



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Vergleich und Optimierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Apoptosedetektion und Apoptoseverhalten blastärer Zellen bei akuten Leukämien nach Kurzzeit-in-vitro-Kultur mit Zytostatika

Autor: Jutta Wucher
Institut / Klinik: Institut für Klinische Chemie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. H. Wisser

Akute Leukämien, auch in den Unterformen mit lymphatischer (ALL) oder myeloischer (AML) Differenzierung, stellen eine heterogene Gruppe maligner hämatologischer Neoplasien dar. Die Behandlung basiert im wesentlichen auf einer intensiven Chemotherapie mit wechselnden Zytostatika-Kombinationen. Die Behandlungschancen sind, insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die verabreichten Zytostatika eine zum Teil erhebliche Toxizität aufweisen, noch immer unbefriedigend. Das therapeutische Ansprechen ist interindividuell unterschiedlich und lässt sich im Einzelfall nicht vorhersagen.

Ein therapeutisches Wirkprinzip ist die Auslösung des programmierten Zelltodes (Apoptose) in den leukämischen Blasten. Die Apoptose ist eine physiologische, genetisch programmierte und regulierte Form des Zellsterbens, die den Gesamtorganismus nicht belastet. In den vergangenen Jahren wurden auf der Grundlage der typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen mehrere Methoden entwickelt, mit denen Apoptose schnell und zuverlässig mittels einer durchflusszytometrischen Analyse erfassbar ist.

Im Rahmen dieser Arbeit werden vier etablierte Methoden – Ausschluss des fluoreszenten DNA-Farbstoffes Propidiumiodid, Verlängerung von DNA-Fragmenten mit fluoreszenz-markierten Nucleotiden (TUNEL-Methode), Sub-G₁-DNA-Messung nach NICOLETTI und Messung der Membrandepolarisation durch Doppelfärbung mit Annexin-V/Propidiumiodid – miteinander verglichen und beurteilt. Der Austausch von Propidiumiodid gegen den schmalbundigen Avitalfarbstoff 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) ermöglichte es uns, durch eine zusätzliche Oberflächen-Immunfluoreszenz selektiv bestimmte Zellpopulationen in ihrem Apoptoseverhalten zu untersuchen.

Das optimierte Verfahren wurde exemplarisch an peripheren Blutproben von 11 Patienten mit akuter myeloischer oder lymphatischer Leukämie zur gezielten Messung der *ex-vivo*-Spontanapoptose der leukämischen Blasten sowie zur Apoptosemessung nach Kurzzeit-in-vitro-Kultur mit Zytostatika eingesetzt. Dabei konnte eine interindividuell stark unterschiedliche Apoptosesensibilität gezeigt werden. Eine Dosissteigerung der Einzelsubstanz sowie die die Inkubation mit verschiedenen Zytostatika-Kombinationen erbrachte nicht zwangsläufig eine hohe Apoptoserate, so dass die individuelle Apoptosebereitschaft der Blasten möglicherweise einen grösseren Einfluss auf das therapeutische Ansprechen hat als Art, Dosis und Kombination der verabreichten Zytostatika. Die Ergebnisse unterstützen das Konzept eines individuellen Therapiemonitorings. Mit der von uns optimierten Methode zur durchflusszytometrischen Apoptosedetektion konnte ein einfaches, schnelles und zuverlässiges Verfahren etabliert werden, mit dem ein solche Therapieüberwachung möglich ist.