einheitliche Menge von 20 pg Gesamt-RNA pro Zelle)

Anhand der in Tabelle 3-2 gezeigten Ergebnisse wird deutlich, daß die Unterschiede für die einzelnen Werte zwischen den Detektionsformaten relativ gering sind, mit einer maximalen Abweichung von ca. 35 % für den 10 ng-Wert. Es fällt aber auf, daß beide Detektionsformate für die einzelnen Verdünnungen der Gesamt-RNA jeweils Unterschiede zwischen den berechneten Kopienzahlen pro Zelle aufweisen. Allerdings differieren diese Werte maximal um den Faktor 2. Auffällig ist, daß die Kopien/Zelle-Zahlen mit der Verdünnung korreliert. Eine Erklärung könnte sein, daß die Ausbeute der Reversen Transkription bei niedrigen RNA-Konzentrationen sinkt.

Ferner wurde untersucht, ob Sensitivitätsunterschiede zwischen den beiden Detektionsformaten bestehen. Da diese Experimente zur Validierung in einem externen Labor stattfanden, in dem üblicherweise mRNA verwendet wird, wurde aus der Leukämie-Zelllinie K562 mRNA isoliert und jeweils im Doppelansatz als 10-fach Verdünnungsreihe im Bereich von 20 ng bis 2 pg als *template* in die RT-PCR eingesetzt. Die Detektion erfolgte zunächst mit SYBR Green I und anschließend mit den *BCR/ABL*-spezifischen Fluorophor-markierten Hybridisierungssonden. Die mittels des LightCyclers generierten Amplifikationskurven werden in Form der logarithmischen Darstellung in Abbildung 3-36 gezeigt.



**Abb. 3-36: Vergleich der beiden Detektionsformate hinsichtlich der Nachweisbarkeit von isolierter mRNA aus K562-Zellen.** Es wurden jeweils Doppelansätze einer 10-fach-Verdünnungsreihe von 20 ng - 2 pg mRNA (■) amplifiziert sowie  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^2$  Kopien Standard-RNA (■).

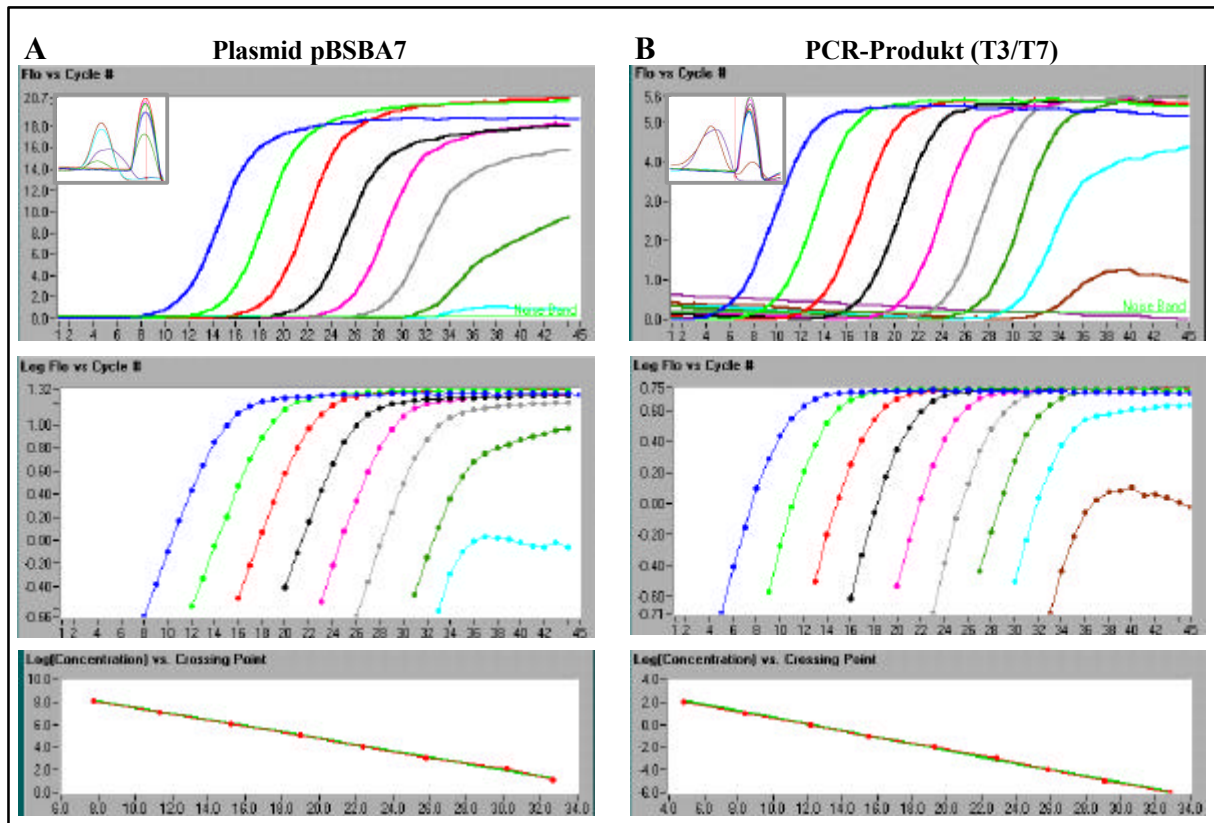
Deutlich erkennt man, daß zwar die Kurvenverläufe hinsichtlich ihrer log-linearen Phase zwischen Standard und Probe bei der Detektion mit SYBR Green I besser als bei der Detektion mit HybProbes übereinstimmen, aber die Quantifizierungsergebnisse für die eingesetzten mRNA-Verdünnungen im Bereich von 20 ng - 20 pg annähernd übereinstimmen. Die exakten Werte (nicht dargestellt) weichen maximal um den Faktor 2 voneinander ab. Zudem ist zu erkennen, daß die Abstände zwischen den einzelnen Standardverdünnungen bei Detektion mit HybProbes sehr viel gleichmäßiger und mit einem durchschnittlichen Abstand von 3.3 Zyklen optimal für eine 10-fach Verdünnungsreihe sind, ohne Berücksichtigung der Standardkurve für  $1.2 \times 10^2$  Transkript-Kopien. Die Detektion mit SYBR Green ergibt über die gesamte Standardreihe einen durchschnittlichen Abstand von 3.06 Zyklen, nimmt man jedoch die letzten beiden Standards aus dieser Berechnung heraus, beträgt der Abstand 3.54 Zyklen. Während bei Detektion mit SYBR Green I, die Nachweisgrenze lediglich 20 pg mRNA betrug, war sie bei Einsatz der Fluorophor-markierten Hybridisierungs sonden der Nachweis von 2 pg K562-mRNA möglich. Ein häufig auftretendes Problem, das sich auch anhand der in Abb. 3-36 gezeigten Standardkurven bei Detektion mit HybProbes nachvollziehen läßt, war die Gewährleistung einer guten Reproduzierbarkeit der Standard-Verdünnungsreihe. Vor allem der reproduzierbare Nachweis von 100 Kopien Standard-RNA gestaltete sich als schwierig, da sich gerade im unteren Nachweisbereich einerseits statistische Schwankungen, andererseits der Abbau von RNA durch RNasen stärker auswirkt, zu erkennen an einem größeren Abstand zwischen den letzten beiden Amplifikationskurven des Standards. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu vermeiden, besteht darin, DNA als Standard zu verwenden. Eine weitere Ursache, die zu diesem Phänomen der schlechten Reproduzierbarkeit beiträgt, ist die Adsorption von RNA an die Wand des Reaktionsgefäßes.

Dies wird zwar in der zur Amplifikation verwendeten Glaskapillare durch die Zugabe von BSA in den Reaktionsmix weitestgehend verhindert, aber solche Adsorptionsphänomene kommen bereits früher beim Pipettieren der Standardverdünnungsreihe zum Tragen. Um nun trotz dieser Beeinträchtigungen eine gute Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von RNA-Standards im niederen Konzentrationsbereich zu gewährleisten, wurde MS2-Phagen-RNA (Roche Diagnostics) als Träger-RNA zu den jeweiligen RNA-Verdünnungen zugegeben. In Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß diese MS2-RNA keine Sequenzbereiche aufweist, die von dem zur *BCR/ABL*-Analyse verwendeten Primer-System amplifiziert wurden. Zudem wurde die Standard-Verdünnungsreihe in großem Maßstab hergestellt und in Form kleiner Aliquots bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.2.5. Amplifikationseigenschaften einer DNA-Standardreihe im Vergleich zur bisher verwendeten RNA-Standardreihe**

Eine Möglichkeit, eine gute Reproduzierbarkeit der Standardreihe zu gewährleisten, ist, wie bereits im Kapitel zuvor angesprochen, die Verwendung von DNA als Standard. Da diese Variante auch in der Literatur zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes häufig zu finden ist (Branford *et al.*, 1999; Cross *et al.*, 1993; Emig *et al.*, 2000), wurde auch in dieser Arbeit untersucht, in wieweit sich eine DNA-Standardreihe zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes auf dem LightCycler eignet. Zur Erstellung einer *BCR/ABL*-DNA-Standardreihe bietet sich die Möglichkeit, die pBSBA7-Plasmid-DNA (s. Kapitel 2.2.4) selbst oder aber einen amplifizierten Bereich dieses Plasmides zu verwenden. Daher wurde zunächst eine Plasmid-Minipräparation (s. Kapitel 2.3.4.1) des Plasmides pBSBA7 durchgeführt, welches als Insert ein 601 Bp-Genfragment der b3/a2-*BCR/ABL*-Transkript-Variante beinhaltet. Anschließend wurde zur Konzentrationsbestimmung ein UV-Spektrum aufgenommen und unter Berücksichtigung der Molmasse des Plasmides (2 293 937 g/Mol) eine Konzentration von 1 nM eingestellt. Zur Generierung eines DNA-Standards in Form eines PCR-Produktes wurde der gesamte *Insert*-Bereich des Plasmides pBSBA7 mit den Plasmid-spezifischen Primern pBS-T3 und pBS-T7 (s. Kapitel 2.3.7.3) amplifiziert. Anschließend wurde dieses 765 Bp lange PCR-Produkt mit einer Molmasse von 461 183 g/Mol ebenfalls auf eine Ausgangs-Konzentration von 1 nM eingestellt. Diese Ausgangslösung wurde für beide *templates* jeweils im Verhältnis 1:10 mit Reinstwasser seriell bis auf eine End-Konzentration von 1 aM verdünnt. Dies entspricht bei 2  $\mu\text{l}$  in die PCR eingesetztem *template BCR/ABL*-Kopienzahlen von  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^0$ . Die Amplifikation

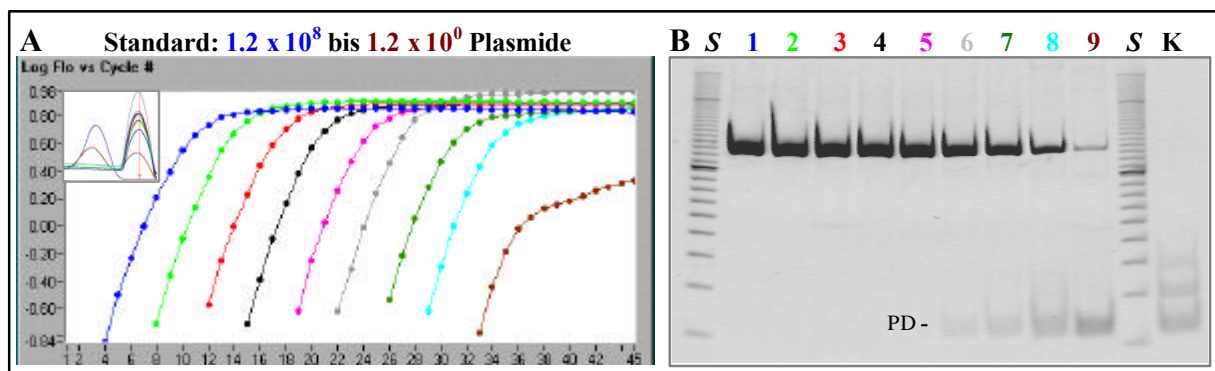
wurde mit *Taq* DNA-Polymerase, die Detektion mittels SYBR Green I auf dem LightCycler durchgeführt. Die Detektion erfolgte jeweils im Anschluß an die Elongationsphase bei 83 °C, um auszuschliessen, daß Pimerdimere einen meßbaren Beitrag zum Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt der Detektion haben. Die Ergebnisse der Amplifikationsexperimente mit dem Plasmid pBSBA7 sowie dem davon generierten PCR-Produkt (T3/T7) als *template* sind in Abbildung 3-37 dargestellt.



**Abb. 3-37: PCR-Experimente mit unterschiedlichen DNA-Standardreihen.**  
 Amplifikation mit *Taq* DNA-Polymerase und Detektion mit SYBR Green I von:  
**A:** supercoiled Plasmid (pBSBA7)  
**B:** PCR-Produkt (T3/T7)  
 Eingesetzt wurden jeweils  $1.2 \times 10^8$  (■) bis  $1.2 \times 10^0$  (■) Kopien. In Abb. **B** ist zudem die Negativkontrolle (■) für beide Experimente dargestellt.

Deutlich erkennt man, daß im Gegensatz zur Plasmid-DNA-Amplifikation bei Amplifikation des PCR-Produktes auch bei geringen Kopienzahlen, selbst bei "theoretisch" einer als *template* eingesetzten Kopie des *BCR/ABL-templates*, ein Fluoreszenz-Anstieg detektiert wurde. Anhand der Schmelzkurven-Analyse erkennt man, daß es sich bei diesem detektierten Amplifikat tatsächlich um das spezifische PCR-Produkt handelt. Dargestellt ist außerdem die Negativkontrolle (ohne *template*), die weder einen Kurvenanstieg zeigt noch in der Schmelzkurve ein spezifisches Produkt aufweist. Die "schlechtere" Amplifikation des

Plasmides könnte ursächlich mit der überwiegenden *supercoiled*-Struktur des Plasmides zusammenhängen. Daher wurde das Plasmid pBSBA7 mit der Restriktionsendonuklease *SalI* gespalten. Dieses Restriktionsenzym besitzt nur eine singuläre Restriktionsschnittstelle innerhalb der *multiple cloning site* des Plasmides, so daß das Plasmid nach Spaltung in einer linearisierten Form vorliegt. Dieses linearisierte Plasmid wurde anschließend als *template* in eine PCR auf dem LightCycler eingesetzt und zwar in den gleichen Konzentrationen wie zuvor das PCR-Produkt bzw. das *supercoiled*-Plasmid. Das Ergebnis dieser Amplifikation ist in Abb. 3-38-A dargestellt. Die so generierten PCR-Produkte wurden zur Analyse auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. (Abb. 3-38-B).



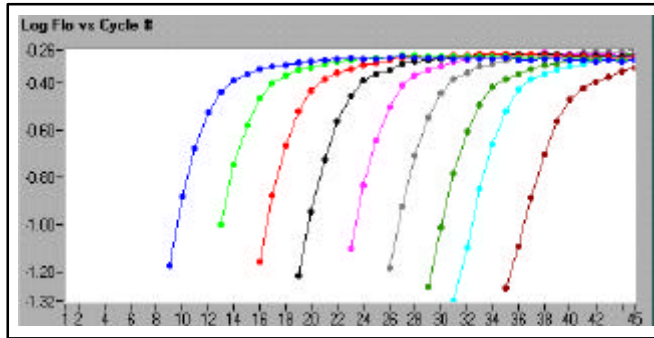
**Abb. 3-38: Analyse der Amplifikation des linearisierten Plasmides pBSBA7.**

**A:** Amplifikations- und Schmelzkurven-Analyse auf dem LightCycler, detektiert mittels SYBR Green I, bei Einsatz von  $1.2 \times 10^8$  (■) bis  $1.2 \times 10^0$  (■) Plasmid-Kopien.

**B:** Analyse der in A generierten PCR-Produkte auf einem 6%igen nativen TPE-Polyacrylamidgel.

Die farbige Beschriftung der Gelspuren entspricht den Farben der zugehörigen Amplifikationskurven. Neben dem spezifischen Produkt sind zudem Primerdimere (PD) zu erkennen.

Das Amplifikations-Ergebnis, das mit dem linearisierten Plasmid als *template* erlangt wurde, deckt sich mit dem in Abbildung 3-37 gezeigten Ergebnis, bei dem das PCR-Produkt als *template* in die PCR eingesetzt wurde. Die Analyse der PCR-Produkte macht deutlich, daß auch bei der größten Verdünnung des *templates* noch ein spezifisches Produkt amplifiziert wird. Vergleichbare Ergebnisse erlangt man also prinzipiell nur bei Verwendung von linearisiertem Plasmid und PCR-Produkt, aber nicht bei Einsatz von *supercoiled* Plasmid als *template* für die Amplifikation. Um Unterschiede im Detektionsformat für die Amplifikation des DNA-*templates* auszuschliessen, wurde die PCR mit *Taq* DNA-Polymerase zudem mit Fluorophor-markierten Sonden als Detektionsformat durchgeführt. In Abb.3-39 wird exemplarisch die Amplifikation des linearisierten Plasmides mit *Taq* DNA-Polymerase und Detektion mittels HybProbes auf dem LightCycler gezeigt

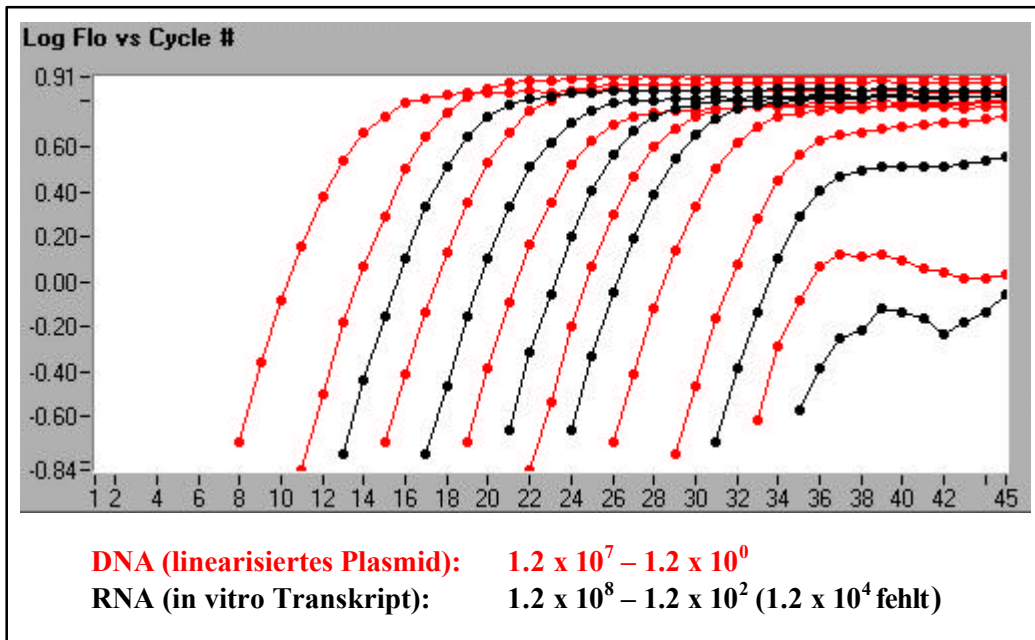


**Abb. 3-39: Amplifikation der *BCR/ABL*-Sequenz mit linearisiertem pBSBA7 Plasmid-*template*.** Die Detektion der Amplifikate auf dem LightCycler erfolgte mittels HybProbes. Als *template* wurden  $1.2 \times 10^8$  (■) bis  $1.2 \times 10^0$  (■) Plasmid-Kopien in die PCR eingesetzt.

Hinsichtlich der Sensitivität ergaben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Detektionsformaten SYBR Green I und HybProbes. Betrachtet man aber die Abstände zwischen den Amplifikationskurven, die bei einer 10-fach Verdünnungsreihe im optimalen Fall 3.3 Zyklen betragen sollten (s. 3.2.2.3), so erkennt man, daß dieser theoretische Abstand bei Detektion mit Hybridisierungs sonden mit durchschnittlich 3.34 Zyklen sehr gut erreicht wird, wohingegen er bei Detektion mit SYBR Green I mit durchschnittlich 3.52 Zyklen von diesem idealen Wert abweicht. Diese Unterschiede zwischen den Detektionsformaten konnten ebenfalls bei der Amplifikation von RNA mittels RT-PCR beobachtet werden (s. 3.2.4).

Anschließend wurde untersucht, ob die Amplifikation von RNA vergleichbar der Amplifikation von DNA ist. Für diesen Vergleich wurde als DNA-*template* das mit *SalI* gespaltene Plasmid pBSBA7 verwendet, als RNA-*template* das *in vitro* generierte *BCR/ABL*-Transkript. Um gleiche PCR- und Amplifikations-Bedingungen für beide *templates* zu schaffen, wurde auch für die Amplifikation des DNA-*templates* das SuperScript One Step RT-PCR System verwendet. Die eingesetzten Kopienzahlen sowie das Ergebnis dieser Amplifikation bei Detektion mittels SYBR Green I ist in Abbildung 3-40 dargestellt.





**Abb. 3-40: Vergleich des Amplifikationsverhaltens von DNA- und RNA-*template* mit den angegebenen Ausgangskopienzahlen.** Die Amplifikation wurde mit dem SuperScript One Step RT-PCR System für beide *templates* auf dem LightCycler durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit SYBR Green I.

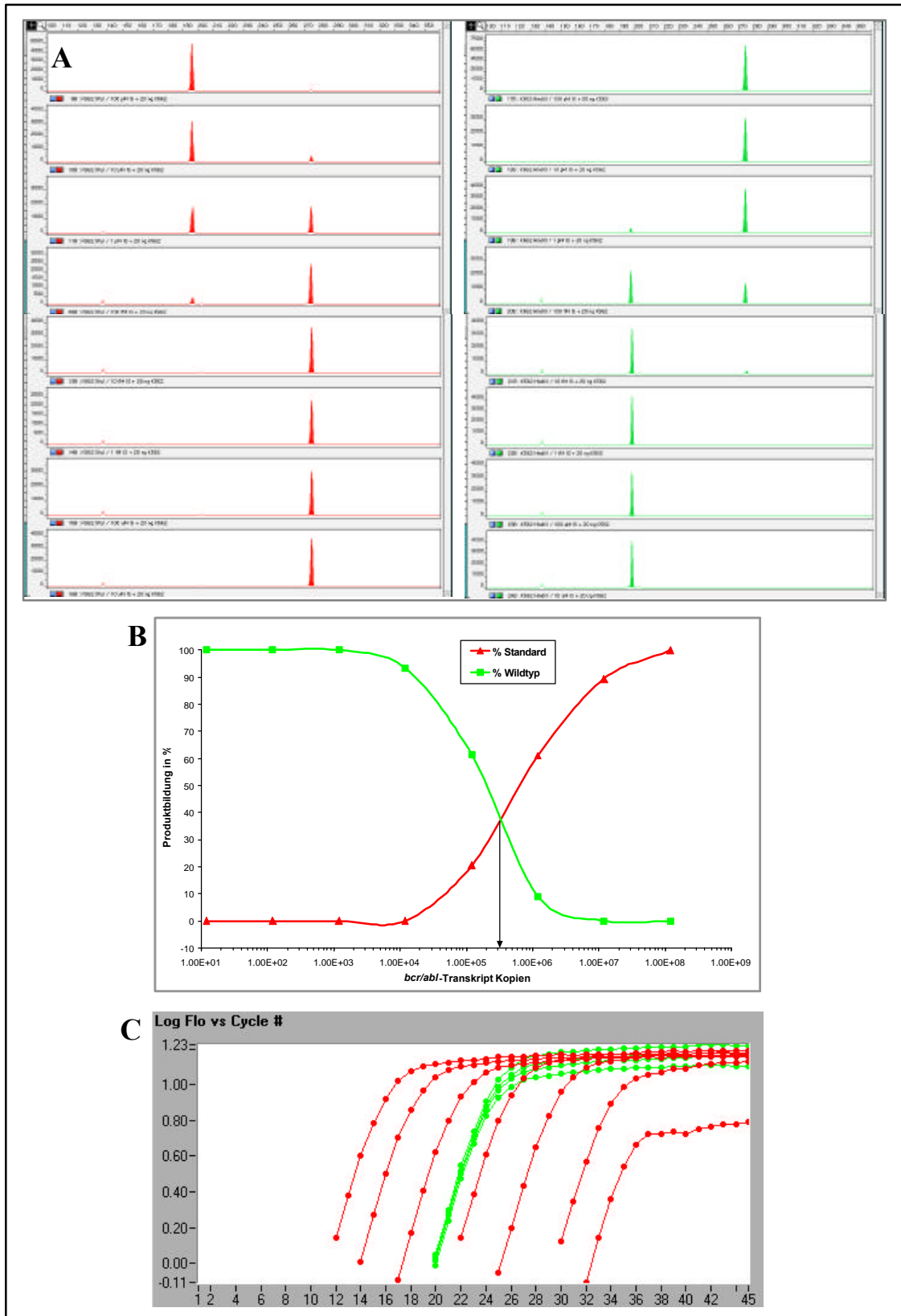
Deutlich zu erkennen ist, daß die Quantifizierung des DNA-*templates* auch bei Amplifikation mit dem SuperScript-System eine Nachweisgrenze von  $1.2 \times 10^1$  Kopien bzw. im dargestellten Fall sogar  $1.2 \times 10^0$  Kopien aufweist. Zudem wird klar, daß sich die Amplifikation von RNA bezüglich der Quantifizierung und der Nachweisgrenze deutlich von dem Amplifikationsergebnis des DNA-*templates* unterscheidet. Dies ist nur durch die vergleichsweise schlechte Effizienz der Reversen Transkription zu erklären. Dies macht es zwingend notwendig bei der präzisen, sensitiven Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes bereits den RT-Schritt durch Verwendung eines RNA-Standards zu berücksichtigen und konsequenterweise als Standard eine RNA bzw. ein entsprechendes *in-vitro*-Transkript zu verwenden.

### 3.2.6. Quantifizierungsvergleich zwischen QC-RT-PCR und LightCycler-RT-PCR

Eine sehr wichtige Frage hinsichtlich der Quantifizierung mittels des LightCyclers war, ob die externe Standardisierung vergleichbare Ergebnisse wie die Quantifizierung mittels interner Standardisierung bei einer quantitativen, kompetitiven RT-PCR (QC-RT-PCR) liefert. Um diese Frage zu beantworten, wurde das *BCR/ABL*-Fusionsgen in verschiedenen Leukämie-spezifischen Zelllinien (K562, BV173, CML-T1) mit beiden Methoden quantifiziert. Zu diesem Zweck wurde aus den Zelllinien die Gesamt-RNA isoliert und auf eine Ausgangskonzentration von 10 ng/μl eingestellt. Für die Quantifizierung auf dem LightCycler mit SYBR Green I wurden jeweils 2 μl dieser RNA-Lösung in die RT-PCR mit dem SuperScript One Step RT-PCR System eingesetzt. Für die Durchführung der QC-RT-PCR wurde der *in vitro* generierte *BCR/ABL*-Standard in entsprechenden Konzentrationen mit den Zelllinien-RNAs gemischt. Die Amplifikation der QC-RT-PCR wurde zur besseren Vergleichbarkeit ebenfalls auf dem LightCycler mit dem SuperScript One Step RT-PCR System durchgeführt, da dieses RT-PCR System für die Amplifikation auf dem LightCycler optimiert wurde. Dieser Versuch wurde zunächst für die Zelllinie K562 durchgeführt.

Zur Quantifizierung wurden die generierten QC-RT-PCR-Produkte zur Unterscheidung zwischen Standard- und Wildtyp-Sequenz einer spezifischen Restriktionsspaltung mit den Enzymen *StuI* (Internen Standard) und *HindIII* (Wildtyp) unterzogen. Anschließend wurden die Spaltprodukte auf einer ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* Kapillarelektrophorese aufgetrennt (s. Kapitel 3.1.4.2.2). Die Analyse der so gewonnenen Rohdaten erfolgte mit Hilfe der GeneScan-Software, welche die Daten in Form von Elektropherogrammen darstellt (s. Abb. 3-41-A). Die Auswertung dieser Daten erfolgte anschließend unter Verwendung des Programmes Microsoft *Excel* und Darstellung der ausgewerteten Peakflächenverhältnisse in Diagrammform. Das Quantifizierungsergebnis läßt sich abschliessend anhand des Schnittpunktes der beiden Standard- und Wildtyp-Kurven im Diagramm ablesen (Abb. 3-41-B). Parallel zum QC-RT-PCR wurde eine Quantifizierung der aus den K562-Zellen isolierten Gesamt-RNA auf dem LightCycler durchgeführt. Als *template* wurden in einem 4-fach Ansatz jeweils 20 ng K562-RNA eingesetzt sowie als Standard eine 10-fach Verdünnungsreihe im Bereich von  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^2$  Kopien des *in vitro* generierten *BCR/ABL*-Transkriptes in die RT-PCR eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit dem SuperScript One-Step RT-PCR System, die Detektion der entstandenen PCR-Produkt mit SYBR Green I, dargestellt in Abb. 3-41-C.



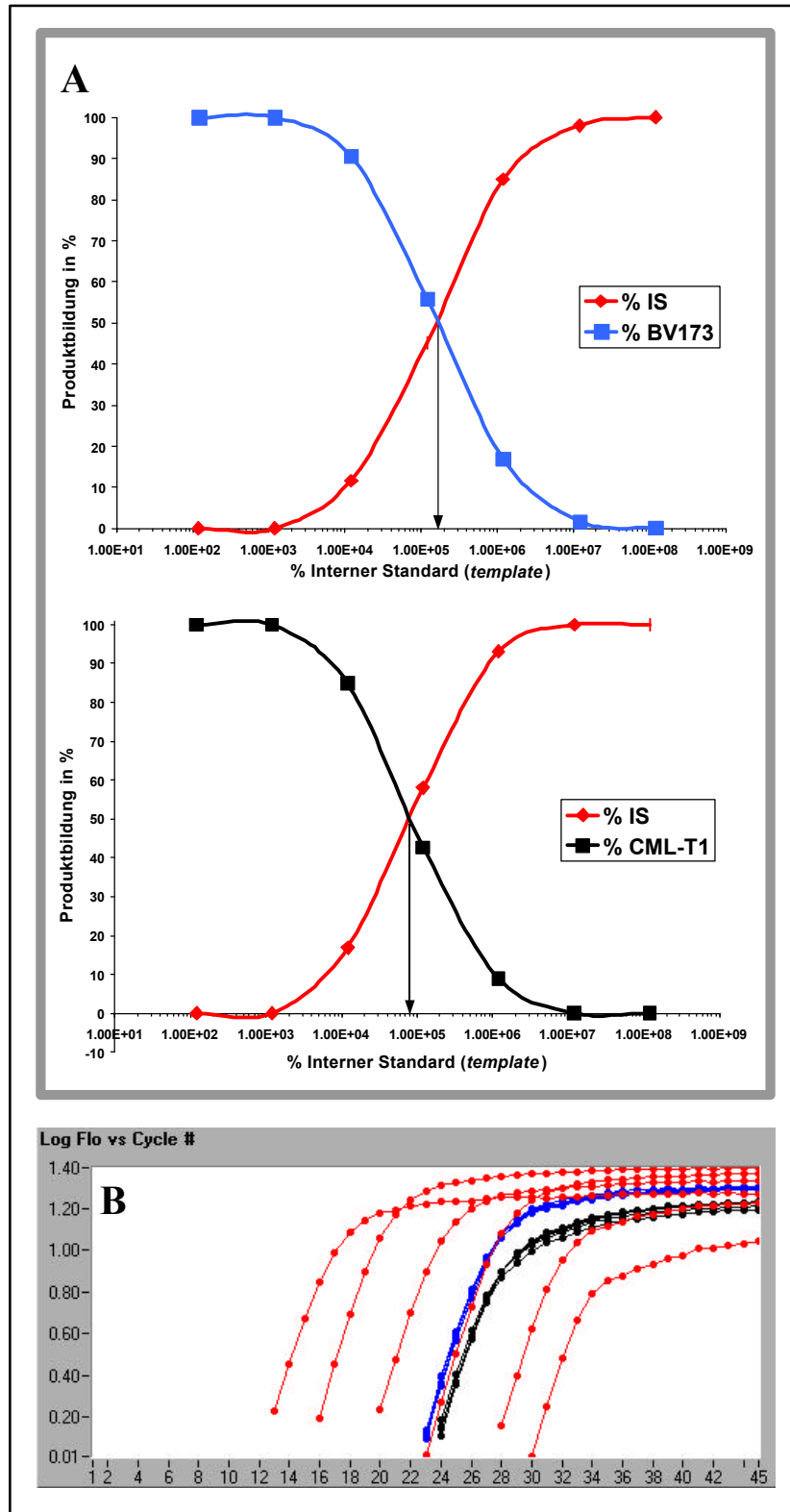


**Abb.3-41: Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes in Gesamt-RNA aus K562-Zellen:**

- mittels QC-RT-PCR und Analyse der Amplifikate durch kapillarelektrophoretische Auftrennung der Standard- (■) und Wildtyp- (■) spezifischen Restriktionsfragmente (A) sowie anschließende Auswertung und Darstellung der erhaltenen Peakflächen in Diagrammform (B);
- mittels externer Standardisierung und Detektion auf dem LightCycler (C).

---

Die Quantifizierung ergab für die QC-RT-PCR eine Kopienzahl von  $3.3 \times 10^5$  Kopien *BCR/ABL*-Transkript für 20 ng Gesamt-RNA isoliert aus K562-Zellen, die Quantifizierung mittels des LightCyclers ergab eine über den 4-fach-Ansatz gemittelte Kopienzahl (CV 6.63 %) von  $3.4 \times 10^5$  Kopien des Fusions-Transkriptes für die gleiche Menge an eingesetzter Gesamt-RNA aus K562-Zellen. Entsprechende Versuche bezüglich der Übereinstimmung der Quantifizierungsergebnisse wurden anschließend an anderen Leukämie-Zelllinien durchgeführt. Da es sich bei dem von den K562-Zellen exprimierten *BCR/ABL*-Transkript ebenfalls, wie auch bei dem als Standard verwendeten *in-vitro*-Transkript, um die b3a2-Variante des Fusionsgens handelt, wurden anschließend die Zelllinien BV173 und CML-T1 verwendet, welche die b2a2-Transkriptvariante exprimieren. Auch von diesen Zelllinien wurden jeweils 20 ng Gesamt-RNA parallel mit beiden Assays quantifiziert, einerseits durch Quantifizierung mittels quantitativer kompetitiver RT-PCR und Analyse der spezifischen Restriktionsfragmente mittels kapillarelektrophoretischer Techniken, andererseits durch RT-PCR mit externer Standardisierung und Detektion mittels SYBR-Green auf dem LightCycler. Die Ergebnisse dieser Quantifizierungen sind in Abbildung 3-42 dargestellt. Die Versuchsanordnung entsprach dem zuvor beschriebenen Experiment zur Quantifizierung von Gesamt-RNA aus K562-Zellen.



**Abb. 3-42:** Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionsgens in 20 ng Gesamt-RNA der Zelllinien BV173 (■) und CML-T1(■). Einerseits erfolgte die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes mittels interner Standardisierung und Quantifizierung der Spaltprodukte durch Auftrennung auf einer Kapillarelektrophorese (A), andererseits mittels externer Standardisierung und Detektion mittels SYBR Green I auf dem LightCycler (B). Die jeweiligen Quantifizierungsergebnisse werden in Tab. 3-3 gezeigt.

Die jeweiligen Quantifizierungsergebnisse sind für alle drei analysierten Zelllinien in Tabelle 3-3 zusammengefaßt.

Zelllinie	QC-RT-PCR [Kopien <i>BCR/ABL</i> -Transkript]	LightCycler RT-PCR [Kopien <i>BCR/ABL</i> -Transkript]
K562	ca. $3.3 \times 10^5$	$3.4 \times 10^5$
BV173	ca. $1.7 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$
CML-T1	ca. $7.9 \times 10^4$	$8.3 \times 10^4$

**Tab. 3-3:** Ergebnisse der in den Abbildungen 3-41 und 3-42 dargestellten Experimente zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionsgens in 20 ng aus den verschiedenen Leukämie-Zelllinien isolierter Gesamt-RNA mittel quantitativer kompetitiver RT-PCR (QC-RT-PCR) sowie Quantifizierung auf dem LightCycler mit SYBR Green I.

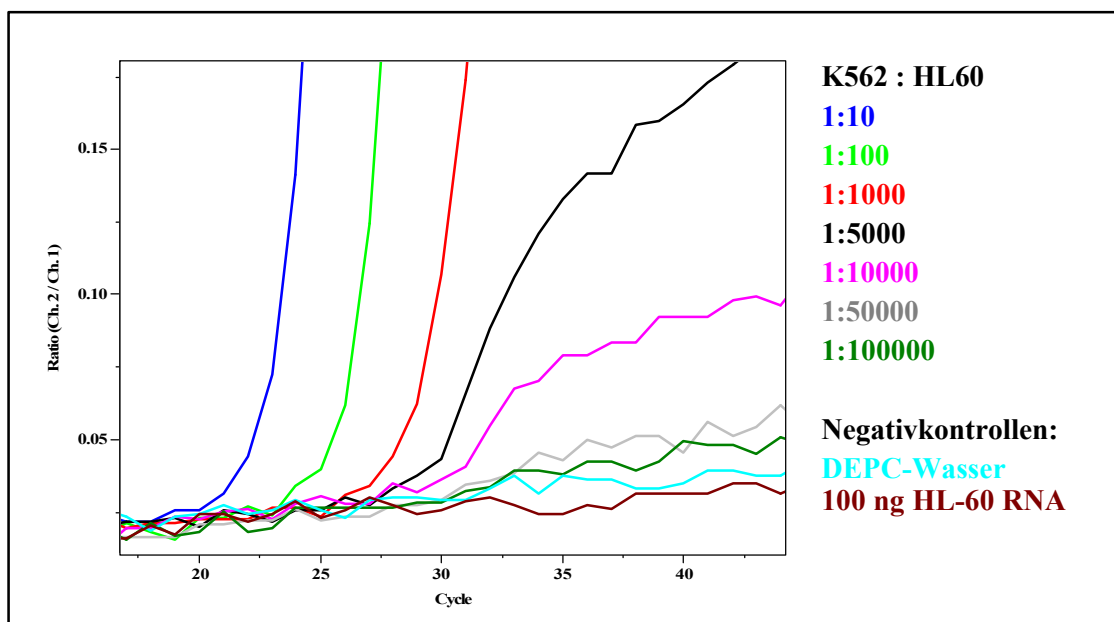
Es zeigt sich, daß auch bei der Quantifizierung der anderen *BCR/ABL*-Transkript-Variante (b2a2) die Ergebnisse der beiden Methoden sehr gut übereinstimmen. Dies bedeutet, daß eine externe Standardisierung genauso zur exakten Bestimmung der jeweiligen Kopienzahlen des Fusionstranskriptes geeignet ist, wie eine interne Standardisierung. Zudem zeigen die Ergebnisse, daß unter bestimmten Umständen auch ein mit der Wildtyp-Sequenz nur entfernt übereinstimmender Kompetitor verwendet werden darf, denn immerhin unterscheiden sich die beiden Varianten des *BCR/ABL*-Fusionsgens in 75 Bp voneinander. Allerdings ist die Basenzusammensetzung für beide Transkripte so ähnlich, so daß sie in einer durchgeführten Schmelzkurvenanalyse nicht voneinander unterscheidbar waren.

### 3.2.7. Routinefähigkeit der Methode

Die entwickelte Methode zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes mittels des LightCyclers sollte nun auf ihre Eignung zur routinemäßigen Analyse von klinischen Proben untersucht werden. Einer der wichtigsten Faktoren für den Einsatz einer Methode zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes ist die Frage, vor einem Hintergrund von wievielen gesunden Zellen, die kein Philadelphia-Chromosom besitzen, eine einzelne Krebszelle, welche das *BCR/ABL*-Gen exprimiert, nachgewiesen werden kann. Dieser Nachweis wird durch sogenannte Spiking-Experimente erbracht (3.2.7.1). Um diese Methode dann aber letztendlich in der Routine-Diagnostik einzusetzen, ist natürlich eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erforderlich (3.2.7.2). Die zur Beantwortung dieser Fragen durchgeführten Experimente werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert. Die Quantifizierung erfolgte hierbei mittels Fluorophor-markierter Sonden.

### 3.2.7.1. Spiking-Experimente

Zur Durchführung von Spiking-Experimenten, die dem Nachweis des *BCR/ABL*-Transkriptes vor einem Hintergrund von gesunden Zellen dienen wurde die Gesamt-RNA von Zelllinien, die kein Philadelphia-Chromosom besitzen (HL-60 bzw. Hela, s. 2.2.3), mit der Gesamt-RNA einer Leukämie-Zelllinie (K562, s. 2.2.3) gemischt, welche das *BCR/ABL*-Gen exprimiert. In einer ersten Versuchsreihe wurden jeweils 100 ng aus HL60-Zellen isolierter Gesamt-RNA mit K562-RNA im Bereich von 10 ng bis 1 pg vermischt (s. Tab. 3-4). Bezieht man diese eingesetzten RNA-Mengen auf die verwendete Zellzahl, indem man für eine Zelle einen Gesamt-RNA-Gehalt von 10 pg (10 - 30 pg/Zelle) annimmt, so variiert das Verhältnis von "gesunden" (HL60) zu "kranken" Zellen (K562) im Bereich von 1:10 bis 1:100 000 Zellen. Exemplarisch ist in Abbildung 3-43 ein solches Spiking-Experiment von amplifizierbarer K562-RNA in einem Hintergrund von nicht-amplifizierbarer HL60-RNA dargestellt.



**Abb. 3-43:** Amplifikation von K562-RNA in einem Hintergrund von nicht-amplifizierbarer HL60-RNA. Das jeweilige Zellzahl-Verhältnis ist in zu den Amplifikationskurven analogen Farben angegeben. Als Negativkontrollen dienen DEPC-Wasser und HL60-RNA. Die Detektion erfolgte mittels *BCR/ABL*-spezifischer Hybridisierungs sonden auf dem LigthCycler. Aufgetragen ist die Fluoreszenz des Kanalverhältnisses gegen die Zyklenzahl.

Anhand dieser Abbildung wird deutlich, daß ein gesicherter Nachweis von einer K562-Zelle vor einem Hintergrund von maximal  $10^4$  HL60-Zellen möglich ist. Zwar zeigen die nachfolgenden Verdünnungen eine geringfügig höhere Fluoreszenz als die beiden Negativkontrollen, es handelt sich dabei jedoch nicht um einen signifikanten

Fluoreszenzanstieg gegenüber dem Hintergrund-Signal und kann daher nicht als Nachweis gelten. Betrachtet man jedoch die Mengen an eingesetzter Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinie (Tabelle 3-4), so wird deutlich, warum vermutlich keine größere Sensitivität erreicht werden konnte.

Zellzahl-Verhältnis K562 : HL60	<i>template</i> -Menge HL60-RNA	<i>template</i> -Menge K562-RNA
1:10	100 ng	10 ng
1:100	100 ng	1 ng
1:1000	100 ng	100 pg
1:5000	100 ng	20 pg
1:10 000	100 ng	10 pg
1:50 000	100 ng	2 pg
1:100 000	100 ng	1 pg

**Tab. 3-4:** Eingesetzte *template*-Mengen an Gesamt-RNA der Zelllinien K562 und HL60 für das in Abb. 3-43 dargestellte Spiking-Experiment.

Bei einer angenommenen Gesamt-RNA-Menge von 10 pg/Zelle (10 - 30 pg/Zelle) bedeutet dies, daß in dem RT-PCR-Ansatz, in welchem eine K562-Zelle in einem Hintergrund von  $10^4$  HL60-Zellen nachgewiesen werden sollte, nur die Gesamt-RNA-Menge einer einzigen K562-Zelle für die Amplifikation eingesetzt wurde. Dies entspricht nach den vorliegenden Daten (s. Tab. 3-1) bei Detektion mit HybProbes 100 Kopien. Die Nachweisempfindlichkeit ist vergleichbar, so daß also am zuvor bestimmten Detektionslimit (120 Kopien) gearbeitet und erfolgreich detektiert wurde. Dadurch ist der Nachweis einer geringeren Menge Gesamt-RNA und somit von einer K562-Zelle in einem größeren Hintergrund an HL60-Zellen im vorliegenden experimentellen Ansatz nicht möglich.

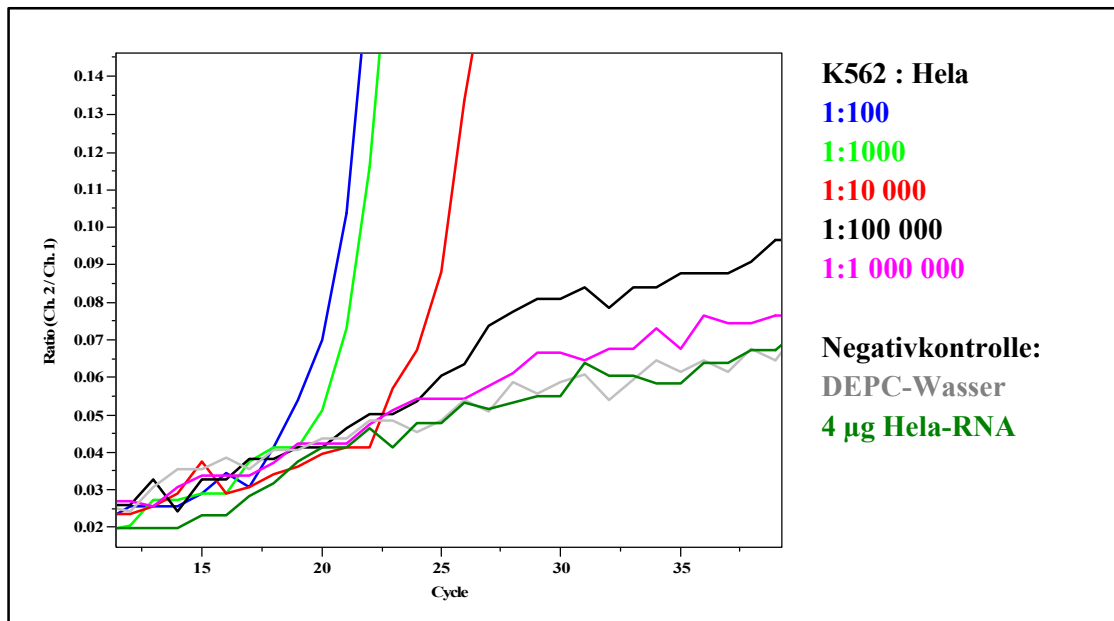
Da HL60-Zellen nicht in größeren Mengen zur Verfügung standen, wurden aus praktischen Erwägungen HeLa-Zellen verwendet. Es wurde zunächst an einer kleinen Menge isolierter Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen sichergestellt, daß mit dem *BCR/ABL*-Primer-System und den entsprechenden Hybridisierungssonden mittels RT-PCR auf dem LightCycler kein spezifisches Produkt zu detektieren war. Anschließend wurde, um eine höhere Ausbeute an Gesamt-RNA aus den HeLa-Zellen zu isolieren, eine RNA-Midi-Präparation durchgeführt (s. Kapitel 2.3.5.3). Um die Konzentration an HeLa-RNA zu erhöhen, wurde die so gewonnene RNA durch Fällung mit Ethanol in Gegenwart von Ammoniumacetat sowie anschließendes Lösen der RNA in einem kleinen Volumen DEPC-Wasser konzentriert. Gleichzeitig wurde

eine RNA-Mini-Präparation aus K562-Zellen durchgeführt, um beide RNA-Präparationen frisch vorliegen zu haben. Die Mischungs-Verhältnisse zwischen K562-RNA und Hela-RNA sowie die in die RT-PCR auf dem LightCycler eingesetzten *template*-Mengen der jeweiligen RNAs sind in der nachfolgenden Tabelle (3-5) aufgeführt:

<b>Zellzahl-Verhältnis K562 : HL60</b>	<b><i>template</i>-Menge Hela-RNA</b>	<b><i>template</i>-Menge K562-RNA</b>
1:100	4 µg	40 ng
1:1000	4 µg	4 ng
1:10 000	4 µg	400 pg
1:100 000	4 µg	40 pg
1:1 000 000	4 µg	4 pg

**Tab. 3-5: Mischungsverhältnisse von isolierter Gesamt-RNA aus K562- und Hela-Zellen bzw. Darstellung der in die RT-PCR auf dem LightCycler eingesetzten *template*-Mengen zur Durchführung eines Spiking-Experimentes.**

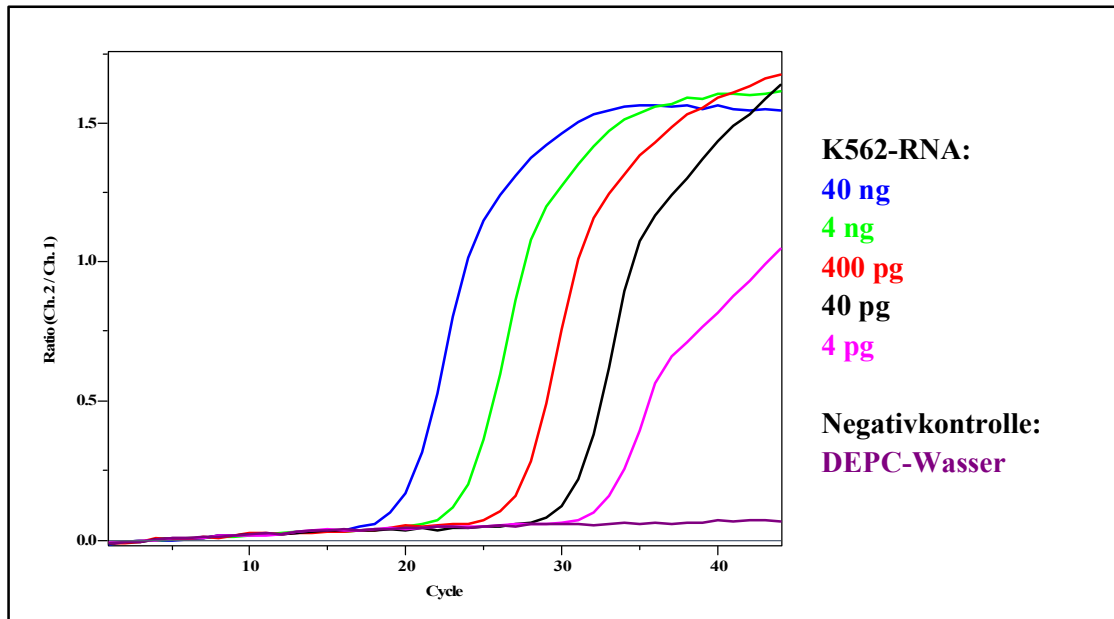
Die Detektion des *BCR/ABL*-spezifischen Fusionstranskriptes der K562-Zellen erfolgte mit Fluorophor-markierten Hybridisierungssonden. Das Ergebnis dieses Spiking-Experimentes ist in Abbildung 3-44 dargestellt.



**Abb. 3-44:** Nachweis des spezifischen *BCR/ABL*-Transkriptes aus K562-Zellen in einem Hintergrund von RNA aus Philadelphia-Chromosom-negativen HeLa-Zellen. Die Amplifikation erfolgte mittels RT-PCR auf dem LightCycler bei Detektion mit Fluorophor-markierten HybProbes. Die jeweiligen Mischungsverhältnisse der beiden Zelllinien sind in den zu den Amplifikationskurven analogen Farben angegeben.

Anhand der in Abb.3-44 dargestellten Amplifikationskurven erkennt man einen deutlichen Anstieg der Kurven bis zu einem Mischungsverhältnis von einer K562-Zelle in  $10^5$  HeLa-Zellen. Auch ist bei einem noch höheren Mischungsverhältnis von einer K562-Zelle in  $10^6$  HeLa-Zellen eine höhere Fluoreszenz gegenüber den beiden Negativkontrollen ersichtlich. Jedoch ist ein signifikanter Fluoreszenz-Anstieg nicht erkennbar. Allerdings handelt es sich auch hier, wie bereits im zuvor durchgeführten Spiking-Experiment von K562- in HL60-Zellen (Abb.3-43), wieder um eine in die RT-PCR eingesetzte *template*-Menge an K562-RNA, die mit 4 pg Gesamt-RNA geringer als die RNA-Menge einer einzelnen Zelle bzw. die Nachweisgrenze war. Zur Kontrolle, ob diese Menge an RNA ohne einen entsprechenden Hintergrund an unspezifischer RNA nachgewiesen werden kann, wurden entsprechende Mengen an K562-RNA unter den gleichen Bedingungen amplifiziert. Das Ergebnis dieser Amplifikation ist in Abbildung 3-45 dargestellt.





**Abb. 3-45: Amplifikation von K562-RNA mittels RT-PCR auf dem LightCycler und Detektion mittels Fluorophor-markierter Sonden.** Die angegebenen RNA-*template*-Mengen entsprechen farblich den Amplifikationskurven.

Klar zu erkennen ist anhand der dargestellten Amplifikationskurven, daß der Nachweis von 4 pg isolierter Gesamt-RNA aus K562-Zellen ohne einen Hintergrund an unspezifischer RNA möglich ist. Allerdings ist auch erkennbar, daß der Fluoreszenzanstieg bei 4 pg eingesetzter Gesamt-RNA bereits deutlich geringer ausfällt, als bei der Amplifikation von größeren Mengen eingesetzten *templates*. Im Vergleich zum vorherigen Versuch (s. Abb. 3-44) kann man feststellen, daß im Bereich der Nachweisgrenze, im vorliegenden Fall also bei 4 pg Gesamt-RNA, ein Hintergrund an unspezifischer RNA einen deutlichen Einfluß auf das Quantifizierungsergebnis hat.

### 3.2.7.2. Reproduzierbarkeit

Damit eine neu entwickelte Methode, wie die in dieser Arbeit entwickelte Detektion des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes mit Fluorophor-markierten Sonden auf dem LightCycler, in der Routineanalytik verwendet werden kann, muß zuvor nachgewiesen werden, daß mit ihr reproduzierbare Ergebnisse gewonnen werden können. Um diesen Nachweis erbringen zu können, wurde zunächst die Reproduzierbarkeit durch Untersuchung von Mehrfachansätzen der gleichen Standards getestet. Dazu wurde eine übliche Standardreihe im Bereich von  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^2$  Kopien *in vitro* generierter RNA verwendet. Zusätzlich wurden in einer ersten Versuchsreihe jeweils 5-fach Ansätze des RNA-Transkriptes mit Ausgangskopienzahlen von  $1.2 \times 10^5$  und  $1.2 \times 10^3$  Kopien *in-vitro*-Transkript pipettiert. Der

Variationskoeffizient (CV), d.h. die jeweilige prozentuale Standardabweichung vom Mittelwert, betrug für den 5-fach-Ansatz mit  $1.2 \times 10^5$  Kopien *in-vitro*-Transkript und Auswertung mit allen 7 Standards 5.6 %, für den 5-fach-Ansatz mit  $1.2 \times 10^3$  eingesetzten Kopien ergab sich ein erwartungsgemäß etwas größerer CV von 14.4 %. Zudem konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, daß es möglich ist, eine geringere Anzahl an Standards zu verwenden, ohne einen Einfluß auf die ermittelten Kopienzahlen der "unbekannten" Proben zu erhalten. Die Proben, 5-fach Ansätze der oben genannten Kopienzahlen, wurden zu diesem Zweck mit nur 5 Standards ( $1.2 \times 10^7$ ,  $1.2 \times 10^5$ - $1.2 \times 10^2$ ) ausgewertet. Bei Quantifizierung mit 5 Standards ergaben sich CVs von 5.6 % ( $1.2 \times 10^5$  Kopien) und 14.6 % ( $1.2 \times 10^3$  Kopien). Um zu belegen, daß die ermittelten Quantifizierungsergebnisse der jeweiligen 5-fach-Ansätze nicht signifikant voneinander abweichen, wurde ein t-Test durchgeführt. Mit Hilfe dieses t-Tests wird ein Paarvergleichstest durchgeführt, um festzustellen, ob sich die Mittelwerte der Proben unterscheiden. Die Auswertung dieses t-Testes ergab, daß die Mittelwerte der durchgeführten Experimente nicht signifikant voneinander abweichen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die nachfolgenden Experimente zur Reproduzierbarkeit jeweils mit nur 5 Standards durchgeführt. Ein weiterer Faktor, der einen Einfluß auf die Quantifizierungsergebnisse und somit auch auf die Reproduzierbarkeit der Methode haben kann, ist die gewählte Methode zur Auswertung der Amplifikationskurven. Die LightCycler Software (Version 3, Roche Diagnostics) bietet hierfür zwei verschiedene Methoden an:

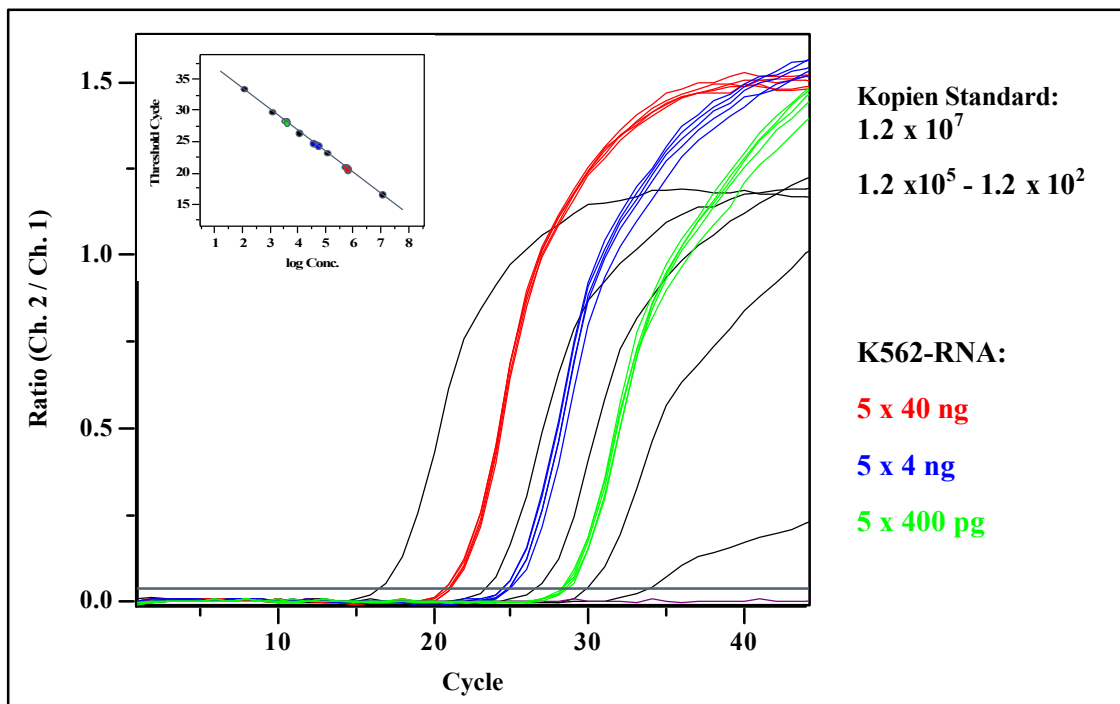
- *Fit-Points*-Methode: die in der bisher verwendeten Software einzige Quantifizierungsmethode, bei der die Auswertung weitgehend manuell (z.B. durch das Festlegen der *threshold*-Linie, etc.) erfolgt.
- *Second-Derivative-Maximum*-Methode: Bei dieser Methode erfolgt eine automatische Quantifizierung der unbekannt Proben ebenfalls unter Bezug auf die mitamplifizierten Standards. Zur automatischen Quantifizierung der Daten wird der Punkt der stärksten Änderung des Fluoreszenzanstieges jeder Amplifikationskurve verwendet. Zur Berechnung dieses Punktes wird das Maximum der 2. Ableitung der Kurven verwendet (*Second Derivative Maximum*). Es ist somit nicht erforderlich die log-lineare Phase des Kurvenverlaufes zu detektieren oder eine *threshold*-Linie zu setzen.

Prinzipiell ist laut Herstellerangaben die *Fit-Points*-Methode auch für die Quantifizierung geringer Kopienzahlen geeignet, während die *Second-Derivative-Maximum*-Methode besonders bei Proben mit höheren Kopienzahlen (z. B. über 1000 Kopien pro Ansatz) eingesetzt werden sollte.

Eine weitere Methode zur Quantifizierung der mittels des LightCyclers gewonnenen Daten stellt die in unserem Labor von Dipl.-Biol. J. Wilhelm entwickelte Software LC-32 dar. Wie bei der *Second-Derivative-Maximum*-Methode handelt es sich hier um eine automatische Quantifizierung, allerdings liegt ihr ein anderer mathematischer Algorithmus zur Beschreibung der Amplifikationskurven zugrunde. Zunächst werden von den mittels des LightCycler gewonnenen Rohdaten die Amplifikations-unabhängigen Signalanteile subtrahiert (*Background Correction*). Die so abgeleiteten Amplifikations-Signale werden durch eine nicht-symmetrische sigmoidale Funktion beschrieben, welche durch Multiplikation zweier logistischer Funktionen gewonnen wurde. Die Parameter dieser Funktion werden durch die Minimierung der Fehlerquadratsumme über 12 Punkte in der exponentiellen Phase bestimmt. Durch diese Minimierung der Fehlerfunktion der Standardkurve wird der optimale Wert der *threshhold*-Linie automatisch berechnet, anhand dessen anschließend die  $C_T$ -Werte der Proben bestimmt werden.

Aus Leukämie-spezifischen K562-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und an 4 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 40 ng, 4 ng und 400 pg als 5-fach-Ansatz in eine RT-PCR mit dem SuperScript One Step RT-PCR System eingesetzt und quantifiziert.

Beispielhaft ist eine solche Quantifizierung in Abbildung 3-46 dargestellt.



**Abb. 3-46: Amplifikation von K562-RNA zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Quantifizierungsergebnisse bei Detektion mit HybProbes.** Es wurden jeweils Mehrfachansätze mit den farblich zu den Amplifikationskurven angegebenen *template*-Mengen in die RT-PCR auf dem LightCycler eingesetzt. Die Auswertung erfolgt hier mit dem "LC-32"-Programm (s. Text).

Die am LightCycler gewonnenen Daten dieser Versuchsreihe wurden mit den zuvor beschriebenen Auswertungsmethoden analysiert. Betrachtet man für die in Abbildung 3-46 dargestellte Quantifizierung jeweils die prozentuale Standardabweichung vom Mittelwert der 5-fach-Ansätze der verschiedenen Ausgangsmengen an K562-RNA, so ergeben sich die in Tabelle 3-6 dargestellten Variationskoeffizienten für die gewählten Auswertungsmethoden.

<b>K562-RNA</b>	<b>CV Fit Points</b>	<b>CV SDM</b>	<b>CV LC-32 BC</b>
<b>40 ng</b>	8.73 %	8.11 %	9.96 %
<b>4 ng</b>	10.21 %	8.99 %	9.37 %
<b>400 pg</b>	12.13 %	14.52 %	12.56 %
<b>Gesamt CV</b>	<b>10.36 %</b>	<b>10.54 %</b>	<b>10.63 %</b>

**Tab. 3-6:** Berechnete Variationskoeffizienten (CV) der 5-fach-Ansätze des in Abb. 3-46 dargestellten Experimentes für die verschiedenen Ausgangskonzentrationen an Gesamt-K562-RNA, gegliedert nach den verschiedenen Quantifizierungsmethoden für den LightCycler: *Fit Points*, *Second Derivative Maximum* (SDM) und LC-32 mit *Background Correction* (BC), die im Text näher erläutert sind.

An den in Tabelle 3-6 aufgeführten Variationskoeffizienten erkennt man deutlich, daß die Abweichungen zwischen den 5 einzeln pipettierten Ansätzen nur relativ gering sind, jedoch mit abnehmender *template*-Menge zunehmen. Dies spiegelt sich auch in der folgenden Tabelle (Tab.3-7) wider, in der die Ergebnisse dieser mehrfach durchgeführten Quantifizierungen im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der ermittelten Daten ausgewertet wurden.

	<b>40 ng Kopien</b>	<b>Fit Points</b>	<b>40 ng Kopien</b>	<b>SDM</b>	<b>40 ng Kopien</b>	<b>LC32-BC</b>
<b>Experiment 1</b>	545660	2.85 %	467580	6.53 %	659665	0.70 %
<b>Experiment 2</b>	547940	2.45 %	556260	11.20 %	650156	2.13 %
<b>Experiment 3</b>	554340	1.31 %	477820	4.48 %	626628	5.68 %
<b>Experiment 4</b>	598800	6.61 %	499300	0.19 %	720909	8.52 %
	<b>561685</b>	<b>3.30 %</b>	<b>500240</b>	<b>5.60 %</b>	<b>664340</b>	<b>4.26 %</b>
	<b>4 ng Kopien</b>	<b>Fit Points</b>	<b>4 ng Kopien</b>	<b>SDM</b>	<b>4 ng Kopien</b>	<b>LC32-BC</b>
<b>Experiment 1</b>	30900	34.85 %	26336	26.78 %	38792	32.56 %
<b>Experiment 2</b>	19228	16.09 %	21926	5.55 %	28914	1.19 %
<b>Experiment 3</b>	19430	15.21 %	16640	19.89 %	21790	25.54 %
<b>Experiment 4</b>	22102	3.55 %	18188	12.44 %	27557	5.83 %
	<b>22915</b>	<b>17.42 %</b>	<b>20772.5</b>	<b>16.17 %</b>	<b>29263</b>	<b>16.28 %</b>
	<b>400 pg Kopien</b>	<b>Fit Points</b>	<b>400 pg Kopien</b>	<b>SDM</b>	<b>400 pg Kopien</b>	<b>LC32-BC</b>
<b>Experiment 1</b>	2148	54.17 %	2069	52.54 %	2528	51.82 %
<b>Experiment 2</b>	1252	10.13 %	1467	8.10 %	1641	1.49 %
<b>Experiment 3</b>	1156	16.99 %	1004	25.98 %	1286	22.80 %
<b>Experiment 4</b>	1016	27.05 %	886	34.66 %	1207	27.52 %
	<b>1393</b>	<b>27.09 %</b>	<b>1357</b>	<b>30.32 %</b>	<b>1665</b>	<b>25.91 %</b>

**Tab. 3-7: Quantifizierungsergebnisse der Experimente zur Reproduzierbarkeit der Detektion des *BCR/ABL*-Transkriptes mit Fluorophor-markierten Sonden auf dem LightCycler.** Die Experimente 1 - 4 wurden an 4 aufeinanderfolgenden Tagen mit gleichen Versuchsanordnungen durchgeführt. Aufgeführt sind für jedes Experiment die aus einem 5-fach-Ansatz der jeweiligen Ausgangsmengen an K562-RNA gemittelten Daten sowie die über alle Experimente gemittelten Kopienzahlen. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf die Abweichungen der einzelnen Experimente von diesem Mittelwert. Die Auswertung erfolgte mit den drei Quantifizierungs-Methoden: *Fit Points*, *Second Derivative Maximum* (SDM) und LC-32 mit *Background Correction* (BC) (s. Text).

Die in der Tabelle 3-7 zusammengefaßten Daten belegen, daß sich auch im Vergleich der Experimente untereinander der Trend fortsetzt, wonach die Abweichungen größer werden, je geringer die eingesetzte *template*-Menge war. Insgesamt sind die Abweichungen jedoch kleiner als Faktor 2. Betrachtet man die Abweichungen jedes einzelnen Experimentes von der ermittelten durchschnittlichen Kopienzahl für alle vier ausgewerteten Experimente, so beträgt die größte Abweichung 54.17 % (400 pg ausgewertet mit der *Fit Points*-Methode). Betrachtet man die Quantifizierungsergebnisse der verschiedenen Auswertungsmethoden, so kann man feststellen, daß die Unterschiede im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Daten gering

sind, was so nicht unbedingt zu erwarten gewesen wäre. Unterschiede sind zwar in der berechneten Kopienzahl zu erkennen, wobei mit der LC32-Methode mit *Background Correction* prinzipiell die höchsten Kopienzahlen berechnet wurden, aber die nominellen Abweichungen zu den ermittelten Kopienzahlen der anderen Quantifizierungs-Methoden sind gering.

### 3.3. Quantitative Analyse klinischer Probenmaterialien

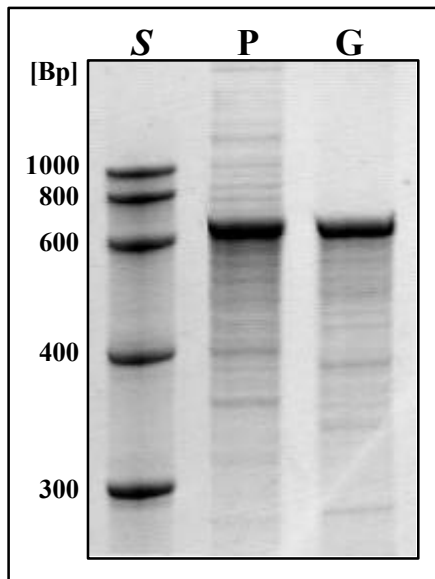
Um nachweisen zu können, daß die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes und somit zum Nachweis von *minimal residual disease* (s. Kapitel 1.3.4.1) geeignet ist, sind die bisher durchgeführten Untersuchungen an verschiedenen Leukämie-Zelllinien nicht ausreichend. Daher sollte der Einsatz dieser Methode abschliessend bei der Analyse unterschiedlicher Proben von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie demonstriert werden.

#### 3.3.1. Kontrollgene

Das bereits im Kapitel 1.3.4.1 vorgestellte Phänomen "*minimal residual disease*" bei Leukämie-Patienten bedingt, daß die Überprüfung der MRD-Rate nicht nur einmalig erfolgt, sondern in gewissen Zeitabständen wiederholt werden muss. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, ist eine einheitliche Güte der RNA-Präparationen Voraussetzung. Da diese jedoch nicht immer gewährleistet werden kann, müssen Unterschiede in den jeweils durchgeführten RNA-Präparationen ausgeglichen werden. Zudem benötigt man eine Positivkontrolle, um bei einem negativen Quantifizierungsergebnis des zu analysierenden Transkriptes ein falsch-negatives Ergebnis ausschliessen zu können. Zu diesem Zweck ist es erforderlich, das Transkript eines zweiten, sogenannten *housekeeping*-Gens mitzuamplifizieren und zu quantifizieren. Bei diesen *housekeeping*-Genen handelt es sich um Gene, die in allen Zellen und Geweben in gleichem Maße exprimiert werden. Abschliessend wird ein Quotient aus der Menge des zu analysierenden Transkriptes, im vorliegenden Fall *BCR/ABL*, und *housekeeping*-Transkript gebildet. Dieser Quotient, angegeben in Prozent, sollte sich auch bei verschiedenen RNA-Präparationen zu unterschiedlichen Zeiten nur dann ändern, wenn sich die Expressionsrate für das zu analysierende *BCR/ABL*-Fusionsgen ändert. In der Literatur werden zur *BCR/ABL*-Analytik verschiedene Kontrollgene wie *ABL* (Biernaux *et al.*, 1995; Chomel *et al.*, 2000; Corsetti *et al.*, 2000), *BCR* (Branford *et al.*, 1999; Delage *et al.*, 1991), *GAPDH* (Elmaagacli *et al.*, 1999),  $\beta$ -*Actin* (Bianchi *et al.*, 1995; Lion *et al.*, 1993) und *PBGD*

(Mensink *et al.*, 1998; Nagel *et al.*, 1996) verwendet. In dieser Arbeit wurde zunächst, auf Anraten unseres Kooperationspartners Dr. A. Elmaagacli, Universitätsklinik Essen, das Transkript des *GAPDH* (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-Gens, später jenes vom *PBGD* (Porphobilinogen-Deaminase)-Gen als Kontrolltranskript verwendet.

Zur Generierung von Standards für die jeweiligen Kontrolltranskripte wurden zunächst in der Datenbank [2] die entsprechenden Gensequenzen recherchiert (s. Kapitel 2.3.7.1) und Primer konstruiert, die es ermöglichen, die gesamte cDNA-Sequenz des jeweiligen Gens in einen Vektor zu klonieren (die entsprechenden Sequenzen sowie Lage der Primer und Sonden werden im Anhang gezeigt). Zu diesem Zweck wurden die kompletten cDNA-Sequenzen der Gene *GAPDH* und *PBGD* unter Verwendung der entsprechenden Primer (s. Kapitel 2.3.7.3), die Überhänge mit Restriktionsschnittstellen für die Klonierung enthalten, amplifiziert. Als *template* diente aus K562-Zellen isolierte Gesamt-RNA. Anschließend wurden die amplifizierten cDNAs in einen entsprechenden Vektor (pBlueScript SK(+)) kloniert, in *E.coli*-Bakterien des Stammes XLI-Blue (s. 2.2.2) transformiert und vervielfältigt. Nach Sequenzierung der in den Vektor integrierten Gene wurden Plasmidpräparationen im großen Maßstab (s. 2.3.4.2) durchgeführt. Die so erhaltenen Plasmid-Maxi-Präparationen wurden zur Generierung eines *in-vitro*-Transkriptes einheitlicher Länge mit den Restriktionsendonukleasen *Nsi*I, spezifisch für das *PBGD*-Gen, bzw. *Ksp*I, spezifisch für das *GAPDH*-Gen, gespalten und mit T7 RNA-Polymerase transkribiert. Anschließend wurden mittels DNaseI die Plasmid-DNA abgebaut, so daß mit den jeweiligen Primern und *Taq* DNA-Polymerase kein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden konnte. Die Konzentrationen der generierten *in-vitro*-Transkripte mit einer Länge von 625 Bp (*GAPDH*) und 657 Bp (*PBGD*) wurden spektrophotometrisch bestimmt und jeweils 500 ng zur Kontrolle der einheitlichen Transkript-Länge in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.



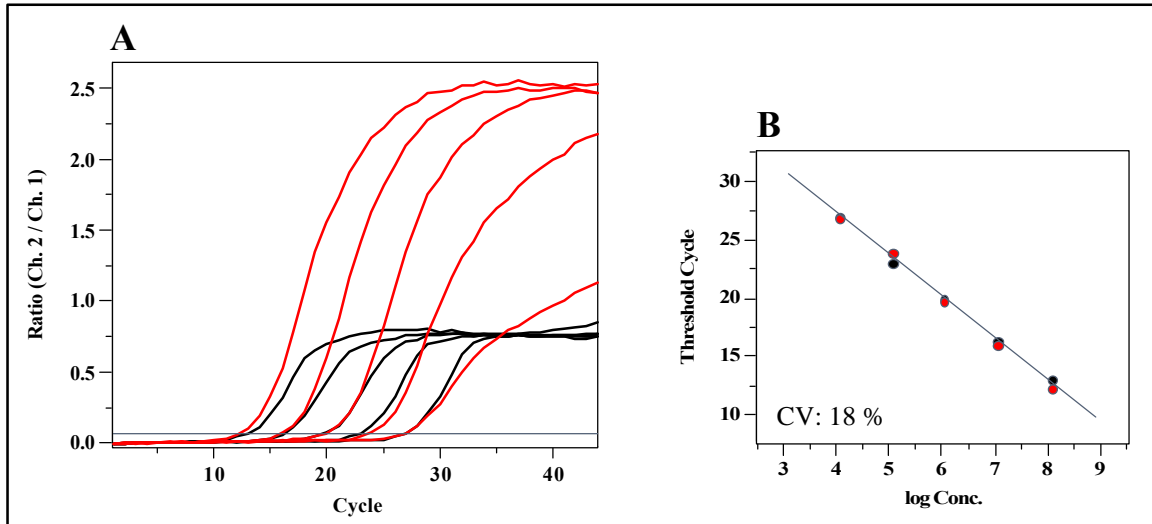
**Abb.3-47: Analyse der mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase generierten *in-vitro*-Transkripte des *PBGD*- (P) und *GAPDH*- (G) Gens mittels denaturierender PAGE.** Aufgetragen wurden jeweils 500 ng *in-vitro*-Transkript sowie ein RNA-Standard (S) mit den angegebenen Längen.

Abbildung 3-47 zeigt jeweils für beide Transkripte eine dominante Haupt-Bande korrekter Länge bei Anwesenheit nur sehr geringer Mengen an RNA-Abbauprodukten. Anschliessend wurde für beide *in-vitro*-Transkripte das spezifische Molekulargewicht berechnet und die RNA auf eine Stammlösungs-Konzentration von 1 nM eingestellt aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für den Einsatz in der RT-PCR wurde diese Stammlösung der Versuchsanordnung entsprechend in mit DEPC behandeltem Reinstwasser verdünnt.

### 3.3.1.1. Verwendung von *GAPDH* als Kontrolltranskript

Zunächst wurde das Transkript des Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens (*GAPDH*) als Kontroll-RNA favorisiert, da dieses *housekeeping*-Gen auch von unseren Kooperationspartnern an der Klinik für Knochenmarktransplantation der Universitätsklinik in Essen verwendet wurde, um so eine bessere Vergleichbarkeit der Quantifizierungsergebnisse zu gewährleisten. Zudem hatte die Verwendung von *GAPDH* den Vorteil, daß ein bereits bestehendes und somit etabliertes Primer- und Sonden-System (s. Kapitel 2.3.7) für die Quantifizierung mittels des LightCyclers übernommen werden konnte. Allerdings wurden noch Optimierungen der RT-PCR hinsichtlich der Magnesium-Konzentration im Bereich von 2 bis 6 mM  $\text{MgSO}_4$  durchgeführt. Die optimale Konzentration für die Quantifizierung des *GAPDH*-Transkriptes mittels Fluorophor-markierter Hybridisierungssonden auf dem LightCycler betrug dabei 3 mM  $\text{MgSO}_4$ . Anschließend wurde ein Vergleich der Amplifikationseigenschaften zwischen der zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes verwendeten Standardreihe und der Standardreihe für die Quantifizierung der *GAPDH* Kontroll-RNA durchgeführt. Dieser Vergleich ist in Abbildung 3-48 dargestellt.



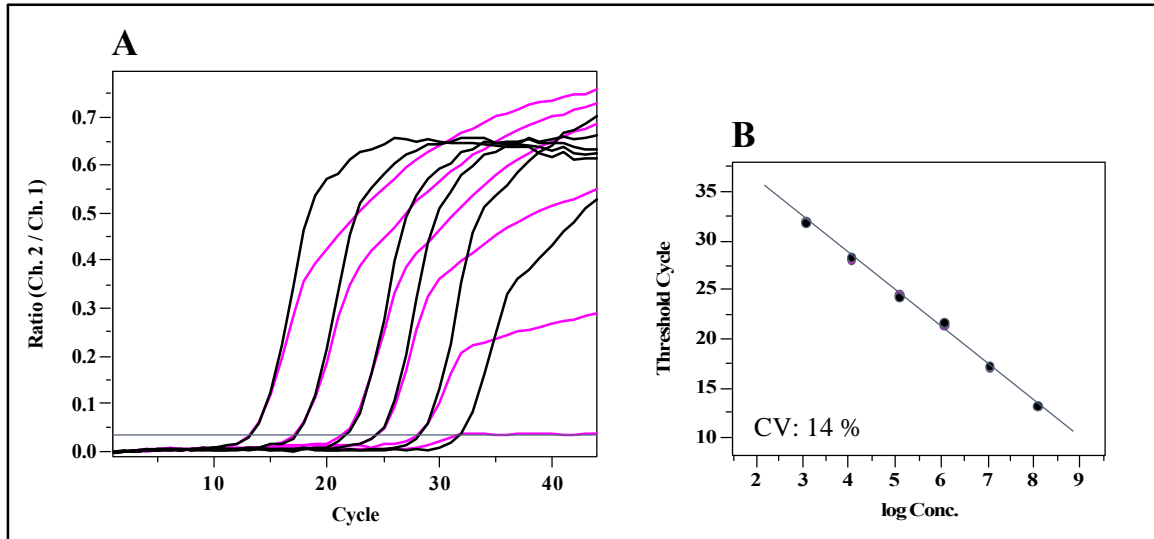


**Abb. 3-48:** Vergleich der zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes (■) und des *GAPDH*-Transkriptes (■) erstellten Standardkurven im Bereich von  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^4$  Kopien eingesetzten *in-vitro*-Transkriptes. Dargestellt sind die Amplifikationskurven (A) und die aus den  $C_T$ -Werten resultierende Standardgerade (B). Die Detektion erfolgte mittels spezifischer HybProbes.

Vergleicht man die in Abbildung 3-48 dargestellten Amplifikationskurven der Standard-Verdünnungsreihen von *in vitro* generierten *GAPDH*- und *BCR/ABL*-Transkripten miteinander, so fällt auf, daß die Fluoreszenz zwar zu ungefähr gleichen  $C_T$ -Werten über das Hintergrundsignal ansteigt, was auf gleiche Ausgangskopienzahlen schliessen läßt, sich die Kurven aber in ihrem weiteren Verlauf deutlich voneinander unterscheiden. Diese unterschiedlichen Kurvenverläufe sind durch unterschiedliche Amplifikationseffizienzen der beiden Gene zu erklären. Dies wird auch deutlich anhand der Anzahl der Zyklen zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen. Bei einer optimalen Amplifikationseffizienz von 2 sollte dieser Abstand bei einer 10fach-Verdünnung 3.3 Zyklen betragen (s. 3.2.2.3). Im abgebildeten Experiment beträgt dieser Abstand im Mittel für das *BCR/ABL*-Transkript 3.45 Zyklen und somit eine Amplifikationseffizienz von 1.95, für das *GAPDH*-Gen 3.95 Zyklen und somit eine Effizienz von 1.79. Dies bedeutet, daß für die exakte Quantifizierung beider Gene auch zwei Standardreihen mitamplifiziert werden müssten. Wünschenswert wäre allerdings ein Kontrollgen, welches mit der gleichen Effizienz wie das *BCR/ABL*-Gen amplifiziert wird, so daß eine Standardreihe zur Quantifizierung beider Gene ausreicht. Aus diesem Grund wurde die RNA-Standardreihe eines zweiten Kontrollgens im Vergleich mit der *BCR/ABL*-Standardreihe getestet.

### 3.3.1.2. Verwendung von *PBGD* als Kontrollgen

Das Porphobilinogen-Deaminase-Gen (*PBGD*) ist ein ubiquitär und konstant exprimiertes Gen (Fink *et al.*, 1998), welches im Gegensatz zum *GAPDH*-Gen (Garcia-Meunier *et al.*, 1993; Hanauer & Mandel, 1984) als pseudogenfrei beschrieben wird (Finke *et al.*, 1993). Pseudogene sind zumeist nicht funktionsfähige Intron-lose Kopien des größten Teiles oder auch des ganzen Gens. Diese Pseudogene stellen für die quantitative RT-PCR-Fragestellung ein Problem dar, da diese Pseudogene in Form von genomischer DNA amplifiziert werden können und diese Amplifikate möglicherweise nicht von den durch RT-PCR generierten PCR-Produkten unterschieden werden können. Dies kann zu falschen Quantifizierungsergebnissen führen (Menon *et al.*, 1991). Für die Amplifikation der *PBGD*-RNA wurde ein bereits etabliertes Primersystem verwendet (Nagel *et al.*, 1996). In den mittels dieser Primer amplifizierten Bereich wurden dann die Hybridisierungssonden unter Beachtung der in Kapitel 3.2.3 festgelegten Bedingungen gelegt. Die komplette Gensequenz inklusive der Lage der Primer und Sonden ist im Anhang aufgeführt. Nach der erfolgreichen Klonierung der gesamten cDNA wurde das *in-vitro*-Transkript der *PBGD*-cDNA synthetisiert, gereinigt und nach spektrophotometrischer Konzentrationsbestimmung auf eine Stammlösungskonzentration von 1 nM eingestellt. Diese Stammlösung wurde jeweils in 10er Schritten mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und diente als *template* für die nachfolgende RT-PCR. Zum Vergleich der *BCR/ABL*- und *PBGD*-Standardreihen wurden gleiche Kopienzahlen im Bereich von  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^3$  in die RT-PCR auf dem LightCycler eingesetzt. Beispielhaft wird in Abbildung 3-49 ein Vergleich zwischen einer *BCR/ABL*- und *PBGD*-Standardreihe gezeigt.

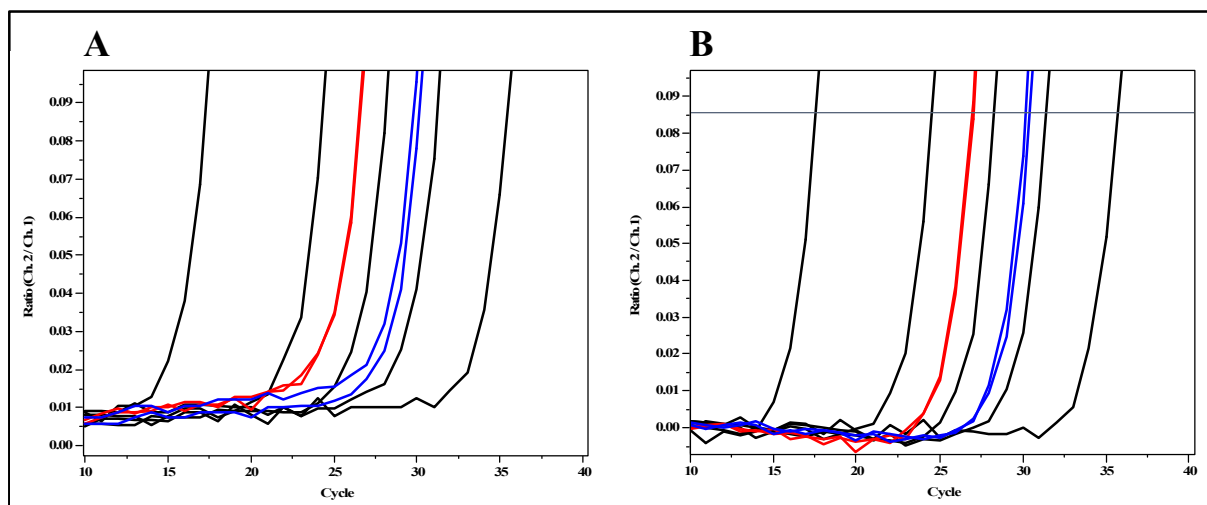


**Abb. 3-49:** Vergleich der 10-fach-Verdünnungsreihen *in vitro* generierten *BCR/ABL*- (■) und *PBGD* (■)-Transkriptes nach Amplifikation auf dem LightCycler. Die Detektion der Amplifikate erfolgte mittels Fluorophor-markierter Hybridisierungssonden. Eingesetzt wurden jeweils  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^3$  Kopien *in-vitro*-Transkript der jeweiligen Gene. Dargestellt sind die Amplifikationskurven (A) sowie die aus den Schnittpunkten mit der *thresh*old-Linie resultierende Standardgerade (B) mit dem ermittelten Variationskoeffizienten (CV).

Deutlich ist zu erkennen, daß die Amplifikationskurven beider Gene in der exponentiellen Phase parallel zueinander verlaufen, bzw. annähernd übereinanderliegen. Dieser gleiche Verlauf wird auch anhand der Abstände in Zyklen zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen deutlich, die für das *BCR/ABL*-Gen im Mittel 3.47 Zyklen und für das *PBGD*-Gen 3.48 Zyklen betragen. Berechnet man daraus die Amplifikationseffizienz, so erhält man für beide Gene eine Effizienz von 1.94. Dieser Versuch wurde insgesamt 10 x wiederholt wobei sich eine mittlere Abweichung der Effizienzen von 0.26 im Vergleich der beiden Gene bei Detektion mittels Fluorophor-markierter Sonden ergab. Dies bedeutet, daß nur eine Standardreihe für die exakte Quantifizierung beider Gene benötigt wird. Dadurch erhält man die Möglichkeit, mehr Patientenproben gleichzeitig zu analysieren, da anderenfalls sonst für zwei Standardreihen bereits 40 % der Kapazität des Probenkarussells benötigt werden, vorausgesetzt man verwendet nur 5 Standards und jeweils eine Negativkontrolle. Da aber beide Standardreihen im Fall von *BCR/ABL* und *PBGD* nahezu gleich verlaufen, kann man sich auf 5 Standards und 2 Negativkontrollen für die Analyse der Patienten-Proben beschränken.

### 3.3.2. Quantitative Analyse der Patienten-Proben

Abschliessend sollte untersucht werden, ob die in dieser Arbeit entwickelte Methode auch geeignet ist, das *BCR/ABL*-Fusionsgens nicht nur unter definierten Bedingungen, also in unter Laborbedingungen kultivierten Zellen, sondern auch in Patienten-Proben sensitiv und quantitativ nachzuweisen. Dafür war es zunächst erforderlich zu testen, mit welcher Auswerte-Software (s. Kapitel 3.2.7.2) die verlässlichsten Ergebnisse erzielt werden können. Den entscheidenden Faktor stellt hierbei die Hintergrundkorrektur dar, also die Berechnung und Subtraktion der Amplifikations-unabhängigen Schwankungen des Fluoreszenz-Signals. Da in den nachfolgenden Versuchen mit lediglich einer Standardkurve sowohl das *BCR/ABL*- als auch *PBGD*-Transkript quantifiziert werden sollen, und diese geringfügig unterschiedliche Grund-Fluoreszenzverläufe aufweisen, erwies sich die LC32-Software mit der Funktion der "background correction" (s. Kapitel 3.2.7.2) als für exakte Quantifizierungen am besten geeignet. Beispielhaft ist dies anhand der Quantifizierung des *PBGD*-Transkriptes aus zwei verschiedenen Patienten-Proben in Abbildung 3-50 gezeigt.



**Abb. 3-50: Vergleich der zur Verfügung stehenden Datenanalyse-Methoden hinsichtlich des Ausgleichs der Amplifikations-unabhängigen Signalschwankungen.**

**A:** mittels "initial value subtraction": diese Methode wird von der LightCycler-Software unterstützt;

**B:** mittels "background correction", welche zur automatischen Quantifizierung mit der LC-32-Software verwendet wird.

Es wurde anhand einer *BCR/ABL*-Standardkurve (■) das *PBGD*-Transkript in zwei verschiedenen Patienten-Proben (1, 2) jeweils in Doppelbestimmung quantifiziert.

Für die Quantifizierung wurden jeweils Doppelbestimmungen beider Transkripte durchgeführt. In Abb. 3-50 wird allerdings nur die Quantifizierung des *PBGD*-Transkriptes gezeigt, da zwischen den Kurven der Standardgeraden und der *BCR/ABL*-Probenkurven keine

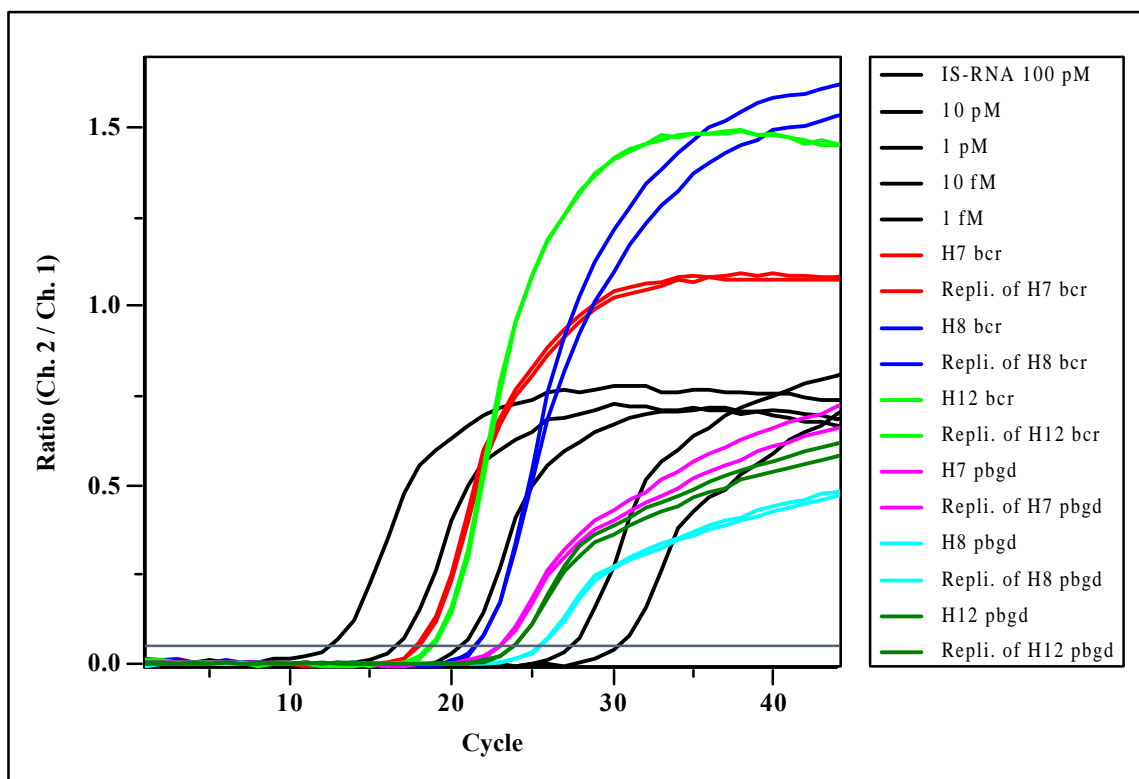
Unterschiede im Grundfluoreszenz-Signalverhalten zu beobachten waren. Deutlich erkennt man, daß die in Abbildung 3-50-A dargestellten Amplifikations-Kurven des *PBGD*-Gens kein mit dem Standard identisches Hintergrund-Signal aufweisen, sondern die Fluoreszenz bereits leicht ansteigt, bevor das Amplifikations-Signal in die exponentielle Phase übergeht. Dadurch ergibt sich ein deutlicher Unterschied für die Quantifizierungsergebnisse der Doppelbestimmung des zweiten Patienten. In Abbildung 3-50-B erkennt man hingegen einen einheitlichen Fluoreszenz-Hintergrund, bevor die jeweiligen Kurven exponentiell ansteigen. Die Doppelbestimmung für Patient 2 ergibt deshalb einheitlichere Werte, wobei das gute Quantifizierungsergebnis für Patient 1 erhalten bleibt. Aus diesem Grund wurden für die nachfolgenden Quantifizierungen der *BCR/ABL*-RNA und der *PBGD*-Kontroll-RNA in CML-Patienten-Proben die LC32-Software mit "*background correction*" verwendet.

Es wurden uns, um die entwickelte Methode unter realistischen Routine-Bedingungen testen zu können, freundlicherweise von der Universitätsklinik in Gießen, Abteilung Hämatologie und Onkologie, und der Klinik für Knochenmarktransplantation der Universitätsklinik Essen Proben von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie zur Verfügung gestellt.

### 3.3.2.1. Patientenproben aus Giessen

Von der Universitätsklinik Gießen, Abteilung Hämatologie und Onkologie unter der Leitung von Professor Dr. Hans Pralle, wurden uns unterschiedlichste Proben von verschiedenen CML-Patienten zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich jeweils um Einzelproben von konventionell therapierten Patienten, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme ausschliesslich mit Zytostatika behandelt wurden. Bei den Proben handelte es sich um frisch entnommene Blutproben, eingefrorene und bei  $-70\text{ °C}$  gelagerte Zellen aus Knochenmark-Biopsien bzw. peripherem Blut. Aus diesen Proben wurde zunächst die Gesamt-RNA isoliert (s. 2.3.5) und deren Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Anschließend wurden jeweils 2 µl dieser RNA-Lösungen je Ansatz in die RT-PCR mit dem SuperScript One Step RT-PCR-System auf dem LightCycler eingesetzt. Für jede Patientenprobe wurde das *BCR/ABL*-Fusionstranskript und das *PBGD*-Kontrolltranskript jeweils in Doppelbestimmung quantifiziert. Die Detektion erfolgte für beide Gene mit den entsprechenden Fluorophormarkierten Hybridisierungssonden. Die Analyse der mittels des LightCyclers generierten Amplifikationsdaten erfolgte mit der LC32-Software mit "*background correction*" (s. 3.2.7.2). Beispielhaft wird in der Abbildung 3-51 eine Quantifizierung beider Transkripte für mehrere Patienten gezeigt. In der Standardreihe wurden hier aufgrund der großen Mengen eingesetzter Gesamt-RNA (1 - 2 µg/RT-PCR-Reaktionsansatz) und der somit zu erwartenden

hohen *BCR/ABL*-Kopienzahlen, 5 Standardwerte im Bereich von  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^3$  Kopien verwendet.



**Abb.3-51: Quantifizierung des *BCR/ABL*- und *PBGD*-Transkriptes in verschiedenen Patienten-Proben (s. Legende) mit HybProbe-Detektion auf dem LightCycler.** Die Auswertung erfolgte mit der LC32-Software mit "background correction" zum Ausgleich der Amplifikations-unabhängigen Fluoreszenzschwankungen. Für die Patientenproben H7, H8 und H12 (s. 7.2.1) wurden jeweils in Doppelbestimmung das *BCR/ABL*- und *PBGD*-Transkript quantifiziert.

Deutlich erkennt man, daß für alle drei in Abb. 3-51 dargestellten Patienten hohe Mengen an *BCR/ABL*-Transkript detektiert wurden. Im Gegensatz dazu wird das als Kontroll-RNA mitamplifizierte und quantifizierte *PBGD*-Transkript in den Zellen in geringerem Maße exprimiert. Es ist daher gut geeignet um bei einer eventuellen *BCR/ABL*-Negativität als Kontroll-RNA bezüglich der Integrität der verwendeten RNA-Präparation zu dienen. Im Anschluß an die Analyse der LightCycler-Daten wird ein in Prozent angegebener Quotient aus den ermittelten Quantifizierungsergebnissen für beide Transkripte gebildet. Dieser Quotient stellt bei Verlaufspuben einen wichtigen Faktor zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes dar. Er ändert sich nur dann, wenn sich die Expression des *BCR/ABL*-Gens ändert, unabhängig von der Menge bzw. Qualität der eingesetzten und analysierten Patienten-RNA bei Annahme eines konstanten *PBGD*-RNA-Levels.

Im Anschluß an die Quantifizierung auf dem LightCycler wurden die generierten RT-PCR-Produkte zur Bestimmung der Translokations-Variante in analytischen Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

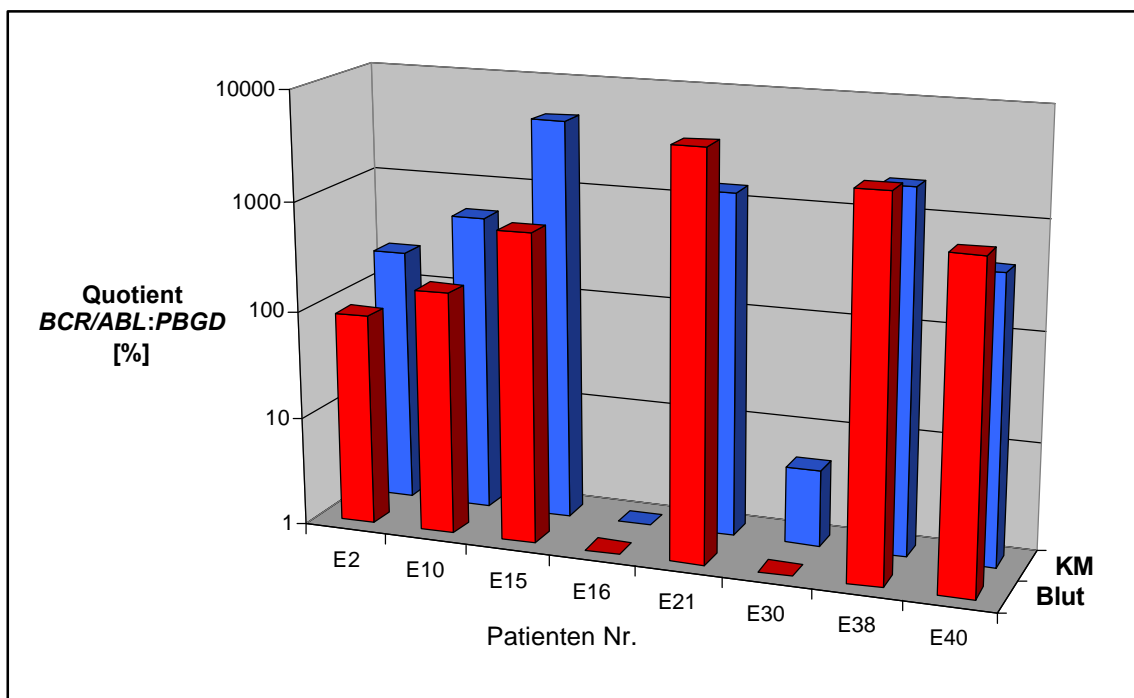
Insgesamt wurden 20 Patienten-Proben von 13 weiblichen und 7 männlichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 58.6 Jahren analysiert. Von diesen Patienten konnte bei 17 sowohl eine Quantifizierung des *BCR/ABL*- als auch des *PBGD*-Transkriptes durchgeführt werden. Bei 3 Patienten konnte weder für *BCR/ABL* noch für *PBGD* ein Fluoreszenz-Anstieg der Amplifikationskurve detektiert werden. Bei ansonst positiven Ergebnissen für andere mit demselben RT-PCR-Mastermix analysierten Patientenproben läßt dies auf eine Degradation der RNA schließen. Die Quantifizierungs-Ergebnisse des *BCR/ABL*- und *PBGD*-Transkriptes, sowie die analysierten *BCR/ABL*-Transkript-Varianten für alle Patienten sind im Anhang in Kapitel 7.2.1 zusammengestellt

### 3.3.2.2. Patientenproben aus Essen

Von der Klinik für Knochenmarktransplantation der Universitätsklinik Essen wurden uns von Dr. Elmaagacli freundlicherweise Proben von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie zur Verfügung gestellt. Diese Patienten wurden alle einer Knochenmarktransplantation unterzogen, wobei einige Proben vor Transplantation, die meisten jedoch zur Kontrolle nach erfolgter Transplantation entnommen wurden. Die Proben wurden in Form von Gesamt-RNA, die aus peripherem Blut, Knochenmarkbiopsien bzw. aus archivierten und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellen mit Hilfe des RNA Isolation Kits der Firma QIAGEN isoliert wurde, zur Verfügung gestellt. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Gesamt-RNA erfolgte erst nach Ansetzen der RT-PCR-Reaktionsansätze und mußte bei einigen Patienten aufgrund extrem limitierter Probenmengen unterbleiben, da die zur Verfügung gestellten RNAs jeweils nur in einem Volumen von max. 20  $\mu\text{l}$  eluiert wurden. Die Analyse der Patienten-RNAs erfolgte, wie bereits zuvor für die Patienten-Proben aus Gießen beschrieben, durch Quantifizierung des *BCR/ABL*- und des *PBGD*-Transkriptes in Doppelbestimmung mit Fluorophor-markierten Hybridisierungssonden auf dem LightCycler. Die *BCR/ABL*-Translokations-Variante wurde durch Auftrennung der erhaltenen RT-PCR-Produkte durch Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen bestimmt. In manchen Fällen war jedoch die Menge an PCR-Produkt zu gering und somit auf einem ethidiumbromidgefärbten Gel nicht sichtbar, weshalb in diesen Fällen die Bestimmung der Translokations-Variante unterbleiben mußte. Im Folgenden werden nun keine Einzelergebnisse der jeweiligen Patienten-Proben gezeigt, diese

werden im Anhang in Kapitel 7.2.2 gegeben, sondern stattdessen Ergebnisse für zusammengefaßte Probengruppen.

Interessant ist der Vergleich der Quantifizierungsergebnisse für RNA aus Knochenmarkspirat und Vollblut, die den Patienten am selben Tag entnommen wurden. Die Ergebnisse dieser Quantifizierungen werden als Quotienten aus ermittelten *BCR/ABL*-Kopienzahlen zu *PBGD*-Kopienzahlen in Form eines Säulendiagrammes in Abbildung 3-52 dargestellt.

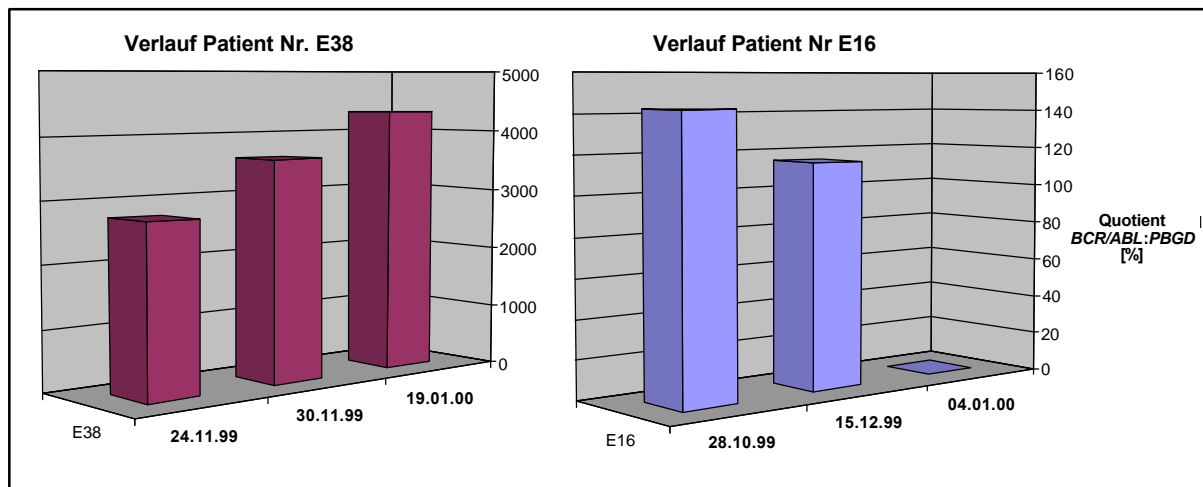


**Abb. 3-52:** Vergleich der in der LigthCycler-RT-PCR ermittelten Quotienten (*BCR/ABL* : *PBGD*) für RNA, die aus Blut (■) bzw. Knochenmark (■) isoliert wurde. Diese Proben wurden den oben aufgeführten Patienten am selben Tag entnommen.

Anhand der in dieser Abbildung aufgeführten Quotienten erkennt man deutlich, daß sich die berechneten Quotienten für Blut und Knochenmark voneinander unterscheiden, minimal um den Faktor 1.34 (Patient Nr E38), maximal um den Faktor 6.82 (Patient Nr. E15). Bei dieser Bewertung wurden allerdings die Werte der Patienten E16 (beide Proben *BCR/ABL*-negativ) und E30 (Blutprobe *BCR/ABL*-negativ) nicht berücksichtigt. Insgesamt ist es somit empfehlenswert, bei der Erstellung von Verlaufsprofilen für einzelne Patienten jeweils nur Werte für Blut oder Knochenmark miteinander zu vergleichen. Von zwei Patienten (E16 und E38) standen uns jeweils 3 zu verschiedenen Zeitpunkten entnommene Blutproben zur Verfügung, die somit einen Vergleich der ermittelten Quotienten zulassen und ein zeitliches



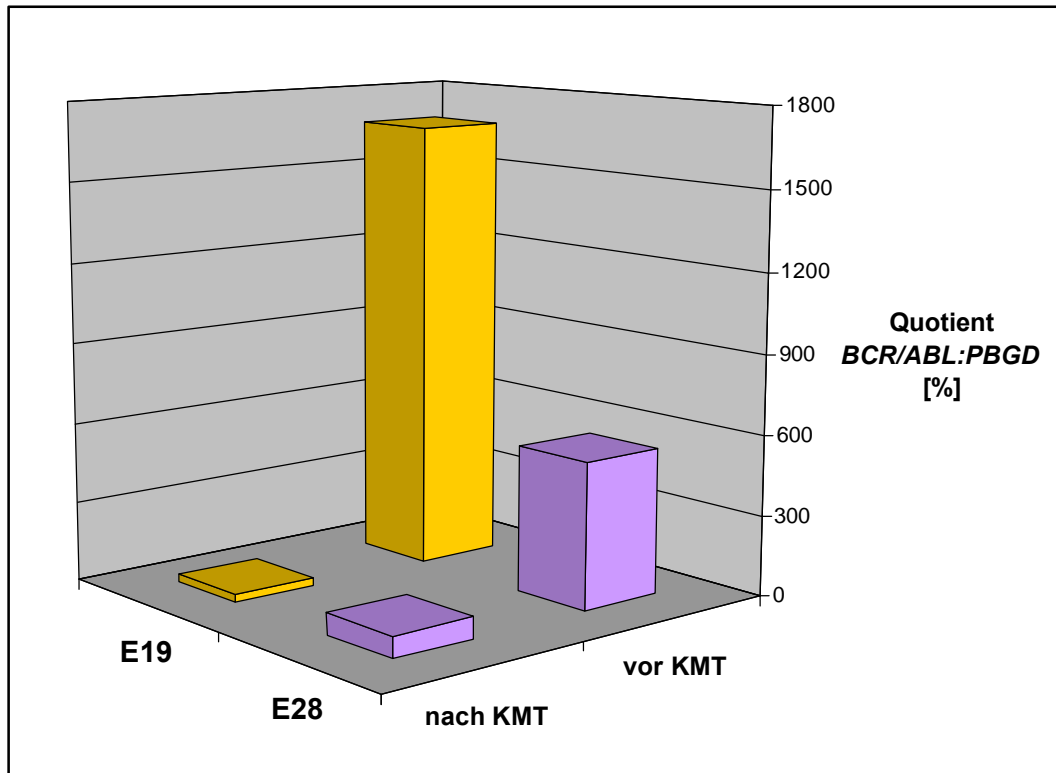
Fenster im Krankheitsverlauf dieser Patienten dokumentieren und verdeutlichen. Die für beide Patienten erstellten Verlaufs-Diagramme werden in Abbildung 3-53 gezeigt.



**Abb. 3-53:** Verlauf der Expression des *BCR/ABL*-Fusionsgens zweier Patienten (E38, E16) ermittelt anhand von drei aufeinanderfolgenden Blutproben. Dargestellt ist für jeden Patienten der Zeitpunkt der Blutentnahme und der jeweils berechnete Quotient von *BCR/ABL*- zu *PBGD*-Kopienzahlen. Die Quantifizierung der beiden Gene erfolgte mittels RT-PCR auf dem LightCycler.

Man erkennt anhand der in Abb. 3-53 gezeigten Diagramme, daß die Verläufe der beiden Patienten sehr unterschiedlich sind. Bei Patient Nr. E38 ist eine kontinuierliche Zunahme des relativen Anteils von *BCR/ABL*-Transkript in der Gesamt-RNA zu beobachten, was auf ein Rezidiv schliessen läßt. Es müßte in diesem Fall über eine erneute Therapie nachgedacht werden. Im Gegensatz dazu nimmt die Expression des *BCR/ABL*-Gens bei Patient Nr. E16 zunächst langsam ab und ist dann nicht mehr nachweisbar. Dies könnte einerseits bedeuten, daß tatsächlich keine Expression des *BCR/ABL*-Fusionsgens mehr stattfindet, andererseits könnte die Expression zwar noch vorhanden sein, die Menge jedoch unterhalb der Detektionsgrenze der Methode liegen. Die jeweiligen Einzeldaten dieser Quantifizierungen sind in Kapitel 7.2.2 im Anhang ersichtlich.

Von zwei Patienten waren Proben vorhanden, die vor und nach der Knochenmarktransplantation entnommen wurden. Die Ergebnisse der Quantifizierungen dieser RNA-Proben sind zusammengefaßt in einem Diagramm in Abbildung 3-54 dargestellt.



**Abb. 3-54: Quantifizierungsergebnisse für entnommene Proben zweier CML-Patienten vor und nach Knochenmarktransplantation.** Dargestellt sind jeweils die Quotienten von ermittelten *BCR/ABL*- zu *PBGD*-Transkriptkopienzahlen. Die Quantifizierung erfolgte mittels RT-PCR auf dem LigthCycler.

Anhand des in Abb. 3-54 dargestellten Diagramms erkennt man deutlich eine starke Abnahme der *BCR/ABL*-Expression nach Knochenmark-Transplantation für beide Patienten. Allerdings ist keiner der beiden Patienten *BCR/ABL*-negativ. Es wird aber häufig beobachtet, daß sich eine komplette molekulare Remission erst nach einiger Zeit einstellt. Erklärbar ist dies durch das als "*graft-versus-leukemia*" bezeichnete Phänomen, bei dem die zugeführten Spenderzellen zu einer *BCR/ABL*-Negativität führen.

Insgesamt wurden 60 RNA-Proben von 41 Patienten (24 männlich, 16 weiblich, 1 unbekannt) mit einem Durchschnittsalter von 36.9 Jahren (18 - 57 Jahre) analysiert. Von diesen 60 RNA-Proben waren 10 *BCR/ABL*-negativ. Bei 5 Patienten-Proben konnte das *PBGD*-Transkript nicht quantifiziert werden, da eine RT-PCR aufgrund technischer Probleme kein Amplifikations-Signal ergab und für eine Wiederholung die Menge an verbliebener RNA nicht mehr ausreichend war. Es konnte auch bei den hier analysierten Proben festgestellt werden, daß das *PBGD*-Gen eine geringe Expressionsrate besitzt, es konnte aber bis auf die zuvor genannten Fälle, für jede Patienten-Probe quantifiziert werden. Die Gesamtheit aller Quantifizierungsergebnisse ist im Anhang (7.2.2) aufgelistet.

## 4 Diskussion

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist eine myeloproliferative Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. In über 95 % der Patienten ist eine charakteristische chromosomale Aberration, das aus der reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 ( $t(9;22)(q34;q11)$ ) entstandene, sogenannte Philadelphia-Chromosom, nachweisbar. Durch diese Translokation entsteht auf Chromosom 22 ein neues chimäres Gen, das *BCR/ABL*-Fusionsgen. Das daraus in 98 % der Philadelphia-Chromosom-positiven Leukämien durch zwei alternative Transkriptvarianten (b2a2, b3a2) translatierte *BCR/ABL*-Protein (p210) weist eine deutlich höhere Tyrosinkinase-Aktivität auf als das ursprüngliche *ABL*-Protein und ist dadurch in der Lage, verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden zu induzieren. Da dieses chimäre *BCR/ABL*-Fusionsgen ausschließlich in leukämischen Zellen auftritt, stellt es für die CML einen wichtigen diagnostischen und prognostischen Faktor dar.

Ziel dieser Arbeit war es, ein quantitatives automatisierbares Testsystem für die Routineanalytik der CML anhand des *BCR/ABL*-Fusionsgen-Nachweises zu entwickeln. Dieser Test soll dazu dienen, für jeden CML-Patienten individuell den Krankheitsverlauf zu dokumentieren. Dies ist erforderlich, um während der Chronischen Phase der Krankheit eine Akzeleration zu detektieren sowie das Ansprechen auf eine Therapie zu verfolgen. Bei der Therapie mit z. B. Interferon-alpha kann bei einigen Patienten eine zytogenetische Remission erreicht werden, so daß die Translokation nur noch in geringem Maße oder gar nicht mehr nachweisbar ist. Von besonderer Bedeutung ist aber der Nachweis von Philadelphia-Chromosom-positiven Zellen nach erfolgter Knochenmarktransplantation (KMT). Bei beiden Therapieformen spricht der erneute Nachweis des Philadelphia-Chromosoms nach kompletter Remission für das Auftreten eines Tumorrezidivs. Es ist jedoch auch nicht auszuschliessen, daß einige wenige Tumorzellen über Jahre im Knochenmark persistieren und nachzuweisen sind, ohne daß es zu einem Rezidiv kommt. Daher ist es besonders wichtig, quantitative Aussagen über den *BCR/ABL*-Status des Patienten treffen zu können. Da es zudem erforderlich ist, einen möglichst sensitiven Nachweis des *BCR/ABL*-Fusionsgens zu gewährleisten, wurden in dieser Arbeit quantitative Analysemethoden entwickelt, die auf der Polymerase-Kettenreaktion basieren.

Da die Bruchpunktregionen der Translokation, die zum charakteristischen Philadelphia-Chromosom führen, auf DNA-Ebene über einen weiten Bereich (200 kbp) gestreut

vorkommen, war es notwendig, die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Gens auf RNA-Ebene und somit über das *BCR/ABL*-Transkript durchzuführen.

## 4.1 Bisher verwendete Methoden zum Nachweis des Philadelphia-Chromosoms

### *Zytogenetische Analyse*

Historisch gesehen war die Zytogenetik zum Nachweis des Philadelphia-Chromosoms über einen langen Zeitraum die einzige Methode und daher das Standard-Verfahren zur Detektion der Translokation t(9;22) in CML-Patienten (Rowley, 1973; Sanchez *et al.*, 1973). Die Abhängigkeit von der Spontanproliferation des leukämischen Klons wie auch das begrenzte Auflösungsvermögen der Chromosomenanalyse setzt allerdings optimale Abnahmebedingungen voraus. Finden sich nur normale Metaphasen, so ist damit eine klonale Anomalie nicht ausgeschlossen, da sie in den nicht-mitotischen Zellen verborgen sein kann. So konnte bei einer Vielzahl von Patienten, die sich nach erfolgter KMT in kompletter hämatologischer Remission befanden, kein zytogenetischer Nachweis des Philadelphia-Chromosoms erfolgen, obwohl mittels RT-PCR das *BCR/ABL*-Transkript detektiert wurde (Martinelli *et al.*, 1991; Mills *et al.*, 1991). Der wichtigste Grund für diesen Unterschied zwischen zytogenetischen Analysen und anderen Methoden zum Nachweis des Philadelphia-Chromosoms bzw. des *BCR/ABL*-Transkriptes ist die geringe Sensitivität, die bei maximal einer Ph<sup>+</sup>-Zelle in 100 Lymphozyten liegt (Hochhaus *et al.*, 2000). Zudem ist diese Methode sehr zeit- und personalaufwendig und daher nur begrenzt für die Routineanalytik geeignet.

### *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)*

Die FISH-Technik erlaubt eine verfeinerte Analyse von Metaphase- und Interphase-Zellen durch Co-Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Sonden (Cosmide oder YACs). Der Nachweis der CML-Zelle erfolgt durch Co-Lokalisation *BCR*- und *ABL*-spezifischer Sonden (Tkachuk *et al.*, 1990). Die Detektion und Quantifizierung ist aber, ebenso wie bei der klassischen zytogenetischen Analyse, stark abhängig von der Qualität des Aspirats. Zudem wird oftmals in Abhängigkeit von der Qualität der verwendeten Sonden ein gewisser Prozentsatz an falsch-positiven Zellen detektiert (Bentz *et al.*, 1994; Garcia-Isidoro *et al.*, 1997; Cuneo *et al.*, 1998; Yanagi *et al.*, 1999). Das Detektionslimit beträgt in der Praxis 1 - 5 %, je nach verwendetem Sonden-System. Der Vorteil der FISH-Analyse gegenüber der konventionellen Zytogenetik liegt in der größeren Anzahl an untersuchten Zellkernen, was

sich in einer geringeren Fehlerrate niederschlägt (Cox Froncillo *et al.*, 1995). Insgesamt handelt es sich hierbei aber um eine relativ teure und zeitaufwendige Technik, deren Sensitivität nur geringfügig besser ist als die der konventionellen Zytogenetik.

### ***Southern-Blot-Analyse***

Southern-Blot: Aus Leukozyten isolierte genomische DNA wird mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten, diese Spaltfragmente werden in Agarose-Gelen aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Anschließend erfolgt ein Hybridisierungsschritt mit zwei markierten Sonden, jeweils spezifisch für das 3'- bzw. 5'-Ende des *BCR/ABL*-Fusionsgens. Diese radioaktiv markierten Sonden können durch nachfolgende Autoradiographie detektiert werden. Die Gefahr von falsch-negativen bzw. falsch-positiven Ergebnissen ist zwar prinzipiell vorhanden, aber in entsprechenden Studien wurden solche Ergebnisse nur sehr selten gefunden (Fishleder *et al.*, 1989; Reiter *et al.*, 1997). Zudem können solche unter anderem durch unzureichende Restriktion bedingten Ergebnisse durch lange Inkubationszeiten, geeignete Wahl der Restriktionsenzyme und Sonden sowie Negativ- und Positivkontrollen vermieden werden. Weitere Einschränkungen der Detektion und Quantifizierung mittels Southern-Blot sind die Qualität des Aspirats sowie die Nicht-Detektion vorhandener genrearrangierter Zellen bei starker Verdünnung des Ausgangsmaterials. Zudem ist sie ebenfalls sehr zeitaufwendig und hat einen hohen Zellbedarf, wobei sich zudem die Quantifizierung durch Vergleich von Bandenintensitäten schwierig gestaltet und nur die Detektion und Quantifizierung von 1 – 5 % der leukämischen Zellen in Gesamt-Lymphozyten erlaubt (Verschraegen *et al.*, 1995; Reiter *et al.*, 1997).

### ***Western-Blot-Analyse***

Die Methode des Western-Blots ist dazu geeignet, das *BCR/ABL*-Protein qualitativ und quantitativ in Zellextrakten sowohl aus dem peripheren Blut als auch aus Knochenmarkaspirat nachzuweisen. Eine Quantifizierung ist prinzipiell zwar möglich, gestaltet sich aber schwierig, da auch hier ein Detektionslimit mit dem Nachweis von 0.5 – 1 % der untersuchten Zellen gegeben ist. Die in der Literatur dokumentierten Ergebnisse korrelieren gut mit denen zytogenetischer Untersuchungen. Somit stellt die Methode des Western-Blots durchaus eine Alternative zur klassischen Zytogenetik dar, wenn sie auch keine Verbesserung der Sensitivität erreicht (Guo *et al.*, 1994, 1996; Schleuning *et al.*, 1999).

### ***Polymerasekettenreaktion (PCR)***

Erste Untersuchungen zur Detektion des *BCR/ABL*-Rearrangements durch RT-PCR wurden bereits 1989 durchgeführt (Morgan *et al.*, 1989). Aufgrund einer hohen Rate an falsch-positiven Ergebnissen in einer großen multizentralen Studie wurde die Bedeutung dieser Methode für die *BCR/ABL*-Analyse zunächst sehr konträr diskutiert (Hughes *et al.*, 1990A, B). Durch rigorose Kontaminationsvermeidung und Durchführung von Positiv- und Negativkontrollen konnte jedoch die Spezifität der PCR deutlich verbessert werden (Hughes & Goldman, 1990). Für die Erstdiagnose wird zumeist eine Multiplex-PCR durchgeführt, um jede der häufigen *BCR/ABL*-Transkriptvarianten (b3a2, b2a2, e1a2) in einer Reaktion detektieren zu können (Cross *et al.*, 1994). Der größte Vorteil der PCR gegenüber den bisher verwendeten Detektionsmethoden liegt in der sehr hohen Sensitivität. So ist z. B. mit einer *nested*-RT-PCR der Nachweis einer einzelnen leukämischen Zelle vor einem Hintergrund von bis zu  $10^6$  normalen Zellen möglich (Bianchi *et al.*, 1995). Weitere Vorteile der Analyse mittels PCR sind der relativ geringe Zeitaufwand, die Schnelligkeit mit der auswertbare Ergebnisse erzielt werden, sowie ein geringer Zellbedarf für die Analyse. Erste Ansätze, die PCR zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes zu verwenden, erfolgten durch aufwendige Zwei-Schritt *nested*-PCRs nach erfolgter cDNA-Synthese. Als Standard diente hierbei isolierte Gesamt-RNA aus K562-Zellen, die zur Erstellung einer Eichgeraden jedoch erst in der 2. PCR als Verdünnungsreihe der generierten cDNA mitamplifiziert wurde und somit keine identischen Amplifikationsbedingungen für Probe und Standard gewährleisten kann und lediglich als semi-quantitative Methode anzusehen ist. Die Analyse bzw. Quantifizierung erfolgt anschließend üblicherweise mittels Agarosegelelektrophorese und Southern-Blot, wobei die Detektion mittels radioaktiv markierter Hybridisierungssonden erfolgte (Delage *et al.*, 1991).

## **4.2 Quantitative kompetitive RT-PCR**

In dieser Arbeit wurde zur exakten Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes zunächst die Methode der quantitativen kompetitiven RT-PCR gewählt. Diese Methode wurde erstmals von Cross *et al.* (1993) zur Abschätzung der *BCR/ABL*-Transkriptmenge in CML-Patienten beschrieben. Als Kompetitor für die PCR wurde hierbei ein linearisiertes Plasmid mit integrierter b3a2-Sequenz verwendet. Zur Unterscheidung zwischen Wildtyp-*BCR/ABL*-Sequenz und Standard wurde zwischen Exon 2 und Exon 3 des *ABL*-Gens ein 201 Bp langes  $\lambda$ -DNA-Fragment integriert. Anschließend wurden Titrationsexperimente

durchgeführt, indem serielle Verdünnungen dieses Plasmids mit Patienten-cDNA gemischt und anschließend amplifiziert wurden. Die Analyse erfolgte im Anschluß an die Amplifikation auf EtBr-gefärbten Agarosegelen. Da durch den relativ großen Längenunterschied zwischen Standard- und *target*-Sequenz auch Unterschiede in der Amplifikationseffizienz zu verzeichnen waren, mußte ein Faktor, der diese Unterschiede ausgleicht, zur Berechnung der genaueren Quantifizierungsergebnisse herangezogen werden.

### ***Interne Standardisierung***

Um für die vorliegende Arbeit hingegen einen idealen Standard für die RT-PCR zu erhalten (s. 3.1), der mit identischer Amplifikationseffizienz wie die *target*-Sequenz vervielfacht wird, wurde die in einen BlueScript-Vektor integrierte b3a2-*BCR/ABL*-cDNA-Sequenz mittels einer inversen PCR-Mutagenese (s. 3.1.1.1) derart verändert, daß aus einer innerhalb der Wildtyp-Sequenz gelegenen singulären *Hind*III-Restriktionsschnittstelle durch Austausch zweier Basen eine für den Standard singuläre *Stu*I-Restriktionsschnittstelle generiert wurde. Diese Restriktionsschnittstelle diente im Anschluß an die Amplifikation der Unterscheidung zwischen Standard- und Wildtyp-Sequenz (Dörsam, 1995). Da die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Genes aus den oben angeführten Gründen über dessen Transkript erfolgen muss, war es sinnvoll, einen RNA-Standard zu verwenden. Daher wurden mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase aus den jeweiligen Plasmiden entsprechende *in-vitro*-Transkripte der Standard- und Wildtyp-Sequenz generiert. Um eine möglichst hohe Ausbeute an *in-vitro*-generierter RNA zu erhalten sowie zur Beseitigung eines amplifizierbaren Hintergrundes an Plasmid-DNA, stellte es sich als vorteilhaft heraus, zunächst nach erfolgter Transkription einen rigiden DNaseI-Verdau durchzuführen und zur anschließenden Isolierung ein RNA-Präparations-Kit (Roche Diagnostics) zu verwenden (s. 3.1.1.2). Das neu geplante PCR-Primer-System für die Analyse des *BCR/ABL*-Transkriptes (s. 3.1.2) wurde zunächst anhand von Plasmid-*templates* und Amplifikation mit *Taq* DNA-Polymerase getestet. Nach PAGE-Analyse ergab sich hierbei eine singuläre PCR-Produktbande der erwarteten Länge von 311 Bp.

### ***Durchführung der RT-PCR***

Zur Amplifikation von RNA standen nun mehrere, in 3.1.3 eingehend vorgestellte Möglichkeiten zur Verfügung. Da aber bei der Entwicklung des neuen Testsystems für die *BCR/ABL*-Analytik die Routinefähigkeit im Vordergrund stehen sollte, wurde zunächst das Ein-Schritt-RT-PCR-System dem Zwei-Schritt-RT-PCR-System vorgezogen. Neben der einfacheren Handhabung, nur ein Reaktionsansatz muß für die Reverse Transkription (RT)

und die direkt im Anschluß durchgeführte Amplifikation der cDNA pipettiert werden, wird gleichzeitig das Kontaminationsrisiko verringert, da nach dem RT-Schritt kein Umpipettieren in einen neuen PCR-Ansatz erforderlich ist. Ein möglicher Nachteil dieser Methode ist jedoch, daß keine cDNA zur Archivierung und späteren Analyse zur Verfügung steht. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist auch archivierte RNA bei richtiger Lagerung prinzipiell über einen längeren Zeitraum stabil. Außerdem ist eine Proben-Archivierung in großen Transplantationszentren (z. B. Uni-Klinik Essen) aufgrund der großen Probenzahlen oftmals gar nicht über einen längeren Zeitraum möglich bzw. vorgesehen.

Für die Ein-Schritt-RT-PCR sind nun zwei alternative Methoden beschrieben:

- ◆ der Einsatz von *Tth* DNA-Polymerase, die aufgrund ihrer intrinsischen RT-Aktivität in Gegenwart von Mangan-Ionen sowohl für die Reverse Transkription als auch für die PCR eingesetzt werden kann (Myers & Gelfand, 1991);
- ◆ Verwendung eines Enzym-Gemisches aus Reverser Transkriptase (AMV oder MMLV) und *Taq* DNA-Polymerase für die Amplifikation.

In dieser Arbeit wurden sowohl die *Tth* DNA-Polymerase als auch ein Enzym-Gemisch in Form des Titan One Tube RT-PCR Systems (AMV als RT, *Taq* und *Pwo* als DNA-Polymerasen) im Vergleich getestet. Mit beiden RT-PCR-Methoden konnte bei Einsatz der *in vitro* generierten *BCR/ABL*-Transkripte als *template* und den für *BCR/ABL* spezifischen Primern nach PAGE jeweils eine singuläre spezifische Produkt-Bande von 311 Bp detektiert werden (s. Abb. 3-4, 3-5). Die anschließende Spaltung mit den für die Wildtyp- bzw. Standard-Sequenz spezifischen Restriktionsendonukleasen ergab, bei ansonsten gleichen Bedingungen, eine vollständige Durchspaltung der spezifischen PCR-Produkte nach Amplifikation mit dem Titan-System, aber einen, wenn auch sehr geringen Anteil nichtspaltbarer PCR-Produkte bei Amplifikation mit der *Tth* DNA-Polymerase. Eine vollständige Durchspaltung war nicht durch nochmalige Zugabe von Enzym und längere Inkubationszeiten sondern erst nach Aufreinigung der mit *Tth* generierten RT-PCR-Produkte über ein entsprechendes Aufreinigungs-Kit (QIAGEN) zu erreichen. Dies deutet auf eine die Restriktionsendonukleasen inhibierende Wirkung des für die RT-PCR verwendeten Puffers hin, der neben einer hohen Konzentration an Mangan-Ionen auch 40 % Glycerin enthält. Ein weiterer Nachteil der *Tth* DNA-Polymerase war die im Vergleich zur Amplifikation mit dem Titan-System deutlich geringere Sensitivität (s. 3.1.3.3). Eine mögliche Ursache dieser geringeren Sensitivität liegt möglicherweise im unterschiedlichen Temperatur-Optimum der Methoden in Bezug auf die Reverse Transkription. So hat die *Tth* DNA-Polymerase ein Temperatur-Optimum von 75 °C (Saiki *et al.*, 1988), hingegen liegt das der im Titan-System



verwendeten Reversen Transkriptase aus AMV bei 42 °C. Für die Durchführung des RT-Schrittes empfiehlt der Hersteller für die *Tth* DNA-Polymerase eine Temperatur von 60–70 °C, für das Titan-System 50–60 °C. Das hohe Temperaturoptimum der *Tth*-Polymerase hat den Vorteil, daß bei dieser Temperatur die Sekundärstrukturen der RNA weitgehend aufgeschmolzen sind und somit eine gesteigerte Effizienz der Reversen Transkription zu erwarten ist. Da aber die optimale Annealing-Temperatur der *BCR/ABL*-spezifischen Primer zu 56 °C bestimmt wurde, erfolgte die Reverse Transkription mit der *Tth* DNA-Polymerase bei 60 °C, also am Rand des vom Hersteller empfohlenen Temperaturbereiches. Somit wurde mit der Temperatur von 60 °C ein Kompromiß gewählt, der sowohl deutlich unter dem Reaktionsoptimum der *Tth* DNA-Polymerase als auch oberhalb der optimalen Primer-Annealingtemperatur liegt und somit die deutlich schlechtere Sensitivität gegenüber dem Titan-System begründen kann. Für das Titan-System werden vom Hersteller Temperaturen zwischen 50–60 °C für die Reverse Transkription empfohlen. Somit ist die gewählte Temperatur von 55 °C sowohl optimal für die Reverse Transkription als auch für das Primer-Annealing.

Die *Tth* DNA-Polymerase wird aber bislang als einziges Ein-Schritt-RT-PCR-System zur Detektion des *BCR/ABL*-Transkriptes mittels eines konventionellen Thermocyclers verwendet (Mar-Aguilar *et al.*, 1998). Bei Durchführung einer *nested*-RT-PCR zur Detektion des *BCR/ABL*-Transkriptes im peripheren Blut von CML-Patienten finden Mar-Aguilar *et al.* eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber einer konventionellen Zwei-Schritt-RT-PCR und heben die Schnelligkeit des Systems sowie die geringe Anzahl von falsch-positiven Ergebnissen durch Verringerung des Kontaminationsrisikos hervor. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen allerdings, daß durch Verwendung des Titan-Systems eine weitere Verbesserung der Sensitivität erreicht wird und diese Methode daher zum Nachweis von *minimal residual disease* deutlich besser geeignet ist.

#### ***Titrationsexperimente zur Quantifizierung des BCR/ABL-Transkriptes***

In den anschließend durchgeführten gegenläufigen Titrationen von Standard- und Wildtyp-RNA konnte festgestellt werden, daß sich die verwendete Standard-RNA wie ein idealer kompetitiver Standard verhält (s. 3.1.4). Nach spezifischer Restriktionsspaltung der kompetitiv generierten PCR-Produkte und anschließender densitometrischer Analyse der auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Spaltfragmente stimmte das Verhältnis von Standard- und Wildtyp-PCR-Produkt mit dem der eingesetzten *template*-RNA überein (s. Abb. 3-11). Die Titrationskurven schneiden sich mit einer geringen Abweichung von 2 % am erwarteten

Äquivalenzpunkt, an dem die ursprüngliche *template*-Konzentration an Standard- und Wildtyp-*in-vitro*-Transkript also gleich ist. Diese Bestimmung ist also extrem genau, da eine Abweichung von 2 % bereits durch Pippettenungenauigkeiten verursacht werden. Die Bildung von Heteroduplices (s. 3.1.4.1) beeinflusst die Bestimmung dieses Äquivalenzpunktes nicht, da diese von beiden Enzymen nicht-spaltbar sind und somit auf beide Kurven den gleichen Einfluß nehmen (Hahn *et al.*, 1995A; McCulloch *et al.*, 1995). Die experimentell bestimmte Menge an Heteroduplices weicht von der theoretisch berechneten idealen Binomialverteilung, bei der der Anteil an Heteroduplices am Äquivalenzpunkt 50 % der Gesamt-Produktmenge betragen sollte, geringfügig ab. Dies ist darauf zurückzuführen, daß am Ende der QC-RT-PCR kein Denaturierungsschritt mit anschließender Renaturierung erfolgte. Deutlich erkennt man aber, daß auch ohne diesen finalen Schritt mit einem Anteil von 35 % an der Gesamt-Produktmenge die Heteroduplex-Bildung nicht zu vernachlässigen ist (s. Abb. 3-11).

Die bisher verwendete Methode zur Analyse der nach QC-RT-PCR und spezifischer Restriktionsspaltung erhaltenen Spaltfragmente zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes mittels üblicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese und densitometrischer Auswertung liefert zwar sehr genaue Ergebnisse, hat aber prinzipiell einige Nachteile:

- ◆ die bei der Elektrophorese auftretende Joulesche Wärme kann nicht abgeleitet werden, daher kann, um eine Bandenverzerrung zu vermeiden, nur bei geringen Feldstärken gearbeitet werden, was die Elektrophoresedauer entsprechend verlängert;
- ◆ Es muß mit toxischen Substanzen wie z.B. Polyacrylamid und Ethidiumbromid gearbeitet werden;
- ◆ Sie erfordert einen hohen Arbeitsaufwand durch Gelgießen, Ethidiumbromid-Färbung und Entfärbung sowie die anschließende densitometrische Auswertung;
- ◆ Die densitometrische Analyse der gefärbten Gele ist kaum standardisierbar und beinhaltet daher verschiedene Fehlerquellen, da für jede Gelspur individuell der zu analysierende Bereich vom Experimentator nach mehr oder weniger subjektiven Kriterien festgelegt wird;

Insgesamt gesehen ist die klassische Gelelektrophorese sehr zeit- und arbeitsintensiv und somit für eine routinefähige Anwendung bei einem größeren Probendurchsatz nicht geeignet. Durch die Einführung von kapillarelektrophoretischen Techniken konnten diese Nachteile überwunden werden (Weinberger, 1993; Altria, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß die Trennung von DNA-Fragmenten im Längenbereich von 200 - 800 Bp, die üblicherweise zur Quantifizierung von RT-PCR und PCR-Produkten verwendet werden, mit einer hohen

Effizienz erfolgte (Schwartz & Ulfelder, 1992; Landers *et al.*, 1993). Insgesamt hat die in dieser Arbeit verwendete Kapillarelektrophorese-Apparatur ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* der Firma Applied Biosystems folgende Vorteile gegenüber einer herkömmlicher Gelelektrophorese:

- ◆ schnellere Trennzeiten durch höhere Feldstärken bei effizienter Wärmeableitung;
- ◆ *online*-Detektion der Proben;
- ◆ geringer Arbeitsaufwand, kein Gelgießen, Färben, Entfärben, keine densitometrische Auswertung;
- ◆ kein Hantieren mit toxischen (z.B. Acrylamid, EtBr) oder radioaktiven Substanzen.

Einige wenige Nachteile, wie z. B. das Fehlen der Möglichkeit zur präparativen Probensammlung und parallelen Trennung mehrerer Proben, können hingegen vernachlässigt werden, da sie für die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes nur eine geringe Bedeutung haben und die zuvor aufgeführten Vorteile bei weitem überwiegen. Eine weitere Vereinfachung im Hinblick auf einen hohen Probendurchsatz stellt das neue ABI PRISM 3100-Gerät dar, bei dem bereits 16 Kapillaren für parallele Analysen verwendet werden. Bei gegenläufigen Titrationsen im Bereich von 100 - 200 fM in die QC-RT-PCR eingesetzter RNA-Gesamtmenge sowie bei Titrationsen mit konstanter Menge an Wildtyp-RNA und variabler Menge an Standard-RNA war es möglich, mittels der kapillarelektrophoretischen Analyse die exakten *template*-Mengen mit einer Abweichung < 5 % zu bestimmen (s. Abb. 3-13, 3-14A). Sogar bei einer eingesetzten *template*-Konzentration von 40 fM *in-vitro*-Transkript konnte bis auf 8 % genau quantifiziert werden (s. Abb. 3-14B).

Im direkten Vergleich der beiden unterschiedlichen Quantifizierungsmethoden konnten anhand einer gegenläufigen Titrationsreihe nur geringfügige Unterschiede mit einer Abweichung von einem Prozentpunkt im Quantifizierungsergebnis festgestellt werden (densitometrischer Äquivalenzpunkt: 52 %, kapillarelektrophoretischer: 53 %). Dies zeigt, daß prinzipiell beide Methoden zur exakten Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes gleich gut geeignet sind. Aufgrund der oben aufgeführten Vorteile ist die Quantifizierung mittels Kapillarelektrophorese in der Routineanalytik gegenüber der konventionellen PAGE zu bevorzugen. Die Methode der kapillarelektrophoretischen Auftrennung, Detektion und Analyse von doppelsträngigen DNA-Fragmenten wird bereits wegen ihres hohen Potentials zur Automatisierung von Routineanalysen für die unterschiedlichsten Fragestellungen verwendet (Gelfi *et al.*, 1994; Nesi *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1995; Heller, 1995; Fasco *et al.*, 1995) und teilweise auch zur Quantifizierung bestimmter *targets* genutzt (Kolesar *et al.*, 1995; Caussé *et al.*, 1997). Für die Diagnose des *BCR/ABL*-Transkriptes in

CML-Patienten wurde die kapillarlektrophoretische Auftrennung der generierten PCR-Produkte zunächst nur zum Nachweis des Transkriptes verwendet (Kearney & Aumatell, 1997).

### *Vergleich zur Literatur*

Parallel zu der hier entwickelten Methode wurden auch andere, auf der quantitativen kompetitiven PCR basierende Verfahren zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes entwickelt. Da es sich bei den Publikationen zu diesem Thema aber ausschließlich um medizinisch-orientierte Veröffentlichungen verschiedener Kliniken handelt und hierbei der Schwerpunkt der Arbeiten auf der Analyse klinischer Daten, wie z. B. Patienten-Daten, Krankheitsstadium und Behandlungsmethoden, liegt, wird in der Literatur nur in den seltensten Fällen intensiver auf die verwendeten Detektions- bzw. Quantifizierungs-Methoden eingegangen. Dies erschwert die Diskussion und den direkten Vergleich zu der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode der Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wird zumeist eine Zwei-Schritt-*nested*-RT-PCR bevorzugt, bei der nach erfolgter Reverser Transkription zunächst eine qualitative PCR ohne Kompetitor durchgeführt wird und im Anschluß eine quantitative kompetitive PCR (Hochhaus *et al.*, 1996B, C, 1997B, 1998, 2000; Corsetti *et al.*, 1999, 2000; Nagel *et al.*, 1996). Hierbei wird die erste PCR oftmals genutzt, um die Translokationsvariante des jeweiligen Patienten zu bestimmen, um in der nachfolgenden QC-PCR den der Translokationsvariante entsprechenden Kompetitor zu verwenden (Martinelli *et al.*, 1998, 2000A, B). Als Kompetitor werden üblicherweise linearisierte Plasmide verwendet. So verwenden Nagel *et al.* (1996) als Kompetitor ein linearisiertes Plasmid mit einer inklonierten b3a2-Sequenz, die jedoch durch Insertion einer heterologen Sequenz einen Längenunterschied von 97 Bp (b3a2) bzw. 172 Bp (b2a2) zwischen Standard- und Wildtyp-PCR-Produkt aufweist, bei PCR-Produkt-Längen zwischen 532/457 Bp für die erste PCR und 460/385 Bp für die *nested*-PCR. Da die anschließende Detektion und Quantifizierung auf EtBr-gefärbten Agarosegelen erfolgt, ist für jedes quantifizierte PCR-Produkt ein spezifischer längenabhängiger Faktor nötig, um eine möglichst genaue Quantifizierung der *BCR/ABL*-Transkript-Kopienzahlen zu erhalten. Diese Arbeit weist also prinzipiell einige Nachteile auf, wie keine gleiche Amplifikationseffizienzen durch einen großen Längenunterschied zwischen Kompetitor- und target-Sequenz, und keine Standardisierung des RT-Schrittes, da wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, erhebliche Unterschiede in der Sensitivität zwischen Amplifikation von DNA und RNA auftreten.

In der Arbeit von Bortolin & Christopoulos (1996) wird zwar, im Gegensatz zu den meisten anderen vorliegenden Publikationen, ebenfalls ein *in-vitro*-Transkript als Standard verwendet, dieses weist aber durch den Austausch von 26 Bp in der *BCR/ABL*-Fusionsregion einen deutlichen Sequenzunterschied gegenüber der Wildtyp-Sequenz auf. Diese 26 Bp-Sequenz wird durch Einsatz spezifischer Sonden zur Unterscheidung zwischen Standard- und Wildtyp-Sequenz genutzt. Nach Reverser Transkription und anschließender PCR mit *Taq* DNA-Polymerase erfolgt die Quantifizierung auf einer Microtiterplatte, an die die spezifischen DIG-markierten Hybridisierungs sonden gekoppelt sind. Die letztendliche Detektion von Terbium ( $Tb^{3+}$ ), welches über Chelatstrukturen an die Sonden gebunden vorliegt, erfolgt nach mehreren Kopplungs- und Waschschr itten mittels zeitaufgelöster Fluoreszenz. Es werden allerdings bei gleichen eingesetzten Mengen an Wildtyp- und Standard-PCR-Produkt keine gleichen Fluoreszenzausbeuten erhalten, so daß ein Korrekturfaktor zur Berechnung möglichst exakter Kopienzahlen herangezogen werden muß.

Ebenfalls ein *in-vitro*-Transkript wird von Nogva *et al.* (1998) als Kompetitor verwendet, die zudem als einzige zur Quantifizierung eine Ein-Schritt-RT-PCR mit *Tth* DNA-Polymerase durchführen. Für die im Anschluß an die erste RT-PCR durchgeführte *nested*-PCR wird ebenfalls *Tth* DNA-Polymerase verwendet. Die generierten *in-vitro*-Transkripte, spezifisch für b3a2 und b2a2, werden jeweils für die andere Translokationsvariante als Kompetitor verwendet. Das heißt, nach der ersten RT-PCR wird die Translokationsvariante des Patienten bestimmt, z. B. b3a2, so daß als Kompetitor für die *nested*-PCR das b2a2-*in-vitro*-Transkript zugegeben wird. Eine Titration des Standards wird im Bereich von  $10^3$  -  $10^8$  Molekülen *in-vitro*-Transkript durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgt durch Abschätzen der auf einem EtBr-gefärbten Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte. Es erfolgt weder eine densitometrische Auswertung der Daten, noch fließt der längenabhängige Unterschied der Fluoreszenzintensität zwischen Kompetitor und *target*-Sequenz in die Quantifizierung mit ein. Im Gegensatz zu EtBr trägt jedes markierte DNA-Fragment ein FAM-Label und somit ist bei kapillarelektrophoretischer Auftrennung die Fluoreszenz direkt proportional zur molaren Menge.

Üblicherweise erfolgt die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes durch Auftrennung der PCR-Produkte auf analytischen Agarosegelen. Eine Ausnahme stellen die Arbeiten von Martinelli *et al.* (1998, 2000A, B) dar, bei denen die Quantifizierung mittels kapillarelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt. Sie stellen in ihren Arbeiten fest, daß die Verwendung von kapillarelektrophoretischen Techniken als nicht-radioaktive Methode sowohl geeignet ist, das Vorhandensein des *BCR/ABL*-Transkriptes in

Patienten-Proben nachzuweisen, als auch eine Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes anhand von QC-RT-PCR-Produkten durchzuführen. Nach Generierung von cDNA durch reverse Transkription folgt zunächst eine qualitative PCR zur Bestimmung der Translokationsvariante und erst im Anschluß die eigentliche QC-PCR, da die Kompetitoren spezifisch für die Varianten b3a2 und b2a2 sind. Es handelt sich dabei um linearisierte Plasmide, die durch Insertion einer heterologen Sequenz einen Längenunterschied von 75 Bp gegenüber der Wildtyp-*BCR/ABL*-Sequenz aufweisen. Die in der QC-PCR generierten PCR-Produkte haben eine Länge von 313 bzw. 388 Bp. Es wird hierbei ebenfalls zur Bestimmung der exakten *BCR/ABL*-Transkript-Kopienzahlen ein längendifferenz-spezifischer Korrekturfaktor benötigt, um Unterschiede in der Quantifizierung zwischen Standard und *target* auszugleichen.

Die Mehrzahl der Publikationen beschäftigt sich mit der medizinischen Bedeutung dieser Methoden für die Verlaufskontrolle von CML-Patienten. So finden Lin *et al.* (1996), daß die Quantifizierung der *BCR/ABL*-Transkripte mittels QC-RT-PCR nach KMT unabdingbar ist, um einen Rückfall gezielt vorhersagen zu können. Sie finden außerdem Hinweise, daß eine kurze Zeit zwischen der Verdopplung der nachgewiesenen Transkriptkopienzahlen auf einen aggressiven Verlauf der Krankheit hindeutet. Hochhaus *et al.* (1998) bestätigen diese Ergebnisse für die Verlaufskontrolle von CML-Patienten nach KMT und stellen ebenfalls fest, daß die Detektion des *BCR/ABL*-Transkriptes möglich ist, bevor die Krankheit erneut ausbricht. Zudem untersuchen sie den klinischen Verlauf von CML-Patienten während einer Interferon-alpha-Therapie und konstatieren, daß eine RT-PCR mit interner Kontrolle auch hier eine zuverlässige Methode zur Verlaufskontrolle darstellt. Außerdem ist diese Methode geeignet, die Häufigkeit der zytogenetischen Untersuchungen und somit der für den Patienten unangenehmen Knochenmarkbiopsien zu verringern (Hochhaus *et al.*, 1996B, C, 1997B). Moravcova *et al.* (1998) stellen ebenfalls fest, daß die QC-RT-PCR die einzige Methode ist, welche sensitiv genug ist, um *minimal residual disease* durch Verlaufskontrollen in CML-Patienten nachzuweisen. Corsetti *et al.* (2000) finden durch die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes mittels QC-RT-PCR eine strenge Korrelation zwischen zytogenetischer Antwort auf die Therapie mittels autologer Stammzelltransplantation und der Anzahl an gemessenen *BCR/ABL*-Transkriptkopienzahlen im peripheren Blut.

Insgesamt gesehen ist also die Quantitative kompetitive RT-PCR eine empfehlenswerte Methode, um Verlaufskontrollen in CML-Patienten durchzuführen. Allerdings lassen die Durchführung der QC-RT-PCR sowie die jeweiligen methodischen Ansätze zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes durchaus noch Verbesserungen zu.

Daher wurde bei der in dieser Arbeit entwickelten QC-RT-PCR-Methode zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes besonderer Wert auf die Routinefähigkeit dieser Methode gelegt:

- ◆ es wurde durch die Verwendung einer Ein-Schritt-RT-PCR nicht nur eine einfachere Handhabung erlaubt, sondern zudem noch das Kontaminationsrisiko deutlich verringert;
- ◆ es wurde eine RT-PCR etabliert, die ohne die Notwendigkeit einer *nested*-PCR auskommt, dabei aber eine vergleichbare Sensitivität gewährleistet;
- ◆ da es keinen Längenunterschied zwischen Standard- und *target*-Sequenz gibt und sich zudem der Sequenzunterschied auf lediglich 2Bp beschränkt, handelt es sich bei dem gewählten Kompetitor um einen idealen Standard;
- ◆ dies ist eine Voraussetzung dafür, daß eine exakte Quantifizierung ohne Einbeziehung eines zusätzlichen Umrechnungs-Faktors möglich ist;
- ◆ zusätzlich, neben der densitometrischen Quantifizierung der spezifischen Spaltprodukte, wurde zudem nachgewiesen, daß die Quantifizierung mittels kapillarelektrophoretischer Auftrennung und LIF-Detektion der fluoreszenz-markierten Spaltprodukte bei exakt gleichen Quantifizierungsergebnissen eine noch schnellere und einfachere Handhabung erlaubt und somit einen weiteren Schritt in Richtung Automatisierung der Routinediagnostik darstellt.

Neben all diesen zuvor genannten Vorteilen der QC-RT-PCR zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes sind aber auch einige nicht zu vernachlässigende Nachteile der Methode zu nennen:

- ◆ zur Erstellung einer Titrationsreihe werden große Probenmengen benötigt. Diese stehen oftmals nicht zur Verfügung, so z. B. bei Quantifizierung des Transkriptes in RNA-Isolaten aus Knochenmarkaspirat.
- ◆ Zudem reicht eine einzelne Titration zur Quantifizierung unter Umständen nicht aus, da es keinen Anhaltspunkt über die tatsächliche Menge an *BCR/ABL*-Transkript gibt und somit der Äquivalenzpunkt außerhalb des gewählten Titrationsbereiches liegen kann. Somit wären mehrere Titrationsexperimente erforderlich. Zudem benötigt man zur exakten Quantifizierung eventuell zunächst eine Grob- und anschließend eine Feintitration.

Um die zuvor genannten Nachteile der QC-RT-PCR, die sich hauptsächlich aus der Durchführung von Titrationsreihen ergeben, zu vermeiden, war es erforderlich, statt einer internen Standardisierung eine externe Standardisierung zu etablieren. Diese Methode sollte allerdings den gleichen hohen Anforderungen genügen, die bereits durch die hier beschriebene Methode der QC-RT-PCR gelöst sind.

### 4.3 *real-time* PCR

Die *real-time*-PCR ist die neueste methodische Entwicklung zur Quantifizierung von DNA und RNA und hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Diese Technik wird bereits erfolgreich für verschiedenste *targets* verwendet, wie z. B. für die Quantifizierung der sogenannten "*viral load*" (Suryanarayana *et al.*, 1998) und die Expression von Cytokinen (Kruse *et al.*, 1997), wobei die Detektion fast ausschließlich mittels des TaqMan (ABI PRISM 7700) erfolgt, welches das erste Gerät auf dem Markt war, das die Durchführung einer *real-time* PCR ermöglichte. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes auf dem LightCycler entwickelt, einem noch relativ neuen Gerät, welches neben der *real-time* PCR zusätzlich eine *online*-Detektion der Proben erlaubt. Zudem können mehrere Detektionsformate für den LightCycler genutzt werden, wobei in dieser Arbeit nur der vom Hersteller empfohlene Fluorophor SYBR Green I sowie Fluorophor-markierte Hybridisierungs-Sonden verwendet wurden (s. 3.2.1). Da sich der LightCycler nicht nur durch sein Detektionssystem von konventionellen Thermocyclern unterscheidet, sondern zudem die Durchführung einer *rapid*-PCR erlaubt, indem ein schneller Temperaturtransfer in das Reaktionsvolumen ermöglicht wird, muß, insbesondere bedingt durch die Verwendung von Glaskapillaren, die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze modifiziert werden (Wittwer *et al.*, 1997).

#### *Verwendung verschiedener RT-PCR-Systeme auf dem LightCycler*

Es wurde das für die QC-RT-PCR optimierte Protokoll zur Durchführung einer RT-PCR mit dem Titan One-Tube RT-PCR System nach den Angaben von Wittwer *et al.* (1997) entsprechend den besonderen Anforderungen der LightCycler-PCR verändert und zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes mittels RT-PCR auf dem LightCycler eingesetzt. Zur Detektion wurde der dsDNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Da mit diesem Farbstoff nicht nur das spezifische RT-PCR-Produkt, sondern jede Form doppelsträngiger DNA detektiert wird, stellte die Bildung und Amplifikation von Primerdimeren (s. 3.2.2) das größte Problem im Hinblick auf die Sensitivität der Reaktion dar. Bei der Verwendung von fluorophormarkierten Hybridisierungs-sonden werden entstandene Primerdimere zwar nicht detektiert, können aber trotzdem z. B. bei der Amplifikation von geringen Kopienzahlen zu fehlerhaften Bestimmungen führen, da sie zu einer Verringerung der Sensitivität beitragen.

Um dieses Problem der Primerdimerbildung zu umgehen und eine möglichst große Sensitivität zu erreichen, wurden sowohl eine Zwei-Schritt RT-PCR als auch verschiedene



Ein-Schritt RT-PCR-Systeme im Vergleich getestet (s. 3.2.2). Der entscheidende Durchbruch gelang hier aber letztendlich erst nach Etablierung eines neuen Primersystems für die Amplifikation des *BCR/ABL*-Transkriptes und Verwendung des SuperScript II One Step RT-PCR Systems (s. 3.2.2.3). Zwar zeigten die  $C_T$ -Wert-Analysen des Zwei-Schritt RT-PCR-Protokolls (AMV, *Taq*) sowie des für den LightCycler empfohlenen RNA Amplification Kits, daß für die gleichen als *template* eingesetzten RNA-Standard-Mengen deutlich geringere  $C_T$ -Werte erzielt wurden als dies bei den anderen experimentellen Ansätzen (Titan-System, *Tth* DNA-Polymerase) der Fall war (s. Abb. 3-24). Dies läßt den Schluß zu, daß die Reverse Transkription in diesen beiden Fällen deutlich effizienter war, was bei der Durchführung des Zwei-Schritt-Protokolls an den von der Amplifikation getrennt erfolgten und somit unter optimalen Bedingungen für die Reverse Transkriptase (hier: AMV) durchgeführten RT-Schritt liegen kann. Diese bessere Effizienz des RT-Schrittes brachte aber weder eine Verringerung der Menge an entstandenen Primerdimeren noch konnte eine Verbesserung der Sensitivität erreicht werden. Eine wirkliche Verbesserung in beiderlei Hinsicht konnte erst durch die Verwendung des SuperScript One-Step RT-PCR Systems erreicht werden. Bei diesem System handelt es sich ebenfalls um ein Ein-Schritt RT-PCR-System mit einem Enzymgemisch aus SuperScript als Reverser Transkriptase und *Taq* DNA-Polymerase. SuperScript ist ein Derivat der MMLV-Reversen Transkriptase, bei der die RNaseH-Aktivität durch Mutation inaktiviert wurde. Da RNaseH die RNA in RNA/DNA-Hybriden spaltet, konnte durch diese Modifikation eine erhöhte Effizienz der cDNA-Synthese erreicht werden. Dies ist ebenfalls an den geringeren  $C_T$ -Werten für gleiche RNA-Konzentrationen ablesbar (s. Abb. 3-25). Eine Erhöhung der Sensitivität konnte bei Detektion mit SYBR Green I durch die Verschiebung des Detektionsmesspunktes von 72 °C auf 83 °C erreicht werden. Wie anhand von Schmelzkurven-Analysen ermittelt wurde, sind bei dieser erhöhten Temperatur die Primerdimere bereits aufgeschmolzen, so daß SYBR Green nicht mehr bindet und somit nur noch die spezifische Fluoreszenz des RT-PCR-Produktes detektiert wird. Durch die Verschiebung des Detektionsmesspunktes und Optimierung des SuperScript-Systems konnte generell mit beiden Detektionsmethoden eine Quantifizierung bis hinab zu 100 Kopien *BCR/ABL-in-vitro*-Transkript durchgeführt werden (s. Abb. 3-26).

Zu einer Verringerung der Mengen an Primerdimeren könnte das neue SuperScript-System beitragen, das jetzt mit einem *Taq*-Start-Antikörper erhältlich ist, so daß die *Taq* DNA-Polymerase keine Aktivität während des RT-Schrittes aufweist, sondern erst durch die hohe Denaturierungstemperatur (> 90 °C) des ersten PCR-Zyklus aktiviert wird.

### *Vergleich der beiden Detektionsformate SYBR Green I und HybProbes*

Prinzipiell haben beide Detektionsmethoden ihre Vor- und Nachteile:

- ◆ SYBR-Green:     - kostengünstigere Alternative;  
                      - Verwendung für ein etabliertes System;  
                      - Schmelzkurvenanalyse oder gelelektrophoretische Analyse zur Verifizierung der PCR-Produkte notwendig.
- ◆ HybProbes:     - teuer;  
                      - spezifische Produktdetektion;  
                      - keine weitere Produktanalyse erforderlich.

Zum Vergleich der beiden Detektionssysteme, SYBR Green I und HybProbes, wurden Quantifizierungen des *BCR/ABL*-Transkriptes in Gesamt-RNA, isoliert aus verschiedener Leukämie-spezifischer Zelllinien (K562, BV173, CML-T1) und dem peripheren Blut eines Leukämie-Patienten, vorgenommen. Die jeweiligen Quantifizierungs-Ergebnisse korrelierten gut miteinander (s. Tab. 3-1 u. 3-2), und die gefundenen unterschiedlichen Expressionsraten der jeweiligen Zelllinien stimmen mit denen in der Literatur überein (Eder *et al.*, 1999). Die maximale Abweichung zwischen den ermittelten *BCR/ABL*-Kopienzahlen beider Detektionsformate betrug für die Patienten-Probe 35 % (s. Tab. 3-2). Zur Bestimmung der Sensitivitätsgrenze jeden Detektionsformates wurde die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes in mRNA, isoliert aus K562-Zellen, durchgeführt. Auch hierbei zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Quantifizierungsergebnisse beider Detektionsvarianten, allerdings war mit HybProbes auch die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes in der mRNA einer einzigen Zelle (2 pg mRNA) möglich, wohingegen mit SYBR-Green kein Anstieg der Fluoreszenz zu detektieren war (s. Abb. 3-36).

Zusammengefaßt sind zwar beide in dieser Arbeit verwendeten Detektionsformate auf dem LightCycler geeignet, das *BCR/ABL*-Transkript sowohl in Gesamt-RNA als auch in mRNA zu quantifizieren. Allerdings weisen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse auf eine bevorzugte Verwendung von HybProbes, obwohl SYBR Green I durchaus für etablierte Systeme zur Quantifizierung eingesetzt werden kann wie z.B. Bohling *et al.* (1999) zeigen, die diese Art der Detektion zur Analyse einer anderen Translokation (*MBR/JH*-Fusionsgen) verwenden.

Bei der Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes in Gesamt-RNA aus verschiedenen Leukämie-Zelllinien war mit beiden Formaten der Nachweis von *BCR/ABL*-RNA-Mengen möglich, die der in einer Zelle enthaltenen Menge (20 pg Gesamt-RNA) entsprechen. Bei der Quantifizierung von mRNA aus der Zelllinie K562 ergab sich jedoch ein

Sensitivitätsunterschied, der gerade bei der genauen Analyse von Patientenproben nicht zu vernachlässigen ist. Daher kann die Entscheidung, welches Detektionsformat zur Analyse von Patienten-Proben gewählt wird, nur zu Gunsten einer Verwendung von HybProbes ausfallen, vor allem auch im Hinblick auf die hohe Spezifität der Detektion, die mit SYBR Green nicht gewährleistet ist.

### ***Vergleich DNA-RNA***

Eine gute Reproduzierbarkeit einer RNA-Standardreihe zu gewährleisten, ist aufwendiger und erfordert größere Vorsichtsmaßnahmen, als dies für eine DNA-Standardreihe der Fall wäre, da bei letzterem weder ein RNA-Abbau durch RNasen noch Degradation durch mehrmaliges Auftauen/Einfrieren eine größere Rolle spielen. Wahrscheinlich wird aus diesen Gründen in vielen Publikationen (Cross *et al.*, 1993; Hochhaus *et al.*, 2000; Malinge *et al.*, 1992) für die RT-PCR die Verwendung von DNA-Standards beschrieben. Daher wurde in dieser Arbeit überprüft, ob sich ein DNA-Standard zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes prinzipiell eignet (s. 3.2.5). Zu diesem Zweck wurden Verdünnungsreihen sowohl des *supercoiled* als auch linearisierten Plasmides pBSBA7 (s. 2.2.4), das eine inserierte b3a2-Sequenz aufweist, verwendet. Außerdem wurde mit den Vektor-spezifischen Primern das einklonierte b3a2-Fragment amplifiziert und das generierte PCR-Produkt als Standard verwendet. Für beide Standardverdünnungsreihen, mit  $1.2 \times 10^8$  bis  $1.2 \times 10^0$  als *template* eingesetzter Kopien linearisierten Plasmids bzw. PCR-Produkts, konnten identische Ergebnisse erzielt werden (s. Abb. 3-37B u. 3-38A). Eine Quantifizierung ist in beiden Fällen über einen Bereich von 7 Größenordnungen möglich. Die Amplifikation einer Standardreihe von *supercoiled* Plasmid wurde hingegen um den Faktor 10 schlechter amplifiziert, obwohl gleiche initiale Kopienzahlen als *template* in die PCR eingesetzt wurden (s. Abb.3-37A). Die Ursache hierfür nur in der *supercoiled*-Struktur begründet liegen, da das linearisierte Plasmid mit der gleichen Effizienz wie das PCR-Produkt amplifiziert wurde. Bedingt durch diese Struktur können die Stränge beim Schmelzen nicht völlig auseinandergehen und sich räumlich trennen, was zu einer bevorzugten *template*-Rehybridisierung führt.

Noch deutlichere Unterschiede zeigten sich beim Vergleich der Amplifikation von DNA und RNA. Es wurden gleiche initiale Kopienzahlen einerseits des linearisierten Plasmides, andererseits des *BCR/ABL-in-vitro*-Transkriptes eingesetzt und im LightCycler unter gleichen Bedingungen mit dem SuperScript-System amplifiziert, um mögliche Unterschiede der Amplifikationseffizienzen zwischen *Taq* DNA-Polymerase und dem SuperScript-System auszuschließen. Der experimentell ermittelte Unterschied der  $C_T$ -Werte betrug zwischen den

beiden Standardreihen bei gleichen Kopienzahlen 9 Zyklen (s. Abb. 3-40). Dies bedeutet, daß die RNA-Standardreihe um ungefähr den Faktor 500 schlechter amplifiziert wird als die DNA-Standardreihe. Ursache hierfür können einerseits stabile Sekundärstrukturen in der RNA sein, wahrscheinlicher ist jedoch die schlechte Effizienz der Reversen Transkription. Dies bedeutet, daß, gleichgültig worin genau nun die Ursachen für diese Ineffizienz liegen mögen, für eine exakte Quantifizierung von RNA nur ein RNA-Standard geeignet ist. Denn nur bei Verwendung eines auf RNA basierenden Standards gehen RNA-Stabilität und Effizienz des RT-Schrittes in die Quantifizierung mit ein.

Es gibt zwar auch Ansätze, die für die CML typische t(9;22)-Translokation auf DNA-Ebene mittels einer *long-template*-PCR nachzuweisen, um einerseits die Einflüsse der Transkriptionseffizienz des Fusionsgens zu umgehen und ruhende Klone zu detektieren bzw. um den Nachweis der Translokation bei unbekanntem Transkript-Varianten zu führen (Waller *et al.*, 1999). Dabei werden PCR-Produkte mit einer Länge von bis zu 19 kbp generiert. Es handelt sich hierbei um einen qualitativen Test, der insbesondere wegen einer schlechten Reproduzierbarkeit nicht für eine Verwendung in der Routine-Analytik geeignet ist.

#### ***Quantifizierungsvergleich zwischen QC-RT-PCR und LightCycler-RT-PCR***

Um entscheiden zu können, welche Quantifizierungsmethode letztendlich besser zum Nachweis von *minimal residual disease* geeignet ist, mußte zunächst die Frage beantwortet werden, ob beide Methoden überhaupt vergleichbare Ergebnisse bei der Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes liefern. Der dabei entscheidende Faktor ist natürlich, ob eine externe Standardisierung wie sie auf dem LightCycler verwendet wird, wirklich eine interne Standardisierung, wie sie bei der QC-RT-PCR genutzt wird, ersetzen kann. Daher wurden die *BCR/ABL*-Transkriptmengen mit beiden Methoden in isolierter Gesamt-RNA aus den Leukämiezelllinien K562, BV173 und CML-T1 quantifiziert (s. 3.2.6). Beide Methoden lieferten exakt die gleichen Quantifizierungsergebnisse für alle drei Zelllinien. Dies bedeutet, daß bei diesem in dieser Arbeit etablierten System eine interne Standardisierung durch eine externe ersetzt werden kann. Außerdem werden die beiden Translokationsvarianten b3a2 (K562-Zellen) und b2a2 (BV173-, CML-T1-Zellen) mit der gleichen Effizienz amplifiziert wie der b3a2-Standard, obwohl ein Längenunterschied von 75 Bp besteht.

Dieses Ergebnis ist deshalb besonders wichtig, da eine externe Standardisierung Nachteile hinsichtlich Berücksichtigung des Effektes eingeschleppter Inhibitoren birgt, die sich nur bei interner Standardisierung auf Standard und Probe gleichermaßen auswirken. Hier konnte

aber erstmals gezeigt werden, daß bei der hier angewendeten und für beide Systeme gleichen Probenvorbereitung auch gleiche Ergebnisse erzielt werden.

### ***Vergleich zu aktuellen real-time Quantifizierungsmethoden für die CML***

Neben der in dieser Arbeit entwickelten Methode der quantitativen *real-time* RT-PCR wurden von anderen Gruppen parallel ebenfalls auf *real-time* PCR basierende Methoden zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes entwickelt. In den meisten dieser Publikationen wird als *real-time* PCR-Gerät der TaqMan (ABI PRISM TM 7700 *Sequence Detection System*) verwendet (Barbany *et al.*, 2000; Branford *et al.*, 1999; Eder *et al.*, 1999; Mensink *et al.*, 1998; Preudhomme *et al.*, 1999) und nur in wenigen Arbeiten der LightCycler (Emig *et al.*, 1999; Wittor *et al.*, 2000). Der Grund hierfür ist, daß der TaqMan das erste System war, welches das Prinzip der quantitativen *real-time* PCR verwirklicht hat und daher eine Vorreiterstellung auf dem Markt hat. Der TaqMan verwendet als Detektionsformat doppelt-fluoreszenz-markierte Hydrolyse-Sonden, die unter dem Namen TaqMan-Sonden besser bekannt sind. Mit Hilfe der 5'-Nuklease-Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase wird durch Sondenhydrolyse der Fluorophor freigesetzt und kann detektiert werden (Holland *et al.*, 1991; Heid *et al.*, 1996). Diese Sondenhydrolyse findet, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, auch bei den auf dem LightCycler verwendeten HybProbes statt. Dieser Sondenabbau während der PCR stellt aber im Fall der LightCycler-Detektion kein Problem dar, da sie in großem Überschuß in die Reaktion eingesetzt werden und dieser Abbau nur bei hohen *template*-Konzentrationen bzw. hoher Anzahl PCR-Zyklen in der Plateauphase nachweisbar war. Bei geringen *template*-Mengen fand kein nachweisbarer Abbau der HybProbes statt (s. Abb. 3-31). Dies bedeutet aber für die Detektion mittels TaqMan-Sonden, daß der Abbau der TaqMan-Sonden in größerem Maße stattfinden muß, da sonst bei geringen *template*-Mengen die Menge an freigesetztem Fluorophor nicht mehr ausreicht, um zu einem auswertbaren Fluoreszenzsignal zu führen. Eine weitere Einschränkung des TaqMan ist die Vorgabe des Herstellers, die Länge der zu generierenden PCR-Produkte auf 50 - 150 Bp zu beschränken. Dies bedeutet z. B. für die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionsgens, daß, wenn man sich an diesem vorgegebenen Rahmen orientiert, für die beiden Translokationsvarianten b2a2 und b3a2 aufgrund des Längenunterschiedes von 75 Bp verschiedene Primersysteme etabliert werden müssen (Branford *et al.*, 1999). Ein großer Vorteil des TaqMan-Gerätes gegenüber dem LightCycler ist allerdings die große Probenkapazität, die durch die Verwendung von Mikrotiterplatten gewährleistet wird. Nachteil dieses Formates ist aber die Verwendung konventioneller Peltier-Elemente, so daß

keine schnelle Wärmeübertragung gewährleistet ist und somit keine *rapid*-PCR durchgeführt werden kann. Die Durchführung einer *rapid*-PCR bietet nicht nur einen großen Zeitvorteil, sondern durch Minimierung der Denaturierungs- und Annealing-Zeiten wird zudem die Spezifität erhöht und die PCR-Produkt-Ausbeute verbessert (Wittwer *et al.*, 1997B).

Insgesamt gesehen ist aber die quantitative *real-time* RT-PCR, unabhängig vom Detektionsformat, sehr gut geeignet, exakte Quantifizierungen des *BCR/ABL*-Transkriptes durchzuführen. Mensink *et al.* (1998) waren die ersten, die eine Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionstranskriptes mittels *real-time* RT-PCR auf dem TaqMan durchführten. Allerdings wurde auch in dieser Arbeit, wie auch bei den meisten anderen Publikationen zur *real-time* RT-PCR, in der Regel eine Zwei-Schritt RT-PCR durchgeführt (Barbany *et al.*, 2000; Branford *et al.*, 1999; Eder *et al.*, 1999; Emig *et al.*, 1999; Wittor *et al.*, 2000). Eine Ausnahme bildet hier die Arbeit von Preudhomme *et al.* (1999), die eine Ein-Schritt RT-PCR vorstellt. Allerdings verwenden sie kein kommerziell erhältliches Ein-Schritt RT-PCR-System, sondern mischen jeden einzelnen Pufferbestandteil in den von ihnen bestimmten optimalen Konzentrationen zusammen und geben MMLV als Reverse Transkriptase und *AmpliTaq-Gold*, eine *Taq* DNA-Polymerase, die mittels *hot start* aktiviert wird, zu. Dies ist natürlich bei Verwendung dieser Methode als Routineanalytik sehr aufwendig und umständlich, und kann nach der hier gewonnenen Erfahrung im Umgang mit dieser Polymerase-Variante auf dem LightCycler nicht effektiv genutzt werden: In hier nicht dargestellten Experimenten wurde ebenfalls der Einsatz der *AmpliTaq-Gold* zur Amplifikation auf dem LightCycler untersucht. Dabei wurden aber erst nach einer sehr langen Denaturierungsphase eine ausreichende Aktivität der DNA-Polymerase erzielt. Dies ist dadurch zu erklären, daß bei einem herkömmlichen Thermocycler oder aber auch wie in dem von Preudhomme *et al.* (1999) verwendeten TaqMan-Gerät eine weitere Aktivierung der Polymerase jeweils in der Denaturierungsphase eines jeden Zyklus stattfindet. Im LightCycler hingegen sind diese Denaturierungsphasen so kurz (1 s 95 °C), daß sie nicht ausreichen, die *AmpliTaq-Gold* wirkungsvoll zu aktivieren.

Auch bezüglich der Standardisierung gab es erhebliche Unterschiede, so verwenden Barbany *et al.* (2000) linearisierte Plasmide, Branford *et al.* (1999) und Emig *et al.* (1999) verwenden jeweils *supercoiled* Plasmide. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit belegen aber eindeutig, daß Plasmide generell nicht geeignet sind, als Standard für eine RT-PCR zu fungieren, hingegen stellt die Verwendung der bei Eder *et al.* (1999) sowie Mensink *et al.* (1998) beschriebenen cDNA-Verdünnungsreihen aus K562-Zellen eine durchaus praktikable Lösung für eine Zwei-Schritt RT-PCR dar, obwohl eine Variabilität der *BCR/ABL*-

Transkriptmenge je nach Zellkultur und Charge, wie sich auch hier zeigen ließ, auftreten kann. Es müssen zudem gleiche Probenvorbereitung sowie einheitliche Durchführung der Reversen Transkription gewährleistet sein. Die Verwendung eines *in-vitro*-Transkriptes findet sich nur bei Wittor *et al.* (2000), hier wird allerdings keine *BCR/ABL*-Sequenz, sondern die *G6PDH*-Sequenz verwendet. Das *G6PDH*-Transkript dient in diesem Versuchsansatz als Kontrollsequenz für die Analyse von Patienten-Proben. Es wird allerdings nicht dargestellt, ob beide Sequenzen, *BCR/ABL* und *G6PDH*, wirklich mit identischer Effizienz amplifiziert werden und gleiche Kurvenverläufe aufweisen, denn nur dann ist, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde eine exakte Quantifizierung möglich. Da aber prinzipiell auch für das *G6PDH*-Transkript keine *template*-Kopienzahlen genannt werden, ist ohnehin nur eine relative Quantifizierung und somit nur eine semi-quantitative Auswertung möglich.

Auch die in den Arbeiten angegebenen Sensitivitätsgrenzen, die durch Spiking-Experimente ermittelt wurden, zeigten eine größere Streuung. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Sensitivität mit einem Nachweis von einer K562-Zelle in maximal  $10^5$  normalen Zellen (s. Abb. 3-44) ist vergleichbar mit der von Barbany *et al.* (2000), die ebenfalls eine K562-Zelle vor einem Hintergrund von  $10^5$  normalen Zellen nachweist, dies allerdings nur in 50 % der Fälle. Ebenfalls in dieser Größenordnung liegen die Nachweisgrenzen von Branford *et al.* (1999), Mensink *et al.* (1998) und Wittor *et al.* (2000) mit dem Nachweis von einer K562- in  $10^5$  HL60-Zellen. Abweichend davon betrug die Nachweisgrenze bei Preudhomm *et al.* (1999) eine K562-Zelle in  $10^4$  HL-60 Zellen, bei Emig *et al.* (1999) sogar eine BV173-Zelle in  $10^6$  HL60-Zellen sowie eine K562-Zelle in  $10^7$  HL60-Zellen. Auffällig ist allerdings, daß zu diesen Spiking-Experimenten weder die Versuchsanordnung noch die experimentell gewonnenen Daten gezeigt werden.

Ähnlich unterschiedlich fallen die ermittelten Daten zur Reproduzierbarkeit der Methoden aus. Ein Vergleich ist hier aber prinzipiell deutlich schwieriger als bei den Daten zur Bestimmung der Sensitivitätsgrenze, da es hier keine einheitliche Versuchsanordnung gibt.

- ◆ So finden Branford *et al.* (1999) eine Intraassay-Varianz von 24 % sowie eine Interassay-Varianz von 48 %.
- ◆ Barbany *et al.* (2000) finden eine Interassay-Varianz von 4 - 6 % für die Plasmid-Standards über 4 - 5 Größenordnungen, aber eine Varianz der Proben von 20 - 40 %.
- ◆ Ähnlich groß sind die Abweichungen bei Eder *et al.* (1999) mit einer Varianz von 30 % bei Quantifizierung der gleichen Probe im Doppelansatz in zwei verschiedenen PCR-Reaktionen.

- ◆ Emig *et al.* (1999) testet die Reproduzierbarkeit nur mit Plasmidmolekülen und erhält bei 20 identischen Proben mit 500 Plasmidmolekülen eine Varianz von 18 % und bei 20 identischen Proben in 20 Läufen an 20 Tagen eine Abweichung von 17 %.
- ◆ Mensink *et al.* (1998) analysierten 10 identische Proben und ermittelten eine Variation von 15 %.

Verglichen damit wurden in der vorliegenden Arbeit eingehendere und umfangreichere Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit vorgenommen, in denen sowohl die Intraassay-Varianz durch Mehrfachansätze verschiedener RNA-Konzentrationen bestimmt wurde, als auch eine Interassay-Varianz, die bei gleicher Versuchsanordnung dieses Experiments durch Wiederholung an vier verschiedenen Tagen bestimmt wurde. Es wurde eine durchschnittliche Interassay-Varianz von 10 % (8.1 - 14.5 %) ermittelt und eine Intraassayvarianz von maximal 5.6 % für die größte Menge an eingesetztem *template* (40 ng K562-RNA) und maximal 30.3 % für die geringste Menge *template* (400 pg K562-RNA) bei Verwendung von drei verschiedenen Quantifizierungsmethoden.

Insgesamt ist also die in dieser Arbeit entwickelte *real-time* RT-PCR im Vergleich mit aktuellen Publikationen hinsichtlich der guten, hier erstmals systematisch analysierten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, der Sensitivität des Nachweises einer einzelnen Leukämiezellen vor einem Hintergrund von  $10^5$  normalen Zellen und zudem einem hier erstmals gegebenen linearen Meßbereich über 6 Größenordnungen eine Methode, die bestens zur exakten Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes geeignet ist.

## 4.4 Untersuchung von Patientenproben

### *Kontrolltranskript*

Die Qualität der RNA, die unter anderem bedingt durch Degradation, Ausbeute, Salzgehalt, evtl. DNA-Verunreinigungen nach Aufreinigung keine einheitliche Güte aufweist, stellt einen entscheidenden Faktor für Sensitivität und Zuverlässigkeit von Quantifizierungen dar. Um aber solche Schwankungen in der Qualität der RNA auszuschliessen und zudem bei *BCR/ABL*-Negativität eine Positivkontrolle zu haben, wird ein sogenanntes *housekeeping*-Gen bzw. dessen Transkript als Kontrollsequenz mitamplifiziert. In der Literatur werden zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes unterschiedliche Kontrolltranskripte wie *ABL* (Corsetti *et al.*, 2000; Emig *et al.*, 1999; Hochhaus *et al.*, 2000; Preudhomme *et al.*, 1999), *BCR* (Branford *et al.* 1999), *GAPDH* (Barbany *et al.*, 2000; Eder *et al.*, 1999), *PBDG* (Mensink *et al.*, 1998; Nagel *et al.*, 1996), *b-Aktin* (Bianchi *et al.*, 1995; Lion *et al.*, 1993) und



*G6PDH* (Wittor *et al.*, 2000) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Eignung von *GAPDH* als Kontrolltranskript für die *BCR/ABL*-Analytik untersucht, da hierzu bereits ein bestehendes Primer- und Sonden-System unseres Kooperationspartners der Uniklinik Essen zur Verfügung stand. Der Vergleich der beiden Standardreihen, bestehend aus Verdünnungen von *BCR/ABL*- und *GAPDH-in-vitro*-Transkript (s. Abb. 3-48), zeigt zwar, daß gleiche initiale *template*-Mengen eingesetzt wurden, aber der Verlauf der Amplifikationskurven durch höhere Fluoreszenz-Signale während der *GAPDH*-Amplifikation deutlich unterschiedlich ist. Somit wäre eine Quantifizierung beider Gene anhand von einer Standardverdünnungsreihe nicht möglich. Da dies jedoch aufgrund der begrenzten Kapazität des Probenkarussells (32 Probenpositionen) wünschenswert wäre, wurde das Transkript eines zweiten Kontrollgens, *PBDG*, im Vergleich zum *BCR/ABL*-Standard getestet. Hier zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der Amplifikationseigenschaften beider Standardverdünnungsreihen, so daß prinzipiell für eine exakte Quantifizierung beider Transkripte nur eine Standardverdünnungsreihe als externer Standard erforderlich ist (s. Abb. 3-49). Ein weiterer Vorteil von *PBDG* gegenüber anderen Kontrollsequenzen besteht darin, daß für dieses Gen keine Pseudogene nachweisbar sind (Finke *et al.*, 1993), im Gegensatz z. B. zu *GAPDH* (Garcia-Meunier *et al.*, 1993; Hanauer & Mandel, 1984) und *b-Aktin* (Ng *et al.* 1985). Pseudogene sind zwar nicht-funktionsfähige Kopien des codierenden Anteils eines Gens, sind aber in Form von genomischer DNA amplifizierbar. Da diese Amplifikate unter Umständen nicht von denen der amplifizierten RNA unterschieden werden können, verfälschen sie somit das Quantifizierungsergebnis bzw. führen zu falsch-positiven Ergebnissen. Daher eignen sich solche Gene bzw. deren mRNA generell nicht zur Verwendung als Kontrollsequenz für exakte Quantifizierungen. Ein weiterer Faktor, der für die Wahl der *PBDG*-RNA als Kontrolltranskript spricht, ist die geringe *PBGD*-Expression, wodurch prinzipiell bereits hohe Ansprüche an die Qualität der RNA gesetzt werden, im Gegensatz zur Verwendung von z. B. *G6PDH*, für das Emig *et al.* (1999) nachweisen konnten, daß die Expression von *G6PDH* im Mittel um den Faktor 1.5 höher liegt als die von *ABL*. *ABL*-RNA wird besonders häufig als Kontrolle verwendet, da durch Verwendung nur eines weiteren Primers innerhalb der *ABL*-Sequenz die Analyse von *ABL* und *BCR/ABL* möglich ist. Allerdings ist *ABL* nicht unumstritten, da dessen Expression nach neueren Erkenntnissen bei Leukämien hochreguliert wird und somit je nach Krankheitsphase mit unterschiedlichen Expressionsraten bzw. zellulären Transkriptmengen gerechnet werden muss (lt. persönlicher Mitteilung von Prof. Dr. A. Neubauer, Leiter der Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinik Marburg).

### *Analyse von Patienten-Proben*

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode wurde anschließend durch Analyse von unterschiedlichen Patienten-Proben auf ihre Tauglichkeit für die Routine-Analytik getestet. Bei diesen Patienten-Proben handelte es sich um archivierte, bei -70 °C gelagerte vitale Zellen und isolierte RNA, um frisch entnommene Blutproben sowie um RNA-Isolate aus Knochenmarkbiopsien isolierte RNA der Universitätskliniken Giessen und Essen. Insgesamt wurden 80 Proben untersucht, von denen in 72 Proben das *PBDG*-Transkript quantitativ nachgewiesen werden konnte. Bei 5 Proben der Universitätsklinik Essen war aufgrund von technischen Problemen eine Quantifizierung der Menge an *PBDG*-Transkript nicht möglich, bei 3 Proben aus Gießen war die Güte der RNA nicht ausreichend, um *PBDG*- oder *BCR/ABL*-Transkripte nachweisen zu können.

Da nur von wenigen Patienten mehrere, zu verschiedenen Zeitpunkten entnommene Proben zur Verfügung standen, kann über den individuellen Verlauf der CML hier keine detaillierte Aussage getroffen werden. Von mehreren Patienten standen jedoch zeitgleich aus dem peripheren Blut und dem Knochenmark entnommene Proben zur Verfügung, was einen direkten Vergleich der Quantifizierungsergebnisse zuläßt. Ein einheitlicher Trend, wonach eine größere Menge an *BCR/ABL*-Transkript im Knochenmark oder im Blut detektiert werden kann, ist allerdings nicht erkennbar (s. Abb. 3-52). Prinzipiell wird aber deutlich, daß, wenn auch die ermittelten Werte maximal um den Faktor 6.8 voneinander abwichen, es dennoch ratsam erscheint, Verlaufskontrollen generell mit gleichartigem Probenmaterial durchzuführen.

Einige Gruppen verwenden inzwischen eine *real-time* RT-PCR für die Analyse von CML-Patienten und finden, daß diese Methode sehr gut geeignet ist, den Krankheits- und Therapie-Verlauf von Patienten zu kontrollieren. So fanden die meisten eine gute Korrelation zwischen Zytogenetik und ermittelten *BCR/ABL*-Kopienzahlen im Blut, erwartungsgemäß war jedoch die Sensitivität der RT-PCR deutlich höher (Branford *et al.*, 1999; Emig *et al.*, 1999; Mensink *et al.*, 1998)

Zudem ergab ein Vergleich zwischen konventioneller *nested*-RT-PCR und *real-time* PCR gleiche Sensitivitäten und gut korrelierende Quantifizierungsergebnisse (Eder *et al.*, 1999; Preudhomme *et al.*, 1999). Zudem konnte von Eder *et al.* (1999) festgestellt werden, daß es keine direkte Korrelation zwischen dem Leukozytengehalt des peripheren Blutes und den ermittelten *BCR/ABL*-Transkriptkopienzahlen gab.

Des Weiteren wurden durch die Verwendung sensitiver Quantifizierungsmethoden neue Erkenntnisse bezüglich Krankheitsverlauf und Therapie der CML-Patienten gefunden. Es

wurde zunächst kontrovers diskutiert, ob die Ergebnisse dieser Quantifizierungen des *BCR/ABL*-Transkriptes tatsächlich geeignet sind, daraufhin basierend weitreichende klinische Entscheidungen zu treffen (Faderl *et al.*, 1999B; Goldman *et al.*, 1999; Lion, 1999; Moravcová *et al.*, 1999). Inzwischen ist aber allgemein anerkannt, daß für CML-Patienten, die sich nach KMT in kompletter zytogenetischer Remission befinden, die Ergebnisse der zeitlich aufeinanderfolgenden quantitativen RT-PCR-Analysen Aussagen gestatten, wann eine erneute Therapie erforderlich wird. Bei Patienten, die mit Interferon- $\alpha$  behandelt werden, wird nur selten beobachtet, daß die Menge an *BCR/ABL*-Transkript unter die Nachweisgrenze der RT-PCR fällt, dennoch läßt sich anhand der ermittelten Quantifizierungsergebnisse die Wahrscheinlichkeit für einen Rückfall ablesen (Chomel *et al.*, 2000; Cross, 1998; Elmaagacli *et al.*, 2000; Kreuzer *et al.*, 2000). Bereits von Lin *et al.* (1996) wurde prognostiziert, daß der kinetischen Analyse der *BCR/ABL*-Transkriptmengen eine große Bedeutung für die Vorhersage eines Rezidivs zukommen wird. Wichtig ist diese Früherkennung von Rezidiven deshalb, weil der Behandlungserfolg am höchsten ist, wenn die Therapie beginnt, bevor sich das Rezidiv klinisch bemerkbar macht. Das heißt, die Therapie sollte schon in einem Stadium, in dem der maligne Zellklon erst eine ganz geringe zahlenmäßige Ausdehnung erreicht hat, beginnen. Auch der rechtzeitige Einsatz erweiterter Therapien wie allogene Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation ist so besser möglich (Burmeister *et al.*, 1998). Zusammengenommen zeigt dies eindrucksvoll, daß sehr sensitive und exakte Quantifizierungen des *BCR/ABL*-Transkriptes erforderlich sind, um bestmögliche Therapie nach "state of the art" gewährleisten zu können.

Im Gegensatz zur Endpunktbestimmung mittels einer konventionellen RT-PCR erlaubt die Quantifizierung durch eine *real-time* RT-PCR mittels  $C_T$ -Wert eine sehr exakte Bestimmung, da, wie bereits zuvor nachgewiesen werden konnte, ein direkter Zusammenhang zwischen initialer *template*-Konzentration und dem  $C_T$ -Wert besteht (Heid *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 1996, Higuchi *et al.*, 1993). Zudem liegt dieser Punkt, der zur Quantifizierung genutzt wird, in der frühen exponentiellen Phase der PCR, und hier nehmen störende Effekte, wie z. B. Konkurrenz um die Reagenzien oder inhibitorische Effekte, nur einen minimalen Einfluß auf die Reaktion. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode der quantitativen *real-time* RT-PCR ist also prinzipiell sehr gut für exakte Quantifizierungen des *BCR/ABL*-Transkriptes geeignet. Diese genaue Bestimmung beruht einerseits auf einem großen linearen Meßbereich der eine Quantifizierung über 6 Größenordnungen ermöglicht, andererseits auf der Tatsache, daß zur Standardisierung RNA-Standards verwendet werden. Dies hat den Vorteil, daß einerseits

bereits die Effizienz der reversen Transkription berücksichtigt wird und andererseits, da es sich um einen idealen Standard handelt, wie mittels QC-RT-PCR nachgewiesen werden konnte, Standard und Zielsequenz mit identischer Effizienz amplifiziert werden. Zudem wird durch die Verwendung einer Ein-Schritt RT-PCR in einem einzigen Reaktionsgefäß und durch Verwendung einer *real-time*-Detektion im geschlossenen Reaktionsgefäß mittels *BCR/ABL*-spezifischer HybProbes das Kontaminationsrisiko stark verringert, da aufgrund der hohen Spezifität der Sonden eine weitere Analyse der Proben entfällt. Durch diese geringe Anzahl von Arbeitsschritten ist die Quantifizierung sehr viel einfacher und schneller durchzuführen als konventionelle Quantifizierungsmethoden. So ist eine übliche Quantifizierung, beginnend mit der Isolierung von RNA aus einer Patienten-Blutprobe bis hin zum Ergebnis der Kopienzahlen des *BCR/ABL*-Transkriptes bzw. dem Quotienten aus *BCR/ABL : PBDG*, in ca. 3.5 h abgeschlossen. Insgesamt gesehen ist also diese hier entwickelte und optimierte Methode, bei einer Nachweisempfindlichkeit von einer Leukämiezelle in  $10^5$  gesunden Zellen, einer Quantifizierungsgrenze von 100 Transkriptkopien und einem dynamischen Bereich von 6 Größenordnungen, sehr gut geeignet den Krankheitsverlauf von CML-Patienten unter Therapie oder nach KMT zu dokumentieren und *minimal residual disease* frühzeitig zu detektieren.

## 4.5 Ausblick

- ◆ Die in dieser Arbeit entwickelte *real-time* RT-PCR-Methode zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes wurde von Dr. Ahmet Elmaagacli an der größten Transplantationsklinik Deutschlands (Klinik für Knochenmarktransplantation der Universitätsklinik Essen) zunächst im Vergleich mit der bisher zur Quantifizierung verwendeten konventionellen *nested*-RT-PCR getestet. Da eine gute Korrelation der ermittelten Ergebnisse gefunden werden konnte, die *real-time* RT-PCR jedoch sensitiver und sehr viel einfacher und schneller durchzuführen ist und zudem das Kontaminationsrisiko deutlich verringert ist, wurde die bisher verwendete Methode vollständig durch die in dieser Arbeit entwickelte Methode ersetzt. Sie wird jetzt zur Routineanalyse von CML-Patienten vor und nach Knochenmarktransplantation verwendet. Zudem laufen Vorbereitungen, dieses Testsystem auch an einer Transplantationsklinik in Korea zu übernehmen.

- 
- ◆ Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode können die häufigsten bei der CML auftretenden Translokationsvarianten (b3a2, b2a2) detektiert und quantifiziert werden. Um die sehr viel seltener vorkommende Variante e1a2, die z. B. von Wittor *et al.* (2000) in einer Multiplex-PCR miterfaßt wird, ebenfalls mit der hier entwickelten Methode zu detektieren, ist prinzipiell nur die Zugabe eines weiteren Primers in die RT-PCR-Reaktion erforderlich. Allerdings müßte zur exakten Quantifizierung zunächst getestet werden, ob der bisher verwendete b3a2-Standard, der für genaue Quantifizierungen der Translokationsvarianten b3a2 und b2a2 geeignet ist, auch für andere Translokationsvarianten verwendet werden kann.
  
  - ◆ Wie Frau Dipl.-Biol. Christiane Thömmes in ihrer bei uns im Labor angefertigten Diplomarbeit am Beispiel der Translokation *AML1/ETO* zeigen konnte, ist das dieser Methode zugrunde liegende Prinzip in relativ kurzer Zeit auch auf die Quantifizierung anderer translokationsspezifischer Fusionstranskripte übertragbar.
  
  - ◆ Es konnte gezeigt werden, daß unter den hier gewählten Bedingungen die QC-RT-PCR und die Quantifizierung mittels LightCycler-RT-PCR gleiche Quantifizierungsergebnisse liefern. Da aber prinzipiell eine Effizienzbeeinflussung z. B. durch Inhibitoren nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, wurde bei der Planung der HybProbes bereits die Durchführung einer kompetitiven RT-PCR auf dem LightCycler geplant. Da die Hybridisierungssonden so gewählt wurden, daß die LC-RED 640 markierte Sonde den Bereich der Unterscheidungssequenz zwischen Standard- und Wildtyp-Sequenz abdeckt, besteht die Möglichkeit, mit Hilfe einer Schmelzkurven-Analyse die beiden verschiedenen Sequenzen aufgrund ihrer unterschiedlichen  $T_m$ -Werte voneinander zu trennen. Diese Methode wird zur Zeit zur Detektion von bekannten Mutationen verwendet und basiert darauf, daß, wenn keine Mutation der Zielsequenz vorliegt, die Sonde vollständig hybridisiert, bei einem mutationsbedingten Mismatch einen niedrigeren  $T_m$ -Wert aufweist. Da die Möglichkeit besteht, mittels der Schmelzkurven-Analyse auch eine Mengenabschätzung durchzuführen, sollte in Zukunft untersucht werden, ob diese Variante auch für die Quantifizierung mittels kompetitiver RT-PCR geeignet ist.

## 5 Zusammenfassung

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist die häufigste myeloproliferative Erkrankung und stellt pathophysiologisch die erste hämatologische Erkrankung dar, bei der eine charakteristische Chromosomenaberration, das sogenannte Philadelphia-Chromosom ( $\text{Ph}^+$ ), beschrieben wurde. Dieses Chromosom stellt das Produkt einer reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 ( $t(9;22)(q34;q11)$ ) dar. In 98 % der  $\text{Ph}^+$ -positiven Fälle führt diese Translokation auf dem Philadelphia-Chromosom zur Bildung eines pathophysiologisch relevanten Fusionsgens, des *BCR/ABL*-Gens, das in ein entsprechendes Protein (p210) translatiert wird. Es gilt als gesichert, daß die Bildung des *BCR/ABL*-Gens in hämatopoetischen Stammzellen ein wesentlicher Schritt in der Veränderung des Wachstums- und Regulationsverhaltens der Stammzelle ist, die zum charakteristischen hämatologischen und klinischen Bild der CML führt. Daher stellt das Philadelphia-Chromosom für die CML ein wichtiges diagnostisches und prognostisches Kriterium dar.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Detektion und Quantifizierung des Transkriptes des *BCR/ABL*-Fusionsgens zu entwickeln, die sich für die Routineanalytik eignet und einen möglichst sensitiven Nachweis erlaubt. Unter diesen Voraussetzungen boten sich prinzipiell nur Methoden an, die auf der Polymerase-Kettenreaktion basieren. Da die Bruchpunkte, die zur Translokation führen, über einen weiten Bereich gestreut vorkommen, war es sinnvoll, die Quantifizierung des *BCR/ABL*-Fusionsgens über dessen Transkript zu führen und somit eine quantitative RT-PCR zu etablieren. Die Quantifizierung wurde zunächst über eine quantitative kompetitive RT-PCR durchgeführt. Voraussetzung für den Aufbau einer quantitativen kompetitiven PCR-Analytik ist das Vorhandensein eines internen Standards, der mit der gleichen Effizienz amplifiziert wird wie die Wildtyp-Sequenz. Zur Generierung eines internen Standards wurde ein Plasmid mit integriertem *BCR/ABL*-cDNA-Fragment verwendet. Durch inverse PCR-Mutagenese wurde eine in der Wildtyp-Sequenz singulär vorkommende *Hind*III-Schnittstelle in eine singuläre *Stu*I-Restriktionsschnittstelle im Standard verwandelt, vom erhaltenen Konstrukt ein definiertes *in-vitro*-Transkripte synthetisiert und isoliert. Im Anschluß daran durchgeführte Titrationsexperimente mit gegenläufigen Wildtyp- und Standard-RNA-Konzentrationen sowie einer konstanten Menge an Wildtyp-RNA und variablen Konzentrationen an Standard-RNA bestätigten, daß es sich bei dem gewählten Standard um einen idealen Standard handelt, der mit der gleichen Effizienz wie die Wildtyp-Sequenz amplifiziert wird. Neben der Quantifizierung der RT-

PCR-Produkte nach spezifischer Restriktionsspaltung mittels densitometrischer Gelbildanalyse wird hier eine neue Quantifizierungsmethode mittels kapillarelektrophoretischer Auftrennung und LIF-Detektion der Fluorophor-markierten Spaltfragmente beschrieben. Diese Methode liefert vergleichbare Ergebnisse wie die densitometrische Quantifizierungsmethode, mit Abweichungen  $< 8\%$  von der eingesetzten *template*-Konzentration, sie ist aber durch einfachere Handhabung und automatische Prozessierung der Proben und automatische Analyse der gewonnenen Daten besser für die Durchführung einer Routineanalyse geeignet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine neue, auf *real-time*-Detektion basierende RT-PCR-Methode zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes entwickelt. Diese Methode basiert auf einer *online*-Fluoreszenzdetektion während der PCR, entweder durch SYBR-Green als Doppelstrang-DNA-bindendem Fluoreszenz-Farbstoff oder durch einen Fluoreszenzresonanz-energieübertrag mittels Fluorophor-markierter Hybridisierungssonden. Im Gegensatz zur QC-RT-PCR basiert die quantitative *real-time* PCR auf einer externen Standardisierung, für die aber ebenfalls die zuvor generierten Standard-*in-vitro*-Transkripte hervorragend geeignet waren. In dieser Arbeit wurde eine Ein-Schritt *real-time* RT-PCR entwickelt, die in der Lage ist, eine Leukämiezelle in  $10^5$  gesunden Zellen nachzuweisen und zudem eine genaue Quantifizierung bis hinunter zu 100 Transkriptkopien erlaubt. Durch Verwendung von *BCR/ABL*-spezifischen HybProbes entfällt aufgrund der hohen Spezifität der Sonden eine weitere Analyse der Proben, so daß genaue Quantifizierungsergebnisse bereits ca. 3.5 h nach Abnahme der Patienten-Probe vorliegen. Um mögliche Qualitätsunterschiede der Patienten-RNA auszugleichen, wurde zudem ein Primer/Sonden-System für das Transkript des *housekeeping*-Gens *PBGD* etabliert und die Methode durch Analyse von CML-Patienten-Proben verifiziert.

Die in dieser Arbeit entwickelte Ein-Schritt *real-time* RT-PCR ist bei einer sehr hohen Sensitivität des Nachweises mit einer einzelnen Leukämiezelle vor einem Hintergrund von  $10^5$  normalen Zellen und dem reproduzierbaren Nachweis von 100 Transkriptkopien sehr viel schneller und einfacher zu handhaben als konventionelle Quantifizierungsmethoden. Zudem erlaubt sie erstmals Quantifizierungen über einen linearen Meßbereich von 6 Größenordnungen. Sie stellt daher eine sehr gut zur Automatisierung geeignete, sensitive und exakte Methode zur Quantifizierung des *BCR/ABL*-Transkriptes dar, um den Krankheitsverlauf von CML-Patienten unter Therapie oder nach KMT zu dokumentieren und *minimal residual disease* frühzeitig zu detektieren. Dies wird auch durch ihren routinemäßigen Einsatz im führenden europäischen Transplantationszentrum demonstriert.

## 6 Literatur

ALLAN, N.C., RICHARDS, S.M. & SHEPHERD P.C. FOR THE UK MEDICAL RESEARCH COUNCIL'S WORKING PARTIES FOR THERAPEUTIC TRIALS IN ADULT LEUKAEMIA (1995): UK Medical Research Council randomised, multicentre trial of interferon-alpha n1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. *Lancet* **345**, 1392-1397.

ALTRIA, K.D. (1996): Capillary Electrophoresis: Principles, Instrumentation and Application. *Humana Press* (Eds), Totowa.

ARLINGHAUS, R.B. (1992): Multiple BCR-related products and their proposed involvement in ligand-induced signal transduction pathway. *Molecular Carcinogenesis* **5**, 171-173.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. & STRUHL, K. (1987-1989): Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons Inc.* New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

AYSCUE, L.H., ROSS, D.W., OZER, H., RAO, K., GULLEY, M.L. & DENT, G.A. (1990): BCR/ABL recombinant DNA analysis versus karyotype in the diagnosis and therapeutic monitoring of chronic myeloid leukemia. *American Journal of Clinical Pathology* **94**, 404-409.

BARBANY, G., HAGBERG, A., OLSSON-STRÖMBERG, U., SIMONSSON, B., SYVÄNEN, A.C. & LANDEGREN, U. (2000): Manifold-assisted Reverse Transcription-PCR with Real-Time Detection for Measurement of the *BCR-ABL* Fusion Transcript in Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Clinical Chemistry* **46**, 913-920.

BARTRAM, C.R., DE KLEIN, A., HAGEMEIJER, A., VAN AGTHOVEN, T., GEURTS VAN KESSEL, A., BOOTSMA, D., GROSVELD, G., FERGUSON-SMITH, M.A., DAVIES, T. & STONE, M. (1983): Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 277-80

BASKARAN, R., DAHMUS, M.E. & WANG, J.Y.J. (1993): Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyterminal domain. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **90**, 11167-11171.

BASKARAN, R., WOOD, L.D., WHITAKER, L.L., CANMAN, C.E., MORGAN, S.E., XU, Y., BARLOW, C., BALTIMORE, D., WYNshaw, B.A., KASTAN, M. & WANG, J.Y. (1997): Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* **387**, 516-519.

BECKER-ANDRÉ, M. & HAHLBROCK, K. (1989): Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Research* **17**, 9437-9446.



- BEELLEN, D.W., GRAEVEN, U., ELMAAGACLI, A.H., NIEDERLE, N., KLOKE, O., OPALKA, B. & SCHAEFER, U.W. (1995): Prolonged administration of Interferon-alpha in patients with chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia before allogeneic bone marrow transplantation may adversely affect transplant outcome. *Blood* **85**, 2981-2990.
- BEN NERIAH, E., BERNARDS, A., PASKIND, M., DALEY, G.Q. & BALTIMORE, D. (1986): Alternative 5'exons in c-abl mRNA. *Cell* **44**, 577-586.
- BENTZ, M., CABOT, G., MOOS, M., SPEICHER, M.R., GANSER, A., LICHTER, P. & DÖHNER, H. (1994): Detection of chimeric BCR-ABL-genes on bone marrow samples and blood smears in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia by *in situ* hybridization. *Blood* **83**, 1922-1928.
- BIANCHI, C., CAIROLI, R., MARENCO, P., MUTI, G., DEL MONTE, U. & PEREGO, R.A. (1995): Detection by Polymerase Chain Reaction of BCR/ABL Transcripts in Myeloproliferative Diseases at Time of Diagnosis and for Monitoring Chronic Myelogenous Leukaemia Patients After Bone Marrow Transplantation. *European Journal of Cancer* **31**, 197-201.
- BIERNAUX, C., LOOS, M., SELS, A., HUEZ, G. & STRYCKMANS, P. (1995): Detection of Major bcr/-abl Gene Expression at Very Low Level in Blood Cells of Some Healthy Individuals. *Blood* **86**, 3118-3122.
- BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523.
- BLUM, E., HORST, G. & KRÖGER, M. (1994): PCR directed preparation and single step purification of highly active histidine tagged restriction endonuclease HgiBI (GGWCC). *J. Biochem. Biophys. Meth.* **29**, 113-121.
- BOHLING, S.D., KING, T.C., WITWER, C.T. & ELENITOBA-JOHNSON, K.S.J. (1999): Rapid simultaneous amplification and detection of the MBR/JH chromosomal translocation by fluorescence melting curve analysis. *American Journal of Pathology* **154**, 97-103.
- BORTOLIN, S. & CHRISTOPOULOS, T.K. (1996): Quantitative RT-PCR combined with time-resolved fluorometry for determination of BCR-ABL mRNA. *Clinical Chemistry* **42**, 1924-1929.
- BRANFORD, S., HUGHES, T.P. & RUDZKI, Z. (1999): Monitoring Chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *British Journal of Haematology*, **107**, 587-599.
- BURMEISTER, M.A., STANDL, T., BRAUER, P., RAMSPERGER, K., KROGER, N., ZANDER, A., SCHULTE, A.M. & ESCH, J. (1998): Safety and efficacy of spinal vs. general anaesthesia in bone marrow harvesting. *Bone Marrow Transplantation* **21**, 1145-1148
- BYRNE, J.L. & MARSHALL, C.J. (1998): The Molecular Pathophysiology of Myeloid Leukaemias: Ras Revisited. *British Journal of Haematology* **100**, 256-264.
- CAMPELL, M.L. & ARLINGHAUS, R.B. (1991): Current status of the bcr gene and its involvement with human leukemia. *Advanced Cancer Research* **57**, 227-256.

CAPLIN, B.E.R.R., BERNARD, P.S. & WITWER, C.T. (1999): The most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica* **1**, 5-8.

CARELLA, A.M., PODESTA, M., FRASSONI, F., RAFFO, M.R., POLLICARDO, N., PUNGOLINO, E., VIMERCATI, R., SESSAREGO, M., PARODI, C., RABITTI, C. (1993): Collection of 'normal' blood repopulating cells during early hemopoietic recovery after intensive conventional chemotherapy in chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* **12**, 267-271.

CARELLA, A.M., SIMONSSON, B., LINK, H., LENNARD, A., BOOGAERTS, M., GORIN, N.C., TOMAS-MARTINEZ, J.F., DABOUZ-HARROUCHE, F., GAUTIER, L., BADRI, N. (1998): Mobilization of Philadelphia-negative peripheral blood progenitor cells with chemotherapy and rhuG-CSF in chronic myelogenous leukaemia patients with a poor response to interferon-alpha. *British Journal of Haematology* **101**, 111-118.

CASTRO-MALASPINA, H., SCHAISON, G., BRIERE, J., PASSE, S., BRIERE, J., PASQUIER, A., TANZER, J., JACQUILLAT, C. & BERNARD, J. (1983): Philadelphia chromosome-positive chronic myelocytic leukemia in children: survival and prognostic factors. *Cancer* **52**, 721-727.

CAUSSÉ, E., SIMÉON, N., NERTZ, M., SALVAYRE, R., BAYARD, F., VALDIGUIÉ, P. & COUDERC, F. (1997): Quantitation of RT-PCR products of bFGF-mRNA by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Journal of Capillary Electrophoresis* **4**, 77-81.

CHOMEL, J.C., BRIZARD, F., VEINSTEIN, A., RIVET, J., SADOUN, A., KITZIS, A., GUILHOT, F. & BRIZARD, A. (2000): Persistence of BCR-ABL genomic rearrangement in chronic myeloid leukemia patients in complete and substained cytogenetic remission after interferon- $\alpha$  therapy or allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **95**, 404-409.

CHRONIC MYELOID LEUKEMIA TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (1997): Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials. *Journal of the National Cancer Institute* **89**, 1616-1620.

CHUNG, C.T., NIEMALA, S.L. & MILLER, R.H. (1989): One step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **86**, 2172-2175.

COLLINS, S.J., GALLO, R.C. & GALLAGHER, R.E. (1977): Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270**, 347-349.

COPELAN, E.A., GREVER, M-R., KAPOOR, N. & TUTSCHKA, P.J. (1989): Marrow transplantation following busulfan and cyclophosphamide for chronic myelogenous leukaemia in accelerated or blastic phase. *British Journal of Haematology* **71** (4), 487-491.

CORSETTI, M.T., LERMA, E., DEJANA, A., BASTA, P., FERRARA, R., BENVENUTO, F., VASSALLO, F., ABATE, M., PIAGGIO, G., PARODI, C., SESSAREGO, M., LI-PIRA, G., MANCA, F. & CARELLA, A.M. (1999): Quantitative competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction for BCR-ABL on Philadelphia-negative leukaphereses allows the selection of low contaminated peripheral blood progenitor cells for autografting in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* **13**, 999-1008.

CORSETTI, M.T., LERMA, E., DEJABNA, A., CAVALIERE, M., FIGARI, O., VASSALLO, F., ABATE, M., LUCHETTI, S., PIAGGIO, G., PARODI, C., LI PIRA, G., MANCA, F. & CARELLA, A.M. (2000): Cytogenetic response to autografting in chronic myelogenous leukemia correlates with the amount of BCR-ABL positive cells in the graft. *Experimental Hematology* **28**, 104-111.

COX FRONCILLO, M.C., CANTONETTI, M., MASI, M., LENTINI, R., GIUDICEANDREA, P., MAFFEI, L., TRIBALTO, M., AMADORI, S., PAPA, G. (1995): Cytogenetic analysis is non-informative for assessing the remission rate in chronic myeloid leukemia (CML) patients on interferon-alpha (IFN-alpha) therapy. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **84**, 15-18.

CROSS, N.C.P., FENG, L., CHASE, A., BUNGEY, J., HUGHES, T.P. & GOLDMAN, J.M. (1993): Competitive Polymerase Chain Reaction to Estimate the Number of BCR/ABL Transcripts in Chronic Myeloid Leukemia Patients After Bone Marrow Transplantation. *Blood* **82**, 1929-1936.

CROSS, N.C.P., MELO, J.V., FENG, L. & GOLDMAN, J.M. (1994): An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in haematological disorders. *Leukemia* **8**, 186-189.

CROSS, N.C.P. (1998): Minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Hematology and Cell Therapy* **40**, 224-228

CUNEO, A., BIGONI, R., EMMANUEL, B., SMIT, E., RIGOLIN, G.M., ROBERTI, M.G., BARDI, M.G., PIVA, N., SCAPOLI, G., CASTOLDI, G., VAN DEN BERGHE, H. & HAGEMEIJER, A. (1998): Fluorescence *in situ* hybridization for the detection and monitoring of the Ph-positive clone in chronic myelogenous leukemia: comparison with metaphase banding analysis. *Leukemia* **12**, 1718-1723.

DALEY, G.Q., VAN ETEN, R.A. & BALTIMORE, D. (1990): Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210 bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* **247**, 824-830.

DALTON, W.T. JR., AHEARN, M.J., MCCREDIE, K.B., FREIREICH, E.J., STASS, S.A. & TRUJILLO, J.M. (1988): HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* **71**, 242-247.

DE KLEIN, A., VAN KESSEL, A.G., GROSVELD, G., BARTRAM, C.R., HAGEMEIJER, A., BOOTSMA, D., SPURR, N.K., HEISTERKAMP, N., GROFFEN, J. & STEPHENSON, J.R. (1982): A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia Chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **300**, 765-767.

DE KLEIN, A., HAGEMEIJER, A., BARTRAM, C.R., HOUWEN, R., HOEFSLOOT, L., CARBONELL, F., CHAN, L., BARNETT, M., GREAVES, M., KLEIHAUER, E., (1986): bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **68**, 1369-1375.

DELAGE, R., SOIFFER, R.J., DEAR, K. & RITZ, J. (1991): Clinical Significance of *bcr-abl* Gene Rearrangement Detected by Polymerase Chain Reaction After Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood* **78**, 2759-2767.

- DE SILVA, D.R.A., HERRMANN, M., TABITI, K. & WITTEWER, C. (1998): Rapid genotyping and quantification on the LightCycler with hybridization probes. *Biochemica Information*, **102**, 9-12.
- DIECKMANN, D., BRILL, S., GARRETT, M.D., TOTTY, N., HSUAN, J., MONFRIES, C., HALL, C., LIM, L. & HALL, A. (1991): Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21(rac). *Nature* **351**, 400-402.
- DÖRSAM, V. (1994): Quantitative PCR mit interner Standardisierung durch koamplifizierte punktmutierte Varianten der Targetnukleinsäure. Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- DREXLER, H.G. (1994): Leukemia cell lines: in vitro models for the study of chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research* **18**, 919-927.
- DREXLER, H.G. (2000): Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* **24**, 109-115.
- DRUKER, B., TAMURA, S., BUCHDUNGER, E., OPHNO, S., SEGAL, G.M., ZIMMERMANN, J. & LYDON, N.B. (1996): Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells. *Nature Medicine* **2**, 561-566.
- DRUKER, B.J. & LYDON, N.B. (2000): Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Investigations* **105**, 3-7.
- ECKSTEIN, R., RIESS, H. & SIEGERT, W. (1991): Hämatologie – Ein Leitfaden für Studierende und Ärzte. Manual 8, *Kohlhammer-Verlag*, Stuttgart.
- EDER, M., BATTMER, K., KAFERT, S., STUCKI, A., GANSER, A. & HERTENSTEIN, B. (1999): Monitoring of BCR-ABL expression using real-time RT-PCR in CML after bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia* **13**, 1383-1389.
- ELMAAGACLI, A.H., BEELEN, D.W., OPALKA, B., SEEBER, S. & SCHAEFER, U.W. (1999): The Risk of Residual Molecular and Cytogenetic Disease in Patients With Philadelphia-Chromosome Positive First Chronic Phase Chronic Myelogenous Leukemia Is Reduced After Transplantation of Allogeneic Peripheral Blood Stem Cells Compared With Bone Marrow. *Blood* **94**, 384-389.
- ELMAAGACLI, A.H., BEELEN, D.W., OPALKA, B., SEEBER, S. & SCHAEFER, U.W. (2000): The amount of BCR-ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disease stage. *Annals Hematology* **79**, 424-431.
- EMIG, M., SAUSSELE, S., WITTOR, H., REITER, A., WILLER, A., BERGER, U., HEHLMANN, R., CROSS, N.C.P. & HOCHHAUS, A. (1999): Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia* **13**, 1825-1832.

- EMIG, M., SAUSSELE, S., WITTOR, H., WEISSER, A., REITER, A., WILLER, A., BERGER, U., HEHLMANN, R., CROSS, N.C.P. & HOCHHAUS, A. (2000): Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia* **13**, 1825-1832.
- EVANS, M.D., WOLFE, J.T., PERRET, D., LUNEC, J. & HERBERT, K.E. (1995): Analysis of internucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes by dynamic sieving capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography* **700**, 151-162.
- FADERL, S., TALPAZ, M., ESTROV, Z., O'BRIAN, S., KURZROCK, R. & KANTARJIAN, H.M. (1999A): The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **341**, 164-172.
- FADERL, S., TALPAZ, M., KANTARJIAN, H.M. & ESTROV, Z. (1999B): Should Polymerase Chain Reaction Analysis to Detect Minimal Residual Disease in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia Be Used in Clinical Decision Making? *Blood* **93**, 2755-2759.
- FAINSTEIN, E., EINAT, M., GOKKEL, E., MARCELLE, C., CROCE, C.M., GALE, R.P. & CANAANI, E. (1989): Nucleotide sequence analysis of human abl and bcr-abl cDNAs. *Oncogene* **4**, 1477-1481.
- FASCO, M.J., TREANOR, C.P., SPIVACK, S., FIGGE, H.L. & KAMINSKY, S. (1995): RNA-PCR-polymerase chain reaction DNA analysis by capillary electrophoresis and laser induced fluorescence. *Analytical Biochemistry* **224**, 140-147.
- FEFER, A., CHEEVER, M.A., THOMAS, E.D., BOYD, C., RAMBERG, R., GLUCKSBERG, H., BUCKNER, C.D. & STORB, R. (1979): Disappearance of Ph1-positive cells in four patients with chronic granulocytic leukemia after chemotherapy, irradiation and marrow transplantation from an identical twin. *New England Journal of Medicine*, **300**, 223-229.
- FINK, L., SEEGER, W., ERMERT, L., HÄNZE, J., STAHL, U., GRIMMINGER, F., KUMMER, W. & BOHLE, R.M. (1998): Real-time quantitative RT-PCR after laser assisted cell picking. *Nature Medicine*, **4**, 1329-1333.
- FINKE, J., FRITZEN, R., TERNES, P., LANGE, W. & DÖLKEN, G. (1993): An improved strategy and a useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin-fixed, paraffin embedded tissues by PCR. *BioTechniques* **14**, 448-453.
- FISCH, P., KÖHLER, G., SCHAEFER, H.E., BRUGGER, W. & KANZ, L. (1996): Generation of antigen presenting cells for soluble protein antigen ex vivo from peripheral blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *European Journal of Immunology* **26**, 595-600.
- FISCHER, T., NEUBAUER, A., MOHM, J., HUHNS, D., BUSEMANN, C., LINK, H., ARSENIJEV, L., BUSSING, B., NOVOTNY, J., GANSER, A., DUYSSTER, J., BUNJES, D., KREITER, S., AULITZKY, W., HEHLMANN, R. & HUBER, C. (1998): Chemotherapy-induced mobilization of karyotypically normal PBSC for autografting in CML. *Bone Marrow Transplant* **21**, 1029-1036.

FISHLEDER, A.J., SHADRACH, B. & TUTTLE, C. (1989): *bcr* rearrangement: potential false positive secondary to an *EcoRI* restriction fragment length polymorphism. *Leukemia* **3**, 746-748.

FITZGERALD, P.H. (1976): Evidence that chromosome band 22q12 is concerned with cell proliferation in chronic myeloid leukemia. *Human Genetics* **33**, 269-274.

FÖRSTER, V.TH. (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics* (Leipzig) **2**, 55-75.

GARCIA-ISIDORO, M., TABERNEIRO, M.D., GARCIA, J.L., NAJERA, M.L., HERNANDEZ, J.M., WIEGANT, J., RAAP, A., SAN MIGUEL, J. & ORFAO, A. (1997): Detection of the M**bc**r-abl translocation in chronic myeloid leukemia by fluorescence *in situ* hybridization: comparison with conventional cytogenetics and implications for minimal residual disease detection. *Human Pathology* **28**, 154-159.

GARCIA-MEUNIER, P., ETIENNE-JULAN, P., FORT, P., PIECHACZYK & BONHOMME, F. (1993): Concerted evolution in the GAPDH family of retrotransposed pseudogenes. *Mammalian Genome* **4**, 695-703.

GELFI, C., ORSI, A., RIGHETTI, P.G., BRANCOLINI, V., CREMONESI, L. & FERRARI, M. (1994): Capillary zone electrophoresis of polymerase chain reaction-amplified DNA fragment in polymer networks: the case of GATT microsatellites in cystic fibrosis. *Electrophoresis* **15**, 640-643.

GIBSON, U.E.M., HEID, C.A. & WILLIAMS, P.M. (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Methods: Genome Research* **6**, 995-1006.

GIRALT, S.A., KANTARJIAN, H.M., TALPAZ, M., RIOS, M.B., DEL GIGLIO, A., ANDERSSON, B.S., PRZEPIORKA, D., DEISSEROTH, A.B. & CHAMPLIN, R.E. (1993): Effect of prior interferon alfa therapy on the outcome of allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **11**, 1055-1061.

GIRALT, S., SCZYDLO, R., GOLDMAN, J.M., VEUM-STONE, J., BIGGS, J.C., HERZIG, R.H., KLEIN, J.P., MCGLAVE, P.B., SCHILLER, G., GALE, R.P., ROWLINGS, P.A. & HOROWITZ, M.M. (2000): Effect of short term interferon therapy on the outcome of subsequent HLA identical sibling bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: an analysis from the International Bone Marrow Transplant Registry. *Blood* **95**, 410-415.

GOLDMAN, J.M., SZYDLO, R., HOROWITZ, M.M., GALE, R.P., ASH, R.C., ATKINSON, K., DICKE, K.A., GLUCKMAN, E., HERZIG, R.H., MARMONT, A., (1993): Choice of pretransplant treatment and timing of transplants for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood* **82**, 2235-2238.

GOLDMAN, J.M., KAEDA, J.S., CROSS, N.C.P., HOCHHAUS, A. & HEHLMANN, R. (1999): Clinical Decision Making in Chronic Myeloid Leukemia Based on Polymerase Chain Reaction Analysis of Minimal Residual Disease. *Blood* **94**, 1484-1486.

GOLDMAN, J.M. (2000): Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leukaemia. *Lancet* **355**, 1031-1032.

- GRATWOHL, A. & HERMANS, J (1996): Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation* **17**, 7-9.
- GROFFEN, J., STEPHENSON, J.R., HEISTERKAMP, N., DE KLEIN, A., BARTRAM, C.R. & GROSVELD, G. (1984): Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosom 22. *Cell* **36**, 93-99.
- GROSSMANN, P.D. & COLBURN, J.C. (1996): Capillary electrophoresis: Theory and Practice. *Academic Press* (Eds), New York.
- GUILHOT, F., CHASTANG, C., MICHALLET, M., GUERCI, A., HAROUSSEAU, J.L., MALOISEL, F., BOUABDALLAH, R., GUYOTAT, D., CHERON, N., NICOLINI, F., ABGRALL, J.F. & TANZER, J. (1997): Interferon-alfa 2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. *New England Journal of Medicine* **337**, 223-229.
- GUO, J.Q., LIAN, J.Y., XIAN, Y.M., LEE, M.S., DEISSEROTH, A.B., STASS, S.A., CHAMPLIN, R.E., TALPAZ, M., WANG, J.Y. & ARLINGHAUS, R.B. (1994): BCR-ABL protein expression in peripheral blood cells of chronic myelogenous leukemia patients undergoing therapy. *Blood* **83**, 3629-3637.
- GUO, J.Q., LIAN, J., GLASSMAN, A., TALPAZ, M., KANTARJIAN, H., DEISSEROTH, A.B. & ARLINGHAUS, R.B. (1996): Comparison of *bcr/abl* protein expression and Philadelphia chromosome analyses in chronic myelogenous leukemia patients. *American Journal of Clinical Pathology* **106**, 442-448.
- HAHN, M., DÖRSAM, V., FRIEDHOFF, P., FRITZ, A. & PINGOUD, A. (1995A): Quantitative polymerase chain reaction with enzyme linked immunosorbent assay detection of selectively digested amplified sample and control DNA. *Analytical Biochemistry* **229**, 236-248.
- HAHN, M., MATZEN, S.E., SERTH, J. & PINGOUD, A. (1995B): Semiautomated quantitative detection of loss of heterozygosity in the tumor suppressor gene p53. *BioTechniques* **18**, 1040-1047.
- HANAUER, A. & MANDEL, J.L. (1984): The glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase gene family: structure of a human cDNA and of an X chromosome linked pseudogene; amazing complexity of the gene family in the mouse. *EMBO Journal* **3**, 2627-2633.
- HANDEN, D.G. & KLINGER, H.P. (1985): ISCN An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. *Karger-Verlag*, Basel.
- HANSON, C.A., HOLBROOK, E.A., SHELDON, S., SCHNITZER, B. & ROTH, M.S. (1990): Detection of Philadelphia chromosome-positive cells from glass slide smears using the Polymerase chain reaction. *American Journal of Pathology* **137**, 1-6.
- HASFORD, J., PFIRRMANN, M., HEHLMANN, R., ALLAN, N.C., BACCARANI, M., KLUIN-NELEMANS, J.C., AKLIMENA, G., STEEGMANN, J.L. & ANSARI, H. FOR THE COLLABORATIVE CML PROGNOSTIC FACTORS PROJECT GROUP (1998): A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon-alpha. *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 850-858.

- HEHLMANN, R., HEIMPEL, H., HASFORD, J. & THE GERMAN CML STUDY GROUP (1993): Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. *Blood* **82**, 398-407.
- HEHLMANN, R., HEIMPEL, H., HASFORD, J. & THE GERMAN CML STUDY GROUP (1994): Randomized comparison of interferon- $\alpha$  with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* **84**, 4064-4077.
- HEHLMANN, R. & HEIMPEL, H. (1996): Current aspects of drug therapy in Philadelphia-positive CML: Correlation of tumor burden with survival. *Leukemia and Lymphoma* **22**, 161-167.
- HEHLMANN, R. & HOCHHAUS, A. (1998): Diagnostik und Therapie der CML. *Onkologie* **4**, 798-807.
- HEHLMANN, R., HOCHHAUS, A., KOLB, H.J., HASFORD, J., GRATWOHL, A., HEIMPEL, H., SIEGERT, W., FINKE, J., EHNINGER, G., HOLLER, E., BERGER, U., PFIRRMANN, M., MUTH, A., ZANDER, A., FAUSER, A.A., HEYLL, A., NERL, C., HOSSFELD, D.K., LOFFLER, H., PRALLE, H., QUEISSER, W. & TOBLER, A. FOR THE GERMAN CML-STUDY GROUP (1999): Interferon alfa before allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia does not affect outcome adversely, provided it is discontinued at least 90 days before the procedure. *Blood* **94**, 3668-3677.
- HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.H.J., WILLIAMS, P.M. (1996): Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* **6**, 986-994.
- HEISTERKAMP, N., STEPHENSON, J.R., GROFFEN, J., HANSEN, P.F., DE KLEIN, A., BARTRAM, C.R. & GROSVELD, G. (1983): Localization of the *c-abl* oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 239-242.
- HEISTERKAMP, N., STAM, K., GROFFEN, J., DE KLEIN, A. & GROSVELD, G. (1985): Structural organization of the BCR gene and its role in the Ph1 translocation. *Nature* **315**, 758-761.
- HEISTERKAMP, N., KNOPPEL, E. & GROFFEN, J. (1988): The first Bcr gene intron contains breakpoint in Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Nucleic Acids Research* **16**, 10069-10081.
- HELLER C. (1995): Capillary electrophoresis of proteins and nucleic acids in gels and entangled polymer solutions. *Journal of Chromatography* **698**, 19-31.
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P.S. & GRIFFITH, R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* **10**, 413-417.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G. & WATSON, R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11**, 1026-1030.
- HOCHHAUS, A., REITER, A., SKLADNY, H., MELO, J.V., SICK, C., BERGER, U., GUO, J.Q., ARLINGHAUS, R.B., HEHLMANN, R., GOLDMAN, J.M. & CROSS, N.C.P. (1996A): A novel *BCR/ABL* fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome negative chronic myelogenous leukemia. *Blood* **88**, 2236-2240.



- HOCHHAUS, A., LIN, F., REITER, A., SKLADNY, H., MASON, P.J., VAN RHEE, F., SHEPHERD, P.C., ALLAN, N.C., HEHLMANN, R., GOLDMAN, J.M. & CROSS, N.C. (1996B): Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon-alpha therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood* **87**, 1549-1555.
- HOCHHAUS, A., LIN, F., REITER, A., SKLADNY, H., HEHLMANN, R., GOLDMAN, J.M. & CROSS, N.C.P. (1996C): Quantitative molecular methods to monitor the response of CML patients to interferon-alpha. *Bone Marrow Transplantation* **17**, 41-44
- HOCHHAUS, A. & HEHLMANN, R. (1997A): Chronische myeloproliferative Erkrankungen. In: OSSENDORF, P.C. & SEEGER, S.: Hämatologie/Onkologie, 265-283. *Urban & Schwarzenberg*, München.
- HOCHHAUS, A., LIN, F., REITER, A., SKLADNY, H., HEHLMANN, R., GOLDMAN, J.M. & CROSS, N.C.P. (1997B): Monitoring the efficiency of interferon-alpha therapy in chronic myelogenous leukemia (CML) patients by competitive polymerase chain reaction. *Leukemia* **11**, 541-544.
- HOCHHAUS, A., REITER, A., SKLADNY, H., REICHERT, A., SAUSSELE, S. & HEHLMANN, R. (1998): Molecular monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients after therapy. *Recent Results in Cancer Research* **144**, 36-45.
- HOCHHAUS, A., REITER, A., SAUSSELE, S., REICHERT, A., EMIG, M., KAEDA, J., SCHULTHEIS, B., BERGER, U., SHEPHERD, P.C.A., ALLAN, N.C., HEHLMANN, R., GOLDMAN, J.M. & CROSS, N.C.P. FOR THE GERMAN CML STUDY GROUP AND THE UK MRC CML STUDY GROUP (2000): Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon- $\alpha$  therapy for chronic myelogenous leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. *Blood* **95**, 62-66.
- HOFFBRAND, A.V. & PETTIT, J.E. (1993): Essential Haematology. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford.
- HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R. & GELFAND, D.H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **88**, 7276-7280.
- HOROWITZ, M.M., PRZEPIORKA, D., CHAMPLIN, R.E., GALE, R.P., GRATWOHL, A., HERZIG, R.H., PRENTICE, H.G., RIMM, A.A., RINGDEN, O. & BORTIN M.M. (1992): Should HLA-identical sibling bone marrow transplants for leukemia be restricted to large centers? *Blood* **79**, 2771-2774.
- HUETTNER, C.S., ZHANG, P., VAN ETTEN, R.A., TENEN, D.G. (2000): Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nature Genetics* **24**, 57-60.
- HUGHES, T., MARTIAT, P., MORGAN, G., SAWYERS, C, WITTE, O.N. & GOLDMAN, J.M. (1990A): Significance of residual leukemia transcripts after bone marrow transplant for CML. *Lancet* **335**, 50.

- HUGHES, T., JANSSEN, J.W.G., MORGAN, G., MARTIAT, P., SAGLIO, G., PIGNON, J.M., PIGNATTI, F.P., MILLS, K., KEATING, A., GLUCKMANN, E., BARTRAM, C.R. & GOLDMAN, J.M. (1990B): False positive results with PCR to detect leukaemia-specific transcript. *Lancet* **335**, 1037-1038.
- HUGHES, T. & GOLDMAN, J.M. (1990): Improved results with PCR for chronic myeloid leukaemia. *Lancet* **336**, 812.
- ISH-HOROWITZ, D. & BURKE, J.F. (1981): Rapid and efficient cosmid cloning, *Nucleic Acids Research* **9**, 2989.
- INNIS, M.A., MYAMBO, K.B., GELFAND, D.H. & BROW, M.A. (1988): DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **85**, 9436-9440
- JACOBS, A. (1989): Benzene and leukemia. *British Journal of Haematology*, **72**, 119-121.
- KÄBISCH, A., PERENYI, L., LOHMEYER, J. & PRALLE, H. (1995): Unmodified phosphodiester antisense oligonucleotides to the *BCR/ABL* junction do not suppress Philadelphia-positive clonogenic cells. *Acta Haematologica* **92**, 190-196.
- KÄBISCH, A., SEAY U., WICKER, S., WEBER, C., LOHMEYER, J., ORTIAGO, J.F.R. & PRALLE, H. (1996): Comparison of different antisense oligonucleotides against the *BCR/ABL* junction in chronic myelogenous leukemia: cellular pharmacology and in vitro efficacy. *International Journal of Oncology* **8**, 859-864.
- KANTARJIAN, H.M., SMITH, T.L., MCCREDIE, K.B., KEATING, M.J., WALTERS, R.S., TALPAZ, M., HESTER, J.P., BLIGHAM, G., GEHAN, E. & FREIRICH, E.J. (1985): Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood* **66**, 1326-1335.
- KANZ, L. (1997): Hochdosistherapie und Stammzelltransplantation – Ein neuer Weg in der Tumortherapie. *Internist* **38**, 1045-1049.
- KAWASAKI, E.S., CLARK, S.S., COYNE, M.Y., SMITH, S.D., CHAMPLIN, R., WITTE, O.N. & MCCORMICK, F.P. (1988): Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **85**, 5698-5702.
- KEARNEY, P.P. & AUMATELL, A. (1997): Rapid diagnosis of chronic myeloid leukaemia by linking PCR to capillary gel electrophoresis. *Clinical Laboratory Haematology* **19**, 261-266.
- KIPREOS, E.T., & WANG, J.Y.J. (1992): Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science* **256**, 382-385.
- KOCH, C.A., ANDERSON, D., MORAN, M.F., ELLIS, C. & PAWSON, T. (1991): SH2 and SH3 domains: Elements that control interaction of cytoplasmatic signal proteins. *Science* **252**, 668-674.

- KOLB, H.J., MITTERMÜLLER, J., CLEMM, C., HOLLER, E., LEDDEROSE, G., BREHM, G., HEIM, M., & WILMANN, W. (1990): Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* **76**, 2462-2465.
- KOLB, H.J., SCHATTENBERG, A., GOLDMAN, J.M., HERTENSTEIN, B., JACOBSEN, N., ARCESE, W., LJUNGMAN, P., FERRANT, A., VERDONCK, L., NIEDERWIESER, D., (1995): Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusion in marrow grafted patients. European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* **86**, 2041-2050.
- KOLESAR, J.M., RIZZO, F.D. & KUHN, J.G. (1995): Quantitative analysis of NQO1 gene expression by RT-PCR and CE-LIF. *Journal of Capillary electrophoresis* **2**, 287-290.
- KOSTRIKIS, G.L., TYAGI, S., MHLANGA, M.M., HO, D.D. & KRAMER, F.R. (1998): Molecular Beacons: Spectral Genotyping of Human Alleles. *Science* **279**, 1228-1229.
- KREUZER, K.A., LASS, U., NAGEL, S., ELLERBROK, H., PAULI, G., PAWLACZYK-PETER, B., SIEGERT, W., HUHN, D. & SCHMIDT, C.A. (2000): Applicability of an absolute quantitative procedure to monitor intra-individual bcr/abl transcript kinetics in clinical samples from chronic myelogenous leukemia patients. *International Journal of Cancer* **86**, 741-746.
- KRUSE, N., PETTE, M., TOYKA, K. & RIECKMANN, P. (1997): Quantification of cytokine mRNA expression by RT-PCR in samples of previously frozen blood. *Journal of Immunological Methods* **210**, 195-203.
- KUHN, R. & HOFSTETTER, S. (1993): Capillary Electrophoresis: Principles and Practice. *Springer Verlag*, Heidelberg.
- KURIYAMA, K., GALE, R.P., TOMONAGA, M., IKEDA, S., YAO, E., KLISAK, I., WHELAN, K., YAKIR, H., ICHIMARU & SPARKES, R.S. (1989): CML-T1: a cell line derived from T-lymphocyte acute phase of chronic myelogenous leukemia. *Blood* **74**, 1381-1387.
- KURZROCK, R., GUTTERMANN, J.U. & TALPAZ, M. (1988): The molecular genetics of Philadelphia chromosom-positive leukemia. *New England Journal of Medicine* **319**, 990-997.
- LANDERS, J.P., ODA, R.P., SPELSBERG, J.A., NOLAN, J.A. & ULFELDER, K.J. (1993): Capillary electrophoresis: a powerful microanalytical technique for biologically active molecules. *Biotechniques* **14**, 98-111.
- LE COUTRE, P., MOLOGNI, L., CLERIS, L., MARCHESI, E., BUCHDUNGER, E., GIARDINI, R., FORMELLI, F. & GAMBACORTI-PASSERINI, C. (1999): In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 163-168.
- LEE, M.S., CHANG, K.S., FREIREICH, E.J., KANTARJIAN, H.M., TALPAZ, M., TRUJILLO, J.M. & STASS, S.A. (1988): Detection of minimal residual bcr/abl transcripts by a modified polymerase chain reaction. *Blood* **72**, 893-897.
- LEE, S.J., ANASETTI, C., HOROWITZ, M.M. & ANTIN, J.H. (1998): Initial therapy for chronic myelogenous leukemia: playing the odds. *Journal of Clinical Oncology* **16**, 2897-2903.

- LENGFELDER, E. & HEHLMANN, R. (1996): Intensive combination chemotherapy in treatment of CML. *Bone Marrow Transplant* **17**, 55-57.
- LEWIS, J.M., BASKARAN, R., TAAGEPERA, S., SCHWARTZ, M.A. & WANG, J.Y. (1996): Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmatic-nuclear transport. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **93**, 15174-15179.
- LIFSHITZ, B., FAINSTEIN, E., MARCELLE, C., SHTIVELMAN, E., AMSON, R., GALE, R.P. & CANAANI, E. (1988): Bcr genes and transcripts. *Oncogene* **2**, 113-117.,
- LIM, Y.M., WONG, S., LAU, G., WITTE, O.N. & COLICELLI, J. (2000): BCR/ABL inhibition by an escort/phosphatase fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **97**, 12233-12238.
- LIN, F., VAN RHEE, F., GOLDMAN, J.M. & CROSS, N.C.P. (1996): Kinetics of increasing BCR-ABL transcript numbers in chronic myeloid leukemia patients who relapse after bone marrow transplantation. *Blood* **87**, 4473-4478.
- LION, T., HENN, T., GAIGER, A., KALHS, P. & GADNER, H. (1993): Early detection of relapse after bone marrow transplantation in patients with chronic myelogenous leukaemia. *Lancet* **341**, 275-276.
- LION, T. (1999): Monitoring of Residual Disease in Chronic Myelogenous Leukemia by Quantitative Polymerase Chain Reaction and Clinical Decision Making. *Blood* **94**, 1486-1488.
- LIU, J., WU, Y. & ARLINGHAUS, R.B. (1996): Sequences within the First Exon of *BCR* Inhibit the Activated Tyrosine Kinases of c-Abl and the Bcr-Abl Oncoprotein. *Cancer Research* **56**, 5120-5124.
- LOEB, LA., TARTOF, K.D. & TRAVAGLINI, E.C. (1973): Copying natural RNAs with E. coli DNA polymerase I. *Nature New Biology* **242**, 66-69
- LOZZIO, C.B. & LOZZIO, B.B. (1975): Human chronic myelogenous cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45** (3), 321-334.
- LU, W., HAN, D.-S., YUAN, J. & ANDRIEU, J.M. (1994): Multi-target PCR analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Nature* **368**, 269-271.
- MALINGE, M.C., MAHON, F.X., DELFAU, M.H., DAHERON, L., KITZIS, A., GUILHOT, F., TAMZER, J. & GRANDCHAMP, B. (1992): Quantitative Determination of the hybrid Bcr-Abl RNA in patients with chronic myelogenous leukaemia under interferon therapy. *British Journal of Haematology* **82**, 701-707.
- MAR-AGUILAR, F., GOMEZ-ALMAGUER, D., CARRIZALES-VILLAREAL, J.A., VIADER-SALVADO, J.M. & BARRERA-SALSANA H.A. (1998): Detecting residual bcr-abl transcripts in chronic myeloid leukaemia patients using coupled reverse transcriptase-polymerase chain reaction with rTth DNA polymerase. *Clinical Laboratory Haematology* **20**, 221-224.

- MARTIN, P.J., CLIFT, R.A., FISHER, L.D., BUCKNER, C.D., HANSEN, J.A., APPELBAUM, F.R., DONEY, K.C., SULLIVAN, K.M., WITHERSPOON, R.P., STORB, R. (1988): HLA-identical marrow transplantation during accelerated-phase chronic myelogenous leukemia: analysis of survival and remission duration. *Blood* **72**, 1978-1984.
- MARTINELLI, G., SESSAREGO, M., GASPARINI, P., AMBROSETTI, A., FRASSONI, F., CHIAMENTI, A.M. & PIGNATTI, P.F. (1991): An assessment of chimeric transcript detection in CML patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* **7**, 21.
- MARTINELLI, G., TESTONI, N., MONTEFUSCO, V., AMABILE, M., SAGLIO, G., OTTAVIANI, E., TERRAGNA, C., BONIFAZZI, F., DE VIVO, A., PANE, F., ROSTI, G. & TURA, S. (1998): Detection of *bcr-abl* transcript in chronic myelogenous leukemia patients by reverse-transcription-polymerase chain reaction and capillary electrophoresis. *Haematologica* **83**, 593-601.
- MARTINELLI, G., MONTEFUSCO, V., TESTONI, N., AMABILE, M., SAGLIO, G., OTTAVIANI, E., TERRAGNA, C., BONIFAZZI, F., ROSTI, G., BANDINI, G. & TURA, S. (2000A): Clinical value of quantitative long-term assessment of bcr-abl chimeric transcript in chronic myelogenous leukemia patients after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica* **85**, 653-658.
- MARTINELLI, G., TESTONI, N., AMABILE, M., BONIFAZZI, F., DE VIVO, A., FARABEGOLI, P., TERRAGNA, C., MONTEFUSCO, V., OTTAVIANI, E., SAGLIO, G., RUSSO, D., BACCARANI, M., ROSTI, G. & TURA, S. (2000B): Quantification of BCR-ABL transcripts in CML patients in cytogenetic remission after interferon-alpha-based therapy. *Bone Marrow Transplantation* **25**, 729-736.
- MARU, Y. & WITTE, O.N. (1991): The BCR gene encodes a novel serin/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* **67**, 459-468.
- MCCULLOCH, R.K., CHOONG, C.S. & HURLEY, D.M. (1995): An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR. *PCR Methods Applic.* **4**, 219-226.
- MCGLAIVE, P., BARTSCH, G., ANASETTI, C., ASH, R., BEATTY, P., GAJEWSKI, J. & KERNAN, N.A. (1993): Unrelated Donor marrow transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia: Initial experience of the National Marrow Donor Program. *Blood* **81**, 543-550.
- MCLAUGHLIN, J., CHIANESE, E. & WITTE, O.N. (1987): In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the p210 bcr/abl oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **84**, 6558-6562.
- MCWHIRTER, J.R., GALASSO, D.L. & WANG, J.Y.J. (1993): A Coiled-Coil oligomerization domain of BCR is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Molecular Cell Biology* **13**, 7587-7595.
- MCWHIRTER, J.R. & WANG, J.Y.J. (1991): Activation of tyrosine kinase and microfilament-binding functions of c-Abl by Bcr sequences in BCR/ABL fusion proteins. *Molecular Cell biology* **11**, 1553-1565.

- MCWHIRTER, J.R. & WANG, J.Y.J. (1993): An actin-binding function contributes to transformation by the bcr/abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO Journal* **12**, 1553-1565.
- MEISS, G., FRANKE, I., GIMADUTDINOW, O., URBANKE, C. & PINGOUD, A. (1998): Biochemical characterization of *Anabaena* sp. strain PCC7120 non-specific nuclease NucA and its inhibitor NuiA. *European Journal of Biochemistry* **251**, 924-934.
- MENON, R.S., CHANG, Y.F., ST.CLAIR, J. & HAM, R.G. (1991): RT-PCR artifacts from processed pseudogenes. *PCR Methods Appl.* **1**, 70-71.
- MENSINK, E., VAN DE LOCHT, A., SCHATTENBERG, A., LINDERS, E., SCHAAP, N., GEURTS VAN KESSEL, A. & DE WITTE, T. (1998): Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *British Journal of Haematology* **102**, 768-774.
- MES-MASSON, A.M., MCLAUGHLIN, J., DALEY, G.Q., PASKIND, M. & WITTE, O.N. (1986): Overlapping cDNA clones define the complete coding region for the p210 bcr-abl gene product associated with chronic myelogenous leukemia cells containing the Philadelphia chromosome. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **83**, 9768-9772.
- MILLS, K.I., BENN, P. & BIRNIE, G.D. (1991): Does the breakpoint within the major breakpoint cluster region (M-bcr) influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia? An analytical comparison of current literature. *Blood* **78**, 1155-61.
- MORAVKOVÁ, J., LUKÁSOVÁ, M., STARY, J. & HASKOVEC, C. (1998): Simple competitive two-step RT-PCR assay to monitor minimal residual disease in CML patients after bone marrow transplantation. *Leukemia* **12**, 1303-1312.
- MORAVKOVÁ, J., NÁDVORNÍKOVÁ, S., LUKÁSOVÁ, M. & KLAMOVIČ, H. (1999): Polymerase Chain Reaction Analyses Should Be Used as a Basis for Clinical Decision Making in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood* **94**, 3609-3611.
- MORGAN, G.J., HUGHES, T., JANSSEN, J.W., GOW, J., GUO, A.P., GOLDMAN, J.M., WIEDEMANN, L.M. & BARTRAM, C.R. (1989): Polymerase chain reaction for detection of residual leukaemia. *Lancet* **1**, 928-929.
- MULDER, I., MCKINNEY, N., CHRISTOPHERSON, C., SNINSKY, J., GREENFIELD, L. & KWOK, S. (1994): Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *Journal of Clinical Microbiology* **32**, 292-300
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium* **51**, 263-273.
- MYERS, T.W. & GELFAND, D.H. (1991): Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**, 7661-7666.

- NAGEL, S., SCHMIDT, M., THIEDE, C., HUHN, D. & NEUBAUER, A. (1996): Quantification of Bcr-Abl transcripts in chronic myelogenous leukemia (CML) using standardized, internally controlled, competitive differential PCR (CD-PCR). *Nucleic Acids Research* **24**, 4102-4103.
- NAZARENKO, I.A., BAHTANAGAR, S.K. & HOHMAN, R.J. (1997): A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Research*, **25**, 2516-2521.
- NEHME, A., BASKARAN, R., AEBI, S., FINK, D., NEBEL, S., CENNI, B., WANG, J.Y., HOWELL, S.B. & CHRISTEN, R.D. (1997): Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA-mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. *Cancer Research* **57**, 3253-3257.
- NESI, M., RIGHETTI, P.G., PATROSSO, M.C., FERLINI, A. & CHIARI, M. (1994): Capillary electrophoresis of polymerase chain reaction-amplified products in polymer networks: the case of Kennedy's disease. *Electrophoresis* **15**, 644-646.
- NG, S.Y., GUNNING, P., EDDY, R., PONTE, P., LEAVITT, J., SHOWS, T. & KEDES, L. (1985): Evolution of the functional human beta-actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Molecular Cell Biology* **5**, 2720-2732.
- NOGVA, H.K., EVENSEN, S.A. & MADSHUS, I.H. (1998): One-tube multiplex RT-PCR of BCR-ABL transcripts in analysis of patients with chronic myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigations* **58**, 647-654.
- NOWELL, P.C. & HUNGERFORD, D.A. (1960): A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* **132**, 1497.
- O'BRIAN, S.G. & GOLDMAN, J.M. (1995): Current approaches to hematopoietic stem-cell purging in chronic myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **13**, 541-546.
- PEGORARO, L., MATERA, L., RITZ, J., LEVIS, A., PALUMBO, A. & BIAGINI, G. (1983): Establishment of a Ph1-positive human cell line (BV173). *Journal of the National Cancer Institute* **70**, 447-453.
- PENDERGAST, A.N., MULLER, A.J., HAVLIK, M.H., CLARK, R., MCCORMICK, F. & WHITE, O.N. (1991): Evidences for regulation of the human ABL tyrosine kinase by a cellular inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **88**, 5927-5931.
- PENDERGAST, A.M., QUILLIAM, L.A., CRIFE, L.D., BASSING, C.H., DAI, Z., LI, N., BATZER, A., RABUN, K.M., DER, C.J., SCHLESSINGER, J. & GISHIZKY, M.L. (1993): BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2-domain of the GRB-2-adaptor protein. *Cell* **75**, 175-185.
- PREUDHOMME, C., RÉVILLION, F., MERLAT, A., HORNEZ, L., ROUMIER, C., DUFLOS-GRARDEL, N., JOUET, J.P., COSSON, A., PEYRAT, J.P. & FENAUX, P. (1999): Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using a 'real-time' quantitative RT-PCR assay. *Leukemia* **13**, 957-964.

- PUIL, L., LIU, J., GISH, G., MBAMALU, G., BOWTELL, D., PELICCI, P.G., ARLINGHAUS, R. & PAWSON, T. (1994): Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO* **13**, 764-773.
- RABBIT, T.H., & RABBITS, P.H. (1989): Molecular pathology of chromosomal abnormalities and cancer genes in human tumors. In: *Oncogenes*. GLOVER, D.M. & HAMES, B.D. (Eds.) *Oxford University Press*, Oxford, New York, Tokyo, 67-111.
- RAEYMAKERS, L. (1993): Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. *Analytical Biochemistry* **214**, 582-585.
- RAEYMAKERS, L. (1995): A commentary on the practical applications of competitive PCR. *Genome Research* **5**, 91-94.
- RAMAKRISHNAN, L. & ROSENBERG, N. (1989): Abl genes. *Biochemica and Biophysica Acta* **989**, 209-224.
- REITER, A., SKLADNY, H., HOCHHAUS, A., SEIFARTH, W., HEIMPEL, H., BARTRAM, C.R., CROSS, N.C.P. & HEHLMANN, R. (1997): Molecular response of CML patients treated with interferon- $\alpha$  monitored by quantitative Southern blot analysis. *British Journal of Haematology* **97**, 86-93.
- RIERI, K.M., RASMUSSEN, R.P. & WITTEW, C.T. (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, **245**, 154-160.
- ROWLEY J.D. (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* **243**, 290-293.
- SACCHI, S., KANTARIJIAN, H.M., SMITH, T.L., O'BRIAN, S., PIERCE, S., KORNBLOU, S., BERAN, M., KEATING, M.J. & TALPAZ, M. (1998): Early treatment decisions with interferon-alfa therapy in early chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **16**, 882-889.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. & ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. (1994): Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Journal of Experimental Medicine* **179**, 1109-1118.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989): *Molecular Cloning (2<sup>nd</sup>)*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor.



- SANCHEZ, O., EXCOBAR, J.J. & YUNIS, J.J. (1973): A simple G-banding technique. *Lancet* **2**, 269.
- SANGER, F. & COULSON A.R. (1975): A rapid method for determining sequence in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* **94**, 441-448.
- SAWYERS, C.L. (1999): Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine* **340**, 1330-1340.
- SCHINDLER, T., BORNMANN, W., PELLICENA, P., MILLER, W:T:, CLARKSON, B. & KURIYAN, J. (2000): Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson tyrosine Kinase. *Science* **289**, 1938-1942.
- SCHWARTZ, H.E. & ULFELDER, K.J. (1992): Capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection of PCR fragments using thiazole orange. *Analytical Biochemistry* **64**, 2348-2351.
- SCHWARTZBERG, P.L., STALL, A.M., HARDIN, J.D., BOWDISH, K.S., HUMARAN, T., BOAST, S., SALOMONI, P., ANTONYAK, M., MARTINEZ, R., MAJEWSKI, M., WONG, A., PERUSSIA, B. & CALABRETTA, B. (1998): The SH3-domain contributes to BCR/ABL-dependent leukemogenesis in vivo: role in adhesion, invasion and homing. *Blood* **91**, 406-418.
- SCHLEUNING, M., MITTERMULLER, J. & KOLB, H.J. (1999): Bcr-abl protein detection in peripheral blood mononuclear cells for follow-up of chronic myelogenous leukaemia patients. *European Journal of Haematology* **62**, 149-154.
- SHTIVELMAN, E., KLIFSHITZ, B., GALE, R.P., ROE, B.A. & CANAANI, E. (1986): Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* fused gene. *Cell* **47**, 277-284.
- SOCINSKI, M.A., CANNISTRA, S.A., ELIAS, A., ANTMAN, K.H., SCHNIPPER, L. & GRIFFIN, J.D. (1988): Granulocytemacrophage colony-stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartement in man. *Lancet* **1**, 1194-1198.
- SOKAL, J.E., COX, E.B., BACCARANI, M., TURA, S., GOMEZ, G.A., ROBERTSON, J.E., TSO, C.Y., BRAUN, T.J., CLARKSON, B.D. & CERVANTES, F. (1984): Prognostic discrimination in good risk chronic granulocytic leukemia. *Blood* **63**, 789-799.
- SOKAL, J.E., BACCARANI, M., RUSSO, D. & TURA, S. (1988): Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Seminars in Hematology* **25**, 49-61.
- SOUTHERN, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoreses. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-507.
- STAM, K., HEISTERKAMP, N., REYNOLDS, F.H. & GROFFEN, J. (1987): Evidences that the PH gene encodes a 160.000-dalton phosphoprotein with associated kinase activity. *Molecular Cell Biology* **7**, 1955-1960.

- SURYANARAYANA, K., WILTROUT, T.A., VASQUEZ, G.M., HIRSCH, V.M. & LIFSON, J.D. (1998): Plasma SIV RNA viral load determination by real-time quantification of product generation in reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *AIDS Research and Human Retroviruses* **14**, 183-189.
- TALPAZ, M., KANTARJIAN, H., KURZROCK, R., TRUJILLO, J.M. & GUTTERMANN, J.U. (1991): Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myeloid leukemia. *Annals Intern Medicine* **114**, 532-538.
- TAJ, A.S., MARTIAT, P., DHUT, S., CHAPLIN, T.L., DOWDING, C., THÜNG, K.H., GOLDSTEIN, I., DALEY, G.Q., YOUNG, B.D. & GOLDMAN, J.M. (1990): Inhibition of p210 BCR/ABL expression in K562 cells by electroporation with an antisense oligonucleotide. *Leukemia Lymphoma* **3**, 201-208.
- THE ITALIAN COOPERATIVE STUDY GROUP ON CHRONIC MYELOID LEUKEMIA (1994): Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* **330**, 820-825.
- TKACHUK, D.C., WESTBROOK, C.A., ANDREEFF, M., DONLON, T.A., CLEARY, M.L., SURYANARAYAN, K., HOMGE, M., REDNERM A., GRAY, J. & PINKEL, D. (1990): Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by *in situ* hybridization. *Science* **250**, 559-562.
- TYAGI, S. & KRAMER, F.R. (1996): Molecular Beacons – probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* **14**, 303-308.
- TYBULEWICZ, V.L.J., CRAWFORD, C.E., JACKSON, P.K., BRONSON, R.T. & MULLIGAN, R.C. (1991): Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* **65**, 669-678.
- VAN ETEN, R.A., JACKSON, P. & BALTIMORE, D. (1989): The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* **58**, 669-678.
- VAN RHEE, F., SZYDLO, R.M., HERMANS, J., DEVERGIE, A., FRASSONI, F., ARCESE, W., DE WITTE, T., KOLB, H.J., NIEDERWISER, D., JACOBSEN, N., GAHRTON, G., BANDINI, G., CARRERAS, E., BACIGALUPO, A., MICHALLET, M., RUUTU, T., REIFFERS, J., GOLDMAN, J.M., APPERLEY, J. & GRATWOHL, A. (1997): Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* **20**, 553-560.
- VERSCHRAEGEN, C.F., TALPAZ, M., HIRSCH-GINSBERG, C.F., PHERWANI, R., RIOS, M.B., STASS, S.A. & KANTARJIAN, H.M. (1995): Quantification of the break point cluster region rearrangement for clinical monitoring in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* **85**, 2705-2710.
- VIRCHOW, R. (1845): Weisses Blut. *Frorieps Notizen* **36**, 151-156.

- WALLER, C.F., DENNEBAUM, G., FELDMANN, C. & LANGE, W. (1999): Long-template DNA polymerase chain reaction for the detection of the bcr/abl translocation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Research* **5**, 4146-4151.
- WANG, J.Y. & BALTIMORE, D., (1983): Cellular RNA homologous to the Abelson murine leukemia virus transforming gene: Expression and relationship to the viral sequence. *Molecular Cell Biology* **3**, 773-779.
- WANG, J.Y. (1998): Cellular responses to DNA damage. *Current Opinions in Cell Biology* **10**, 240-247.
- WEINBERGER, R. (1993): Practical Capillary Electrophoresis. *Academic Press*, San Diego.
- WELCH, P.J. & WANG, J.Y.J. (1993): A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-abl tyrosine kinase in the cell-cycle. *Cell* **75**, 779-790.
- WERNER, M., NOLTE, M., EWING, M., KALOUTSI, V., KAUSCHE, F. & GEORGII, A. (1995): Zytogenetik und molekulare Untersuchungen sichern die histopathologischen Diagnosen von chronisch myeloproliferativen Erkrankungen ab. *Pathologe* **16**, 41-45.
- WHITCOMBE, D., THEAKER, J., GUY, S.P., BROWN, T. & LITTLE, S. (1999): Detecting of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology*, **17**, 804-807.
- WITTOR, H., LEYING, H., HOCHHAUS, A. & VAN MILTENBERG, R. (2000): Real-time Quantification of BCR-ABL mRNA Transcripts Using the LightCycler-t(9;22) Quantification Kit. *Biochemica* **2**, 8-11.
- WITTWER, C.T. HERRMANN, M.G., MOSS, A.A. & RASMUSSEN, R.P. (1997A): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, **22**, 130-131.
- WITTWER, C.T., RIRIE, K.M., ANDREW, R.V., DAVID, D.A., GUNDR, R.A. & BALIS, U.J. (1997B): The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **22**, 176-181.
- YANAGI, M. SHINJO, K., TAKESHITA, A., TOBITA, T., YANO, K., KOBAYASHI, M., TERASAKI, H., NAOE, T., OHNISHI, K. & OHNO, R. (1999): Simple and reliably sensitive diagnosis and monitoring of Philadelphia chromosome-positive cells in chronic myeloid leukemia by interphase fluorescence *in situ* hybridization of peripheral blood cells. *Leukemia* **13**, 542-552.
- YOUNG, J.W., SCABOLCS, P. & MOORE, M.A.S. (1995): Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34<sup>+</sup> bone marrow progenitors that are expanded by c-kit ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of GM-CSF and TNF $\alpha$ . *Journal of Experimental Medicine* **182**, 1111-1120.
- YOUNG, K.K.Y., RESNICK, R.M. & MYERS, T.W. (1993): Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 882-886.
- ZABEAU, M. & STANLEY, K.K. (1982): Enhanced expression of cro-b-galactosidase fusion proteins under the control of P<sub>R</sub> promotor of bacteriophage  $\lambda$ . *EMBO Journal*, **1**, 1217-1224.

**INTERNET-ADRESSEN**

[1] <http://www.bassarek.de/Leukaemie>

[2] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

## 7 Anhang

### 7.1 Sequenzen

#### 7.1.1 Sequenz des *BCR/ABL*-Inserts in pBSBA7

Bei dem Plasmid pBSBA7 handelt es sich um einen Bluescript-Vektor M13- der Firma Stratagene, in den an der *Sma*I-Restriktionsschnittstelle innerhalb der *multiple cloning site* ein 601 Bp großes Genfragment des *BCR/ABL*-Fusionsgens kloniert wurde. Es handelt sich hierbei um die b3a2-Variante des Fusionsgens, von dem die ersten drei Exone des *BCR*-Gens sowie das Exon2 und partiell das Exon 3 des *ABL*-Gens insertiert wurden. Nachfolgend aufgeführt ist die Sequenz des Inserts, die Lage der verwendeten Primer und Hybridisierungssonden, sowie die für die QC-RT-PCR verwendete Restriktionsschnittstelle (*Hind*III, spezifisch für die Wildtyp-Sequenz):

```

1  ATGTCTCCCA GCATGGCCTT CAGGGTGCAC AGCCGCAACG bcr(1) GCAAGAGTTA bcr(2) CACGTTCCCTG
61 ATCTCCTCTG ACTATGAGCG TGCAGAGTGG LC (1) up AGGGAGAACA TCCGGGAGCA GCAGAAGAAG
121 TGTTTCAGAA LC (2) WT-down GCTTCTCCCT GACATCCGTG GAGCTGCAGA TGCTGACCAA CTCGTGTGTG
181 AAACTCCAGA CTGTCCACAG CATTCCGCTG ACCATCAATA AGGAAGATGA TGAGTCTCCG
241 GGGCTCTATG GGTTTCTGAA TGTCATCGTC CACTCAGCCA CTGGATTTAA GCAGAGTTCA
*          abl (1)          abl (2)
301 AAAGCCCTTTC AGCGGCCAGT AGCATCTGAC TTTGAGCCTC AGGGTCTGAG TGAAGCCGCT
361 CGTTGGAACT CCAAGGAAAA CCTTCTCGCT GGACCCAGTG AAAATGACCC CAACCTTTTC
421 GTTGCACTGT ATGATTTTGT GGCCAGTGGA GATAACACTC TAAGCATAAC TAAAGGTGAA
481 AAGCTCCGGG TCTTAGGCTA TAATCACAAT GGGGAATGGT GTGAAGCCCA AACCAAAAAT
541 GGCCAAGGCT GGGTCCCAAG CAACTACATC ACGCCAGTCA ACAGTCTGGA GAAACACTCC
601 T

```

\* Fusionsstelle zwischen *BCR*- und *ABL*-Gen

## 7.1.2 Sequenz des *GAPDH*-Gens

Nachfolgend ist die komplette cDNA-Sequenz des *GAPDH* (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-Gens (Zugangs-Nr. M002046, [2]) mit den zur Klonierung verwendeten Primern (GAP-H-*Xho*I, bzw. -R-*Bam*HI), den PCR-Primern (GAP-for bzw. -rev) und den fluoreszenzmarkierten Hybridisierungs sonden (GAP-up bzw. -down) sowie der als Stop für die *in-vitro*-Transkription verwendete *Ksp*I-Restriktionsschnittstelle aufgeführt:

### GAP-H-*Xho*I

CCGCTCGAGATGGGGAAGG TGAAGGTCG

1 ATGGGGAAGG TGAAGGTCGG AGTCAACGGA TTTGGTCGTA TTGGGCGCCT GGTACCAGG

61 GCTGCTTTTA ACTCTGGTAA AGTGGATATT GTTGCCATCA ATGACCCCTT CATTGACCTC

121 AACTACATGG TTTACATGTT CCAATATGAT TCCACCCATG GCAAATTCCTA TGGCACCCTC

181 AAGGCTGAGA ACGGGAAGCT TGTCAATCAAT GGAAATCCCA TCACCATCTT CCAGGAGCGA

241 GATCCCTCCA AAATCAAGTG GGGCGATGCT GGCCTGAGT ACGTCGTGGA GTCCACTGGC

### GAP-for

301 GTCTTACCA CCATGGAGAA GGCTGGGGCT CATTTGCAGG GGGGAGCCAA AAGGGTCATC

361 ATCTCTGCCC CCTCTGCTGA TGCCCCATG TTCGTCATGG GTGTGAACCA TGAGAAGTAT

421 GACAACAGCC TCAAGATCAT CAGCAATGCC TCCTGCACCA CCAACTGCTT AGCACCCCTG

### down

481 GCCAAGGTCA TCCATGACAA CTTTGGTATC GTGGAAGGAC TCATGACCAC AGTCCATGCC

### GAP-rev

541 ATCACTGCCA CCCAGAAGAC TGTGGATGGC CCCTCCGGGA AACTGTGGCG TGATGGCCGC

### *Ksp*I

601 GGGGCTCTCC AGAACATCAT CCCTGCCTCT ACTGGCGCTG CCAAGGCTGT GGGCAAGGTC

661 ATCCCTGAGC TGAACGGGAA GCTCACTGGC ATGGCCTTCC GTGTCCCAC TGCCAACGTG

721 TCAGTGGTGG ACCTGACCTG CCGTCTAGAA AAACCTGCCA AATATGATGA CATCAAGAAG

781 GTGGTGAAGC AGGCGTCGGA GGGCCCCCTC AAGGGCATCC TGGGCTACAC TGAGCACCAG

841 GTGGTCTCCT CTGACTTCAA CAGCGACACC CACTCCTCCA CCTTTGACGC TGGGGCTGGC

901 ATTGCCCTCA ACGACCACTT TGTCAAGCTC ATTTCCCTGGT ATGACAACGA ATTTGGCTAC

961 AGCAACAGGG TGGTGGACCT CATGGCCCAC ATGGCCTCCA AGGAGTAA

TG TACCGGAGGT TCCTCATT--CTAGGGCG

GAP-R-*Bam*HI

### 7.1.3 Sequenz des *PBGD*-Gens

Nachfolgend ist die komplette cDNA-Sequenz des *PBGD* (Porphobilinogen-Deaminase)-Gens (Zugangs-Nr. M95623, [2]) mit den zur Klonierung verwendeten Primern (pbgd-H-*Xho*I, bzw. -R-*Bam*HI), den PCR-Primern (pbgd3 bzw. pbgd8, Nagel *et al.*, 1996) und den fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden (pbgd(1)-up bzw. pbgd(2)-down) sowie der als Stop für die *in-vitro*-Transkription verwendete *Nsi*I-Restriktionsschnittstelle aufgeführt:

#### pbgd-H-*Xho*I

```

CCGCTCGAGATGTCTGGTA ACGGCAATG                               pbgd3
 1 ATGTCTGGTA ACGGCAATGC GGCTGCAACG GCGGAAGAAA ACAGCCCAA GATGAGAGTG

61 ATTTCGCGTGG GTACCCGCAA GAGCCAGCTT GCTCGCATAC AGACGGACAG TGTGGTGGCA

                               pbgd(1)-up                               pbgd(2)-down
121 ACATTGAAAG CCTCGTACCC TGGCCTGCAG TTTGAAATCA TTGCTATGTC CACCACAGGG

181 GACAAGATTC TTGATACTGC ACTCTCTAAG ATTGGAGAGA AAAGCCTGTT TACCAAGGAG

241 CTTGAACATG CCCTGGAGAA GAATGAAGTG GACCTGGTTG TTCACTCCTT GAAGGACCTG

                               pbgd8
301 CCCACTGTGC TTCCTCCTGG CTTCACCATC GGAGCCATCT GCAAGCGGGA AAACCCTCAT

361 GATGCTGTTG TCTTTCACCC AAAATTTGTT GGAAGACCC TAGAAACCCT GCCAGAGAAG

421 AGTGTGGTGG GAACCAGCTC CCTGCGAAGA GCAGCCCAGC TGCAGAGAAA GTTCCCGCAT

481 CTGGAGTTCA GGAGTATTCG GGGAAACCTC AACACCCGGC TTCGGAAGAT GGACGAGCAG

541 CAGGAGTTCA GTGCCATCAT CCTGGCAACA GCTGGCCTGC AGCGCATGGG CTGGCACAAC

601 CGGGTTGGGC AGATCCTGCA CCCTGAGGAA TGCATGTATG CTGTGGGCCA GGGGGCCTTG

                               NsiI
661 GCGGTGGAAG TGCGAGCCAA GGACCAGGAC ATCTTGGATC TGGTGGGTGT GCTGCACGAT

721 CCCGAGACTC TGCTTCGCTG CATCGCTGAA AGGGCCTTCC TGAGGCACCT GGAAGGAGGC

781 TGCAGTGTGC CAGTAGCCGT GCATACAGCT ATGAAGGATG GGCAACTGTA CCTGACTGGA

841 GGAGTCTGGA GTCTAGACGG CTCAGATAGC ATACAAGAGA CCATGCAGGC TACCATCCAT

901 GTCCCTGCCC AGCATGAAGA TGGCCCTGAG GATGACCCAC AGTTGGTAGG CATCACTGCT

961 CGTAACATTC CACGAGGGCC CCAGTTGGCT GCCCAGAACT TGGGCATCAG CCTGGCCAAC

1021 TTGTTGCTGA GCAAAGGAGC CAAAAACATC CTGGATGTTG CACGGCAGCT TAACGATGCC
                               TCGA ATTGCTACGG

1081 CATTAA
      GTAATTCCTAGGGCG
      pbgd-R-BamHI

```

## 7.2 Ergebnisse und Daten des analysierten klinischen Probenmaterials

### 7.2.1 Patienten-Proben der Universitätsklinik Giessen

Patient Nr.	m/w	Alter	Therapie	Datum	Material	RNA [ng/µl]	Kopien <i>BCR/ABL</i>	Kopien <i>PBGD</i>	Quotient	Variante
<b>H1</b>	w	34	unbehandelt	24.02.97	KM*	1198	<b>6259118</b>	<b>44390</b>	<b>14100.29%</b>	b2a2
<b>H2</b>	w	42	n.b.	11.03.97	Blut*	1212	<b>60978944</b>	<b>1912153</b>	<b>3189.02%</b>	b3a2
<b>H3</b>	w	64	HU	03.04.97	KM*	11	<b>63038</b>	<b>27696399</b>	<b>0.23%</b>	b3a2
<b>H4</b>	m	60	HU	12.05.97	KM*	893	<b>62828054</b>	<b>4217893</b>	<b>1489.56%</b>	b2a2
<b>H5</b>	w	56	HU	07.07.97	Blut*	374	<b>11870954</b>	<b>119631</b>	<b>9922.97%</b>	b2a2
<b>H6</b>	w	35	n.b.	25.05.97	KM*	639	<b>1833103</b>	<b>309513</b>	<b>592.25%</b>	b3a2
<b>H7</b>	w	53	Ara-C	16.12.97	KM*	1021	<b>6289890</b>	<b>173527</b>	<b>3624.73%</b>	b3a2
<b>H8</b>	m	51	HU, Ara-C	20.02.98	KM*	1071	<b>571251</b>	<b>28555</b>	<b>2000.53%</b>	b2a2
<b>H9</b>	w	86	HU	25.02.98	KM*	104	neg.	neg.	<b>0.00%</b>	
<b>H10</b>	m	88	HU	16.04.98	KM*	175	neg.	neg.	<b>0.00%</b>	
<b>H11</b>	w	60	HU	21.04.98	KM*	106	neg.	neg.	<b>0.00%</b>	
<b>H12</b>	m	61	IFN-α	30.06.98	KM*	576	<b>3634363</b>	<b>97994</b>	<b>3708.76%</b>	b2a2
<b>H13</b>	w	50	Erstdiagnose	14.07.98	KM*	985	<b>92183</b>	<b>6541</b>	<b>1409.31%</b>	b3a2
<b>H14</b>	w	49	IFN-α	31.05.99	Blut	142	<b>492271</b>	<b>11780</b>	<b>4178.87%</b>	b3a2
<b>H15</b>	w	69	unbehandelt	31.05.99	Blut	54	<b>185651</b>	<b>6114</b>	<b>3036.49%</b>	b3a2
<b>H16</b>	m	60	IFN-α/AraC	07.06.99	Blut	53	<b>319857</b>	<b>5105</b>	<b>6265.56%</b>	b2a2
<b>H17</b>	m	69	HU	07.06.99	Blut	476	<b>2966130</b>	<b>173252</b>	<b>1712.03%</b>	b3a2
<b>H18</b>	w	60	HU	14.06.99	Blut	33	<b>73637</b>	<b>4016</b>	<b>1833.59%</b>	b3a2
<b>H19</b>	w	71	Busulfan	15.06.99	Blut	563	<b>880123</b>	<b>21538</b>	<b>4086.37%</b>	b3a2
<b>H20</b>	m	53	IFN-α	28.06.99	Blut	9	<b>10870</b>	<b>740</b>	<b>1468.92%</b>	b2a2

**Therapie:** AraC: Arabinosyl-Cytosin  
 HU: Hydroxyurea  
 IFN-α: Interferon-alpha

**Material:** KM: Knochenmark  
 Blut: peripheres Blut  
 \*: bei -70 °C archivierte Proben



## 7.2.2 Patienten-Proben der Universitätsklinik Essen

Patient Nr.	m/w	Alter	Therapie (B/T)	Datum	Material	RNA [ng/µl]	Kopien BCR/ABL	Kopien PBGD	Quotient	Variante
E1	m	31	1/1*	17.11.99	KM	46	51476	6029	853.81%	b2a2
E2	m	55	0/0	20.12.99	KM	40	19940	8920	223.54%	b3a2
				20.12.99	Blut	60	10876	12211	89.07%	
E3	m	20	1/2	22.11.99	KM	4	1860	1140	163.16%	b2a2
				14.12.99	Blut	71	187976	10351	1816.02%	
E4	m	48	1/1	08.12.99	Blut	107	1312	22423	5.85%	b2a2
E5	w	33	1/2*	12.01.00	KM	346	1457552	87901	1658.17%	b3a2
E6	m	38	1/1	27.10.99	Blut	46	1220	1619	75.36%	
E7	w	32	1/1	29.11.99	Blut	34	23346	4834	482.95%	b3a2
E8	w	46	1/2	Nov.99	Amp.	256	neg.	n.b.	0.00%	
E9	w	43	1/2	Nov.99	Amp.	63	neg.	10460	0.00%	
E10	w	28	1/2*	05.01.00	Blut	neg.	7012	4128	169.86%	b3a2
				05.01.00	KM	30	26607	4899	543.11%	
E11	m	51	1/2	vor KMT	Amp.	117	28824	n.b.		b2a2
E12	w	18	1/1	01.12.99	KM	156	2283017	94280	2421.53%	b2a2
E13	m	53	1/1	vor KMT	Amp.	66	7741	n.b.		b3a2
				15.12.99	Blut	61	263109	20433	1287.67%	
E14	m	33	1/2	vor KMT	Amp.	68	15084	3504	430.48%	b2a2
E15	m	30	1/2	06.01.00	Blut	neg.	276533	40185	688.15%	b2a2
				06.01.00	KM	265	495065	10545	4694.78%	
E16	w	22	4/2	28.10.99	Blut	50	4568	3212	142.22%	b3a2
				04.01.00	KM	51	neg.	27926	0.00%	
				15.12.99	Blut	32	6955	6067	114.64%	
				04.01.00	Blut	87	neg.	41645	0.00%	
E17	m	26	1/2	vor KMT	Amp.	69	191091	103082	185.38%	b3a2
E18	w	44	1/1	02.12.99	Blut	48	2428	5690	42.67%	b3a2
				11.01.00	Blut	109	6916	7573	91.32%	
E19	m	47	1/1	vor KMT	Amp.	660	3059726	182263	1678.74%	b3a2
				21.01.00	KM	130	5993	20635	29.04%	
E20	m	34	4/2	22.12.99	Blut	49	neg.	7934	0.00%	
E21	w	32	1/1	04.01.00	Blut	neg.	354212	7105	4985.39%	b2a2
				04.01.00	KM	203	684597	49063	1395.34%	
E22	m	34	3/2	Nov.99	Amp.	143	164	7872	2.08%	?
E23	w	22	1/2	15.12.99	KM	254	1116779	116187	961.19%	b3a2
E24	m	29	1/2*	Nov.99	Amp.	83	neg.	12207	0.00%	neg.
E25	m	38	1/1*	27.10.99	KM	498	742363	26071	2847.47%	b3a2
E26	w	31	1/2*	08.12.99	KM	186	373059	12351	3020.48%	b2a2
E27	m	57	1/1	vor KMT	Amp.	129	175259	13223	1325.41%	b3a2
E28	m	51	1/2*	27.10.99	Blut	48	1229	1523	80.70%	b3a2
				vor KMT	Amp.	55	25475	4663	546.32%	
E29	w	32	1/2	Nov.99	Amp.	80	neg.	2173	0.00%	neg.
E30	w	39	1/1	08.12.99	Blut	106	neg.	22817	0.00%	b3a2
				12.01.00	KM	64	461	8532	5.40%	
E31	m	44	4/2	28.10.99	Blut	78	4	8741	0.05%	?

Patient Nr.	m/w	Alter	Therapie (B/T)	Datum	Material	RNA [ng/µl]	Kopien <i>BCR/ABL</i>	Kopien <i>PBGD</i>	Quotient	Variante
E32	w	52	1/1	vor KMT	Amp.	42	3295	1354	243.35%	b3a2
E33	m	35	1/1	07.12.99	KM	125	3060822	98433	3109.55%	b3a2
E34	m	28	1/1	Nov.99	Amp.	86	neg.	n.b.	0.00%	neg.
E35	w	37	1/2	28.10.99	Blut	36	neg.	2360	0.00%	neg.
				03.12.99	Blut	59	neg.	50483	0.00%	
E36	w	35	1/1	28.10.99	KM	346	308594	27192	1134.87%	b2a2
				Nov.99	Amp.	74	20585	n.b.		
E37	m	?	?	24.11.99	KM	184	1317	112175	1.17%	?
E38	m	33	3/2	24.11.99	Blut	183	655485	23867	2746.41%	b2a2
				24.11.99	KM	221	2867410	139723	2052.21%	
				30.11.99	Blut	78	711629	19753	3602.64%	
				19.01.00	Blut	292	888040	20498	4332.33%	
E39	m	?	?	19.01.00	KM	81	11057	17549	63.01%	b3a2
E40	m	40	1/1	11.01.00	KM	49	83474	19241	433.83%	b3a2
				11.01.00	Blut	57	123437	13391	921.79%	
E41				vor KMT	Amp.	74	58131	9993	581.72%	b2a2

**Therapie: Bestrahlung/Transplantation:**

- 1: Ganzkörperbestrahlung und Cyclophosphamid (klassische Konditionierung)  
3: Fludarabin und Busulfan und ATG (Dosisreduzierte, nichtmyeloablative Konditionierung)  
4: Ganzkörperbestrahlung und Cyclophosphamid und Thiope (Konditionierung vor Transplantation mit Hochanreicherung von Stammzellen (CD34 hochangereicherte Blutstammzell-Transplantation)  
/1: Knochenmark  
/2: Blutstammzellen  
/0: vor Transplantation  
\*: Fremdspender

**Material:**

- KM: Knochenmarkbiopsie  
Blut: peripheres Blut  
Amp.: archivierte, in DMSO eingefrorene Zellen

**ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Die Arbeit wurde so oder in ähnlicher Form noch keinem anderen Prüfungsausschuß vorgelegt.

Annette Freist

Gießen, 21. Dezember 2000

---

## LEBENS LAUF

### *Persönliche Daten*

Name: Annette Freist, geb. Spies  
Geburtsdatum: 08.10.1966  
Geburtsort: Gummersbach  
Adresse: von-Diergardt-Str. 19b, 51375 Leverkusen  
Familienstand: verheiratet

### *Schulischer Werdegang*

1972-1973 evangelische Grundschule in Gummersbach  
1973-1976 Albert-Schweitzer-Grundschule in Wipperfürth  
1976-1985 Engelbert-von-Berg-Gymnasium in Wipperfürth  
Mai 1985 Abitur

### *Beruflicher Werdegang*

Aug. 1985 - Jan. 1988 Ausbildung zur Bankkauffrau, Volksbank Wipperfürth eG  
Jan. 1988 Prüfung vor der IHK Gummersbach  
Jan. 1988 - Sept. 1988 Angestellte der Volksbank Wipperfürth eG

### *Hochschulausbildung*

1988 - 1996 Studium der Biologie (Diplom) an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
1992 Diplom-Vorprüfung im Fach Biologie  
1995 Diplom-Hauptprüfung im Fach Biologie  
1995 - 1996 Diplomarbeit am Institut für Biochemie des Fachbereiches Biologie unter Anleitung von Prof. Dr. A.M. Pingoud  
Aug. 1996-Dez. 1996 wissenschaftliche Mitarbeiterin des Institutes für Biochemie des Fachbereiches Biologie der Justus-Liebig Universität Gießen  
Jan. 1997 – Dez. 1999 Stipendiatin des Graduiertenkollegs "Molekulare Biologie und Pharmakologie" in Gießen  
Jan. 1997- Dez. 2000 Promotion am Institut für Biochemie des Fachbereiches Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Anleitung von Prof. Dr. A.M. Pingoud