

Aus der Univeristätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)
Ärztlicher Direktor: PROFESSOR DR. R. HANDGRETINGER

**Identifikation einer Zellpopulation mit Stammzellmarkern mit
Korrelation zum klinischen Verlauf bei Diagnosestellung
akuter kindlicher Leukämien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
JÖRG AHLERS
aus Hamburg

- 2010 -

Dekan:

PROFESSOR DR. I. B. AUTENRIETH

1. Berichterstatter:

PROFESSOR DR. P. LANG

2. Berichterstatter:

PROFESSOR DR. L. KANZ

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Akute Leukämien	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie akuter Leukämien bei Kindern	1
1.1.2 Therapie der akuten Leukämie	3
1.2 Hämatopoetische Stammzellen	5
1.2.1 Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen.....	5
1.2.2 Nachweis hämatopoetischer Stammzellen.....	7
1.3 Leukämische Stammzellen	10
1.3.1 Bedeutung von leukämischen Stammzellen für die Entstehung von Leukämien	11
1.3.2 Problematik der Charakterisierung.....	13
1.3.3 Rolle von leukämischen Stammzellen bei Therapie, Resistenz und Rezidiv	14
1.4 Studienziel	15
2. Patienten und Material	16
2.1 Herkunft der Patientenproben und Einschlusskriterien	16
2.2 Allgemeine Geräte sowie Glas- und Kunststoff-Material.....	17
2.3 Allgemeine Chemikalien	19
2.4 Stammlösungen	20
2.5 Stammzellreagenzien, Antikörper und Fluorochrome sowie Leben/Tod-Marker	20
2.5.1 Stammzellreagenzien	20
2.5.2 Antikörper und Fluorochrome	21
2.5.3 Lebend/Tot-Marker	22
2.5.4 Beads.....	23

2.6 EDV-Programme	23
3. Methoden.....	24
3.1 Vorbereitung der Proben	24
3.1.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus frischem Knochenmark	24
3.1.2 Auftauen kryokonservierter Proben.....	24
3.2 Hoechst Färbung.....	25
3.2.1 Färbung der Zellen	26
3.2.2 Variationen bei Färbung und DyeCycle TM Violet reagent	27
3.2.3 FACS Analyse.....	28
3.3 Aldefluor Färbung.....	29
3.3.1 Aktivierung des Aldefluor®	30
3.3.2 Färbung der Zellen	31
3.3.3 FACS-Analyse	32
3.4 Monoklonale Oberflächenantikörper.....	32
3.4.1 Verwendete Epitope.....	33
3.4.2 Fluoreszenz-Farbstoffe	34
3.4.3 Konjugation von monoklonalen Antikörpern mit Fluorochromen	36
3.4.4 Färben der Zellen	38
3.5 Beads	39
3.5.1 Allgemeine Eigenschaften.....	39
3.5.2 Konjugation von Beads mit Fluorochromen.....	39
3.6 Lebend/Tot-Marker	40
3.6.1 Propidium Iodid	40
3.6.2 LIVE/DEAD®	41
3.7 Prinzip der Durchflusszytometrie	41
3.7.1 Aufbau des Geräts und Messtechnik	42
3.7.2 Auswertung der gewonnen Daten	44
3.7.3 Kompensation	45
3.8 Untersuchung der AML-/ALL-Patientenproben.....	47
3.8.1 Auswahl der Antikörper und Fluorochrome	47
3.8.2 Ablauf der Analyse	48
3.9 Auswertung der Daten.....	50

3.10 Statistik.....	54
3.10.1 T-Test.....	54
3.10.2 Pearson-Korrelation.....	54
3.11 Korrelation mit klinischem Verlauf.....	54
4. Ergebnisse.....	56
4.1 Einzelfärbungen	56
4.1.1 Hoechst	56
4.1.2 Aldefluor®	58
4.1.3 Antikörper	59
4.1.3.1 Vergleich von selbstkonjugierten mit kommerziell erhältlichen Antikörpern	59
4.1.3.2 Vergleich verschiedener Fluorochrome	61
4.1.4 Lebend/Tot-Marker	63
4.2 Kontrollmessungen an nicht an Leukämie erkrankten Kindern	63
4.3 ALL-Proben.....	64
4.3.1 Messergebnisse	64
4.3.2 Korrelation mit klinischem Verlauf	68
4.4 AML-Proben.....	71
4.4.1 Messergebnisse	71
4.4.2 Korrelation mit klinischem Verlauf.....	75
5. Diskussion	79
5.1 Allgemein	79
5.2 Kontrollmessungen an nicht an Leukämie erkrankten Kindern	82
5.3 ALL-Proben.....	82
5.3.1 Messergebnisse	82
5.3.2 Korrelation mit klinischen Parametern	84
5.3.2.1 Aldefluor®	84
5.3.2.2 Oberflächenantikörper	85
5.3.2.3 Allgemeine Beurteilung.....	86
5.4 AML	88
5.4.1 Messergebnisse	88

5.4.2 Korrelation mit klinischen Parametern	89
5.4.2.1 Korrelation mit Aldefluor®	89
5.4.2.2 Oberflächenantikörper	90
5.4.2.3 Allgemeine Beurteilung	90
5.5 Ausblick	92
6. Zusammenfassung	93
7. Literaturverzeichnis	96
8. Anhang	101
8.1 Patientengut und Messergebnisse	101
8.2 Abbildungsverzeichnis	105
8.3 Tabellenverzeichnis	107
9. Danksagung	108
10. Lebenslauf	109

Abkürzungsverzeichnis

ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALDH ^{br}	Population mit stark positiven Aldefluor®-Werten
AML	akute myeloische Leukämie
ALL	akute lymphatische Leukämie
CD	cluster of differentiation
CFU	colony forming unit
FSC	forward scatter
HSC	hämatopoetische Stammzelle
LIZ	leukämie-induzierende Zelle
LSC	leukämische Stammzelle
MNC	mononukleäre Zelle
MRD	minimal residual disease
SP	side population
SSC	side scatter
SSC ^{lo}	Population mit niedrigem side scatter

1. Einleitung

1.1 Akute Leukämien

Der Begriff Leukämie wurde erstmals von Virchow im 19. Jahrhundert geprägt, der pathologische Prozesse beschrieb, die durch eine stark erhöhte Zahl weißer Blutkörperchen charakterisiert wurden. Heute ist eine Leukämie definiert als eine Erkrankung des blutbildenden Systems, die durch ungehemmte Proliferation von Blutzellen und Verdrängung der normalen Hämatopoese unbehandelt zum Tod führt.

Leukämien werden nach der betroffenen Zelllinie klassifiziert. Entarten Zellen der lymphatischen Reihe, handelt es sich um eine lymphatische Leukämie, im anderen Fall um eine myeloische Leukämie. Die Einteilung in akut bzw. chronisch erfolgt nach dem natürlichen Verlauf: Bei den im Kindesalter seltenen chronischen Leukämien überleben die Patienten aufgrund der zunächst langsamen Progression unbehandelt bis zu mehreren Jahren, während die akuten Leukämien bereits innerhalb weniger Wochen bis Monate tödlich enden.

Inzwischen können viele Formen der akuten Leukämien durch zytotoxische Chemotherapeutika wirksam behandelt werden. Durch Eliminierung der malignen Zellen soll die normale Hämatopoese wieder hergestellt werden. Zwar sind die Heilungsraten bei Kindern sowohl für die akute myeloische Leukämie (AML) als auch für die akute lymphatische Leukämie (ALL) in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen, dennoch kommt es bei einigen Patienten zu Rückfällen (Gutjahr 2003).

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie akuter Leukämien bei Kindern

Bis zum 15. Lebensjahr machen Leukämien 34 % aller onkologischen Erkrankungen

aus (siehe Abb. 1.1). Im Vordergrund stehen hierbei – anders als bei Erwachsenen – die akuten Leukämien, wovon wiederum ALL mit 79 % deutlich häufiger sind als AML mit einem Anteil von 14 %. Bei Kindern unter 15 Jahren beträgt die Inzidenz für akute Leukämien in Deutschland derzeit 4,8/100.000 Einwohner. Ein Neugeborenes hat ein Risiko von 72/100.000 (0,07 %), bis zu seinem 15. Lebensjahr an einer Leukämie zu erkranken (*Deutsches Kinderkrebsregister*).

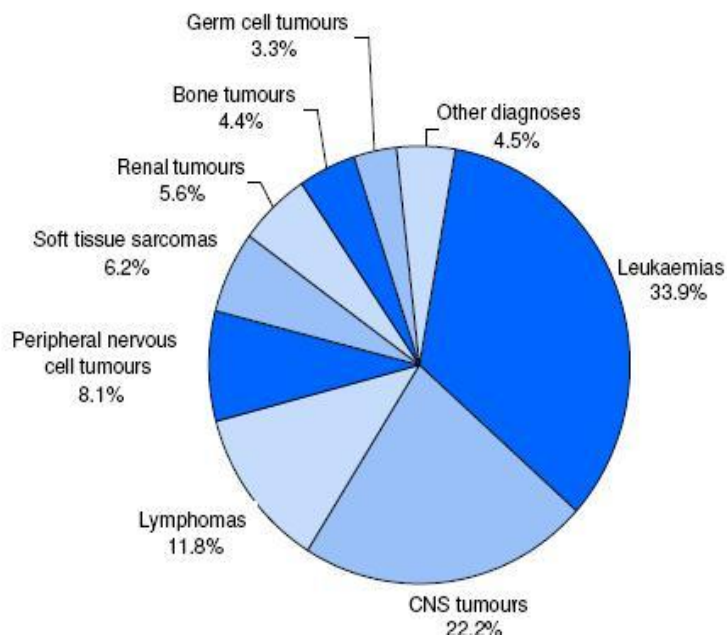


Abb. 1.1: Relative Häufigkeit onkologischer Erkrankungen bei Patienten unter 15 Jahren in der BRD (1996 - 2005)
(Quelle: Kinderkrebsregister)

Die Leukämie ist eine maligne Erkrankung, bei der es zur unkontrollierten Proliferation von dysfunktionalen Zellen des Blutes – genannt Blasten – kommt. Leukozyten werden unterteilt in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, weitere Bestandteile des Blutes sind die Thrombozyten und Erythrozyten. Handelt es sich bei den Blasten um Zellen aus der Linie der Monozytopoese, Granulozytopoese, Erythropoese oder der Thrombozytopoese, so spricht man von einer AML, bei einer Entartung der Lymphozytopoese entsprechend von einer ALL. Die Krankheit entsteht durch eine gestörte oder fehlerhafte Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen zu reifen Zellen des Immunsystems. Bei einer unkontrollierten und

überschießenden Bildung im Knochenmark kommt es zur Anhäufung funktionsuntüchtiger Blasten, die im Verlauf auch in das periphere Blut ausgeschwemmt werden können. Die Proliferation dieses malignen Zellklones breitet sich sukzessive im blutbildenden Knochenmark aus, wodurch die normale Hämatopoese verdrängt wird. Dies kann eine Anämie, Thrombozyto- oder Leukopenie (bezogen auf funktionelle Leukozyten) zur Folge haben.

Die Ätiologie akuter Leukämien ist bislang nicht umfassend geklärt, handelt es sich doch um eine sehr heterogene Entität. Einigkeit besteht darüber, dass die Proliferation der Blasten auf die Kumulation von zwei und mehr genetische Aberrationen in einer Vorläuferzelle der Hämatopoese zurückzuführen ist. Bezüglich der dieser Entartung zugrunde liegenden Ursache sowie der Erklärung, warum es nur in manchen Fällen eines Gendefekts zum Ausbruch der Erkrankung kommt, existieren derzeit zahlreiche Hypothesen. Diskutiert werden sowohl genetische Einflüsse als auch chemische, physikalische oder biologische Ursachen. Bei letzteren könnten sowohl bakterielle als auch virale Infektionen von Bedeutung sein (*Buffler 2005, Greaves 2002*).

1.1.2 Therapie der akuten Leukämie

Inzwischen können durch eine invasive Polychemotherapie ca. 60 – 80 % der kindlichen Leukämien geheilt werden (*Pui 2001*). Entscheidend dabei ist eine genaue Diagnose der Subtypen von ALL oder AML, da sich die Therapie-Schemata deutlich unterscheiden (*Gutjahr 2003*).

Primäres Ziel der Therapie ist das Erreichen einer Remission, die dadurch definiert ist, dass sich im Knochenmark morphologisch keine Leukämiezellen mehr nachweisen lassen. Jedoch ist mit dem Nachweis einer ersten Remission die Leukämie keineswegs ausreichend behandelt. Es wurde lediglich die Anzahl der leukämischen Zellen derartig reduziert, dass die geringe Zahl der Blasten sich nicht mehr sicher von den physiologischen Myeloblasten differenzieren lässt und bereits wieder eine normale Hämatopoese eingesetzt hat. Dies wird in der Regel durch den

ersten intensiven Therapieabschnitt, die sogenannte Induktionstherapie, erreicht. In aller Regel erfolgt danach die Konsolidierungsphase, in der durch andere Medikamentenkombinationen eine weitere Reduktion der Blasten erreicht werden soll. Bei der kindlichen ALL wird dann ein Reinduktionsblock angehängt, durch den das Rückfallrisiko weiter gesenkt wird.

Da sich ein Teil der Leukämiezellen, insbesondere die unreiferen leukämischen Zellen, in Ruhephasen des Zellzyklus befinden, können sie chemotherapeutisch nicht bekämpft werden. Daher ist im Anschluss an die intensive Chemotherapie eine Dauertherapie – eine niedrigdosierte orale Chemotherapie – nötig, die über einen längeren Zeitraum Zellen angreift, sobald diese wieder in Proliferationsphasen eintreten.

Der Erfolg der Therapie ist letztlich nur daran zu messen, ob ein Rückfall, das heißt ein Wiederauftreten leukämischer Zellen, dauerhaft verhindert werden kann. In der Regel sind Rückfälle später als 5 Jahre nach Erstdiagnose sehr selten, so dass Patienten ab diesem Zeitpunkt als geheilt angesehen werden (*Pui 2001*).

Eine wesentliche Rolle bei der Entscheidung über die Intensität der Therapie (Therapiestratifizierung) ist die Messung der MRD (minimal residual disease, minimale Resterkrankung).

Hierbei handelt es sich um den Nachweis eines niedrigen Anteils von Leukämiezellen an physiologischen Zellen des Blutes und des Knochenmarks, der zwar nicht mehr morphologisch, aber mit molekular- und zellbiologischen Methoden festzustellen ist. Untersuchungen belegten, dass die Höhe der MRD mit der Anzahl späterer Rezidive korreliert (*Steenbergen 1995*). Deshalb wird die Therapieintensität im Verlauf auf die Ergebnisse der MRD-Diagnostik abgestimmt: Je höher die MRD-Last ist, desto aggressivere und damit belastendere Behandlungsprotokolle werden gewählt. Der Zeitpunkt, an dem die MRD Diagnostik die größte Aussagekraft über den späteren Verlauf der Erkrankung besitzt, ist Tag 33 des Behandlungsprotokolls. Dies entspricht gleichzeitig dem 33. Tag der Therapie (*van Dongen 1998*).

Kommt es zu einem Rezidiv, sind die Heilungschancen mit einer erneuten

Chemotherapie zwar noch gegeben, jedoch weit niedriger. In ausgewählten Fällen ist dann eine Knochenmarktransplantation indiziert.

Da die Behandlung von Rezidiven geringere Erfolgsaussichten hat, ist eine ausreichend aggressive primäre Chemotherapie anzustreben. Eine höhere Aggressivität ist jedoch mit schwerwiegenden Nebenwirkungen und teilweise mit Langzeitschäden assoziiert. Daher muss die Therapie zwar so aggressiv wie nötig, aber gleichzeitig so nebenwirkungsarm wie möglich gewählt werden. Um dies zu erreichen, ist neben der genauen Diagnose eine Risikoeinschätzung nötig, in die je nach Protokoll neben der MRD-Last weitere Faktoren wie das Ansprechen auf Decortin, die Blastenzahl bei Diagnosestellung sowie der Nachweis von definierten Translokationen und anderen molekularbiologischen Markern einfließen können (*Gutjahr 2003*).

1.2 Hämatopoetische Stammzellen

Alle reifen Zellen, die im peripheren Blut zu finden sind, haben eine eingeschränkte Lebensdauer und sind – abgesehen von Lymphozyten – nicht fähig, sich durch Teilung zu vermehren. Sie werden im Knochenmark gebildet und gehen auf eine kleine Zahl gemeinsamer pluripotenter Zellen zurück, den sogenannten hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Sie haben die Potenz, sich in jede beliebige Zelle des hämatopoetischen Systems zu differenzieren und bedingen so die Produktion aller peripheren Zellen. Der Anteil HSC an den Zellen im Knochenmark ist wegen der uneinheitlichen Charakterisierung schwer einzuschätzen (s.u.).

1.2.1 Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen

HSC teilen sich entweder symmetrisch, wodurch zwei neue HSC entstehen, oder asymmetrisch, wodurch eine Tochterzelle als pluripotent erhalten bleibt, während die zweite entstandene Zelle sich differenziert, bis sie sich schließlich zu einer reifen

Zelle entwickelt hat (Ravandi 2006). Die Genese verwandter Zellarten (myeloische oder lymphatische Zellreihen) erfolgt so anfangs noch parallel über gemeinsame Progenitorzellen (vgl. Abb. 1.2). Dieser Prozess, in dem die Zelle sukzessiv ihre Plastizität zugunsten spezifischer Eigenschaften verliert, wird über verschiedene intrinsische und extrinsische Einflussfaktoren gesteuert. Unter anderem ist die Interaktion mit Stromazellen, Osteoblasten, extrazellulären Matrixproteinen und verschiedenen Zytokinen von Bedeutung (Moore 2006).

Sowohl HSC als auch Progenitorzellen haben das Potential, in vitro und in vivo Kolonien zu bilden. Man bezeichnet derartige Zellen colony forming unit (CFU). Im Gegensatz dazu können sich ausdifferenzierte Blutzellen mit Ausnahme der Lymphozyten nicht mehr teilen. Der Unterschied zwischen HSC und Progenitorzellen besteht darin, dass in Progenitorzellen die jeweilige Zelllinie bereits determiniert ist. Sie sind demnach nicht mehr pluripotent sondern oligopotent.

Zusammenfassend bestehen die wichtigsten drei Eigenschaften von HSC neben der Pluripotenz aus Selbsterneuerung, Regulation der Proliferation sowie Quieszenz.

Pluripotenz beschreibt die Fähigkeit der HSC, sich über Progenitorzellen und verschiedene Zwischenstufen zu jeder hämatologischen Zelle entwickeln zu können. Das Prinzip der Selbsterneuerung durch asymmetrische Teilung sichert das Fortbestehen des HSC-Pools. Durch genau geregelte Differenzierung und Proliferation wird das Gleichgewicht aus Produktion und Apoptose der hämatopoetischen Zellen aufrecht erhalten. Quieszenz ist ein Stadium des Zellzyklus, in dem sich HSC zumeist befinden. Hierbei findet keinerlei Teilung statt, die Zelle befindet sich in einem Ruhezustand (Morrison 1995, Ahmed 2007).

Definitionsgemäß kann auch innerhalb der HSC zwischen den unreiferen Langzeit-HSC und den reiferen Kurzzeit-HSC unterschieden werden. Langzeit-HSC können das blutbildende System lebenslang aufrechterhalten, Kurzzeit-HSC gelingt dies dagegen nur über wenige Wochen, da sie nicht über genügend Fähigkeiten zur Selbsterneuerung verfügen (Rieger 2007).

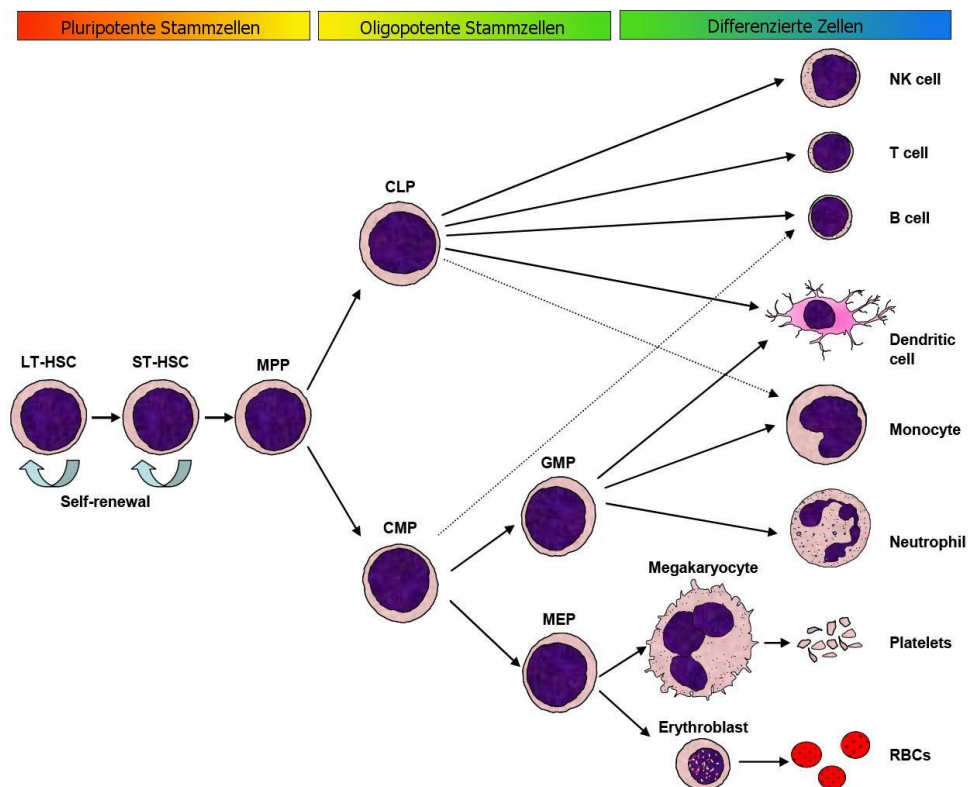


Abb. 1.2: Stammzellen und Hämatopoese: HSC lassen sich in Langzeit-HSC (LT-HSC), Kurzzeit-HSC (ST-HSC) und Multipotente Progenitor-Zellen (MPP) unterteilen. Bei der weiteren Differenzierung entstehen pluripotente Vorläufer der lymphatischen und die myeloischen Zelllinie. Diese verlieren mehr und mehr ihre pluripotenten Eigenschaften und entwickeln sich zu reifen Zellen der verschiedenen Linien. (Quelle: Ahmed 2007)

1.2.2 Nachweis hämatopoetischer Stammzellen

Beim Nachweis von HSC wurden bislang vor allem Dank besserer Charakterisierung der Oberflächenmarker Fortschritte erzielt. Anhand der unterschiedlichen Expression von Molekülen an der Zelloberfläche, die systematisch als Cluster of Differentiation (CD) beschrieben und nummeriert sind, lassen sich nicht nur verschiedene Zellpopulationen unterscheiden, sondern auch die unterschiedlichen Stadien der Entwicklung beschreiben. Der am häufigsten benutzte Marker für humane HSC ist CD34, da nachgewiesen werden konnte, dass eine Zellpopulation,

die CD34 exprimiert, mit CFUs angereichert ist. Untersuchungen bezüglich der synchronen Expression von CD38 ergaben, dass CD34⁺/CD38⁻-Zellen signifikant mehr Stammzeleigenschaften besitzen. Der Anteil an CFUs dieser Population ist gegenüber CD34⁺-Zellen, die für CD38 ebenfalls positiv sind (CD34⁺/CD38⁺), vierfach erhöht (*Conneally 1997*). Zusätzlich werden andere Oberflächenmarker wie CD133 oder CD119 zur positiv- oder negativ-Selektion verwendet, da diese entweder vorwiegend auf sehr wenig oder sehr stark differenzierten Zellen zu finden sind. Lange Zeit wurden Stammzellen demnach als CD34⁺/CD38⁻ charakterisiert, sowie lin⁻ das bedeutet negativ für eine Gruppe so genannter Lineage-Marker. Diese werden von Zellen gebildet, die bereits für eine Zelllinie determiniert sind und somit keine pluripotenten Eigenschaften mehr besitzen (*Goodell 1997*).

Jedoch konnten inzwischen Untersuchungen zeigen, dass nicht alle HSC CD34 exprimieren. Wiederholt wurde nachgewiesen, dass auch bestimmte CD34⁻-Zellen ein hohes Potential zur Koloniebildung besitzen bzw. teilweise sogar naiver sind als CD34⁺-HSC (*Goodell 1997*). Ob die Expression von CD34 vom Grad der Naivität bzw. Differenzierung oder vielmehr vom Zustand der Aktivierung einer Stammzelle abhängig ist, ist Gegenstand aktueller Diskussion (*Ogawa 2002*).

Im klinischen Alltag der Stammzellgewinnung für Transplantationen ist jedoch die Selektion nach CD34⁺ nach wie vor Standard. Unabhängig davon, wie groß der Anteil von CD34⁺-Zellen an der Gesamtheit der HSC ist und ob evtl. noch naivere CD34-negative Stammzellen existieren, weisen CD34⁺-Zellen ein ausreichend großes Potential auf, die Hämatopoese nach Chemotherapie zu regenerieren und langfristig aufrecht zu erhalten (*Ogawa 2002, Balduzzi 2001*).

Da es jedoch bislang keinen verlässlichen Oberflächenmarker gibt, mit dem sich HSC direkt und spezifisch nachweisen lassen, wird nach Alternativen gesucht. Die derzeit wichtigsten Entwicklungen basieren auf dem Nachweis von stammzellspezifischen enzymatischen Eigenschaften, die sich mittels fluoreszierenden Farbstoffen darstellen lassen. Von Bedeutung ist v.a. Hoechst 33342, ein Bisbenzimid, das im Zellkern an DNA bindet. Bevor Goodell et al. 1996 erstmals die Stammzellpopulation beschrieben, die sie mit Hilfe von Hoechst 33342 entdeckt hatten, war dieser

Farbstoff lange als Zellzyklusmarker bekannt und vielfach verwendet. Bei Experimenten fiel auf, dass sich in einer kleinen Zellpopulation der Farbstoff deutlich weniger anreichert als in der Masse der Zellen, was Anlass zu weiteren Untersuchungen gab. Diese Zellen, die den Farbstoff rasch ausscheiden, werden als Side Population (SP) bezeichnet. In dieser kleinen distinkten Population sind Zellen stark angereichert, die mit der Fähigkeit, Langzeit-Kolonien zu bilden und in vitro ein hämatopoetisches System zu regenerieren, Eigenschaften von HSC aufweisen. Dabei ist von Bedeutung, dass die meisten Zellen der SP CD34⁻ sind oder vielmehr CD34 erst im Verlauf nach Stimulation exprimieren. Da v.a. die SP/CD34⁻ Zellen zur Langzeit-Koloniebildung fähig sind, wird die SP als eine Population von sehr nativen LT-HSC betrachtet, die durch Oberflächenmarker bislang nicht identifiziert werden konnte (Goodell 1996).

Inzwischen wurde die Ursache für die geringere Fluoreszenz der SP ermittelt. Im Gegensatz zu differenzierteren Zellen verfügen jene der SP über bestimmte Transportproteine an der Zellmembran. Diese Proteine verkürzen durch aktiven Efflux die intrazelluläre Akkumulation des Farbstoffes. Eines der für die Expression dieser Transporter verantwortlichen Gene ist MDR1 (multi drug resistance gene), dessen Genprodukte als P-Glykoproteine bekannt sind. Für die Pumpfunktion entscheidend sind hierbei Regionen, die als ATP-binding cassette (ABC) bezeichnet werden (Jonker 2005). Es wurde vielfach gezeigt, dass verschiedene P-Glykoproteine durch die erwähnten transmembranären Transportprozesse zugleich eine wichtige Rolle bei der Resistenz von primitiven HSC und Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika spielen (Chen 1986).

Ebenfalls von Bedeutung bei Resistenzmechanismen ist die Aldehyddehydrogenase (ALDH). Stammzellen besitzen eine besonders hohe Aktivität dieses Enzyms, wodurch sie insbesondere gegenüber Alkylanzien weniger empfindlich sind, wie z.B. aktiven Derivaten von Cyclophosphamid. Zum Nachweis der ALDH existiert ein Reagenz mit dem Namen Aldefluor®. Es handelt sich hierbei um ein Substrat der ALDH, dessen Umsetzung durch Farbumschlag per FACS-Analyse quantitativ untersucht werden kann (Invitrogen 2004).

Die Zielpopulation bei dieser Untersuchung ist sehr stark positiv für Aldefluor® und wird deshalb als ALDH^{br} bezeichnet. Untersuchungen von peripherem Blut ergaben, dass ein Großteil der ALDH^{br}-Zellen CD34 koexprimiert, bzw. dass sich durchschnittlich über die Hälfte aller CD34⁺-Zellen innerhalb der ALDH^{br}-Population befinden. Diese Population wies nur wenig Zellen mit differenziertem Phenotyp (entspricht lin⁻) sowie zahlreiche naive Zellen auf. Kolonisierungsversuche ergaben, dass die ALDH^{br}-Population an Zellen mit CFU-Eigenschaften deutlich angereichert ist und dass sich aus ihr multiple Zelllinien entwickeln können (*Fallon 2003*). Bei Untersuchungen von Nabelschnurblut zeigte sich, dass unter den Zellen mit der Eigenschaft Lin⁻/CD34⁻/CD38⁻ nur diejenigen die Fähigkeit zur Langzeit-Koloniebildung besaßen, die sich gleichzeitig in der ALDH^{br}-Population befanden. ALDH^{br}-Zellen besitzen also den Phänotyp und die funktionellen Eigenschaften von primitiven HSC (*Pearce 2005*).

Da sowohl die ALDH-Aktivität als auch die Hoechst-SP Zellen mit Stammzeleigenschaften identifiziert, wurde zunächst angenommen, dass mit beiden Methoden sehr ähnliche Zellen nachgewiesen werden – insbesondere im Bezug auf CD34⁻-Zellen. Allerdings bestätigte sich diese Vermutung nicht. Für CD34⁻/CD38⁺-Zellen konnte keine signifikante Überlappung festgestellt werden, lediglich unter CD34⁺-Zellen fand sich ein kleiner Anteil sowohl in der SP als auch unter SSC^{lo}ALDH^{br}-Zellen wieder (*Pearce 2007*). Da unter der SP gerade für CD34⁻-Zellen Eigenschaften sehr früher HSC beschrieben wurden, wird vermutet, dass es sich bei SSC^{lo}ALDH^{br}-Zellen bereits um etwas differenziertere HSC handelt als bei denen der SP.

1.3 Leukämische Stammzellen

In vitro Versuche mit Leukämiezellen konnten zeigen, dass diese auch in Kultur die Fähigkeit zur Koloniebildung besitzen. Die Proliferation ließ sich durch leukozytären Wachstumsfaktoren deutlich steigern. Es fiel jedoch auf, dass unter der Masse der Blasten in Kultur nur ein geringer Teil zur Koloniebildung fähig war (*Griffin 1986*).

Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass es auch unter der scheinbar homogenen Population leukämischer Blasten Zellen mit Stammzeleigenschaften gibt, sogenannte leukämische Stammzellen (LSC) (Sutherland 1996).

1.3.1 Bedeutung von leukämischen Stammzellen für die Entstehung von Leukämien

Durch die Diskussion über die Rolle von LSC entstanden verschiedene Modelle zur Entstehung einer Leukämie. Den früheren Modellen gemeinsam war die Annahme, dass der Auslöser der Erkrankung in der Mutation einer HSC besteht. Bei dieser Theorie, die lange Zeit als einzige mögliche Erklärung verstanden wurde, geht man davon aus, dass die Genese leukämischer Zellen vergleichbar ist mit der physiologischen Hämatopoese. Dies bedingt, dass LSC ähnliche Charakteristika wie HSC besitzen müssen. In der Tat verfügen sie – wenn auch in eingeschränktem Maß – über die drei grundlegenden Eigenschaften von HSC. Sie sind fähig zu Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung. Reifere leukämische Zellen verlieren ebenso wie hämatopoetische die Fähigkeit zur Teilung. Jedoch verläuft die Entwicklung zur ausdifferenzierten Zelle in den meisten Fällen fehlerhaft bzw. unzureichend, wodurch die entstehenden leukämischen Zellen sich von physiologischen Blutzellen unterscheiden und auch nicht über deren Funktionalität verfügen. Der Grad der Differenzierung hat traditionell zur Beschreibung und Einteilung der Leukämie geführt (Guzman 2004).

Der traditionellen Theorie zur Entstehung einer Leukämie liegt also zugrunde, dass es nach der Mutation einer Stammzelle nur eine kleine Gruppe LSC gibt, durch welche die Erkrankung aufrecht erhalten wird. Es wird von einem hierarchischen Modell ausgegangen, in dem die Entwicklung der Zellen nur in einer Richtung verlaufen kann, nämlich von der naiven hin zur gereiften Zelle.

Inzwischen gibt es jedoch neue Ansätze, die erklären, dass in einer Leukämie auch ausgereifte Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wiedererlangen können und somit wieder den Status von Stammzellen erreichen und die Krankheit unterhalten

(*Ravandi 2006*). Diese Zellen, die in einem zuvor gesunden Organismus eine Leukämie auslösen können, werden auch als Leukämie-induzierende Zellen (LIZ) bezeichnet.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Gene, die für spezifische Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung kodieren, auch in den gereiften Zellen vorhanden sind. Sie sind also nicht stammzellspezifisch sondern werden vielmehr nur von gewissen Zellen aktiviert. Dies führte zu der These, dass es sich bei LSC vielleicht nicht um eine definierten Phänotyp sondern viel mehr um einen Zustand handeln könnte, in dem sich die Zelle befindet (*Ravandi 2006*).

Andere Theorien besagen, dass sowohl LSC als auch differenzierte Blasten die Fähigkeit zur Proliferation besitzen. Dies steht freilich im Widerspruch zu Versuchen, die nachweisen konnten, dass als Tumor-Stammzellen gekennzeichnete Zellen, vornehmlich $CD34^+/CD38^-$ oder $CD34^+/CD19^-$, ein deutlich höheres Potential zur Tumor-Induktion in transplantierten Mäusen besitzen. Jedoch zeigen neue Untersuchungen, dass dies möglicherweise ein Phänomen ist, welches durch die Spezies-überschreitende Implantation von menschlichen Tumorstammzellen in Mäuse vorgetäuscht oder zumindest überschätzt wird. Experimente mit Zellen von Maus-eigenen Tumoren verschiedener Entität, darunter auch Leukämien, konnten beweisen, dass auch differenziertere leukämische Zellen ohne Stammzell-Phänotyp unter bestimmten Umständen homogene Blastenpopulationen in zuvor gesunden Mäusen verursachen konnten (*Le Viseur 2008*). Dieses Modell wird als klonales Expansions-Modell bezeichnet (*Adams 2008*).

Zusammenfassen lässt sich die Entstehung von Leukämien wahrscheinlich auf genetische Aberrationen von entweder hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen – mit Verlust der Regulationsmechanismen – oder von reiferen hämatopoetischen Zellen – mit Rückgewinnung von Stammzeleigenschaften – zurückführen. Welche Theorie die Genese der Leukämien letztlich am besten beschreibt oder ob man von einer Kombination von hierarchischem und klonalem Modell mit leukämiespezifischer Gewichtung ausgehen muss, ist weiter unklar. Sehr wahrscheinlich ist jedoch, dass – wenn nicht für alle Leukämieerkrankungen, dann

zumindest größtenteils – leukämische Zellen mit Stammzeleigenschaften bei deren Genese und somit evtl. auch Therapie von großer Bedeutung sind und es somit von großem Interesse ist, diese Zellen zu identifizieren und charakterisieren.

1.3.2 Problematik der Charakterisierung

Die Charakterisierung von HSC ist durchaus nicht eindeutig. Wie oben beschrieben können jedoch auf verschiedene Arten zumindest mehr oder weniger große Teile der heterogenen HSC-Population eingegrenzt werden.

Die Definition per Oberflächenmarker ist bei der Suche nach LSC aufgrund der asynchronen Expression von CD-Markern problematisch. So konnte besonders für die AML gezeigt werden, dass die Zellen, die zur Lang- oder Kurzzeit-Koloniebildung fähig sind, in der Expression von für Stammzellen typischen Oberflächenmarkern wie CD34 und CD38 stark variieren und nicht direkt mit HSC vergleichbar sind. So gibt es etwa Leukämien, bei denen die reifen Blasten noch CD34 exprimieren (Sutherland 1996).

Daher kann man nicht von der Existenz eines allgemeinen Phänotyps von LSC ausgehen. Entweder ändert sich das Expressionsprofil sehr stark abhängig vom Leukämie-Subtyp und Stadium der Stammzellen, oder LSC exprimieren Oberflächenmarker sehr inkonstant bzw. nicht einem allgemein gültigen Schema folgend, was ihrer Natur von aberranten Zellen, die auch von der physiologischen Differenzierung abweichen, entsprechen würde. Obgleich man lange Zeit zum Nachweis von LSC Kombinationen aus Oberflächenantikörpern benutzt und damit wertvolle Erkenntnisse gewonnen hat, ist es wegen der genannten Unzuverlässigkeit der Oberflächenmarker wichtig, neue Charakteristika zu definieren. Dabei werden zunächst diejenigen neuen Nachweismethoden untersucht, die sich auch bei HSC als vielversprechend bezüglich neuer Erkenntnisse der Charakterisierung erwiesen, wie etwa Hoechst 33342 oder Aldefluor®. Doch stellt sich auch hier die Frage, ob es sich bei den der Färbung zugrunde liegenden Expressionen nicht wiederum um Eigenschaften handelt, die von bestimmten

Leukämiesubgruppen inhärent, d.h. unabhängig von Differenzierungsgrad, exprimiert werden.

In ersten Publikationen wurde in diesem Zusammenhang bereits veröffentlicht, dass eine hohe ALDH-Aktivität bei erwachsenen AML-Patienten LSC nachweist (Pearce 2005).

1.3.3 Rolle von leukämischen Stammzellen bei Therapie, Resistenz und Rezidiv

LSC spielen bei der Entstehung und Therapie von Leukämien nach neueren Erkenntnissen eine wesentliche Rolle. Da es sich um Zellen handelt, die durch ihre Potenz eine leukämische Population initiieren können, stellen sie bei Resistenz gegenüber der Therapie eine potentielle Quelle von Rezidiven dar. Die Mechanismen, die eine erhöhte Resistenz bewirken, wurden in Kapitel 1.2.2 bereits angesprochen. Durch die langsame Proliferation und die Tatsache, dass diese Zellen sich über lange Zeiträume in Ruhephasen befinden (Quieszenz), entgehen sie oft der Therapie mit aggressiven Chemotherapeutika. Zudem spielen die erwähnten MDR1 eine entscheidende Rolle. Sie entfernen aktiv zellschädigende Substanzen aus dem Lumen und verringern so deren toxischen Einfluss auf die Zelle. Ebenso wurden für die ALDH nachgewiesen, dass dieses Enzym toxische Substanzen neutralisieren kann und somit protektiv wirkt.

Die genaue Funktion bzw. klinische Wertigkeit der einzelnen Resistenzmechanismen ist bislang nicht abschließend abzuschätzen. Auch die exakte Rolle von LSC bei Therapie und Rezidiv-Entstehung sowie die daraus resultierende Frage, ob eine spezifische Therapie gegen LSC erstrebenswert ist, ist Gegenstand aktueller Diskussion (Sikic 2006).

Zusammenfassend gilt es als sehr wahrscheinlich, dass in zahlreichen Leukämieerkrankungen LSC als Quelle für Rezidive und bei der Therapie eine wesentliche Bedeutung zukommt.

1.4 Studienziel

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines durchflusszytometrischen Essays zum Nachweis von Leukämiezellen mit Stammzelleigenschaften mittels stammzelltypischer Enzymaktivitäten. Dafür sollten die Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 zum Nachweis der MDR-Aktivität sowie Aldefluor® zum Nachweis der ALDH-Aktivität zum Einsatz kommen. Die beiden untersuchten Populationen Sidepopulation und ALDH^{br} sollten zum einen untereinander und zum anderen mit klassischen Oberflächenmarkern zum Nachweis von HSC verglichen werden.

Im Anschluss sollten mit der Methode, die sich in diesen Versuchen als besser geeignet erweisen würde, die eigentlichen Untersuchungen durchgeführt werden. Dies sollte ebenfalls im Vergleich mit erwähnten Oberflächenmarkern geschehen, wobei insbesondere die Populationen CD34+, CD34+/CD38- und CD34+/CD38-/CD45^{dim} analysiert werden sollten.

Hauptziel der Untersuchungen war die Frage, ob bei AML und ALL des Kindesalters eine Korrelation zwischen der Frequenz der Zellen mit Stammzelleigenschaften bei Diagnosestellung und dem klinischen Verlauf der Erkrankung vorliegt.

Zudem sollten die Charakteristika von ALDH^{br}- bzw. Sidepopulation-Zellen bei Leukämien hinsichtlich des Expressionsprofil von Oberflächenantigenen beschrieben werden.

2. Patienten und Material

2.1 Herkunft der Patientenproben und Einschlusskriterien

Bei den untersuchten Patientenproben handelt es sich in den meisten Fällen um Knochenmark oder, bei hoher peripherer Blastenlast, um Peripherblut (periphere mononukleäre Zellen, pMNC). Beides wurde im Rahmen der Routinediagnostik bei Diagnosestellung der Leukämie entnommen. Bei allen Patienten, bei denen eine Einverständniserklärung zur Verwendung ihrer Proben zu Forschungszwecken vorlag, wurden routinemäßig Samples in flüssigem Stickstoff konserviert. Hierbei wurden nach Ficoll-Auftrennung die mononukleären Zellen von Mitarbeitern der Routinediagnostik eingefroren.

Die Proben, die für die Vorversuche zur Etablierung der Methode verwendet wurden, wurden auf gleiche Weise entnommen. Sie wurden nicht kryokonserviert, sondern primär bearbeitet.

Die Auswahl der Patienten, die für die Studie berücksichtigt wurden, erfolgte nach Diagnose sowie Verfügbarkeit von konservierten Proben. Sowohl bei AML als auch ALL wurden sämtliche Patienten ermittelt, deren Erstdiagnose in den Jahren 1999 bis 2007 in der Universitäts-Kinderklinik Tübingen zweifelsfrei gestellt wurde. Waren von diesen Patienten ausreichend (>3) Proben kryokonserviert worden, wurden sie in die Studie eingeschlossen. Im Anhang werden die Patientencharakteristika aufgelistet (siehe 8.1).

Zur Etablierung der Färbemethoden wurden Vergleichsproben von physiologischem Knochenmark benötigt, um die Ergebnisse intern kontrollieren zu können. Hierzu wurden fünf Knochenmark-Proben von nicht-leukämiekranken Patienten gemessen. Da eine Knochenmarkpunktion zu Forschungszwecken ethisch nicht vertretbar ist

und andererseits gesunde Kinder nicht punktiert werden, handelt es sich dabei in der überwiegenden Zahl der Fälle um Patienten mit rheumatischer Erkrankung, bei denen vor Beginn einer Steroidtherapie eine leukämische Erkrankung ausgeschlossen wurde.

Vier der fünf Proben stammten von an juvenilem Rheuma bzw. rheumatischer Arthritis erkrankten Kindern. Die fünfte Probe wurde einem Knochenmarkspendenden Kind entnommen.

2.2 Allgemeine Geräte sowie Glas- und Kunststoff-Material

Tab. 2.1: Allgemeine Geräte sowie Glas- und Kunststoff-Material

Material	Hersteller
Sterile Werkbank <i>Hera safe</i>	Heraeus
Beheizbares Wasserbad	Memmert
Spektrophotometer <i>Ultrospec 3000</i>	Pharmacia Biotech
Zentrifuge <i>Rotixa 50 RS</i>	Hettich
Zentrifuge <i>Micro 22R</i>	Hettich
Blutanalysegerät <i>Cellcounter Advia 120</i>	Bayer
Durchflusszytometer <i>FACS Aria</i>	BD Bioscience
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-25°C)	Bosch
Gefrierschrank (-80°C) <i>-86° Freezer</i>	Forma Scientific
Vortexer <i>Reox Top</i>	Heidolph
Schüttler <i>MTS 2</i>	Janke & Kunkel
Feinwage	Sartorius

Wage 500 g	Sartorius
Pipettiergerät <i>Pipettboy Plus</i>	Integra Bioscience
Pipettiergerät <i>Pipettboy</i>	Tec No Vara
Sterile Plastikpipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml	Costar
Verstellbare Pipetten <i>Pipetman</i> 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson
Pipettenspitzen	Greiner
PPN-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner
FACS-Röhrchen 5 ml, Rundboden	Becton Dickinson
Zellsieb für FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
Safe-Lock-Tubes 0,5 ml	Eppendorf
Zentrifugenfilter Amicon Ultra-4, 10 kDa	Millipore
Zentrifugenfilter Microcon YM-100, 100 kDa	Millipore
Spritzen, steril 5, 10 ml	Braun
Kanülen <i>Sterican</i> 20, 22 G	Braun

2.3 Allgemeine Chemikalien

Tab. 2.2: Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Fetales Kälber Serum (FCS), inaktiviert (30 Minuten bei 56 °C)	PAA Laboratories
Biocoll Separating Solution, Ficoll	Biochrom
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Cambrex
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Cambrex
RPMI 1640	Biochrom
HEPES	Biochrom
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Lonza
Einfrierlösung	Baxter
AldefluorPuffer®	Aldagen
Human-Albumin 20 %	Biotest
FACSFlow, Puffer	Becton Dickinson
Formaldehyd	SIGMA

2.4 Stammlösungen

Auftaulösung

500ml RPMI
+ 10 % FCS

PBSA (Phosphat Buffered Saline + Bovines Serum Albumin)

1,76l H₂O-dest.
+ 40ml Na-Azid 10 % (in aqua bidest)
+ 4g BSA
+ 200ml 10x DPBS

SP-Puffer

500ml DMEM
+10 % FCS
+10mM HEPES

2.5 Stammzellreagenzien, Antikörper und Fluorochrome sowie Leben/Tod-Marker

2.5.1 Stammzellreagenzien

Tab. 2.3: Stammzellreagenzien

Reagenz	Hersteller
Aldefluor® (AF)	Aldagen
Hoechst 33342	SIGMA
Verapamil	SIGMA
DyeCycle™ Violet (DCV)	Invitrogen

2.5.2 Antikörper und Fluorochrome

Tab. 2.4: Konjugierte Antikörper, verwendet bei Analyse der Patientenproben

Fluoreszenzmarkierte Antikörper	Hersteller	Klon
CD3 - APC	Becton Dickinson	SK7
CD34 - APC	Becton Dickinson	8G12
CD38 - PE	Becton Dickinson	HB7
CD45 - Pacific Blue	Caltag	HI30

Tab. 2.5: Konjugierte Antikörper, testweise verwendet bei Etablierung der Kombination

Fluoreszenzmarkierter Antikörper	Hersteller	Klon
CD34 - FITC	Immunotech	581
CD38 - AlexaFluor 700	Exbio Praha a.s.	HIT2
CD38 - APC-DY747	Exbio Praha a.s.	HIT2
CD38 - PE-DY747	Exbio Praha a.s.	HIT2
CD38 - PE-DY590	Exbio Praha a.s.	HIT2
CD45 - Pacific Orange	Caltag	HI30
CD45 - AlexaFluor 700	Exbio Praha a.s.	MEM-28
CD45 - PE-DY747	Exbio Praha a.s.	MEM-28
CD45 - PE-DY647	Exbio Praha a.s.	MEM-28

Tab. 2.6: Monoklonale Antikörper, testweise verwendet bei Etablierung der Antikörper-Kombination

Monoklonaler Antikörper	Hersteller	Klon
CD34	Exbio Praha a.s.	4H11 (APG)
CD38	Invitrogen	HIT2

Tab. 2.7: Fluorochrome, testweise verwendet bei Etablierung der Antikörper-Kombination

Fluorochrom	Hersteller
AlexaFluor 405 (A405)	Invitrogen
AlexaFluor 680 (A680)	Invitrogen
AlexaFluor 700 (A700)	Invitrogen
Pacific Blue	Invitrogen
Pacific Orange	Invitrogen

2.5.3 Lebend/Tot-Marker

Tab. 2.8: Lebend/Tot-Marker

Reagenz	Hersteller
Propidium Iodid (mit Aqua dest. 200X verdünnt)	Fluka
LIVE/DEAD®	Invitrogen

2.5.4 Beads

Tab. 2.9: Beads

Reagenz	Hersteller
Easy-Comp FITC	Spherotech
Polystyren, amino modified	Kisker

2.6 EDV-Programme

Tab. 2.10: EDV-Programme

Programm	Hersteller
FACSDiva™	Becton Dickinson
FCSExpress	De Novo

3. Methoden

3.1 Vorbereitung der Proben

3.1.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus frischem Knochenmark

Das zur Etablierung der Färbemethoden verwendete Knochenmark stand meist am Tag der Entnahme oder am Folgetag zur Verfügung. Es befand sich in heparinisiertem Zustand und wurde nach Verdünnung mit PBS per Dichtezentrifugation mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten aufgetrennt. Da mononukleäre Zellen (MNC) eine geringere Dichte haben als z.B. Erythrozyten, lassen sie sich nach Zentrifugation aus der so genannten Interphase entnehmen. Um restliches Ficoll zu entfernen, erfolgte eine Zellwäsche mit PBS.

3.1.2 Auftauen kryokonservierter Proben

Bei den Knochenmark-Proben, die für die Studie gemessen wurden, handelt es sich um MNC aus Knochenmark und in wenigen Fällen auch um periphere MNC. Sie wurden jeweils bei Diagnosestellung isoliert und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierbei wurden die MNC in einer Konzentration zwischen 10^6 und 20×10^6 Zellen/ml in Einfrierlösung suspendiert und zu je 1 - 1,8 ml eingefroren. Da dieses Medium bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkt, die Zellen andererseits aber bei zu schneller Verdünnung wegen osmotischer Prozesse zu lysieren drohen, muss bei der Geschwindigkeit des Auftauens ein Kompromiss gefunden werden. Wir etablierten folgendes Protokoll:

1. Die Röhrchen mit kryokonservierten Zellen wurden im Wasserbad (37°C) angetaut, bis die Suspension zu schmelzen begann. Aus einer 5 ml Pipette

wurde Auftaumedium (Raumtemperatur) auf die Zellen aufgetropft. Danach wurden alle bereits getauten und somit flüssigen Bestandteile in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Dieser Vorgang wurde ein- bis zweimal wiederholt, bis sich alle Zellen im Falconröhrchen befanden.

2. Auffüllen des Falconröhrchens auf 14 ml mit AM. Danach erfolgte eine Zentrifugation (450 g, 5 Minuten, Raumtemperatur).
3. Abnehmen des Überstandes mit Pipette, gründliches Resuspendieren des Pellets in 1 ml Auftaumedium. Anschließend Überführung in FACS-Röhrchen. Dieses wurde mit 3 ml Auftaumedium aufgefüllt und zentrifugiert (450 g, 3 Minuten, Raumtemperatur)
4. Dekantieren des Röhrchens, Rest ca. 150 µl. Auffüllen auf 2815 µl mit Auftaumedium. Hiervon wurden 250 µl zur Zellzahlbestimmung mit dem Advia-Gerät entnommen. Das Röhrchen wurde erneut zentrifugiert (450 g, 3 Minuten, Raumtemperatur).
5. Dekantieren des Röhrchens, Rest ca. 150 µl. Anhand der in der Zwischenzeit bestimmten Zellzahl wurden die Zellen auf eine Konzentration von $3,66 \times 10^6$ /ml in AldefluorPuffer® eingestellt.

3.2 Hoechst Färbung

Bei der Färbung mit Hoechst 33342 finden sich HSC in einer Population, die den Farbstoff im Vergleich zu anderen Zellen deutlich weniger intrazellulär anreichert (vgl. 1.2.2). Die Messung des Farbstoffgehaltes erfolgt durchflusszytometrisch. Hoechst 33342 emittiert Licht sowohl im blauen Wellenlängenbereich bei 450 nm (Hoechst Blue) als auch im roten bei >675 nm (Hoechst Red). Stellt man die gemessenen Zellen in einem 2D-Diagramm mit diesen Parametern dar, erscheint die Sidepopulation als eine distinkte Zellgruppe, die der Hauptpopulation seitlich zum Ursprung hin anliegt (s. Abb. 3.1).

Da die Ursache der verminderten Farbstoffanreicherung auf die Existenz eines P-Glykoprotein-Multidrug-Transporters (MDR1) zurückzuführen ist, lässt sich die

Färbung diesbezüglich überprüfen. So wird neben der Standardfärbung eine Kontrollprobe untersucht, in der die Zellen neben Hoechst 33342 auch mit Verapamil, einem kompetenten Inhibitor von MDR1, inkubiert werden. In dieser Kontrolle sollte demnach keine Side Population erscheinen, da nun auch Zellen der Side Population den Farbstoff intrazellulär anreichern.

Da die Färbung auf einer aktiven Reaktion in den Zellen beruht, verläuft sie am besten bei physiologischer Temperatur von 37 °C. Umgekehrt kann die Reaktion durch konstante Kühlung der Zellen auf 4 °C zum Stillstand gebracht werden.

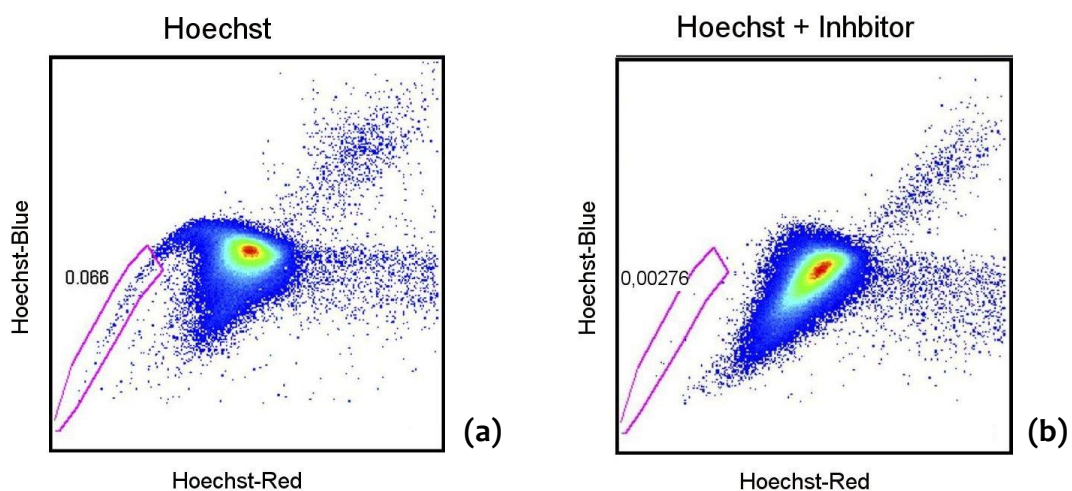


Abb. 3.1: Darstellung der Sidepopulation: Ohne (a) und mit Inhibitor (b) auf FACS-Gerät mit UV-Laserquelle. In der Darstellung Hoechst-Blau vs. -Rot liegt die Side Population der Hauptpopulation seitlich zum Ursprung hin an. Der Inhibitor verhindert die aktive Eliminierung von Hoechst, so dass die gesuchten Zellen nun Teil der Hauptpopulation sind. (Quelle: Pearce 2007)

3.2.1 Färbung der Zellen

Für die Färbung mit Hoechst wurden meist MNC aus frischem Knochenmark verwendet. Gelegentlich froren wir auch selbst MNC bei -80 °C ein und konnten diese Zellen innerhalb der folgenden Tage verwenden. Das Auftauen erfolgte analog der unter 3.1.2 beschriebenen Methode.

Die Färbung mit Hoechst geschah in Anlehnung an das von Goodell et al.

veröffentlichte Protokoll (Goodell 1999), das wir im Verlauf der Versuche modifizierten.

Nach Ficoll-Separation oder Auftauen wurden die Zellen in vorgewärmtem SP-Puffer (37 °C) in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml aufgenommen und auf die FACS-Röhrchen verteilt. Pro Ansatz befinden sich zwischen 0,5 ml und 5 ml Zellsuspension in den Röhrchen. Es folgt die Zugabe von 5 µg/ml Hoechst 33342, danach werden die Zellen gründlich gemischt. Im Kontrollansatz wird zusätzlich mit Verapamil (Zielkonzentration: 50 µM) zeitgleich mit Hoechst zugegeben. Sowohl Proben als auch Kontrolle werden nun bei 37 °C über 90 Minuten inkubiert.

Erfolgte eine parallele Färbung mit Aldefluor, so wurde dies während der Inkubation 50 Minuten zugegeben, so dass die Zellen mit Aldefluor noch 40 Minuten inkubieren konnten.

Danach werden die Röhrchen bei 4 °C zentrifugiert (300 g, 10 Minuten, An-/Auslaufzeit: 7/0 sec). Von diesem Zeitpunkt an müssen die Zellen bis zur Messung stets in gekühltem Zustand gehalten werden, um einen Verlust des Farbstoffes zu verhindern. Nach der Zentrifugation werden die Zellen in 100 µl FACSFlow resuspendiert und je nach Ansatz mit Antikörpern gefärbt. Im Anschluss an die Antikörperfärbung erfolgt eine erneute Zentrifugation (300 g, 10 Minuten, An-/Auslaufzeit: 7/0 sec, 4 °C) und anschließende Resuspendierung in 100 µl FACSFlow.

3.2.2 Variationen bei Färbung und DyeCycle™ Violet reagent

Bei dem Versuch, die Darstellung der Side Population zu optimieren und eine bessere Abgrenzung der gesuchten Zellen zu erreichen, wurde obiges Vorgehen an verschiedenen Stellen variiert. Wir testeten verlängerte sowie verkürzte Inkubationszeiten von 90 bis 150 Minuten, sowie verschiedene Hoechst-Konzentrationen von 75 bis 400 % der empfohlenen Menge. Zudem versuchten wir, die Inhibition der MDR1-Moleküle zu verbessern, indem die Zellen des Kontrollröhrchens vor der Hoechst-Zugabe bereits 10 bis 30 Minuten mit Verapamil

inkubiert wurden. Da DMEM nur mit rotem Farbstoff versetzt zur Verfügung stand, wurde es versuchsweise durch PBS in der Hoffnung ersetzt, dadurch die Hintergrundfluoreszenz zu verringern. Um einen evtl. toxischen Effekt des FCS im SP-Puffer auszuschließen, wurde dieses bei 57°C über 60 Minuten inaktiviert.

Schließlich wurde mit DyeCycleTM Violet reagent (DCV) ein weiterer Farbstoff getestet, der noch weitgehend unbekannt ist. DCV stellt eine vergleichbare Alternative zu Hoechst 33342 dar. Es handelt sich ebenfalls um einen fluoreszierenden Farbstoff, der Substrat der gleichen Efflux-Pumpen wie Hoechst 33342 ist. Obwohl für DCV derzeit noch sehr wenige Studien vorliegen, lassen erste Untersuchungen vermuten, dass damit eine sehr ähnliche Zellpopulation nachgewiesen wird. Die Darstellung der Ergebnisse gleicht denen von Hoechst (vgl. 3.2.3). Die gesuchten Zellen befinden sich in einer vergleichbaren Darstellung ebenfalls in einer „Side Population“. Im Unterschied zu Hoechst 33342 hat DCV allerdings ein Exzitationsmaximum von 369 nm und kann daher besser von violetten Lasern angeregt werden. Für Messungen mit 407 nm-Lasern wurden folglich wesentlich deutlichere Ergebnisse beschrieben als bei Hoechst 33342.

Die Färbung der Zellen mit DCV verläuft analog zur Färbung mit Hoechst 33342 mit einer Zielkonzentration von 10 µM (Telford 2007).

3.2.3 FACS Analyse

Zur Messung der Side Population wird die Verwendung eines UV-Lasers empfohlen, welcher den Farbstoff bei 350 nm anregt. Die Fluoreszenz soll mit einem 450/20 BP Filter (Hoechst Blue) und einem 675 nm Longpass Filter gemessen werden (vgl. 3.7.1). Jedoch wurde wiederholt veröffentlicht, dass sich die Side Population auch mit einem violetten Laser darstellen lässt.

Da in dem von uns verwendeten FACSAria kein UV Laser zur Verfügung stand, verwendeten wir einen violetten Laser mit 407 nm. Mit diesen Voraussetzungen konnte andere Arbeitsgruppen bereits erfolgreich eine Side Population darstellen

(Telford 2004, Simpson 2006). Anfangs verwendeten wir zur Messung des roten Spektrums einen 655 nm Longpass-Filter. Dieser wurde später durch einen 620 nm Longpass-Filter ersetzt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der zugehörigen Software BD FACSDiva™. Bei gleichzeitiger Färbung mit PI (vgl. 3.6.1) wurden zuerst die toten Zellen ausgeschlossen. Im SSC/FSC-Plot wurden danach die Leukozyten selektioniert, die schließlich im Hoechst-Blue/Hoechst-Red-Plot auf Zellen der Side Population untersucht wurden. Diese wiederum lassen sich in weiteren Plots durch verschiedene Oberflächenmarker genauer charakterisieren.

3.3 Aldefluor Färbung

Wie bereits beschrieben wird mit dem Reagenz Aldefluor® die ALDH nachgewiesen (vgl. 1.2.2), welche in Stamm- und Progenitorzellen eine vielfach höhere Aktivität aufweist als in reiferen Zellen. Aldefluor® wurde von der Firma Aldagen entwickelt und beinhaltet eine Vorstufe von BODIPY®-Aminoacetaldehyd (BAAA). BAAA diffundiert frei in die Zellen und ist ein Substrat der ALDH, welche es zu dem stark fluoreszierenden Produkt BAA (BODIPY®-Aminoacetat) umsetzt. Demnach beginnen Zellen mit einem hohen Gehalt an ALDH sehr stark zu fluoreszieren (ALDH^{br}) und können per FACS-Analyse detektiert werden (s. Abb. 3.2). BAA kann aufgrund seiner negativen Ladung nicht passiv durch die Zellmembran diffundieren, wird allerdings – ähnlich Hoechst 33342 – von bestimmten ABC-Transportern aus dem Zelllumen aktiv entfernt. Deswegen ist ein geeigneter Inhibitor dieser Proteine bei der Färbung und Analyse der Zellen wichtig, welcher in dem vom Hersteller mitgelieferten AldefluorPuffer® bereits enthalten ist.

Es wurden bislang 17 Isoenzyme der ALDH beschrieben. Aldefluor® wurde für ALDH-1A1 optimiert, ist jedoch gleichzeitig Substrat einiger anderer Isoenzyme.

Um den Erfolg der Färbung zu überprüfen, wird eine Kontrolle mit dem ALDH-Inhibitor DEAB (Diethylamino-Benzaldehyd) angesetzt. Da nun BAAA nicht mehr zu BAA umgesetzt wird, sollte sich in diesem Ansatz keine ALDH^{br}-Population

identifizieren lassen. Dieser Versuch dient auch zur Unterscheidung gegenüber Zellen, die passiv größere Mengen BAAA aufnehmen oder über eine geringe ALDH-Aktivität verfügen.

Nach der Färbung sollten die Zellen bis zur Messung bei einer Temperatur $<8\text{ }^{\circ}\text{C}$, vorzugsweise auf Eis, aufbewahrt bzw. weiterverarbeitet (Antikörperfärbung) werden. Dies verhindert die Eliminierung von BAA aus den Zellen und verbessert die Fluoreszenz (Invitrogen 2004).

Aldefluor® ist als fertiges Kit erhältlich und beinhaltet die erforderlichen Reagenzien.

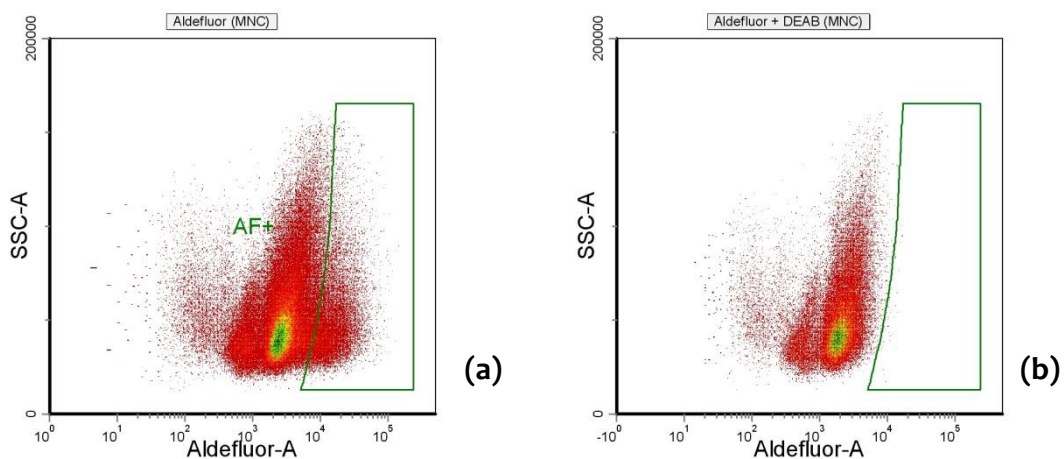


Abb. 3.2: ALDH^{br}-Population: Diese Zellen liegen deutlich rechts der Hauptpopulation (a). Wird die ALDH mit DEAB gehemmt, kann Aldefluor® nicht mehr umgesetzt werden und es finden sich keine stark positiven Zellen (b).

3.3.1 Aktivierung des Aldefluor®

Das Aldefluor®-Reagenz wird in trockenem Zustand in einer stabilen inaktiven Form geliefert. Zur Aktivierung durch Umwandlung in das aktive BAAA folgten wir den Angaben des Herstellers:

1. Alle Kit-Reagenzien werden vor Beginn auf Raumtemperatur angewärmt.
2. Zu dem trockenen Aldefluor® werden anfangs 25µl DMSO zugegeben. Gut mischen und 1 Minute ruhen lassen. Danach 25µl 2N HCL hinzufügen und

gut mischen. Dieser Ansatz muss 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

3. Abschließend werden 360 µl AldefluorPuffer® zugegeben. Von nun an sollte das aktivierte Reagenz während des Gebrauchs auf 2-8 °C gekühlt werden.

Da die Menge an aktiviertem Aldefluor® für viele Versuche ausreichend ist, wurde das Reagenz in Aliquots zu 5 µl bei -80 °C eingefroren.

3.3.2 Färbung der Zellen

Die Färbung der Zellen erfolgte ebenfalls gemäß den Hinweisen des Herstellers. Die Zellen waren entsprechend 3.1.1 oder 3.1.2 vorbereitet und mit Aldefluor®-Puffer auf eine Konzentration von $3,66 \times 10^6$ (bei Vorversuchen bis zu 5×10^6) Zellen/ml eingestellt.

1. Aufgrund nachfolgender Antikörper-Färbung sowie der Aldefluor®-Kontrolle mit DEAB (vgl. 3.3) benötigten wir standardmäßig 300 µl der Zell-Suspension zur Aldefluor®-Färbung. Diese wird zu Beginn in ein FACS-Röhrchen überführt.
2. Für die Aldefluor®-Kontrolle mit einem Volumen von 100 µl wird 1 µl DEAB (Zielkonzentration 1 µl/100 µl Flüssigkeit) in ein weiteres FACS-Röhrchen vorgelegt.
3. Zugabe von 1,5 µl Aldefluor®-Reagenz (Zielkonzentration 0,5 µl/100 µl Flüssigkeit) in das Probenröhrchen, danach gründlich mischen.
4. Von diesen 300 µl werden anschließend 100 µl in das Kontrollröhrchen mit DEAB überführt und gut gemischt. Da nach Zugabe des aktivierten Aldefluor® die enzymatische Reaktion unmittelbar beginnt und besonders anfangs sehr schnell abläuft, muss dieser Schritt ohne Verzögerung erfolgen.
5. Inkubation beider Röhrchen in vorgewärmtem Wasserbad bei 37 °C über 40 Minuten. Dabei sanftes Mischen im Abstand von ca. 10 Minuten.

6. Beenden der Reaktion durch Lagerung der Röhrrchen in Eiswasser.

Von diesem Punkt an müssen die Zellen wie erwähnt ständig in gekühltem Zustand gehalten werden. Um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, werden die Ansätze vor der FACS-Analyse bei 4 °C zentrifugiert (300 g, 10 Minuten, An-/Auslaufzeit: 7/0 sec) und ggf. anschließend in 100 µl FACSTFlow resuspendiert (vgl. 3.8.2).

Von jeder Probe wurden 150 µl der Aldefluor®-Probe und 50 µl Aldefluor®-Kontrolle mit Antikörpern gefärbt (vgl. 3.4.4). Dies erfolgte direkt nach Schritt 6 der Aldefluor®-Färbung ohne zwischenzeitliche Zentrifugation.

3.3.3 FACS-Analyse

Die Zellen wurden im Anschluss an die Färbung am selben Tag mit dem FACSria-Durchflusszytometer gemessen. Aldefluor® wird hierbei von dem 488 nm Argon-Ionen Laser angeregt und die von BAA emittierten Strahlen haben ihr Maximum bei 512 nm.

Verwendete Filterkombination: 502LP + 530/30

3.4 Monoklonale Oberflächenantikörper

Bei monoklonalen Antikörpern handelt es sich um einen definierten Antikörperklon, der aus einer einzelnen B-Zelle abgeleitet wurde und der eine hohe spezifische Affinität zu einem definierten Antigen hat. Alle bekannten Oberflächenantigene wurden im CD-System (Cluster of Differentiation) katalogisiert und nummeriert. Entsprechend dem Antigen, gegen welches die Antikörper gerichtet sind, wird der Antikörper mit derselben CD-Nummer bezeichnet.

Werden zu einer Zellsuspension monoklonale Antikörper gegeben, die zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert worden waren, so korreliert bei der späteren Messung die Intensität des Farbstoffes pro Zelle mit der Expression des Antigens

auf dieser Zelle.

3.4.1 Verwendete Epitope

Zur Untersuchung der Leukämieproben wurden folgende Antikörper verwendet:

CD34-Antikörper, konjugiert mit APC

CD34 findet sich im hämatopoetischen System wie beschrieben besonders auf Stammzellen; im Verlauf der Differenzierung wird die Expression herunter reguliert. Des Weiteren wird CD34 auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert, hier vor allem auf vaskulären Endothelzellen und embryonalen Fibroblasten (*antibodies-online 2008*).

CD38-Antikörper, konjugiert mit PE

CD38 ist ein Protein, das neben enzymatischer Aktivität im Kalziumstoffwechsel vor allem auch als extrazellulärer Rezeptor fungiert und dabei einen Einfluss auf Adhäsion und Signaltransduktion von Leukozyten hat. Es wird besonders von differenzierten B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen und z.T. Monozyten exprimiert und dient u.a. zur Selektion naiver Zellen (vgl. 1.2.2) (*Deaglio 2001*).

CD45-Antikörper, konjugiert mit Pacific Blue

Bei CD45 handelt es sich um ein Transmembranprotein mit intrazellulärer Tyrosin-Phosphatase-Aktivität, das vermutlich als Oberflächenrezeptor wirkt. Beim Menschen kommen 5 verschiedene Isoformen vor, die sich auf nahezu allen differenzierteren Leukozyten findet. CD45 wird daher auch als Pan-Leukozytenmarker bezeichnet. Zudem wird CD45 von leukämischen Zellen signifikant geringer exprimiert als von normalen Leukozyten und kann so der Diskriminierung von Blasten gegenüber gesunden Blutzellen dienen. Diese Blasten erscheinen hier als CD45-negativ oder schwach positiv („45^{dim/neg}“) gegenüber den stark positiven normalen Leukozyten (*Charbonneau 1988, Lacombe 1997*).

3.4.2 Fluoreszenz-Farbstoffe

Das für diese Arbeit benutzte FACSAria-Durchflusszytometer bietet mit drei Lasern im roten, blauen und violetten Farbbereich ein breites Analysespektrum. Da für Aldefluor® (Emissionsmaximum: 512 nm), Hoechst 33342 (Emissionsmaximum 450 nm bzw. > 675 nm) und PI (Emissionsmaximum 633 nm) bereits einige Wellenlängenbereiche reserviert waren, mussten die Farbstoffe für die Antikörper entsprechen gewählt werden. Für die Messung der KM-Proben mit Aldefluor und PI wurden schließlich verwendet:

APC

Allophycocyanin besitzt eine Molekülmasse von ca. 80 kDa. Bei einem Absorptionsmaximum von 650 nm wird es von der 633 nm Laserquelle angeregt und emittiert Strahlen mit einem Maximum von 660 nm.

PE

Phycoerythrin ist ein akzessorisches Pigment der Photosynthese bei bestimmten Algen. Seine Absorptionsmaxima liegen bei 480 nm sowie 565 nm, sein Emissionsmaximum bei 575 nm. Die Anregung erfolgt bei 488 nm.

Pacific Blue

Bei einem Absorptionsmaximum von 410 nm und einem Emissionsmaximum von 455 nm wird es vom violetten Laser bei 407 nm angeregt.

Weitere getestete Farbstoffe

Neben diesen drei, welche letztlich für die Messung der Patientenproben ausgewählt wurden, testeten wir noch weitere Fluorochrome. Unter anderem handelt es sich hierbei um Tandem-Konjugate. Diese bestehen aus zwei Fluorochromen, wobei das Emissionsspektrum des einen mit dem Exzitationsspektrum des anderen Moleküls überlappt. Befinden sich die Fluorochrome in ausreichend geringem Abstand zueinander (2 – 5 nm), findet ein

Resonanz-Energie-Transfer statt. Das erste Fluorochrom, genannt Donor, wird so durch eine Laserquelle kürzerer Wellenlänge angeregt und emittiert längerwelliges Licht, das nahezu vollständig vom zweiten Fluorochrom, dem Akzeptor, absorbiert und wiederum in längerwellige Strahlen umgewandelt wird. Ein Beispiel hierfür ist das Konjugat PE-DY747. PE wird vom blauen Laser bei 488 nm angeregt. Die emittierten Strahlen regen ihrerseits DY747 an und schließlich entsteht ein Emissionsmaximum bei 782 nm. Diese Tandem-Konjugate ermöglichen die Messung eines breiteren Spektrums an Farben, ohne zusätzliche Laserquellen zu benötigen. In dieser Arbeit wurden neben oben erwähnten noch folgende Fluorochrome getestet (geordnet nach anregender Laserquelle, AM = Absorptionsmaximum, EM = Emissionsmaximum):

Laserquelle 407 nm (violett):

Pacific Orange	AM: 400 nm	EM: 451 nm
----------------	------------	------------

Laserquelle 488 nm (blau):

AlexaFluor 405	AM: 402 nm	EM: 421 nm
FITC	AM: 495 nm	EM: 519 nm
PE-DY590	AM: 480/565 nm	EM: 599 nm
	Spektrum vergleichbar mit PE-Texas Red oder PE-Alexa Fluor 590	
PE-DY647	AM: 480/565/652 nm	EM: 672 nm
	Spektrum vergleichbar mit Cy5 oder Alexa Fluor 747	
PE-DY747	AM: 480/565 nm	EM: 782 nm
	Spektrum vergleichbar mit PE-Cy7	

Laserquelle 633 nm (rot):

AlexaFluor 680	AM: 679 nm	EM: 702 nm
AlexaFluor 700	AM: 696 nm	EM: 720 nm
APC-DY747	AM: 595-640 nm	EN: 782 nm
	Spektrum vergleichbar mit PE-Cy7	

3.4.3 Konjugation von monoklonalen Antikörpern mit Fluorochromen

Zu Beginn der Arbeit waren einige der unter 3.4.2 aufgeführten Farbstoffe noch nicht oder nur schwierig in Kombination mit den benötigten Antikörper erhältlich. Daher führten wir diese Konjugation selbst durch. Testweise wurde CD38 konjugiert mit AlexaFluor 405 und AlexaFluor 700 sowie CD34 mit AlexaFluor 405 und Pacific Blue.

Bei Lieferung befinden sich 1 mg Antikörper in 1 ml PBS mit 15 mM Natriumazid sowie der Farbstoff in trockenem Zustand als Pulver. Die Konjugation erfolgte nach folgendem Schema (in Anlehnung an Roeder 2004):

1. Zur Konjugation mit Farbstoffmolekülen ist allerdings eine höhere Konzentration nötig (Ziel 5 - 6 mg/ml). Daher wird die gesamte Menge der AK in einen Amicon Ultra-4 Zentrifugenfilter überführt, dessen semipermeable Membran Proteine ab 10 kDa abfiltriert. Die Zentrifugation erfolgt bei 3000 g über 30 Minuten.
2. Konzentration der im Überstand befindlichen Antikörper über Restvolumen berechnen. Entnehmen der gewünschten Menge, Aufbewahrung des Restes im Kühlschrank. Durch Zugabe von HCO_3^- (Ziel: 10 %) sowie PBS wird eine AK-Konzentration von 5 - 6 mg/ml eingestellt.
3. Der Farbstoff ist in trockener Form erhältlich und wird tiefgefroren gelagert. Durch Zugabe von DMSO wird eine Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erreicht.
4. Nun folgt die Zugabe des Farbstoffes zu den AK. Die einzusetzende Menge ist je nach Farbstoff verschieden und muss im Einzelfall experimentell angepasst werden. Wir erzielten gute Ergebnisse bei 90 μg Farbstoff / μg AK.
5. Diese Reaktion läuft sehr rasch ab. Um eine gleichmäßige Verteilung der Farbstoffmoleküle auf die AK zu gewährleisten, muss nach Zugabe innerhalb kürzester Zeit eine gründliche Durchmischung (Vortexer über >3 Minuten) erfolgen. Danach Inkubation auf Rüttler für bis zu 60 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend über Nacht bei 4 °C.

6. Zum Aufreinigen der gefärbten AK werden diese mit PBS auf ca. 1 µg/µl verdünnt und die Suspension auf einen Zentrifugenfilter (Microcon, 100 kDa) überführt. Zentrifugation bei 14000 g über 20 Minuten. Nach Verwerfen des Filtrats und Spülung des Microcon-Cups mit PBS wird nun der Filter um 180° gedreht, d.h. mit den AK auf der Membran zum Cup-Lumen hin eingesetzt.
7. Spülen des Filters. Hierzu wird PBS auf den Filter aufgetragen. Nach 10 Minuten mit gelegentlichem Vortexen erfolgt eine Zentrifugation über 1 Minute bei 14000 g, ggf. diesen Schritt wiederholen, bis sich ausreichend Flüssigkeit mit der entsprechenden Menge AK im Microcon-Cup befindet. Diese wird nun in ein Eppendorf-Cup überführt und mit PBS auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl eingestellt.

Um den Erfolg der Konjugation bzw. den Farbstoffgehalt pro Antikörper zu bestimmen, wird das DOL bestimmt (Degree of Labeling, entspricht Mol Farbstoff / Mol Antikörper). Dies erfolgt durch photometrische Messung nach Verdünnung des aufgereinigten Antikörpers mit PBS.

Zuvor wird ebenfalls photometrisch die Proteinkonzentration der Flüssigkeit ermittelt. Hierzu muss die Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Protein) sowie beim Absorptionsmaximum des jeweiligen Farbstoffes gemessen werden. Zum Nullabgleich dient jeweils eine Küvette mit PBS.

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Proteinkonzentration } [\mu\text{mol}/\mu\text{l}] = \frac{[A_{280} - A_M \times H] \times dil}{\epsilon}$$

- mit
- A_M = Absorption bei Absorptionsmaximum des Farbstoffes
 - H = spezifischer Korrekturfaktor für die Absorption des Farbstoffes bei 280 nm
 - dil = Verdünnungsfaktor
 - ϵ = molarer Extinktionskoeffizient für Protein bei 280 nm
(für die meisten IgGs gilt: $\epsilon = 203.000 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$)

Danach wird der Farbstoffgehalt pro Antikörper berechnet:

$$\text{DOL} = \frac{A_M \times \text{dil}}{\varepsilon_M \times \text{Proteinkonzentration}}$$

für ε_M = Molarer Extinktionskoeffizient des Farbstoffes für pH = 8,0
bei A_M

3.4.4 Färben der Zellen

Das Färben der Zellen mit fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern erfolgte stets im Anschluss an die enzymatischen Reaktionen von Aldefluor® oder Hoechst. Die Zellen befinden sich in AldefluorPuffer® (nach Aldefluor®-Färbung bzw. FACSFlow bei Hoechst 33342). Die zuzugebende Menge an Antikörper ist hauptsächlich abhängig von den fluoreszierenden Eigenschaften des Farbstoffs. Es zeigte sich, dass in vielen Fällen mit ca. ¼ der Angabe des Herstellers gute Ergebnisse erzielt werden. Im Einzelnen wurden pro 100 µl eingesetzt:

APC:	2µl
APC-Konjugate:	5µl
PE sowie PE-Konjugate:	5µl
Pacific Blue/Orange:	5µl
Alexa Farbstoffe:	4µl

Die Inkubation erfolgt über 30 Minuten bei 4 °C in FACS-Röhrchen, anschließend Zellwäsche durch Zugabe von 3 ml PBSA und Zentrifugation (300 g, 4 Minuten, An-/Auslaufzeit: 7/0 sec, 4 °C). Danach Dekantieren der Röhrchen.

Bis zur nachfolgenden FACS-Analyse werden die Röhrchen in Eiswasser möglichst lichtgeschützt gelagert.

3.5 Beads

Bei Beads handelt es sich um kleine Kunststoffpartikel, die mit Fluorochromen gefärbt sind.

3.5.1 Allgemeine Eigenschaften

Im Vergleich zu Zellen bieten Beads wesentlich konstantere Eigenschaften im Bezug auf Gleichmäßigkeit des Labelings, Intensität der Fluoreszenz und Stabilität über einen längeren Zeitraum. Daher werden sie zur Kalibrierung des FACS-Gerätes verwendet, um vergleichbare Ergebnisse bei der Messung zu erhalten (vgl. 3.7). (Sack 2006) Da Beads in hohen Konzentrationen aufbewahrt werden, genügen zur Messung mit dem FACSAria 5 μl in ca. 50 μl FACSTFlow.

3.5.2 Konjugation von Beads mit Fluorochromen

Um das Gerät für jeden zu messenden Farbstoff zu kalibrieren, werden entsprechend gefärbte Beads benötigt. Da zu Beginn unserer Experimente für Pacific Blue keine Beads erhältlich waren, führten wir diese Konjugation selbst durch. Es wurden Polystyren-Micropartikel verwendet, die eine reaktive Aminogruppe besitzen, an welche der Farbstoff bindet. Die Konjugation erfolgte nach folgendem Schema:

1. Der zu konjugierende Farbstoff wird mit DMSO auf 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Hiervon werden 5 μl zu 100 μl Beads gegeben. Sofort gut mischen (Vortexer) und ca. 1 h auf Rüttler inkubieren lassen.
2. Danach mit 300 μl PBS auffüllen und bei 200 g über 5 Minuten zentrifugieren.
3. Überstand abnehmen und gefärbte Beads mit 400 μl Formaldehyd (4 %) fixieren.
4. Falls die Beads durch die Zentrifugation verklumpt sind (sichtbar durch hohe Werte im SSC), folgt eine kurze Behandlung mit Ultraschall.

3.6 Lebend/Tot-Marker

Bei kryokonservierten Zellen oder bei Verwendung von zytotoxischen Reagenzien wie z.B. Hoechst ist die Vitalität der Zellen z.T. deutlich vermindert. Dies kann bei FACS-Analysen insofern problematisch sein, als tote oder geschädigte Zellen oft unspezifisch Antikörper binden oder Fluoreszenzfarbstoffe aufnehmen und so die Ergebnisse verfälscht werden. Daher ist es nötig, durch geeignete Lebend/Tot-Marker (LTM) diese Zellen mit entsprechenden Gates von der weiteren Analyse auszuschließen (vgl. 3.9).

3.6.1 Propidium Iodid

Einer der hierfür am gebräuchlichsten Marker ist Propidium Iodid (PI). Es handelt sich hierbei um ein fluoreszierendes Molekül (AM/EM: 535/617 nm), das intrazellulär an DNA und RNA bindet. Durch diese Bindung wird seine Fluoreszenz um das 20- bis 30-fache verstärkt und das Emissionsmaximum um ca. 15 nm in den blauen Bereich verschoben. Da PI intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann, kann es in lebendigen Zellen nicht akkumulieren. Nur wenn die Barriere der Zellmembran defekt ist, was im Allgemeinen bei geschädigten oder toten Zellen der Fall ist, kommt es zu intrazellulären Bindungen mit den beschriebenen Effekten.

Die Detektion toter Zellen mit PI funktioniert sehr zuverlässig. Problematisch ist das relativ breitgipflige Emissionsspektrum, wodurch PI gefärbte Zellen stark in Kanäle anderer Farbstoffe strahlen und eine suffiziente Kompensation erforderlich ist. (vgl. 3.7.3)

Die Zugabe von PI erfolgt unmittelbar (ca. 1 - 5 Minuten) vor der durchflusszytometrischen Messung der Probe. Zu der Zellsuspension werden ca. 2 µl des mit Aqua dest. 200-fach verdünnten PI hinzugefügt

3.6.2 LIVE/DEAD®

Wegen der beschriebenen Nachteile von PI testeten wir mit LIVE/DEAD® eine neuere Alternative. Es handelt sich hierbei um ein fluoreszierendes Farbstoffmolekül, das mit Aminogruppen reagiert. Ist die Zellmembran beschädigt und somit durchlässig, kommt es zu einer Reaktion mit Aminogruppen im Zellinneren sowie auf der Zelloberfläche. Bei lebendigen Zellen ist die Reaktivität dagegen beschränkt auf die Zelloberfläche, was eine geringere Fluoreszenz zur Folge hat. Laut Hersteller sollen tote Zellen mit einer 50-fach stärkeren Intensität fluoreszieren.

LIVE/DEAD® ist für verschiedene Wellenlängenbereiche erhältlich. Wir testeten die violette Variante (Absorptions-/Emissionsmaximum: ~416/451 nm) (*Invitrogen 2007*). Zur Färbung wurden die Zellen nach Inkubation mit Aldefluor® zentrifugiert (450 g, 3 Minuten, 4 °C) und in 100 µl PBS resuspendiert.

Nach dieser Vorbereitung werden die Proben mit LIVE/DEAD® über 30 Minuten inkubiert, testweise bei Raumtemperatur sowie auf Eis. Anschließend erfolgte eine Zellwäsche durch Zugabe von 3ml PBSA und Zentrifugation (300 g, 4 Minuten, An-/Auslaufzeit: 7/0 sec, 4 °C). Danach wurden die Röhrchen dekantiert.

Bis zur nachfolgenden FACS-Analyse werden die Röhrchen in Eiswasser möglichst lichtgeschützt gelagert.

3.7 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) stellt eine Methode dar, bei der Partikel, meistens Zellen, einzeln auf Größe, Granularität, gebundene Antikörper und andere Zelleigenschaften untersucht werden. Grundlage ist die Verwendung von Farbstoffmolekülen, deren Quantität für das jeweilige Partikel mittels spezifischer Lichtemission bestimmt werden kann. Sind die Farbstoffmoleküle z.B. an monoklonale Antikörper gebunden, lässt sich anhand der

Fluoreszenz im für den Farbstoff charakteristischen Wellenlängenbereich auf die Menge der an eine Zelle gebundenen Antikörper schließen. So können in kurzer Zeit für viele Zellen gleichzeitig mehrere Parameter bestimmt werden.

3.7.1 Aufbau des Geräts und Messtechnik

Die im Proberöhrchen in flüssigem Medium konzentrierten Zellen werden angesaugt, in isotoner Lösung emulgiert und in einem Flüssigkeitsstrahl perlenschnurartig aufgereiht. So werden sie einzeln an einer gebündelten Laserquelle vorbei geleitet, die Licht in drei definierten Wellenlängen emittiert (407/488/633 nm bei dem von uns verwendeten FACS Aria). Die angeregte Zelle wandelt nun je nach Beschaffenheit diese Energie in Lichtstrahlen unterschiedlicher Farbe, deren Intensität von photoelektrischen Detektoren in definierten Wellenlängenbereichen gemessen wird.

Diese spezifische Fluoreszenz wird hauptsächlich durch Farbstoffe charakterisiert, die Licht von einem der drei Laser absorbieren und in einem möglichst schmalen Spektrum emittieren, das stets etwas energetisch niedriger und somit langwelliger ist. Es lassen sich zwar mehrere Farbstoffe durch den gleichen Laser anregen, jedoch unterscheiden sich die Emissionsspektren in charakteristischer Weise. Durch unterschiedliche Verwendung der Farbstoffe lassen sich so verschiedene Zelleigenschaften wie z.B. Antigenexpression oder Enzymtätigkeit quantifizieren. In den meisten Fällen handelt es sich um konjugierte Antikörper, aber auch Farbstoffe wie Hoechst 33342 oder Aldefluor®, die nur von bestimmten Zellen intrazellulär umgesetzt oder angereichert werden.

Zusätzlich zur Farbfluoreszenz wird das so genannte Streulicht gemessen. Die Zellen passieren in vertikaler Richtung den horizontalen Laserstrahl rechtwinklig. Hierbei wird Licht in alle horizontalen Richtungen abgelenkt. Lichtstrahlen, die durch Beugung nur in einem Winkel von wenigen Grad abgelenkt werden, werden als „forward-scatter“ (FSC) bezeichnet. Sie werden in der Achse des einfallenden Lichts gemessen und sind ein Maß für die Zellgröße. Die Ablenkung in einem Winkel von

90° kommt durch Lichtbrechung und Reflexion zustande. Sie ist proportional zur Anzahl der Membranschichten, auf die der Laserstrahl trifft. Daher ist der so genannte „side-scatter“ (SSC) ein Maß für die Granularität der Zellen.

Die Fluoreszenz wird ebenfalls im Winkel von 90° aufgenommen und fiberoptisch zu einem System aus Spiegeln und Filtern weitergeleitet. Hier werden die Strahlen nach ihrer Wellenlänge aufgetrennt. Ihre Intensität wird nun im jeweiligen Bereich von Detektoren erfasst und in elektrische Signale umgewandelt. Diese werden unmittelbar an einen angeschlossenen Computer weitergeleitet und dort verarbeitet (siehe Abb. 3.3).

Um die maximale Intensität eines Fluorochroms zu messen, muss die dem Detektor vorgeschaltete Filterkombination möglichst genau den Bereich des Emissionsmaximums selektieren. Ist dieser Bereich zu schmal, kommt nur ein schwaches Signal zustande, im gegenteiligen Fall führt die Streustrahlung anderer Fluoreszenzen zu undeutlichen Ergebnissen.

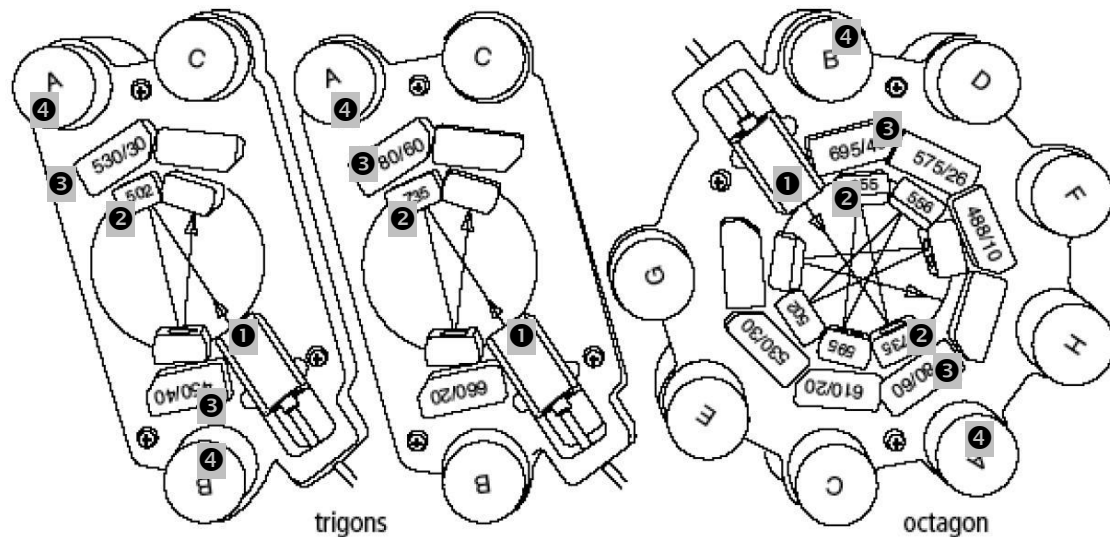


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Filter und Detektoren für die drei Wellenlängenbereiche am FACS Aria. Das einfallende Licht ① trifft auf einen Longpass-Filter ②, wo die Strahlen je nach Wellenlänge passieren oder reflektiert und somit zum nächsten Filter mit geringerer Wellenlänge weitergeleitet werden. Hinter den Longpass-Filtern befindet sich jeweils ein weiterer Filter, der den Wellenlängenbereich auf die zu detektierenden Strahlen einschränkt ③. Dahinter erfassen Detektoren die einfallenden Strahlen ④. (Quelle: BD Bioscience 2001)

3.7.2 Auswertung der gewonnenen Daten

Neben FSC und SSC werden für jede Zelle Werte für Fluoreszenzen in verschiedenen Kanälen gemessen. Am FACSAria ist die gleichzeitige Messung von bis zu 15 Parametern möglich (wir erfassten durchschnittlich fünf bis sechs). Diese werden am Computer verarbeitet und in ein- oder zweidimensionalen Diagrammen abgebildet. In der zweidimensionalen Darstellung werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen, wodurch sich graphisch verschiedene Populationen abgrenzen lassen. Diese werden bei Interesse einzeln markiert und können so gesondert anhand anderer Parameter weiter charakterisiert werden. Man bezeichnet dieses Vorgehen als „gating“.

Nachdem in der Darstellung SSC vs. PI nur die lebendigen Zellen ausgewählt wurden, die als PI- nahe dem Ursprung liegen, folgt die weitere Analyse der morphologischen Parameter FSC und SSC (s. Abb. 3.4). In diesem Diagramm erscheinen große Zellen weiter rechts auf der x-Achse, stark granuliert weiter oben auf der y-Achse. Zelltrümmer und die im Vergleich zu Leukozyten kleineren Erythrozyten liegen demnach ursprungsnah auf der x-Achse und können durch einen sogenannten „threshold“, einem Schwellenwert für Zellgröße, grundsätzlich von der Auswertung ausgeschlossen werden. Leukozyten erscheinen in der Darstellung als oftmals homogene Wolke im Zentrum des Diagramms. Folglich wird auf diese Population ein Gate gelegt, so dass im weiteren Verlauf nur noch diese ausgewählten Zellen anhand weiterer Parameter betrachtet werden. Setzt man danach weitere Gates, erhält man eine Gate-Hierarchie (s. Abb. 3.5). Die Auswertung erfolgt meist anhand von Prozentzahlen der Zellen innerhalb eines Gates im Bezug auf die Gesamtzahl der gemessenen Zellen oder aber der Zellzahl eines übergeordneten Gates.

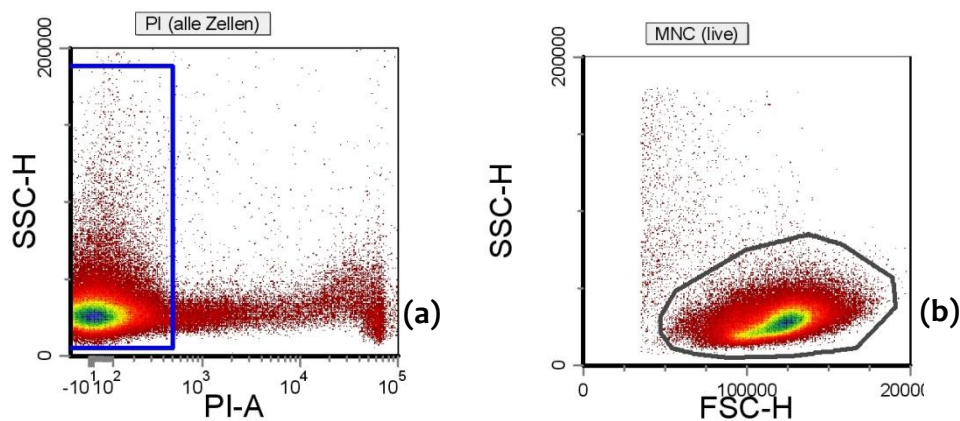


Abb. 3.4: Gating: Zuerst Auswahl der lebenden Zellen durch Gate auf PI-negative Zellen (a). Darstellung dieser Population in FSC/SSC-Plot und Auswahl der MNC. Zelltrümmer befinden sich hierbei links, verklumpte Zellen rechts der Zielpopulation (b). Danach erfolgen die weitere Analyse dieser Zellen bezüglich der gewählten Parameter und die diesbezügliche statistische Auswertung als Prozentzahl der MNC.

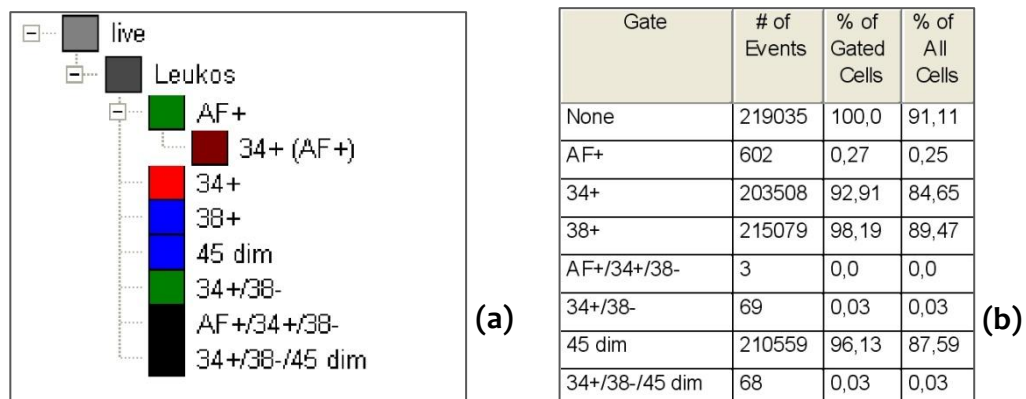


Abb. 3.5: Auswertung: Gate-Hierarchie (a) und Auswertung der einzelnen Parameter als Prozentwerte der MNC (b).

3.7.3 Kompensation

Wie bereits beschrieben, emittieren die Fluoreszenzfarbstoffe nach Anregung durch den Laser Lichtstrahlen in einem charakteristischen Bereich. Dabei handelt es sich allerdings um ein mehr oder weniger breites Spektrum verschiedener Wellenlängen mit einem Emissionsmaximum. Die den Detektoren vorgeschalteten dichromatischen Filter bewirken, dass jeder Detektor Strahlen in einem bestimmten

Wellenlängenbereich registriert. Wählt man diesen Bereich so, dass der Detektor den Peak eines Farbstoffes einschließt, erhält man das stärkste mögliche Signal. Der Farbstoff APC z.B. hat sein Maximum bei 660 nm und wurde detektiert im Bereich von 640 bis 680 nm.

Da die Farbstoffe neben dem Bereich der maximalen Emission auch Licht geringerer Intensität in anderen Wellenlängen emittieren, werden diese oftmals von Detektoren mit erfasst, die eigentlich das Signal eines anderen Farbstoffes messen sollen. Die Spektren der Farbstoffe überlappen (s. Abb. 3.6). Besonders bei Emissionsspektren mit breiter Basis wie Propidium Iodid oder Farbstoffen von großer Intensität wie Aldefluor ist dies problematisch, da so die Werte anderer Parameter verfälscht werden. Um diese Messfehler auszugleichen, bedient man sich einer rechnerischen Kompensation: Für jeden Farbstoff wird in jedem Fremd-Detektor, der dessen Fluoreszenz eigentlich nicht erfassen soll, der Prozentwert der Intensität im Farbstoff-spezifischen Detektor bestimmt, der dann im Fremd-Detektor zur Korrektur abgezogen werden muss. Misst mal etwa für Farbstoff 1 im zugeordneten Detektor 1 den fiktiven Wert von 200, in Detektor 2, der eigentlich Farbstoff 2 messen soll, den Wert 40 für Farbstoff 1, so entspricht dies einer nötigen Kompensation von 20 %. Demnach werden in den folgenden Messungen vom Wert des Detektors 2 stets 20 % des Wertes von Detektor 1 subtrahiert.

Je größer die Intensität in benachbarten Detektoren ist, desto schwieriger und ungenauer wird auch die Kompensation. Um die Werte in den Fremd-Detektoren genau ermitteln zu können, benötigt man entweder Einzelfärbungen mit nur einem Farbstoff (sog. single stain) oder FMO („fluorescence minus one“), d.h. Proben, die systematisch mit allen Farbstoffen außer einem gefärbt sind.

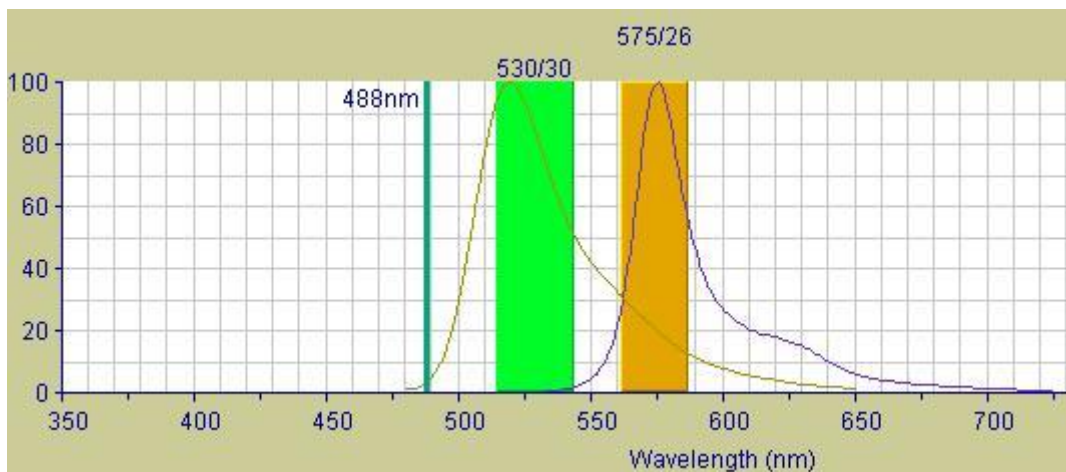


Abb. 3.6: Streustrahlung am Beispiel von Aldefluor® und PE: Die beiden Kurven stellen die Emissionsspektren von Aldefluor® (li) bzw. PE (re) dar, die senkrechte Linie die Laserquelle. Die beiden Balken markieren den von der jeweiligen Filterkombination erfassten Bereich. Aus der Abb. ist ersichtlich, dass der Detektor von PE (re) ebenfalls Impulse von Aldefluor® erfasst, die sich zu den Impulsen von PE addieren. Diese werden als Prozentzahl des Signals im Aldefluor®-Filter von dem PE-Wert subtrahiert. (Quelle: BD Bioscience 2008)

3.8 Untersuchung der AML-/ALL-Patientenproben

Sämtliche AML- und ALL-Patientenproben wurden stets nach demselben Schema untersucht. Zur internen Überprüfung der Messungen wurden zudem fünf Knochenmarkproben von nicht-Leukämiekranken Kindern in gleicher Weise analysiert. Hierbei handelte es sich um ein gesundes Kind, ein Kind mit juveniler Rheuma und drei Kinder mit Rheumatoider Arthritis (vgl. 2.1).

3.8.1 Auswahl der Antikörper und Fluorochrome

Um eine optimale Darstellung der Parameter in der FACS-Analyse zu erreichen, d.h. im Besonderen um Probleme durch Streustrahlung und zu starke Kompensation zu vermeiden, wurden insgesamt nur 5 Kanäle gemessen. Nachdem sich in den Vorversuchen Aldefluor® als die praktikablere Variante gegenüber Hoechst33342 erwiesen hatte, war neben PI die Messung von 3 weiteren Farbstoffen möglich. Da

APC im Bereich des roten Lasers liegend das deutlichste Signal mit der geringsten Störung durch andere Fluorochrome bot, verwendeten wir den wichtigsten Stammzellmarker CD34 in Konjugation mit APC. Daneben wählten wir CD38 in Kombination mit PE, um die in 1.2.2 beschriebenen Subpopulationen von CD34 erfassen zu können. Als einzig im violetten Bereich gemessener Farbstoff fiel die Wahl auf Pacific Blue konjugiert mit CD45, um leukämische von normalen Zellen trennen zu können (vgl. 3.4.1).

3.8.2 Ablauf der Analyse

Es wurden bis zu sechs Patientenproben parallel untersucht. Nach dem Auftauen der Zellen entsprechend 3.1.2 wurden diese zuerst mit Aldefluor® (3.3.2) und danach mit Antikörpern (3.4.4) gefärbt. Es wurden jeweils Ansätze nach Tab. 3.1 vorbereitet.

Tab. 3.1: Zellvolumina bei Aldefluor®-Färbung

Färbung mit	eingesetztes Vol. (µl)
AF	30
AF + AK	150
AF-C	50
AF-C + AK	50

AK: Standard-Antikörper: CD34-APC
 CD38-PE
 CD45-Pacific Blue

AF Aldefluor®

AF-C: Aldefluor®-Kontrolle mit DEAB (vgl. 3.3.2)

Vol.: Volumen der Zellsuspension nach dem Auftau-Prozess (vgl. 3.1.2), d.h. in 100µl befinden sich ca. $3,66 \times 10^5$ Zellen

Zusätzlich wurden für die Kompensation von jeweils einer der parallel analysierten Patientenproben Einzelfärbungen vorbereitet (vgl. Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Zellvolumina bei Antikörper-Färbung

Färbung mit	eingesetztes Vol. (μl)
ohne Färbung	25
CD3-APC	25
CD38-PE	25
CD45-Pacific Blue	25

Da CD34 nur von sehr wenigen Zellen exprimiert wird, reichen die CD34+ Zellen in den meisten Fällen nicht für eine vernünftige Berechnung der Kompensation aus. Deswegen wurde stattdessen zur Messung der Kompensationswerte CD3-APC verwendet.

Diese Ansätze wurden zur Antikörperfärbung mit je 25 μl AldefluorPuffer® auf 50 μl aufgefüllt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt und anschließendem Dekantieren blieb ein Restvolumen von ca. 100 μl in den Röhrchen zurück, welches für die FACS-Analyse ausreichend ist. Bei dem Ansatz „AF + AK“ wurden aufgrund der höheren Zellzahl vor der Messung ca. 100 μl FACSTFlow hinzugefügt.

Um vergleichbare Absolutwerte bei der Fluoreszenzmessung zu gewährleisten, wurde das FACS-Gerät spätestens an jedem 2. Tag mit Hilfe von Beads (vgl. 3.5) kalibriert. Die Kalibrierung wurde für jeden zu messenden Kanal durchgeführt und Abweichungen durch Einstellung der Spannung am jeweiligen Detektor ausgeglichen. Als Zielwert dienten die durchschnittlichen Fluoreszenzwerte der jeweils positiven Beads bei der Messung der ersten 4 Patientenproben.

Im Anschluss wurden als erstes die Ansätze für die Kompensation gemessen und diese automatisch vom Computer berechnet, so dass schon während der Analyse der eigentlichen Zellen eine grobe Einschätzung des Ergebnisses möglich war. Zur Kompensation von PI wurde der Ansatz mit den ungefärbten Zellen nach deren

Messung verwendet.

Danach wurden jeweils die vier Ansätze pro Patient gemessen. Um die Messgenauigkeit zu erhöhen, wurde die Aquisitions geschwindigkeit nicht über Stufe 6 (von 11) erhöht. Anschließend wurden die Daten als FCS-Dateien exportiert und gespeichert.

3.9 Auswertung der Daten

Die Auswertung der Daten erfolgte nach Abschluss aller Messungen mit dem Programm FCSExpress. Hier wurde zuerst eine möglichst exakte Kompensation erstellt, d.h. die vom Computer errechneten Kompensationswerte wurden manuell nachbearbeitet. Dabei wurden die mit nur einem Farbstoff gefärbten Zellen in 2D-Dotplots gegen alle weiteren Parameter dargestellt. Nun wurde überprüft, ob die für den eingesetzten Farbstoff positiven Zellen für den jeweils anderen Parameter den gleichen Wert besaßen wie die negativen Zellen. Ggf. wurde der Kompensationsfaktor angepasst.

Im der Darstellung SSC/PI wurde anfangs ein Gate auf die negativen und somit intakten Zellen relativ restriktiv gelegt. Diese Population wurde nun im SSC/FSC-Plot angezeigt und die Leukozyten, die sich in dieser Darstellung im zentralen Bereich befanden, wurden ausgewählt. Hierbei wurden Zelltrümmer und verklumpte Zellen, die sich aufgrund ihrer Größe am linken bzw. rechten Rand der FSC-Darstellung befinden, ausgeschlossen, wie auch andere Zellarten, die sich durch ihre Granularität unterscheiden. Die Zellen in diesem Leukozytengate wurden nun auf die Parameter Aldefluor[®], APC (CD34), PE (CD38) und Pacific Blue (CD45) einzeln untersucht. (vgl. 3.7.2)

Die bevorzugte Methode zum Setzen der Gates ist die Negativkontrolle, in der das Gate für die positiven Zellen an den Rand der negativen Population gelegt wird. In unseren Auswertungen strebten wir zur besseren Vergleichbarkeit einen Anteil von <0,1 % positive Zellen im Gate der Negativkontrolle an. Als Negativkontrolle sollten FMOs verwendet werden (vgl. 3.7.3). Für Aldefluor[®] diente hier der Ansatz „AF-C + AK“, um trotz der hohen Intensität von Aldefluor[®] auch die Fluoreszenz der nur

schwach gefärbten Zellen nicht außer Acht zu lassen. Eben diese hohe Intensität von Aldefluor® führte auch dazu, dass als „FMO“ für die Antikörper die Einzelfärbung mit Aldefluor® allein keinen Nachteil gegenüber einer zusätzlichen Färbung mit den eigentlich zum FMO-Ansatz fehlenden Antikörpern hatte.

Das Legen der Gates erfolgt somit nach folgenden Kriterien:

Aldefluor®

Die gesamte Zellpopulation ist in dem Ansatz mit Inhibitor DEAB durchschnittlich um den Faktor 1,55 nach links verschoben (vgl. Abb. 3.7) Dieses Problem wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, vgl. *Pearce 2007*. Dadurch erhält man durch ein Setzen des Gates nach der Negativkontrolle zu viele falsch positive Zellen. Um dieses Problem zu vermeiden, wurden die positiven Zellen in der Aldefluor®-Probe ausgewählt und die Lage des Gates in der Negativkontrolle überprüft. Dies ist möglich, da sich die ALDH^{br}-Zellen meist deutlich von den restlichen Zellen abgrenzen. Allerdings gab es auch Proben, in denen die ALDH^{br}-Population eher unscharf aus der Hauptpopulation hervorging. In diesen Fällen wurde das Gate nach der Negativkontrolle gesetzt und mit Hilfe des durchschnittlichen Verschiebungswertes (s.o.) und der Morphologie des Aldefluor®-Plots angepasst. Beim Vergleich mit einem Auswertungsalgorithmus, der stets mit Negativkontrolle und Korrektur des Verschiebungswertes operierte, erwies sich diese Methode im Bezug auf falsch positive bzw. negative Zellen als sinnvoller. Ursache hierfür ist unter anderem, dass die Verschiebung nicht konstant um den gleichen Wert erfolgt.

In allen Fällen wurde die Prozentzahl derjenigen Zellen, die sich in der Negativkontrolle im ALDH^{br}-Gate befanden, von dem Wert der Positivprobe subtrahiert (Median: 0,05 %).

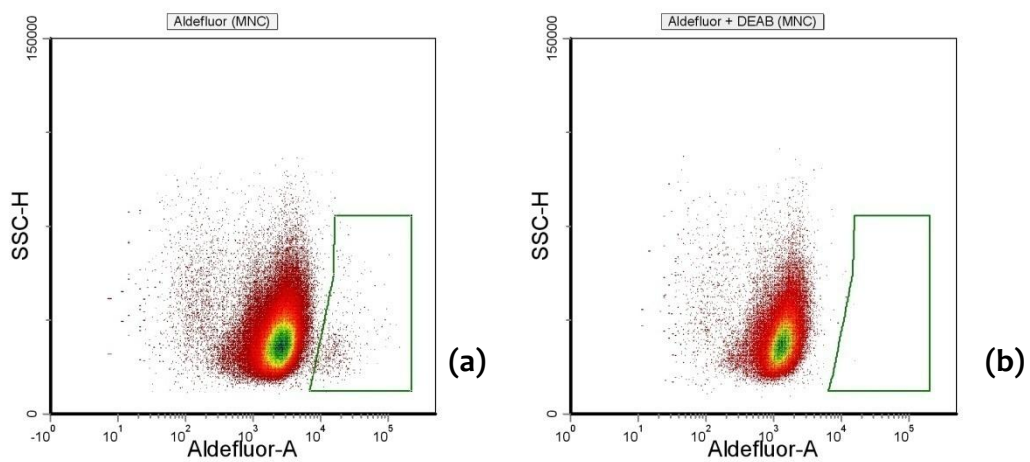
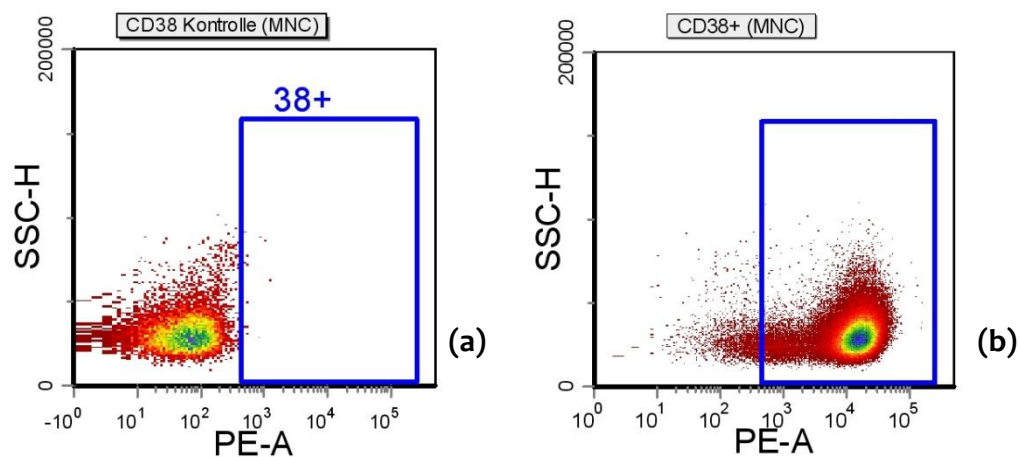


Abb. 3.7: Verschiebung der ALDH^{br}-Population: Die ALDH^{br}-Zellen grenzen sich hier gut von den übrigen Zellen ab und können mit einem Gate gut erfasst werden (a). Im Vergleich ist die Hauptpopulation in der Kontrollfärbung mit dem Inhibitor DEAB insgesamt deutlich nach links verschoben (b).

APC und PE

In den meisten Fällen konnte das Gate nach der Negativkontrolle gesetzt werden. In einigen Ausnahmen waren Zellen vorhanden, die weit im APC/PE-positiven Bereich lagen, sodass ein Setzen des Gates nach oben erwähnten Kriterien viele falsch-negative Zellen zur Folge gehabt hätte. Daher wurde in diesen Fällen die Lage des Gates anhand der Positiv-Probe korrigiert. In manchen Fällen war es nötig, ein polygonales Gate zu setzen, um deutlich abgrenzbare Populationen nicht unphysiologisch zu trennen (vgl. Abb. 3.8).



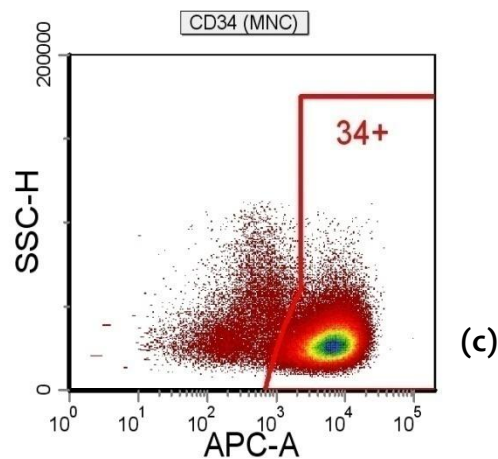


Abb. 3.8: Setzen der Gates bei PE und APC: In den meisten Fällen war dies wie hier gut anhand der Negativkontrolle (a) möglich. In diesem Fall sind nahezu alle Zellen positiv für PE (b). Bei CD34 erwies sich in wenigen Fällen ein polygonales Gate als sinnvoller, um erkennbare Populationen sinnvoll zu trennen (c).

Pacific Blue

Da bei CD45 wie erwähnt die stark positiven Zellen von den schwach positiven bzw. negativen Zellen getrennt werden sollten (vgl. 3.4.1), wurde um letztere ein Gate gelegt ($CD45^{dim/neg}$). In diesem Fall ist die Negativkontrolle zum Setzen des Gates nicht sinnvoll. Da sich die Population der stark positiven Zellen meist deutlich von den schwächer positiven abgrenzt, wurde dieses polygonale Gate anhand der zu messenden Probe gesetzt (vgl. Abb. 3.9).

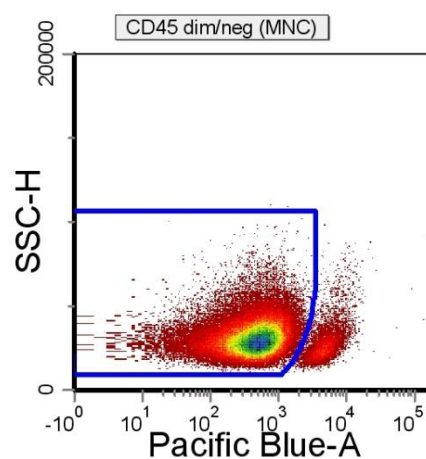


Abb. 3.9: Setzen der Gates bei Pacific Blue: Deutliche Trennung der $CD45^+$ Zellen von den $CD45^{dim/neg}$ Zellen.

3.10 Statistik

3.10.1 T-Test

Der T-Test eignet sich besonders, um Mittelwerte kleiner Stichproben zu untersuchen. Mit diesem Test werden unabhängige Stichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten verglichen. Er sagt aus, ob die Differenz der Mittelwerte zweier Stichproben zufällig entstanden ist oder ob eine Signifikanz im statistischen Sinne besteht.

Die statistische Signifikanz richtet sich nach dem sogenannten p-Wert und wird in zwei Niveaus unterteilt. Ein p-Wert $< 0,05$ gilt als „signifikant“ und beschreibt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Als „hochsignifikant“ wird ein p-Wert $< 0,01$ bezeichnet, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % entspricht.

3.10.2 Pearson-Korrelation

Ein Maß für die Stärke und Richtung des Zusammenhangs zweier metrischer Merkmale ist der Korrelationskoeffizient „r“. „r“ wird mit Hilfe der Pearson-Korrelation berechnet und befindet sich definitionsgemäß zwischen -1 und +1. Positive Werte sprechen für einen gleichgerichteten Zusammenhang zweier Wertegruppen x und y: je größer x desto größer y. „r“ = 0 beschreibt, dass es keinen Zusammenhang gibt, negative Werte sprechen für eine gegensinnige Beziehung: je größer x desto kleiner y. Voraussetzung für das Verwenden der Pearson-Korrelation ist die Existenz von Wertepaaren, die miteinander verglichen werden. Diese müssen sich in einer Intervall- oder höherwertiger Skala befinden (Mährlein 2004).

3.11 Korrelation mit klinischem Verlauf

Gemäß der Fragestellung wurden die Messergebnisse mit dem klinischen Verlauf korreliert. Als klinische Parameter sollten hierbei Ereignisse im Zusammenhang mit

der Leukämie-Erkrankung dienen. Hierzu zählen sowohl ein Rezidiv der Krankheit als auch der Tod des Patienten.

Bei den Patienten mit ALL war absehbar, dass – erfreulicherweise – zu wenige Ereignisse auftraten, um bei der eingesetzten Probenzahl eine signifikante Korrelation erreichen zu können. Dies lag zum einen daran, dass einige der Erstdiagnosen weniger als 5 Jahre zurück liegen. Ein weiterer Grund sind die guten Heilungsaussichten der Erkrankung. Daher wählten wir für diese Patienten einen Surrogatmarker. Zur Risikoeinteilung und Festlegung des Behandlungsprotokolls werden Knochenmarkproben bei Diagnosestellung und im Verlauf der Therapie auf klonspezifische B- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements mittels klonspezifischer DNA-Sonden untersucht. Dies geschieht im Rahmen der ALL-BFM 2000-Studie, in die nahezu alle Patienten mit ALL im Kindesalter der Tübinger Klinik eingeschlossen sind.

Die Untersuchung im Rahmen der Studie geschieht mittels PCR-Technik und dient dem Nachweis bzw. der Einteilung einer MRD (minimal residual disease, minimale Resterkrankung). Sind die Blasten der jeweiligen Leukämie positiv für einen oder mehrere der 5 verwendeten Marker, kann der MRD-Level semiquantitativ bestimmt werden. Die Angabe erfolgt als Anzahl der gesunden Zellen (in 10er Potenzen), unter denen sich genau eine leukämische Zelle befindet. Ein Wert von 10^{-4} bedeutet demnach, dass unter 10^4 Zellen eine leukämische Zelle nachgewiesen werden kann (Elbers 2007). Die zuverlässigsten Aussagen über das spezifische Rezidiv-Risiko des Patienten lassen sich anhand der MRD an Tag 33 des Behandlungsprotokolls machen.

Daher wählten wir die Risikoeinschätzung der MRD-Diagnostik von Tag 33, um sie mit den Messergebnissen zu korrelieren. Die semiquantitative Analyse ergibt hierzu 6 Gruppen gemäß der Nachweisgrenzen in Zehnerpotenzen von 10^{-1} bis 10^{-5} sowie weniger als 10^{-5} (Schrapppe 2007). Je geringer der MRD-Level ist, d.h. je weniger Zellen mit Leukämie-spezifischen Markern gefunden werden, desto besser ist die Prognose (Steenbergen 1995, van Dongen 1998) – und folglich ist eine weniger aggressive Therapie ausreichend.

4. Ergebnisse

4.1 Einzelfärbungen

4.1.1 Hoechst

Die Zellen der Sidepopulation liegen bei Anregung mit violetterm Laser ungefähr entlang der Winkelhalbierenden zwischen Ursprung und der Hauptpopulation (siehe Abb. 4.1). Bei gesundem Knochenmark beträgt die durchschnittliche Frequenz von Sidepopulation-Zellen um 0,05 % (0,03 % – 0,09 %, vgl. Goodell 1997).

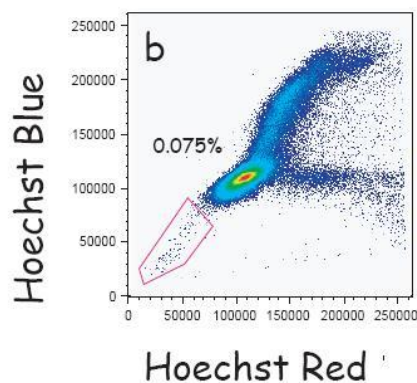


Abb. 4.1: Hoechst-Sidepopulation bei UV- Laser (Quelle: Simpson 2006)

Bei unseren Versuchen konnten wir die Sidepopulation nicht eindeutig nachweisen. Zum Einen lag die Anzahl der Zellen in dem Bereich, in dem die Sidepopulation zu erwarten ist, im Vergleich zu publizierten Daten deutlich höher (vgl. Abb. 4.2). Zum anderen reduzierte sich die Menge dieser Zellen auch nicht signifikant bei Zugabe des spezifischen Inhibitors Verapamil. Somit erhielten wir zu viele falsch positive Zellen. Auch die Änderungen am Färbungsprotokoll (vgl. 3.2.2) führten zu keiner entscheidenden Verbesserung.

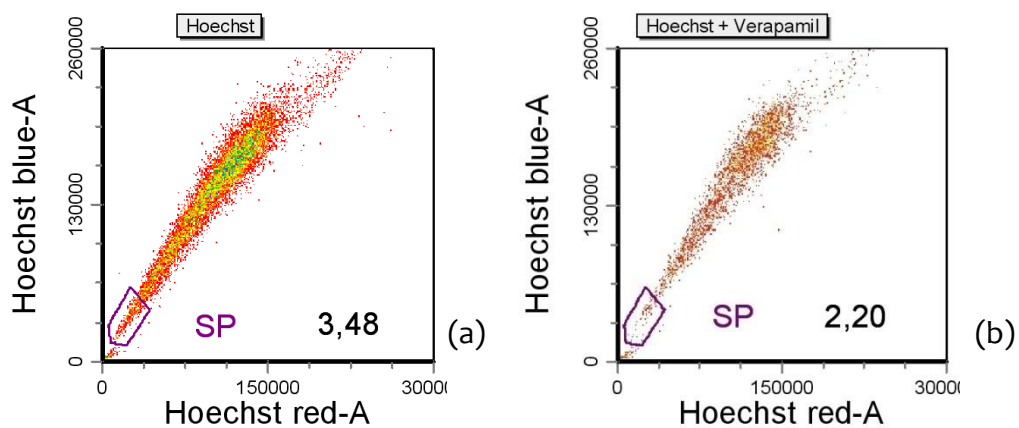


Abb. 4.2: Hoechst 33342 bei violetterm Laser, 620 nm LP-Filter: Keine Sidepopulation abgrenzbar, deutlich zu viele Zellen in dem Bereich, in dem die Sidepopulation zu erwarten wäre (a). Keine signifikante Reduktion der Zellen bei Kontroll-Färbung mit Inhibitor Verapamil (b).

Eine deutlichere Darstellung konnte durch Verwenden einer geeigneteren Filterkombination (620 nm Longpass statt 655 nm Longpass für Hoechst-Blue) erzielt werden. Hierdurch wurde zwar die Zellzahl im Bereich der Sidepopulation deutlich geringer und diese Zellen waren nun besser von der Hauptpopulation abgrenzbar, jedoch konnte im Vergleich zur Verapamil-Kontrolle wiederum kein zuverlässiger Unterschied festgestellt werden (vgl. Abb. 4.3).

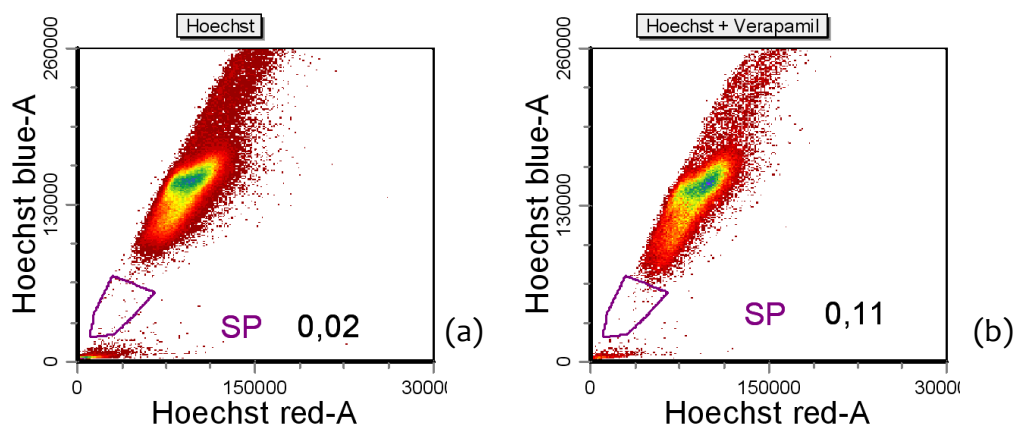


Abb. 4.3: Hoechst 33342 bei violetterm Laser, 655nm LP-Filter: Verbesserung der Darstellung durch Filterkombination (a). Jedoch keine Sidepopulation detektierbar, die sich durch Verapamil inhibieren lässt (b).

Ähnlich verhielt es sich mit dem vergleichbaren Farbstoff DyeCycle™ Violet reagent

(DCV). Auch hier konnten wir annäherungsweise eine Darstellung der Sidepopulation erreichen, jedoch ohne zuverlässige Bestätigung der Ergebnisse durch Inhibition mit Verapamil. Somit konnte die Sidepopulation nicht reproduzierbar dargestellt werden (vgl. Abb. 4.4).

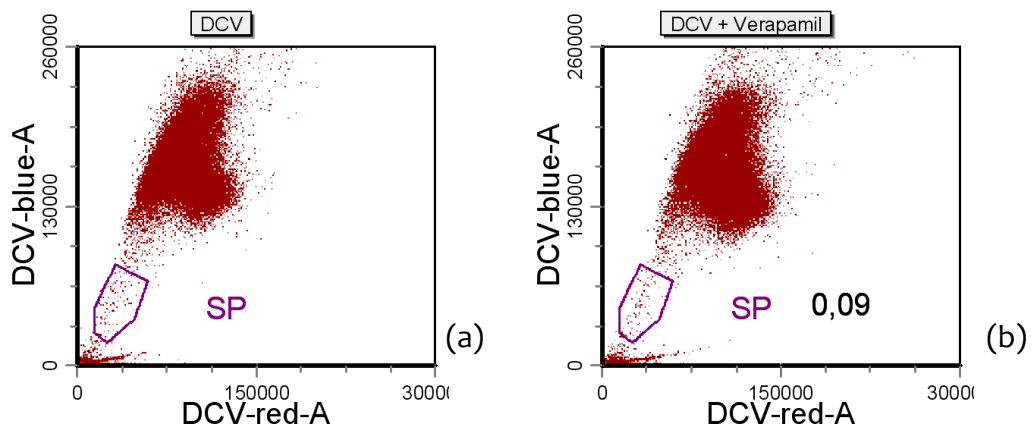


Abb. 4.4: DCV bei violetterm Laser: ähnliche undeutliche Ergebnisse wie Hoechst 33342

4.1.2 Aldefluor®

Sowohl der Hoechst 33342 Sidepopulation-Phänotyp, der auf der Aktivität von p-Glykoprotein beruht, als auch die ALDH-Aktivität sind typische Eigenschaften von Stammzellen. Aufgrund der unzureichenden Darstellung der Sidepopulation sollten die Patientenproben mit Aldefluor® gemessen werden, um die eventuellen Vorteile eines enzymatischen Stammzell-Nachweises im Gegensatz zu Oberflächenmarkern zu ermitteln. Hierzu wurde eine Optimierung der Analyse mit Aldefluor® durchgeführt.

Die Ergebnisse der Aldefluor®-Färbung waren bei Durchführung gemäß den Herstellerangaben von Anfang an deutlich. Es konnte klar eine ALDH-positive Subpopulation abgegrenzt werden, die mit dem Inhibitor DEAB nicht zur Darstellung kam. Es zeigte sich, dass eine Inkubationszeit von 40 Minuten die besten Resultate lieferte. Des Weiteren erwies sich die Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Aldefluor®-Puffers als notwendig, da hierbei die Aldefluor®-positiven

Zellen (ALDH^{br}) deutlicher abzugrenzen waren als bei Verwendung anderer Puffer.

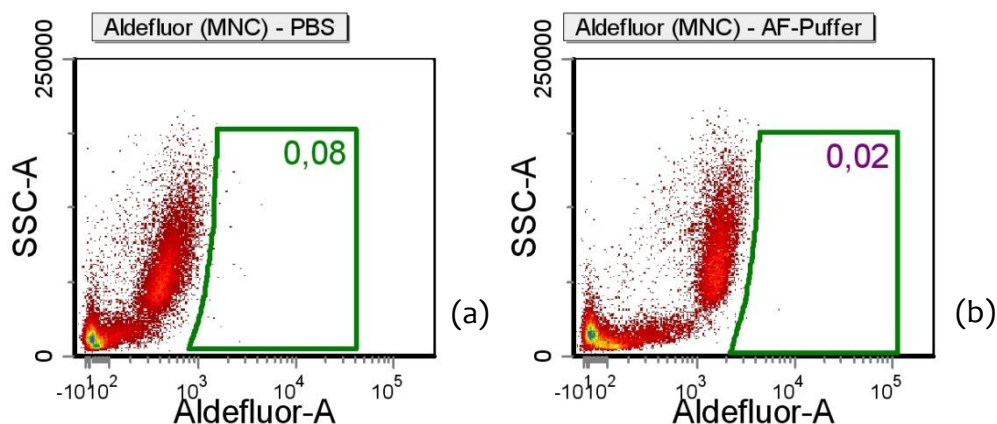


Abb. 4.5: Aldefluor®-Puffer vs. PBS: Bei Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers (a) stellen sich die Populationen deutlicher dar als etwa bei PBS (b), besonders bei der Kontrolle mit DEAB.

4.1.3 Antikörper

Um mit dem FACSaria mehrere Parameter gleichzeitig zu messen, ist eine optimale Nutzung der Wellenlängenbereiche und Filterkombinationen nötig (vgl. 3.7.1). Es wurden verschiedene an Antikörper konjugierte Fluorochrome getestet, um eine möglichst geringe Interferenz der Fluorochrome bzw. Detektoren zu erreichen und so die erforderliche Kompensation möglichst zu reduzieren.

4.1.3.1 Vergleich von selbstkonjugierten mit kommerziell erhältlichen Antikörpern

Die nach 3.4.3 konjugierten Antikörper wurden nach der Aufreinigung gegen kommerzielle AK mit anderen Fluorochromen getestet. Hierzu wurden jeweils Knochenmark-Zellen mit den zu vergleichenden AK einzeln gefärbt und zudem eine Doppelfärbung durchgeführt. Für letztere wurden Zellen mit beiden Antikörpern, die gegen das gleiche Epitop gerichtet sind, simultan inkubiert. Hierfür wurden die AK zuvor gemischt, dann gemeinsam zu den Zellen zugegeben.

Es zeigte sich, dass die Ergebnisse annähernd vergleichbar waren. Mit dem selbst

konjugierten CD34-A405 erzielten wir bei Probeversuchen ähnliche Prozentwerte an positiven Zellen (6,29 %) wie mit CD34-FITC (4,96 %). Die Doppelfärbung mit beiden Antikörpern gleichzeitig lies allerdings erkennen, dass die positiven Zellen nur zu ca. 56 % übereinstimmen. Konzentrationsreihen ergaben, dass je höher die zugegebene Menge an CD34-Aldefluor®405 war, desto mehr FITC⁺ Zellen auch positiv für A405 waren. Gleichzeitig waren aber auch prozentual weniger A405⁺ Zellen FITC⁺ (vgl. Abb. 4.6). Da während der Vorversuche die Antikörper fertig konjugiert im Handel erhältlich waren, wurde die Optimierung an dieser Stelle abgebrochen und die kommerziell produzierten Antikörper verwendet.

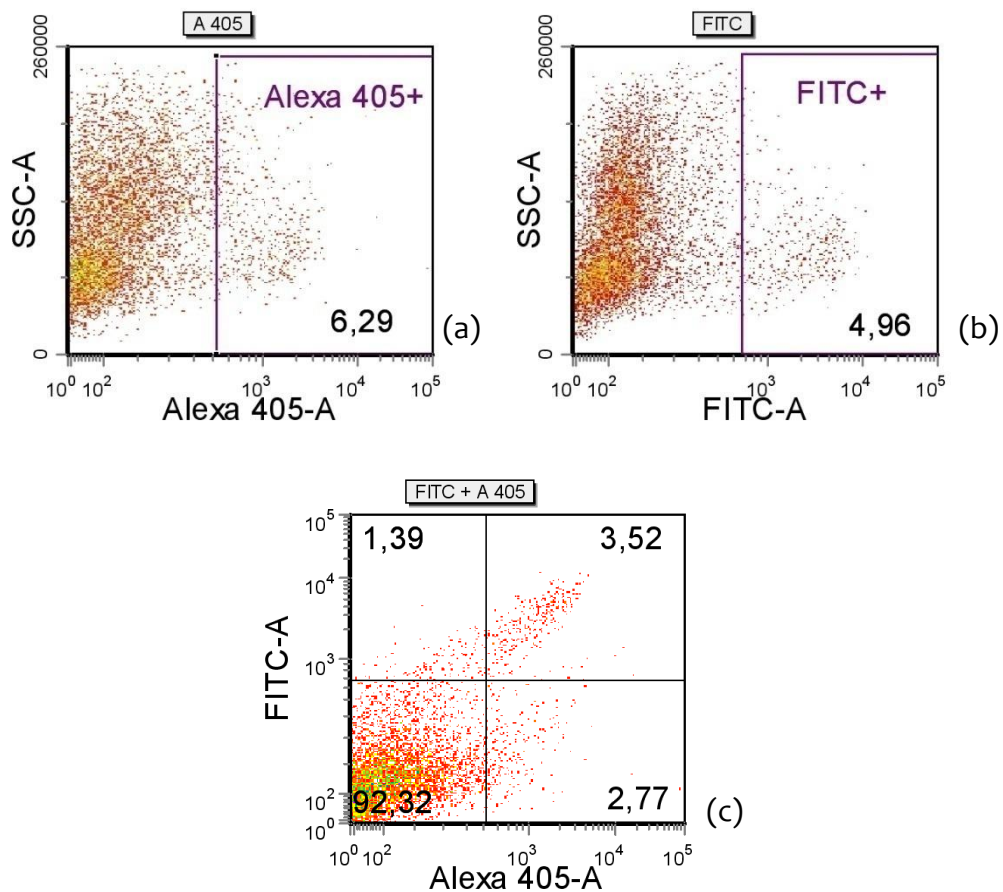


Abb. 4.6: Vergleich von selbst- mit kommerziell konjugierten Antikörpern: Tests von selbst (a) mit kommerziell (b) konjugierten Antikörpern brachten vergleichbare Ergebnisse. Bei der Doppelfärbung zeigt sich allerdings, dass im Verhältnis zu den doppelt gefärbten Zellen(3,52 %) eine Vielzahl (1,39 bzw. 2,77 %) mit nur einem Antikörper markiert ist (c).

4.1.3.2 Vergleich verschiedener Fluorochrome

Die getesteten Tandem-Konjugaten (vgl. 2.5.2) stellten im Vergleich zu den direkten Fluorochromen keine Verbesserung dar. Die Separation der positiven Zellen war etwa bei PE wesentlich günstiger als bei PE-Konjugaten (vgl. Abb. 4.7). Gleiches gilt für Konjugat-Farbstoffe anderer Wellenlängenbereiche.

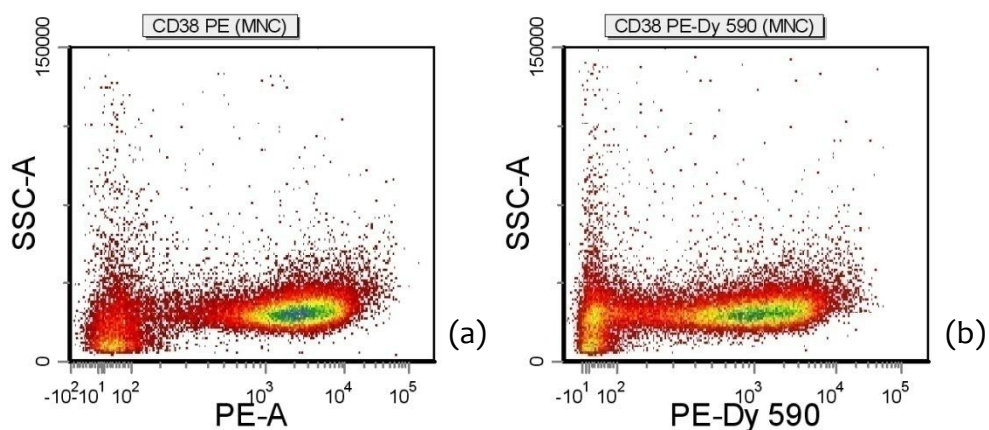


Abb. 4.7: Vergleich von PE und PE-Dy 590: Die positiven Zellen sind bei Färbung mit PE wesentlich deutlicher von der negativen Population getrennt als bei dem Konjugat PE-Dy 590.

Aufgrund dieser Ergebnisse konzentrierten sich die weiteren Versuche auf folgende Fluorochrome:

Im violetten Bereich testeten wir Pacific Blue und Pacific Orange. Hierbei zeigte sich, dass bei den mit Pacific Blue gefärbten Zellen die positive Population deutlicher von den negativen Zellen zu differenzieren war (siehe Abb. 4.8). Deswegen wurde für CD45 Pacific Blue gewählt.

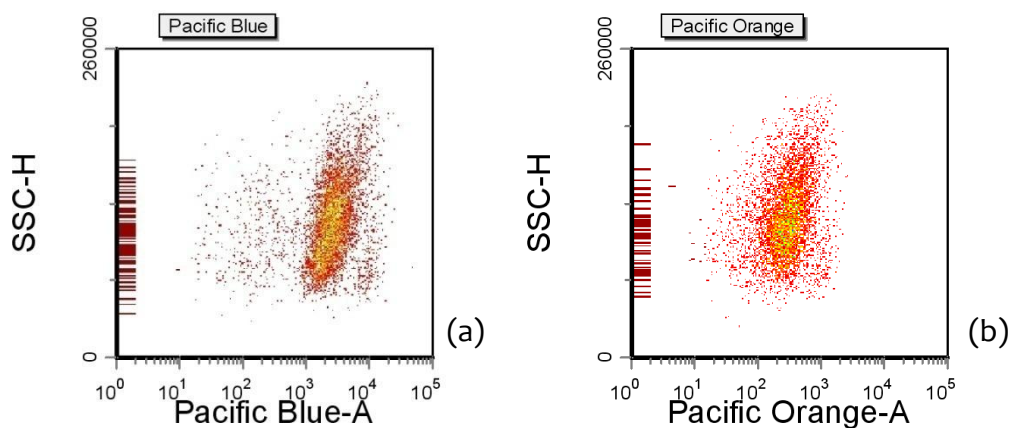
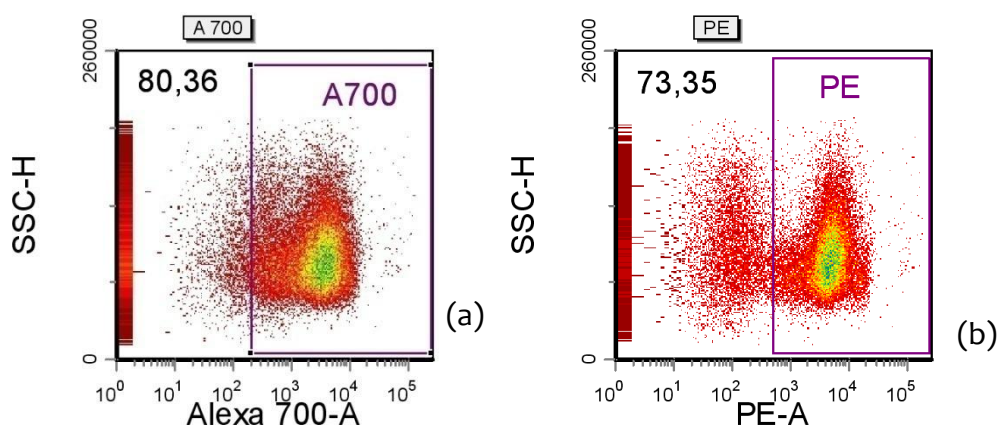


Abb. 4.8: Vergleich Pacific Blue mit Pacific Orange: Deutlich bessere Separation der CD45⁺ Zellen bei Pacific Blue sind als bei Pacific Orange.

APC lieferte konstant gute Ergebnisse und wurde als zuverlässigstes Fluorchrom in Kombination mit dem wichtigsten Antikörper CD34 verwendet.

Für CD38 war ursprünglich PE vorgesehen. Allerdings ist der Messkanal für PE sehr anfällig für Streustrahlung bei gleichzeitiger Verwendung von Aldefluor® und PI. Aus diesem Grund wurde alternativ CD38-A700 getestet. Mehrere Versuche zeigten jedoch, dass sich dabei die positive Population entscheidend schlechter von der negativen auftrennen als dies bei PE der Fall war. Selbst bei gleichzeitiger Färbung mit Aldefluor® und PI ergaben sich bei suffizienter Kompensation zuverlässigere Ergebnisse für PE (vgl. Abb. 4.9).



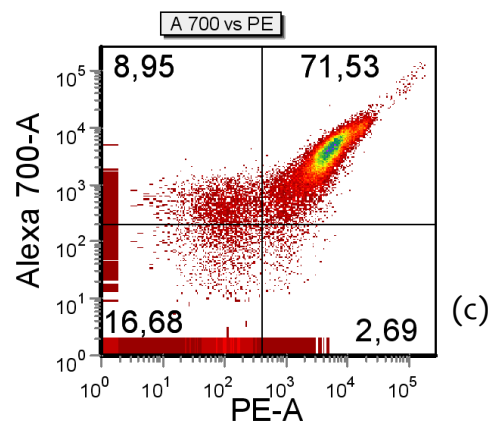


Abb. 4.9: Vergleich von Alexa Fluor 700 und PE: Bessere Trennung von positiven und negativen Zellen bei PE (b) als bei Alexa Fluor 700 (a), auch bei Doppelfärbung deutlich erkennbar (c).

4.1.4 Lebend/Tot-Marker

Da PI durch sein breites Emissionsspektrum auch an den Detektoren anderer Fluorochrome ein deutliches Signal hervorruft, testeten wir, ob es sich durch andere Lebend/Tot-Marker ersetzen lies.

Im Vergleich zu PI war die Abgrenzung der toten Zellen bei Verwendung von LIVE/DEAD® undeutlicher und der Anteil toter Zellen inkonstant. Es zeigte sich kein weiterführender Unterschied bei den verschiedenen Inkubationstemperaturen (auf Eis vs. Raumtemperatur, vgl. 3.6.2). Da die Färbung mit LIVE/DEAD® zusätzlich im Vergleich zu PI wesentlich aufwendiger und kostenintensiver ist, entschieden wir uns nach obigen Ergebnissen, die Versuche mit PI fortzusetzen.

4.2 Kontrollmessungen an nicht an Leukämie erkrankten

Kindern

Zur internen Kontrolle der Methode wurde zusätzlich Knochenmark von 5 Patienten untersucht, die nicht an einer Leukämie erkrankt waren (vgl. 3.8). Auf diese Weise sollte gesichert werden, dass die Ergebnisse untereinander vergleichbar sind. Die

Auswertung erfolgte nach der gleichen Methode wie bei den Leukämieproben (vgl. 3.9). Hierbei fanden sich konstante Werte für ALDH-Aktivität mit einem Durchschnitt von 6,93 % ($\pm 1,92$) ALDH^{br}-Zellen, sowie für CD34⁺ (7,99 % $\pm 4,68$) und CD34⁺/CD38⁻ (0,09 % $\pm 0,7$). Die zusätzliche Selektion der CD34⁺/CD38⁻ Zellen nach CD45^{dim/neg} ergab nur eine geringfügig genauere Charakterisierung dieser Population (CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg}: 0,08 % $\pm 0,7$).

4.3 ALL-Proben

In dem Zeitraum von 1999 bis 2007 erfüllten 54 Patienten die Kriterien (vgl. 2.1), um in die Studie aufgenommen zu werden. Ältere Proben wiesen aufgrund einer Serumumlagerung eine zu schlechte Vitalität auf, und auch die Dokumentation sowie das Follow-up der Patienten waren vor dieser Zeit nicht lückenlos.

Die Proben wurden gemäß 3.1.2 aufgetaut und im Anschluss unmittelbar mit Aldefluor® gefärbt. Ohne Zwischenschritt folgte die Inkubation mit Antikörpern, danach direkt die Messung am FACSaria. Dabei erfolgte kurz zuvor die Zugabe von PI (vgl. 3.8.2). Da nicht zu allen Patienten die für die klinische Korrelation erforderlichen MRD-Daten zur Verfügung standen, konnten insgesamt 42 Patienten für die Studie ausgewertet werden.

4.3.1 Messergebnisse

Die Auswertung wurde nach Abschluss aller Messungen mit dem Programm FCSExpress durchgeführt, entsprechend der in 3.9 beschriebenen Gating-Strategie. Die folgenden Prozentwerte beziehen sich jeweils auf MNC, wenn nicht anders erwähnt.

Nach Auswertung aller 42 ALL-Proben ergab sich ein durchschnittlicher Wert für den Anteil ALDH^{br}-Zellen an den MNC von 13,37 %. Die Menge der ALDH^{br}-Zellen variierte dabei stark von 0,05 bis 82,61 %, wobei die einzelnen Werte keine deutliche

Abstufung von schwach zu stark Aldefluor®-positiven Leukämien erkennen ließen (vgl. Abb. 4.10).

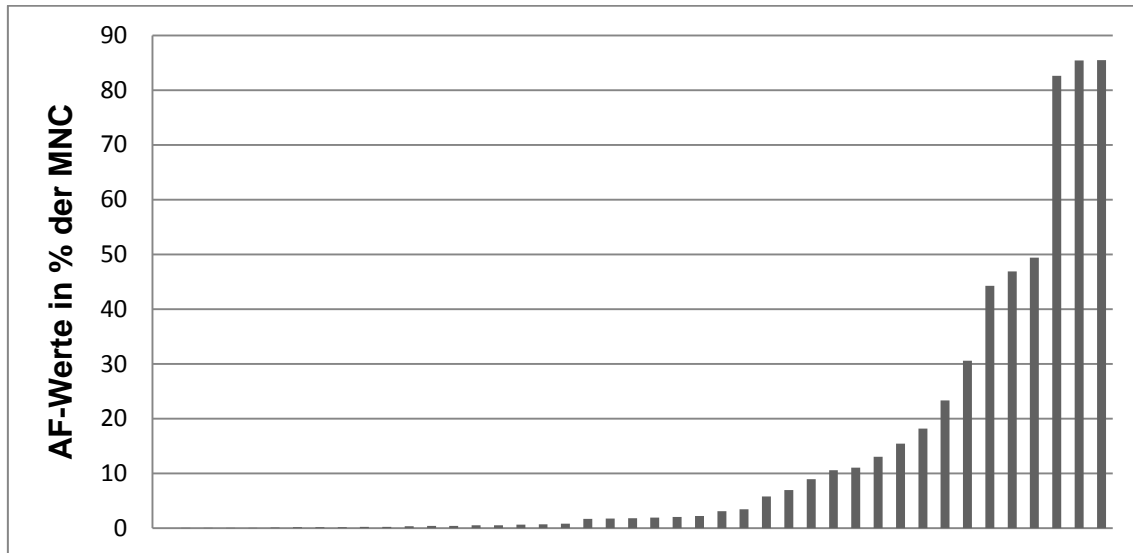


Abb. 4.10: ALL-Proben: Darstellung der Aldefluor®-Werte bezogen auf MNC, aufsteigend sortiert

Von den ALDH^{br}-Zellen waren im Mittel 42,33 % ebenfalls positiv für CD34, jedoch differierten die Werte stark (Range: 0,08 bis 99,28 %). Es war keine Korrelation erkennbar, so dass es sich bei den C34-positiven und Aldefluor®-positiven Zellen um unterschiedliche Populationen handelt (vgl. Abb. 4.11).

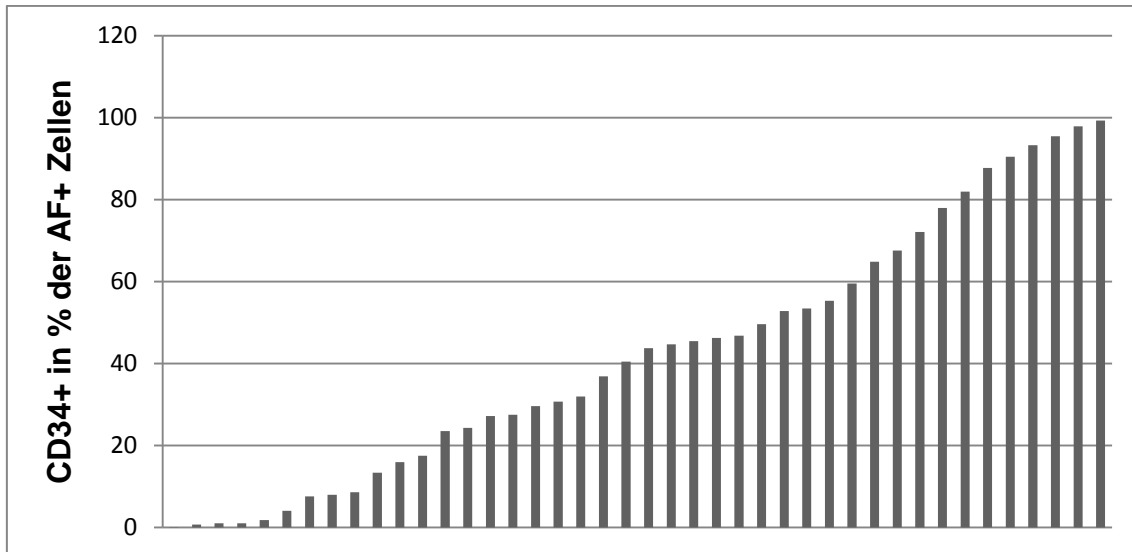


Abb. 4.11: ALL-Proben: Darstellung des Anteils der CD34⁺ Zellen an den ALDH^{br}-Zellen, aufsteigend sortiert

Auch bei den Oberflächenantikörpern zeigte sich ein deutlicher Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe. Der mittlere Wert für CD34⁺ Zellen lag für die ALL-Proben bei 45,91 % (Range 0,13 % - 82,61 %, Kontrolle: 7,99 %) (vgl. Abb. 4.12).

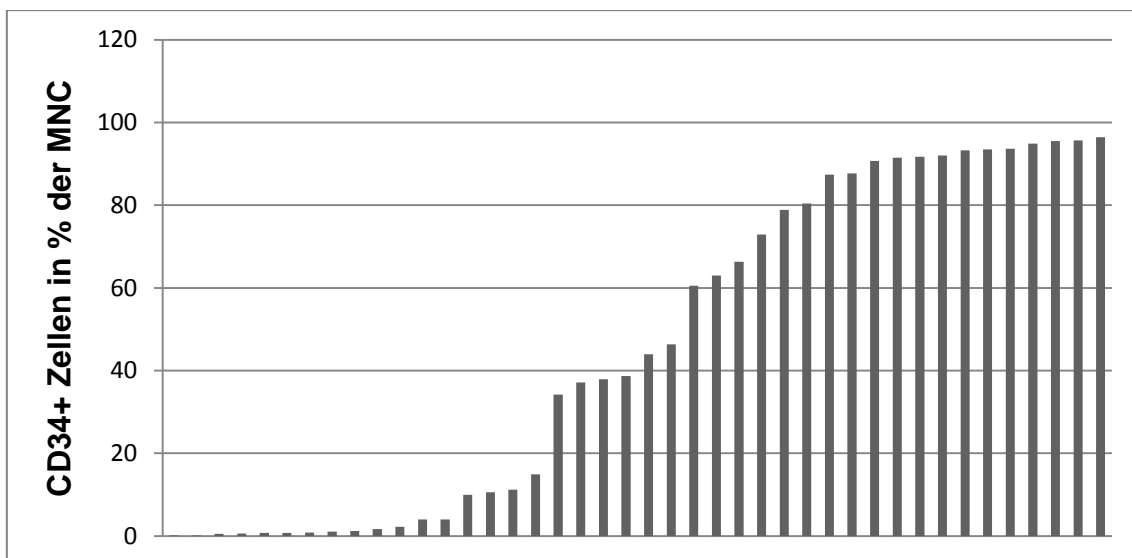


Abb. 4.12: ALL-Proben: Darstellung der CD34-Werte bezogen auf MNC, aufsteigend sortiert

Die Menge der CD34⁺/CD38⁻ Zellen lag bei durchschnittlich 3,61 % (Range: 0,0 % - 81,94 %). Es zeigte sich, dass diese Zellen CD45 fast ausschließlich schwach oder gar

nicht exprimieren, so dass die Werte in Kombination mit $CD45^{dim/neg}$ ($CD34^+/CD38^-/CD45^{dim/neg}$) jeweils nur wenig darunter lagen (3,59 %, Range 0,0 bis 81,94 %).

Deutlichere Unterschiede ergaben sich bei der Kombination von $CD34^+/CD38^-$ und Aldefluor®. Beide Populationen wiesen eine sehr geringe Überlappung auf – nur durchschnittlich 0,78 % der Zellen befanden sich innerhalb des kombinierten Gates $CD34^+/CD38^-/ALDH^{br}$ (Range: 0,0 bis 22,96 %). Bei dem durchschnittlichen Wert von 13,37 % $ALDH^{br}$ -Zellen bedeutet dies, dass nur 5,85 % dieser Zellen auch $CD34^+/CD38^-$ sind. Umgekehrt weisen durchschnittlich 21,61 % der $CD34^+/CD38^-$ Zellen zugleich eine hohe $ALDH$ -Aktivität auf.

Zusätzlich wurden die Proben nach $ALDH$ -Aktivität sortiert ausgewertet. Hierbei zeigte sich für Proben mit geringen $ALDH^{br}$ -Populationen (<1 %, $n = 18$) eine hoch signifikante Korrelation der $ALDH$ -Aktivität mit der Population $CD34^+/CD38^-$ (Pearsonkoeffizient $r = 0,750$, $p < 0,001$) (vgl. Abb. 4.13). Eine zusätzliche Berücksichtigung von $CD45$ hatte keinen Einfluss auf die Korrelation.

Für Proben mit hohen $ALDH^{br}$ -Werten (>1 %, $n = 24$) dagegen konnte keine Korrelation nachgewiesen werden.

Bei den Proben mit geringer $ALDH$ -Aktivität lag zudem der durchschnittliche Anteil der $CD34^+$ -Zellen an den $ALDH^{br}$ -Population mit 52,97 % ($\pm 18,62$ %) über dem Gesamtdurchschnitt (42,33 %, s.o.). Bei den Leukämien mit hoher $ALDH$ -Aktivität lag dieser Anteil mit 34,34 % unter dem Gesamtdurchschnitt und war wesentlich inkonstanter (Standartabweichung $\pm 34,91$ %).

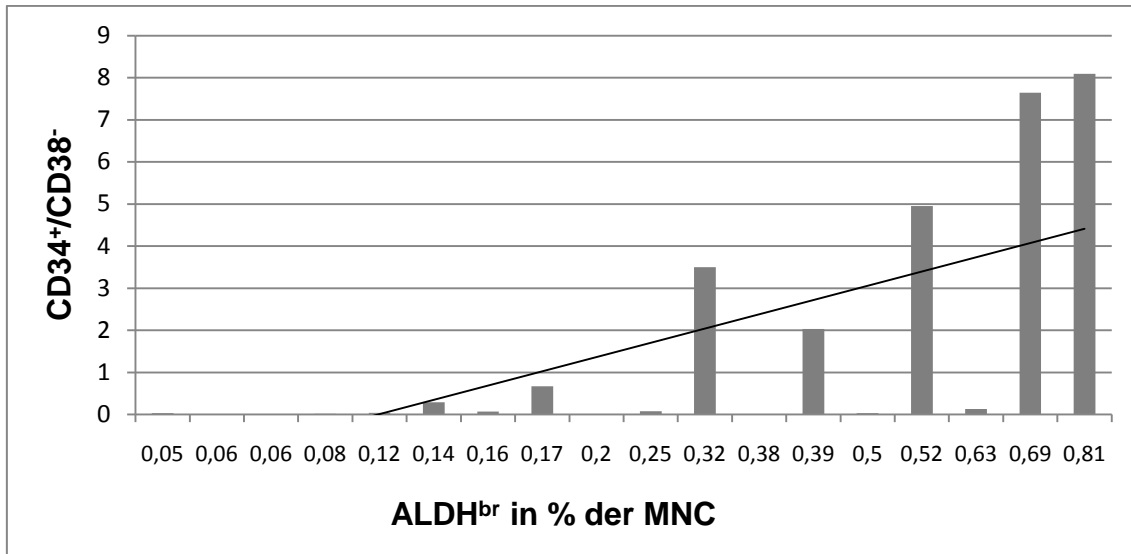


Abb. 4.13: ALL-Proben: Korrelation zwischen ALDH^{br}-Aktivität und CD34⁺/CD38⁻ (ALDH^{br}-Werte <1%), Trendlinie

4.3.2 Korrelation mit klinischem Verlauf

Wie in 3.11 beschrieben erfolgte die Korrelation bei den ALL-Proben nicht direkt mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung, da aufgrund der glücklicherweise seltenen Ereignisse wie z.B. Rezidiv eine statistische Auswertung diesbezüglich noch höhere Fallzahlen erfordern würde. Stattdessen diente die MRD-Messung von Tag 33 als Surrogatmarker, da dieser Wert eng mit der Prognose korreliert (van Dongen 1998, Steenbergen 1995). Die MRD-Werte von 10^{-1} bis 10^{-5} bzw. $<10^{-5}$ wurden zur einfacheren Auswertung in eine lineare Skala von 0 bis 5 übertragen (siehe Tab. 4.1)

Tab. 4.1: MRD-Level bei ALL – Übertragung in lineare Skala

Lineare Skala	MRD-Level	Prognose
0	$<10^{-5}$	besser
1	10^{-5}	<div style="text-align: center;"> ↓ ↑ schlechter </div>
2	10^{-4}	
3	10^{-3}	
4	10^{-2}	
5	10^{-1}	

Zur Bestimmung der Korrelation wurden jeweils der Pearson-Koeffizient und dessen Signifikanz mittels P-Wert berechnet.

Aldefluor®

In erster Linie sollte der Zusammenhang zwischen ALDH^{br}-Zellen und dem klinischen Verlauf untersucht werden. Hierzu wurden die Aldefluor®-Werte der einzelnen Patienten mit der linearen Skala der übertragenen MRD-Level korreliert. Für jeden MRD-Level wurde zunächst der durchschnittliche Aldefluor®-Wert berechnet. Die Korrelation ergab schließlich einen Pearson-Koeffizient von $r = -0,242$. Somit konnte keine positive Korrelation zwischen Aldefluor®-Werten bei Diagnosestellung und MRD-Level festgestellt werden. Auch die negative Korrelation war nicht signifikant (vgl. Tab. 4.2).

Tab. 4.2: ALL-Ergebnisse: Korrelation von Aldefluor® mit MRD

MRD (linear)	Fallzahl	ALDH ^{br} in % der MNC	
0	13	22,98	± 35,39
1	1	30,60	-
2	13	8,95	± 17,59
3	9	52,80	± 15,28
4	3	5,82	± 8,36
5	3	14,12	± 11,81

Zusätzlich erfolgte ebenfalls eine Analyse der Proben bezüglich der MRD-Ergebnisse, bei der zwischen hohen (>1 %) und niedrigen (<1 %) Aldefluor®-Werten unterschieden wurde. Ähnlich zum Vergleich mit der Population CD34⁺/CD38⁻ (vgl. 4.3.1) ergab dies unterschiedliche Ergebnisse. Während die Proben mit ALDH-Aktivität >1 % gegenüber Gesamtmenge keine Verbesserung der Korrelation aufwiesen, zeigte sich für niedrige Aldefluor®-Werte eine deutlich positive Korrelation: Der Pearson-Koeffizient zwischen ALDH-Aktivität und MRD-Level betrug hier $r = 0,61352$ ($p < 0,01$). Somit besteht für Aldefluor®-Werte <1 % ein

signifikanter positiver Zusammenhang mit dem MRD-Level. (vgl. Abb. 4.14)

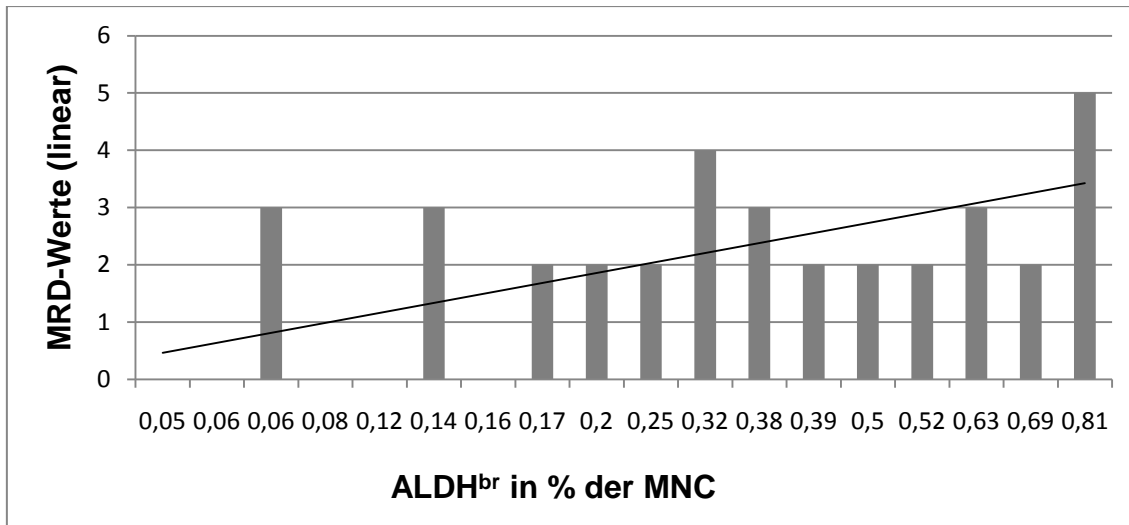


Abb. 4.14: ALL-Proben: Korrelation zwischen ALDH^{br}-Aktivität und MRD-Werten (ALDH^{br}-Werte <1%), Trendlinie

CD34, CD38 und CD45

Auf gleiche Art wurden nun die Oberflächenmarker mit den MRD-Werten verglichen. CD34 alleine wies ebenfalls keine signifikante Korrelation auf.

In Kombination mit CD38 ergab sich jedoch für die Population CD34⁺/CD38⁻ ein Pearson-Koeffizient von $r = 0,317$ mit einem Signifikanz-Level von $p = 0,0207$. Somit konnte hier ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der relativen Höhe der Population von CD34⁺/CD38⁻ und dem MRD-Level von Tag 33 aufgezeigt werden.

Einen nur sehr geringen Unterschied machte die zusätzliche Kombination mit CD45 aus: Die Population CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} korreliert ebenfalls signifikant positiv mit dem MRD-Level (Pearson-Koeffizient = $0,316$, $p = 0,0207$).

CD34⁺/CD38⁻ und Aldefluor®

Da die Population CD34⁺/CD38⁻ bereits eine signifikante Korrelation bot, wurde untersucht, ob sich diese durch den zusätzlichen Marker Aldefluor® verstärken würde. Dies war nicht nachzuweisen, im Gegenteil berechnete sich ein geringerer

Pearson-Koeffizient von $r = 0,269$. Das Signifikanzniveau fiel niedriger aus ($p = 0,0424$).

Auch bei der nach ALDH-Aktivität getrennten Auswertung führte die Kombination von Aldefluor® und Antikörpern nicht zu einer Verbesserung der Korrelation (vgl. Tab. 4.3).

Tab. 4.3: ALL-Ergebnisse: Korrelation verschiedener Populationen mit MRD

MRD (linear)	Fall- zahl	CD34 ⁺		CD34 ⁺ /CD38 ⁻		CD34 ⁺ /CD38 ⁻ / CD45 ^{dim/neg}		CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /ALDH ^{br}	
0	13	35,15	± 43,06	0,07	± 0,13	0,07	± 0,13	0,05	± 0,13
1	1	93,52	-	30,11	-	30,03	-	7,56	-
2	13	38,05	± 36,71	1,29	± 2,36	1,27	± 2,33	0,05	± 0,04
3	9	94,90	± 40,13	0,70	± 0,93	0,68	± 0,92	0,06	± 0,08
4	3	61,00	± 40,05	2,02	± 1,7	1,99	± 1,69	0,08	± 0,12
5	3	74,98	± 15,59	30,48	± 44,87	30,35	± 44,81	7,72	± 13,2

4.4 AML-Proben

Da die Inzidenz von AML im Kindesalter wesentlich geringer ist als die der ALL, war hier auch das Patientenkollektiv kleiner. In dem untersuchten Zeitraum von 1999 bis 2007 fanden sich 17 Patienten, von welchen ausreichend Knochenmarkproben bei Diagnosestellung eingefroren worden waren. Gleich den ALL-Proben wurden die der AML aufgetaut, mit Aldefluor® gefärbt und mit Antikörpern inkubiert. Die Zellen wurden nach Zugabe von PI direkt nach Abschluss der Färbung am FACSAria gemessen (vgl. 3.8.2).

4.4.1 Messergebnisse

Die Auswertung wurde nach Abschluss aller Messungen ebenfalls mit dem

Programm FCSExpress durchgeführt, entsprechend der in 3.9 beschriebenen Gating-Strategie. Wenn nicht anders erwähnt beziehen sich die folgenden Prozentwerte jeweils auf MNC.

Auch bei den AML-Proben differierte die Menge der ALDH^{br}-Zellen stark (vgl. Abb. 4.15). Insgesamt waren durchschnittlich 14,98 % der MNC Aldefluor[®]- positiv (Range: 0,09 % bis 70,19 %).

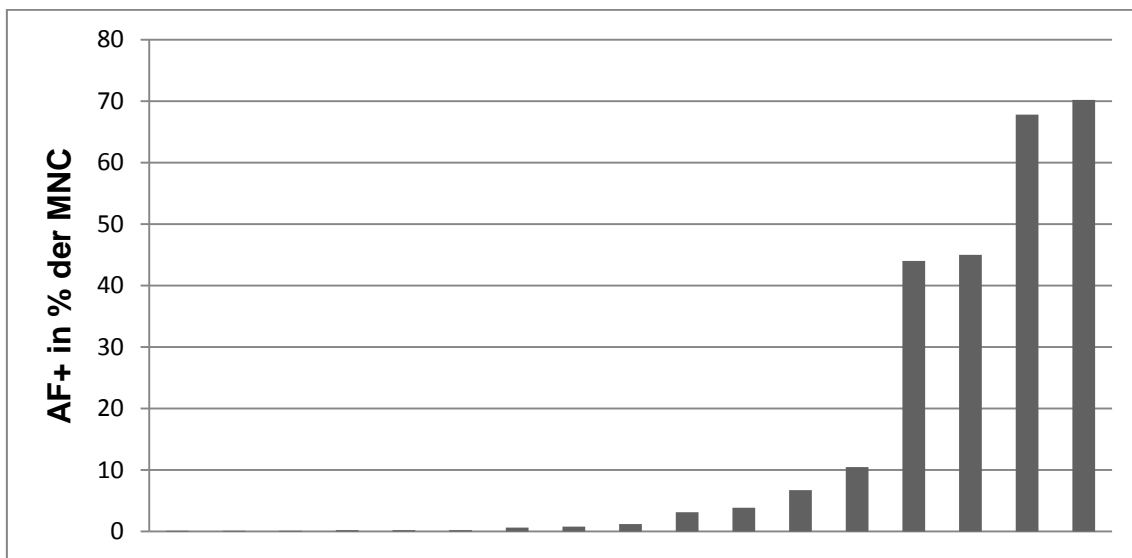


Abb. 4.15: AML-Proben: Darstellung der Aldefluor[®]-Werte bezogen auf MNC, aufsteigend sortiert

Die Zahl der CD34⁺ Zellen unter den ALDH^{br} betrug durchschnittlich 40,56 %, doch auch hier schwankten die Ergebnisse stark (Range: 0,34 bis 99,82 %), so dass ebenfalls keine Korrelation zwischen CD34 und Aldefluor[®] bestand (vgl. Abb. 4.16).

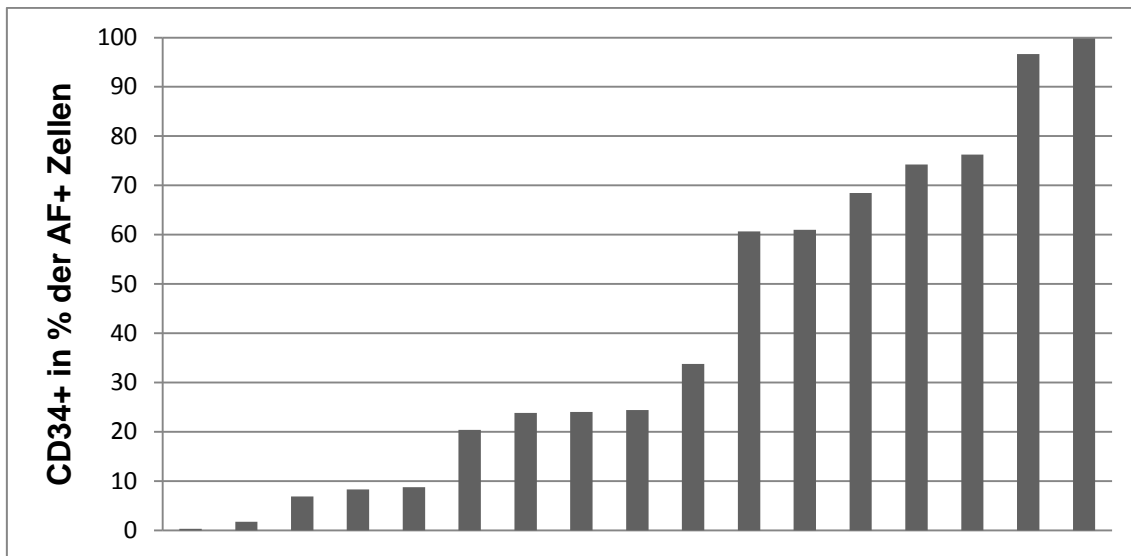


Abb. 4.16: AML-Proben: Darstellung des Anteils der CD34⁺ Zellen an den ALDH^{br}-Zellen, aufsteigend sortiert

Der durchschnittliche Anteil von CD34⁺ Zellen an den MNC war 31,92 % (Range: 1,36 - 93,65 %) (vgl. Abb. 4.17).

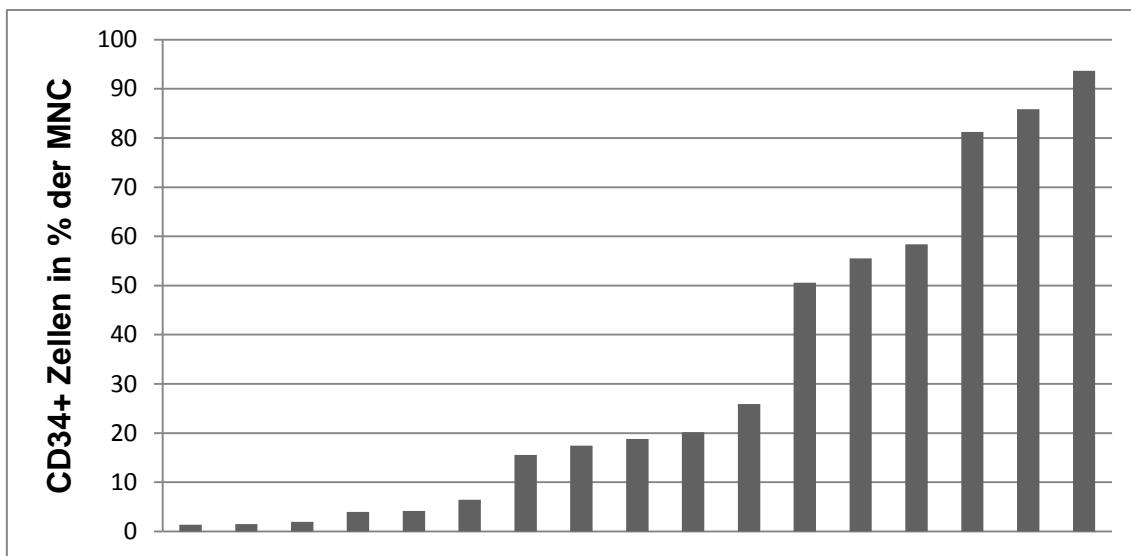


Abb. 4.17: AML-Proben: Darstellung der CD34 Werte bezogen auf MNC, aufsteigend sortiert

In Kombination mit CD38 ergab sich ein Mittelwert für die Population CD34⁺CD38⁻ von 1,21 % (Range: 0,02 % - 4,5 %). Für CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} lag der Mittelwert ähnlich den ALL-Ergebnissen geringfügig niedriger bei 1,02 % (Range: 0,01 % - 4,46 %).

Die Populationen $CD34^+/CD38^-$ und $ALDH^{br}$ korrelierten nur in sehr geringem Maß: Der Mittelwert für $CD34^+/CD38^-/ALDH^+$ lag bei 0,14 % (Range: 0 % - 0,77 %) (vgl. Abb. 4.18).

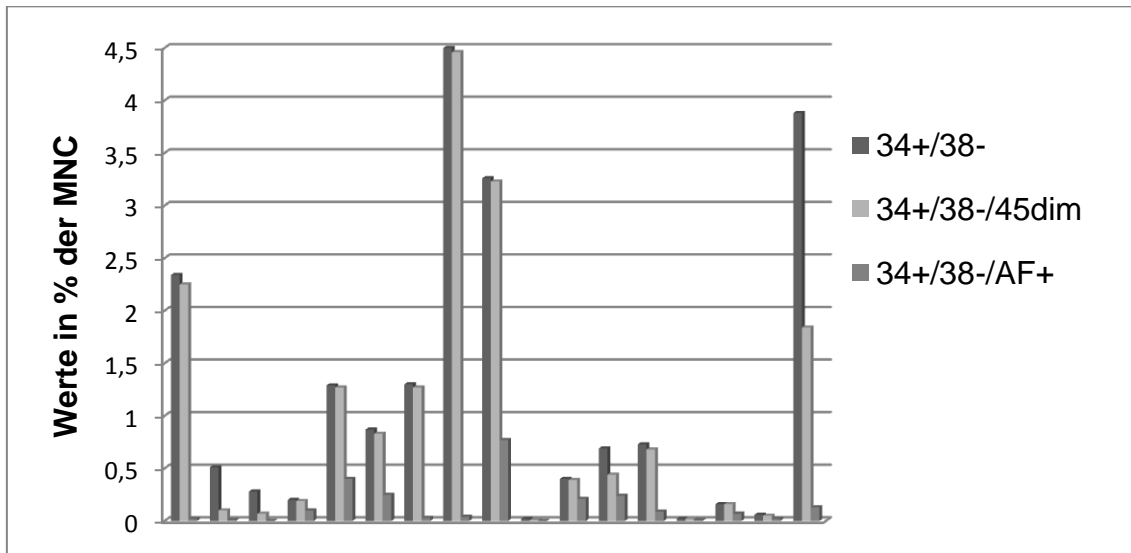


Abb. 4.18: AML-Proben: Darstellung verschiedener Populationen als Anteil der MNC, sortiert nach Nummerierung.

Die zusätzliche Analyse der Proben sortiert nach Aldefluor®-Werten zeigte ähnliche Ergebnisse wie bei den ALL-Proben, wenn auch weniger deutlich: Für Leukämien mit geringer ALDH-Aktivität ($<1\%$, $n = 8$) ergab sich eine signifikant positive Korrelation der Aldefluor®-Werte mit der Population $CD34^+/CD38^-$ (Pearsonkoeffizient $r = 0,628$, $p = 0,048$). Der Anteil $CD34^+$ Zellen an der $ALDH^{br}$ -Population war dabei gegenüber der Grundgesamtheit nicht erhöht (vgl. Abb. 4.19). Eine zusätzliche Berücksichtigung von CD45 wirkte sich negativ auf das Signifikanzniveau aus. Für $ALDH^{br}$ -Werte $>1\%$ ($n = 9$) dagegen konnte keine Korrelation nachgewiesen werden.

Somit lässt sich bei AML zwischen den Populationen $ALDH^{br}$ und $CD34^+/CD38^-$ kein allgemeiner linearer Zusammenhang feststellen, wohl aber für $ALDH^{br}$ -Werte $<1\%$.

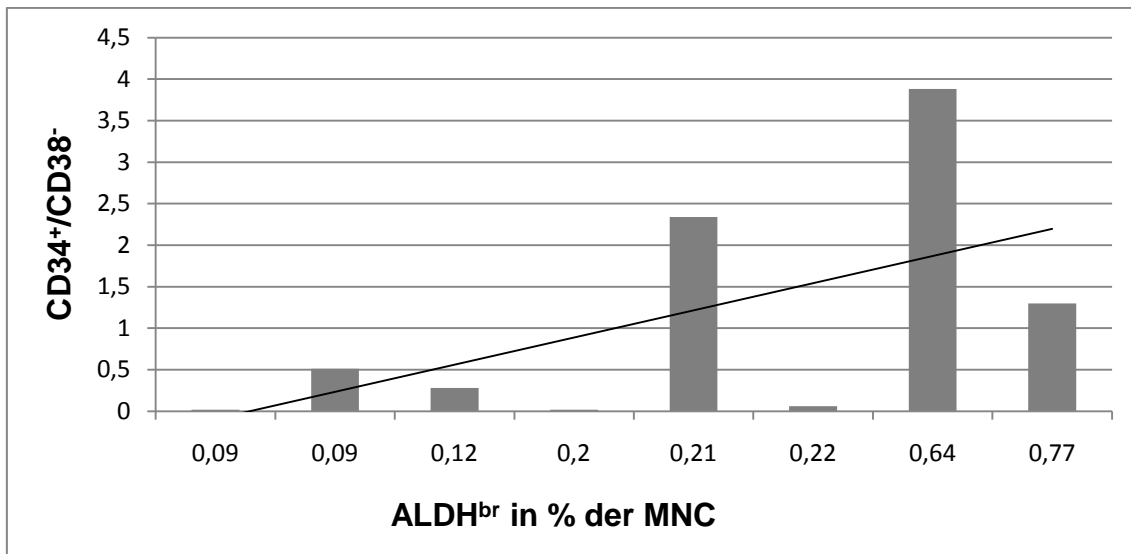


Abb. 4.19: AML-Proben: Korrelation zwischen ALDH^{br}-Aktivität und CD34⁺/CD38⁻ (ALDH^{br}-Werte <1 %), mit Trendlinie

4.4.2 Korrelation mit klinischem Verlauf

Nach Abschluss der Auswertung erfolgte die Korrelation mit dem klinischen Verlauf. Hierzu wurden die Patienten in zwei Gruppen „mit“ bzw. „ohne Ereignis“ geteilt (Gruppe 1 = „ohne“, Gruppe 2 = „mit“). Als Ereignis galt hierbei ein Rezidiv der Leukämie oder das Versterben des Patienten. In Gruppe 1 befanden sich acht Patienten, in Gruppe 2 neun Patienten. Von beiden Gruppen wurde das arithmetische Mittel der einzelnen Parameter oder deren Kombination bestimmt und die Unterschiede mittels T-Test auf Signifikanz untersucht.

Aldefluor®

Bei Mittelwerten für Aldefluor® von 23,04 % in Gruppe 1 und 7,82 % in Gruppe 2 war die Differenz aufgrund großer Streubreite der einzelnen Werte nicht signifikant. Es konnte also kein Hinweis auf einen prognostischen Wert der Aldefluor®-Messung gefunden werden (vgl. Abb. 4.20 sowie Tab. 4.4).

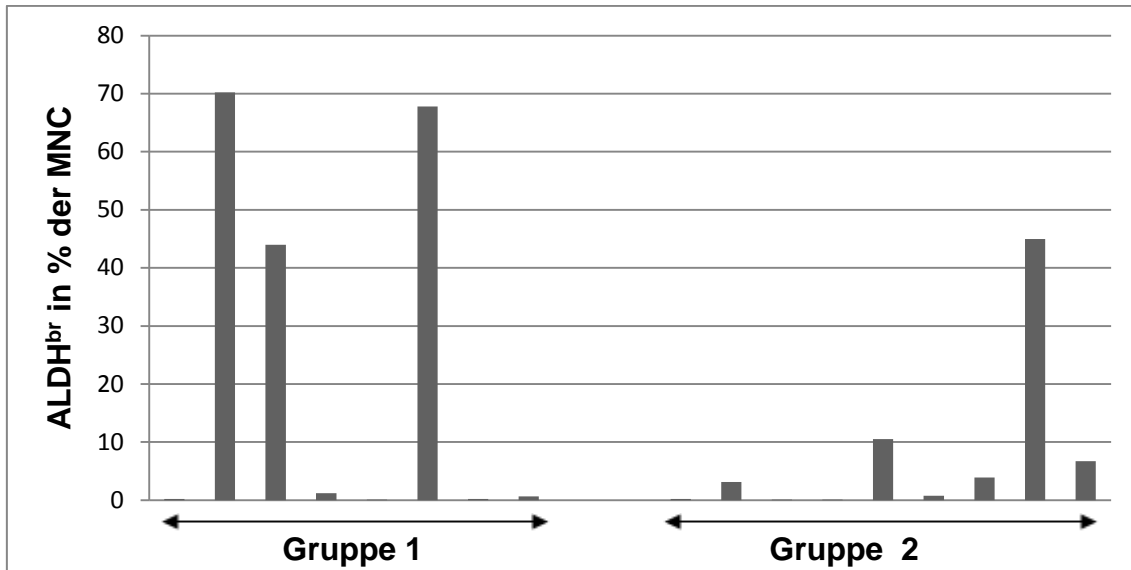


Abb. 4.20: AML-Proben: Darstellung der Aldefluor®-Werte bezogen auf MNC

Tab. 4.4: AML-Ergebnisse: Analyse der klinischen Gruppen bezüglich Aldefluor®

Gruppe	Fallzahl	ALDH ^{br} in % der MNC
1	8	23,04 ± 32,10
2	9	7,82 ± 14,37
t-Test		0,109

Für eine Korrelation der Proben mit ALDH-Aktivität <1 % war die Fallzahl zu gering.

CD34, CD38 und CD45

Auch die Anzahl der CD34⁺ Zellen unterschied sich nicht signifikant in beiden Gruppen. Für die Population CD34⁺/CD38⁻ ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellen (vgl. Abb. 4.21 sowie Tab 4.5).

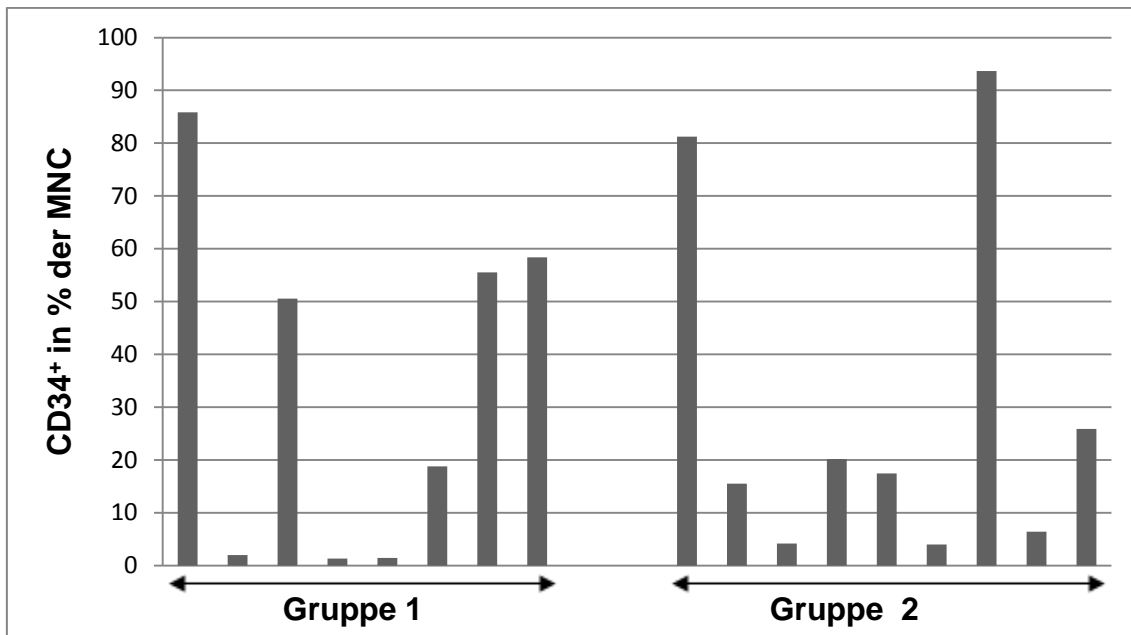


Abb. 4.21: AML- Proben: Darstellung der CD34-Werte bezogen auf MNC

Im Gegensatz dazu führte der zusätzliche Marker CD45 zu einem signifikanten Unterschied der beiden Gruppen. In Gruppe 1 fanden sich im Mittel 0,45 % Zellen der Population $CD34^+/CD38^-/CD45^{dim/neg}$ gegenüber 1,52 % in Gruppe 2. Bei einem P-Wert von 0,042 erreicht dies statistische Signifikanz(vgl. Abb. 4.22, 4.23 sowie Tab 4.5).

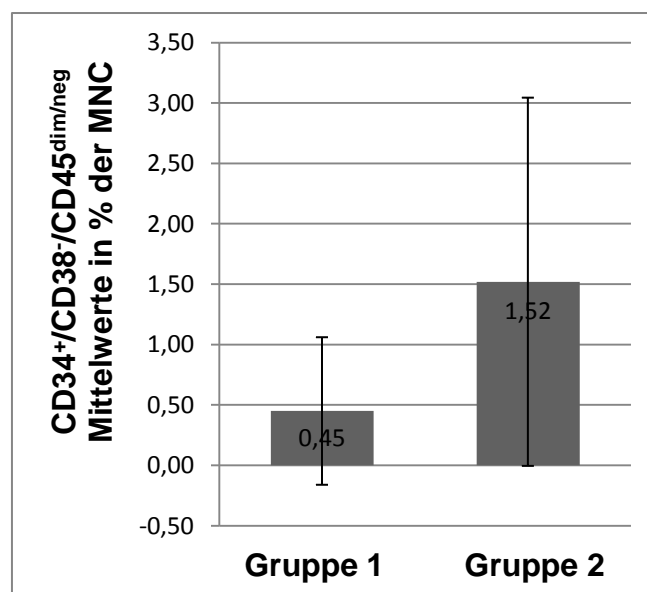


Abb. 4.22: Vergleich der AML-Gruppen „ohne“ (1) und „mit“ (2) Ereignis im Bezug auf die Population $CD34^+/CD38^-/CD45^{dim/neg}$

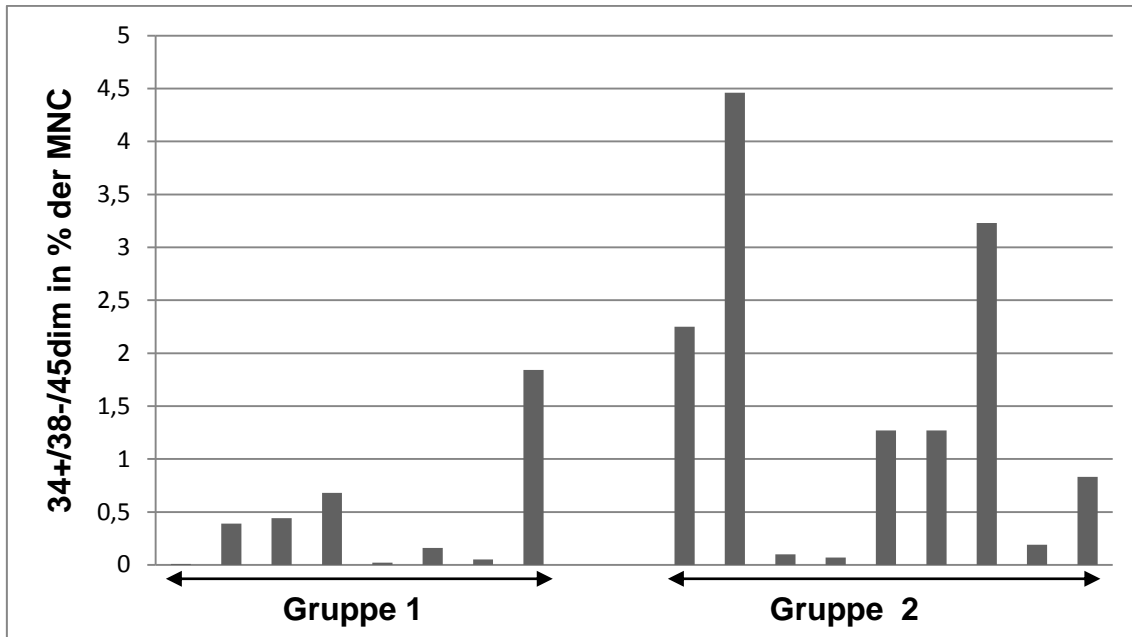


Abb. 4.23: Verteilung der CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg}-Werte innerhalb der beiden AML-Gruppen

CD34⁺/CD38⁻ und Aldefluor[®]

Nachdem für Aldefluor[®] allein kein Unterschied bezüglich der beiden Gruppen nachzuweisen war, war es ähnlich den ALL-Proben von Interesse, ob Aldefluor[®] in Kombination mit der Population CD34⁺/CD38⁻ prognostischen Wert hat. Hierzu wurden Gruppe 1 und 2 auf die Population CD34⁺/CD38⁻/ALDH^{br} hin untersucht. Analog zur Auswertung der Patienten mit ALL zeigt sich auch hier, dass die Einbeziehung dieses Markers die Trennschärfe bezüglich der Korrelation mit dem Klinischen Verlauf verwischt (vgl. Tab. 4.5).

Tab. 4.5: AML-Ergebnisse: Analyse der klinischen Gruppen bezüglich verschiedener Populationen

Gruppe	Fallzahl	CD34 ⁺	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	CD34 ⁺ /CD38 ⁻ / CD45 ^{dim/neg}	CD34 ⁺ /CD38 ⁻ / ALDH ^{br}
1	8	34,25 ± 32,51	0,75 ± 1,30	0,45 ± 0,61	0,10 ± 0,09
2	9	29,85 ± 33,64	1,62 ± 1,47	1,52 ± 1,52	0,18 ± 0,26
t-Test		0,394	0,109	0,042	0,2

5. Diskussion

5.1 Allgemein

Die Therapie von akuten Leukämien im Kindesalter hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert. Entscheidend für den höheren Therapieerfolg ist zum einen die genaue Klassifizierung der Leukämie, zu der die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung und die Beschreibung molekulargenetischer Marker entscheidend beigetragen haben. Der zweite wichtige Fortschritt ist eine exaktere Risikostratifizierung über die Messung des Therapieansprechens (s.u.), die in die Entscheidung über die Therapieintensität einfließt.

Um die Therapiestrategien weiter zu verbessern, wird die überwiegende Zahl (>95 %) der kindlichen Leukämiepatienten im deutschsprachigen Raum in Behandlungsstudien, sogenannte Therapieoptimierungsstudien der Gesellschaft für Onkologie und Hämatologie, eingeschlossen. Bei der ALL handelt es sich um die ALL-BFM 2000- und die CoALL-Studien. Im Rahmen dieser breit angelegten Protokolle werden die Patienten in verschiedene Risikogruppen eingeteilt. Nach dem aktuellen ALL-BFM-Studienprotokoll geschieht diese Einteilung fast ausschließlich anhand von Faktoren bezüglich des Ansprechens auf die Chemotherapie. Zum einen wird der Nachweis von leukämischen Blasten im peripheren Blutbild nach 7 Tagen Therapie mit Prednisolon erfasst. Zum anderen wird die Dynamik des Therapieansprechens der Leukämie auf molekularer Ebene untersucht. Hierbei handelt es sich um die Bestimmung des MRD-Levels im Knochenmark, das an Tag 33 und vor Beginn von Protokoll M bestimmt wird. Diese MRD-Messungen fließen in die Auswertung für diese Arbeit ein (vgl. Schrappe 2007).

Die Einteilung erfolgt in die drei Gruppen „Standard-Risiko“, „Mittleres Risiko“ und „Hohes Risiko“. Gemäß dieser Einteilung wird die Intensität der Therapie gewählt.

Da aufgrund der hohen Toxizität der Chemotherapie keine Übertherapie erfolgen sollte, aber umgekehrt eine Untertherapie mit der Folge eines Rezidives die Prognose drastisch verschlechtert, ist eine möglichst exakte Risikoeinschätzung nötig. Zudem wäre es von Vorteil, bereits bei Diagnosestellung Aussagen über das jeweilige Risiko treffen zu können, um eventuell von Beginn an ein geeignetes Therapieschema zu wählen – was aufgrund der heutigen Methoden wie erwähnt erst im Verlauf der Therapie möglich ist.

Die Bedeutung von LSC im Bezug auf Therapieansprechen bzw. dem Auftreten von Rezidiven ist Gegenstand aktueller Diskussion. Aufgrund der Potenz von LSC, Leukämien hervorzurufen und aufrecht zu erhalten, sowie der erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapie wird ihnen eine entscheidende Rolle bezüglich des Wiederauftretens der Erkrankung nach erfolgreicher Primärtherapie zugeschrieben (Guzman 2004). Demzufolge wird auch die Notwendigkeit einer spezifischen Therapie gegen LSC immer häufiger betont (Hope 2004). Derartige Ergebnisse neuerer Forschung verlangen also nach weiteren Nachweisen für einen direkten Zusammenhang zwischen LSC und Prognose (van Rhenen 2005). Da die Anzahl der LSC bereits bei der Knochenmarkpunktion bei Diagnosestellung bestimmt werden kann, steht damit möglicherweise ein Parameter zur Verfügung, mit welchem Aussagen über die Risikoeinteilung zu einem deutlich früheren Zeitpunkt getroffen werden könnten als mit der etablierten MRD-Diagnostik. Zudem gelänge durch die genauere Charakterisierung dieser Population ein wichtiger Schritt in Richtung einer spezifischen Therapie eben dieser Zellen. Entsprechende Versuche wurden bereits anhand von Oberflächenantigenen bei erwachsenen Patienten mit AML durchgeführt (van Rhenen 2005). Hier konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen der Stammzell-Population $CD34^+/CD38^-$ bei Diagnosestellung und einem höheren MRD-Level sowie schlechterem Überleben besteht. Bisher liegen allerdings keine Vergleichsstudien für kindliche Leukämien vor.

Zum Nachweis von HSC wurden neben dem phänotypischen Nachweis von bestimmten Oberflächenmarker-Kombinationen andere Methoden wie der Nachweis von stammzellspezifischen Enzymaktivitäten beschrieben. Der Farbstoff

Hoechst 33342 wird von P-Glykoproteinen aktiv aus der Zellen eliminiert. Dieses Enzym ist bei Stammzellen wesentlich stärker exprimiert, wie auch die Aldehyddehydrogenase (ALDH), die den Farbstoff Aldefluor® in eine stärker fluoreszierende Form umsetzt (vgl. 3.3). Enzymatische Nachweise sind möglicherweise von Vorteil, da die Expression der CD-Moleküle bei Leukämien aberrant erfolgt. Einzelne Leukämien exprimieren Stammzellmarker wie CD34 konstitutionell, und auch der umgekehrte Fall – der Verlust von SC-Markern auf LSC – kann nicht sicher ausgeschlossen werden. Somit sind Stammzeleigenschaften auf diese Art nicht sicher nachweisbar (Sutherland 1996, Blair 1997). Cheung et al. führten Untersuchungen von Knochenmark erwachsener Leukämie-Patienten mit Aldefluor® durch. Die Versuche ergaben bei der AML Hinweise darauf, dass es sich bei ALDH^{br} Zellen in Aldefluor®-positiven (>5 % ALDH^{br}-Zellen) Leukämien um primitive LSC handelt. Dies war mit einer schlechteren Prognose korreliert (Am Cheung 2007).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei kindlichen Leukämie-Patienten den Anteil LSC bei Diagnosestellung mit dem klinischen Verlauf zu korrelieren. Im positiven Fall wäre daraus ein früher prognostischer Marker ableitbar. Neben Hoechst und ALDH wurden die Zellen mit den Antikörpern CD34, CD38 und CD45 markiert, um eventuell über diese Marker eine Population mit Korrelation zum klinischen Verlauf definieren zu können, was für Leukämien bei Erwachsenen zum Teil bereits beschrieben wurde.

Nachdem die Darstellung der Hoechst-Sidepopulation nicht zufriedenstellend gelang, wurde zunächst die Aldefluor®-Färbung optimiert und ein Schema für die gemeinsame FACS-Analyse erarbeitet. Anhand dessen wurden kryokonservierte Knochenmarkproben von kindlichen Leukämiepatienten bei Diagnosestellung untersucht und die Ergebnisse mit Parametern des weiteren Krankheitsverlaufs verglichen. Bei den AML-Patienten handelte es sich hierbei um das Rezidiv-freie Überleben. Bei der ALL wurde wegen der erfreulicherweise zu geringen Anzahl von Rezidiven als Vergleichs-Parameter das Ergebnis der MRD-Diagnostik von Tag 33

gewählt, da dies sehr eng mit der Prognose korreliert (vgl. 1.1.2).

5.2 Kontrollmessungen an nicht an Leukämie erkrankten

Kindern

Die Messungen ergaben eine durchschnittliche ALDH-Aktivität von 6,93 %. Diese Werte verhielten sich sehr konstant im Gegensatz zu den Leukämieproben, liegen allerdings deutlich über den Ergebnissen von Gentry et al., die für gesunde Erwachsene Aldefluor®-Werte von durchschnittlich 1,2 % ermittelten (Gentry 2007). Diese Differenz ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass vier der fünf analysierten Proben von Kindern stammen, die zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion an einer Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis litten. Aufgrund der Entzündungsaktivität und der damit verbundenen erhöhten Proliferation wäre naheliegend, dass auch die Anzahl der Zellen mit Stammzeleigenschaften vermehrt ist. Die einzige Probe eines gesunden Kindes ohne entzündliche Grunderkrankung wies mit 3,58 % den niedrigsten Wert auf. Zudem waren die Untersuchungen von Gentry et al. an Erwachsenen durchgeführt worden, für Kinder existieren derzeit keine publizierten Referenzwerte.

Das wichtigste Ergebnis der Kontrollmessungen liegt in der weitestgehenden Konstanz der Expression der Oberflächenmarker bzw. deren Kombinationen, was die Verlässlichkeit unsere Analysen bestätigt.

5.3 ALL-Proben

5.3.1 Messergebnisse

Cheung et al. beschrieben, dass bei der Analyse erwachsener Patienten mit ALL keine ALDH^{br}-Zellen nachgewiesen werden konnten (Cheung 2007). Im Gegensatz dazu fanden wir bei den analysierten ALL-Proben 13,37 % (\pm 23,78) ALDH^{br}-Zellen. Als

Erklärung für diese Diskrepanz ist sicherlich der große biologische Unterschied zwischen kindlichen und erwachsenen Leukämien zu nennen. Zudem belief sich die Fallzahl von Cheung et al. auf lediglich acht Patienten mit ALL. Für Nabelschnurblut sowie Knochenmark gesunder Probanden hatten andere Arbeitsgruppen gezeigt, dass ALDH^{br}-Zellen zu großen Teilen CD34 koexprimieren. (Storms 1999) Besonders in Nabelschnurblut scheinen diese ALDH^{br}/CD34⁺ Zellen einen sehr großen Anteil der Vorläuferzellen zu enthalten (Storms 2005). Bei Analyse der ALDH^{br}-Zellen Zellen sämtlicher ALL-Patienten fiel neben der breiten Streuung diesbezüglich auf, dass keine Korrelation mit CD34 vorlag. Dagegen zeigte eine getrennte Auswertung nach Leukämien mit einem hohen (>1 %) bzw. niedrigen (<1 %) Anteil Aldefluor®-positiver Zellen ein anderes Ergebnis: Bei letzteren lag der durchschnittliche Anteil der CD34⁺-Zellen an der ALDH^{br}-Population mit 52,97 % (±18,62 %) über dem Gesamtdurchschnitt aller Proben (42,33 %). Für Leukämien mit hoher ALDH-Aktivität betrug dieser Anteil lediglich 34,34 % (±34,91 %). Zu erklären ist dieses Ergebnis durch die Annahme, dass es sich bei der Expression der ALDH nicht in jedem Fall um eine Stammzelleigenschaft handelt, sondern einige Leukämieformen dieses Enzym unabhängig von Differenzierungsgrad exprimieren. Somit ist die ALDH in diesen Fällen als intrinsische Eigenschaft der Leukämie zu sehen. Bei Leukämien mit niedriger ALDH-Aktivität handelt es sich dagegen mit großer Wahrscheinlichkeit wie bei HSC um eine Stammzelleigenschaft, was durch die Koexpression von CD34 bestätigt wird.

Diese Annahme wird von Untersuchungen bezüglich der Korrelation der ALDH-Aktivität mit der Population CD34⁺/CD38⁻ unterstützt. Für diejenigen Proben mit wenigen Aldefluor®-positiven Zellen war diese Korrelation hoch signifikant ($p < 0,001$), während sie für Proben mit hoher ALDH-Aktivität nicht nachweisbar war. Obgleich es sich hierbei nicht um identische Populationen handelt, da nur teilweise die gleichen Zellen nachgewiesen werden, ist der Zusammenhang durchaus plausibel, da für beide Populationen Stammzelleigenschaften nachgewiesen wurden.

5.3.2 Korrelation mit klinischen Parametern

Da Rezidiv bzw. Nichtansprechen auf Therapie als Korrelationsparameter eine sehr große Stichprobe erfordern würden, wurde die Korrelation zu dem MRD-Level von Tag 33 berechnet, der erwiesenermaßen eng mit der Prognose korreliert (Steenbergen 1995).

5.3.2.1 Aldefluor®

Bei den ALL-Proben wurde die Höhe der ALDH^{br}-Population mit dem MRD-Level von Tag 33 verglichen, wobei keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden konnte. Demzufolge gibt es keine Anzeichen auf einen allgemeinen direkten Zusammenhang zwischen ALDH^{br}-Zellen und dem Verlauf der Erkrankung. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob mit Aldefluor® in allen Fällen tatsächlich eine LSC-Population nachgewiesen wurde, bzw. wie groß der Einfluss der Höhe der Stammzellpopulation zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auf den MRD-Verlauf und damit auf die Prognose (s.o.) ist.

Die nach ALDH-Aktivität getrennte Auswertung ergab dagegen eine Differenz ähnlich der Korrelation mit CD34⁺/CD38⁻ (vgl. 5.3.1). Proben mit hohen Aldefluor®-Werten wiesen wie das Gesamtergebnis keine Korrelation mit dem MRD-Level von Tag 33 auf. Im Gegensatz dazu bestand bei Leukämien mit geringen Aldefluor®-Werten ein hoch signifikant positiver Zusammenhang ($p < 0,001$). Pearce et al. fanden ähnlich zu unseren Ergebnissen in 5.3.1 für erwachsener Leukämiepatienten heraus, dass bei Leukämien mit geringer ALDH-Aktivität der Anteil CD34⁺-Zellen an ALDH^{br}-Zellen signifikant größer ist als bei hoher ALDH-Aktivität (Grenzwert ebenfalls 1 %) (Pearce 2005). Nach Transplantationsversuchen im Mausmodell beschrieben sie allerdings, dass es sich bei den ALDH^{br}-Zellen der Leukämien mit geringer ALDH-Aktivität nicht ausschließlich um LSC, sondern auch um physiologische HSC handelt. Bei Leukämien mit hoher ALDH-Aktivität würden dagegen mit Aldefluor® nahezu ausschließlich LSC nachgewiesen. Dies steht im Gegensatz zu der in 5.3.1 beschriebenen Annahme, dass es sich bei der

nachgewiesenen ALDH-Aktivität nur bei niedrigen Aldefluor®-Werten um eine Stammzeleigenschaft handelt, andernfalls um eine intrinsische Eigenschaft der Leukämieform. Allerdings wird diese von der nachgewiesenen hohen Korrelation der ALDH-Werte mit den MRD-Werten bestätigt. Zur Erklärung der abweichenden Ergebnisse ist wiederum die unterschiedliche Biologie erwachsener und kindlicher Leukämien zu nennen.

Für AML bei Erwachsenen konnte von Cheung et al. eine negative Korrelation zwischen der Anzahl der LSC bei Diagnosestellung, die mit ALDH-Positivität definiert worden waren, und der Prognose gezeigt werden (Cheung 2007). Diese bei uns nicht nachweisbare generelle Korrelation der ALDH-Aktivität mit dem MRD-Level/klinischen Verlauf und mit anderen Stammzell-typischen Markern wie CD34⁺/CD38⁻ machen es wahrscheinlich, dass die ALDH^{br}-Zellen bei kindlichen ALL-Patienten nicht generell mit einer putativen Stammzellpopulation korreliert werden können. Dagegen zeigen unsere Ergebnisse der getrennten Auswertung in Verbindung mit der hohen prognostischen Aussagekraft des MRD-Levels, dass für Leukämien mit insgesamt geringer ALDH-Aktivität diese in einem negativen Zusammenhang mit der zu erwartenden Klinik steht, d.h. dass man für kindliche Patienten dieser Gruppe mit hohen Aldefluor®-Werten eine schlechtere klinische Prognose erwarten kann.

5.3.2.2 Oberflächenantikörper

Der Vergleich der analysierten Oberflächenantikörper mit den MRD-Werten ergab im Gegensatz zu Aldefluor® für die Gesamtheit der Proben einen positiven Zusammenhang. Patienten mit einer größeren CD34⁺/CD38⁻ Population hatten signifikant höhere MRD-Werte. Der p-Wert der Pearson-Korrelation beträgt hier 0,02. Für CD34 allein konnte keine Korrelation gefunden werden. Keinen wesentlichen Unterschied machte die zusätzliche Selektion nach CD45, so dass mit CD34⁺/CD38⁻ eine Population gefunden wurde, die mit den MRD-Werten positiv korreliert. Das gleiche Signifikanzniveau wird für CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} erreicht.

Ein ähnlicher Effekt wurde wie erwähnt bereits von van Rhenen et al. für erwachsene AML-Patienten beschrieben. Sie konnten zeigen, dass der Anteil der CD34⁺/CD38⁻ Zellen an der CD45^{dim}/SSC^{lo} Population signifikant mit den MRD-Werten korreliert, während die Population der CD34⁺-Zellen nicht mit dem MRD-Verlauf in Zusammenhang stand (van Rhenen 2005).

Da für die Höhe der ALDH^{br}-Population keine generelle Korrelation mit dem MRD-Verlauf vorliegt, wurde weiterhin untersucht, ob eine Kombination mit den analysierten Oberflächenmarkern die prognostische Aussagekraft erhöht. Besonders die Population der CD34⁺ unter den ALDH^{br} Zellen war aus oben genannten Gründen interessant. Allerdings führte die Markerkombination CD34⁺/CD38⁻/ALDH^{br} zu keiner Erhöhung der prognostischen Aussagekraft. Zwar war eine signifikante Korrelation nachzuweisen, diese lag allerdings unter derjenigen von CD34⁺/CD38⁻ allein. Dies bestätigt die Aussage, dass ALDH-Aktivität nicht generell als Stammzeleigenschaft zu betrachten ist.

5.3.2.3 Allgemeine Beurteilung

Zusammenfassend lässt sich aufgrund unserer Ergebnisse sagen, dass sich die Messung der ALDH-Aktivität nicht generell als Marker für klinische Prognoseeinschätzung bei ALL eignet, weder als einzelner Parameter noch in Kombination mit den Oberflächenantigenen CD34, CD38 und CD45. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür besteht darin, dass bei der kindlichen ALL die ALDH-Aktivität nicht in jedem Fall einen Marker für Stammzellpotenz, sondern bei einigen Leukämieformen ein konstitutionelles Charakteristikum darstellt. Hierfür sprechen die variable Expression sowie die fehlende Korrelation der Gesamtheit der Proben mit Oberflächenantikörpern und den MRD-Werten. Dies ist bei Leukämien mit hoher ALDH-Aktivität anzunehmen. In diesen Fällen ist durchaus denkbar, dass das für die Reaktion verantwortliche Enzym Aldehyddehydrogenase nicht ausschließlich von LSC, sondern als intrinsische Eigenschaft einer spezifischen Leukämieform von leukämischen Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien

exprimiert wird. Untersuchungen bezüglich Stammzeleigenschaften wie Kolonienegenizität und Leukämogenizität im Mausmodell werden diese Frage klären können.

Dagegen konnten wir zeigen, dass eine kleine Population nachweisbar ist, die allgemein mit den MRD-Werten und somit mit der klinischen Prognose in Zusammenhang steht, nämlich der Anteil $CD34^+/CD38^-$ Zellen an den MNC des Knochenmarks. Dieses Ergebnis ist aufgrund der statistischen Signifikanz und Vorarbeiten bzw. ähnlichen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (s.o.) plausibel. Aufgrund der niedrigen Fallzahl und der starken Streuung der einzelnen Werte müssen diese Ergebnisse jedoch kritisch betrachtet werden. Insbesondere eine klinische Bedeutung sollte nicht vorschnell abgeleitet werden. Die vielfach erwähnte Problematik der variablen Expression ist damit zudem nicht gelöst. Wie groß der Anteil von LSC an dieser Population ist bzw. wie viele LSC durch diese Markerkombination nicht erfasst werden, müssen weitere Versuche – insbesondere im Xenotransplantationsmodell – zeigen. Sollte sich jedoch der Zusammenhang der $CD34^+/CD38^-$ Zellen mit MRD-Status und klinischer Prognose weiterhin bestätigen, wäre hiermit eine Population gefunden, die sowohl bei der Risikoeinschätzung von Bedeutung wäre als auch evtl. ein neues Ziel spezifischer Stammzelltherapie darstellen könnte.

Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass für Leukämien mit niedriger ALDH-Aktivität diese mit den MRD-Werten und konsekutiv mit der klinischen Prognose korreliert. Die Signifikanz dieses Zusammenhangs ist deutlich höher als die der Population $CD34^+/CD38^-$ (s.o.). Im Falle einer Bestätigung dieses Ergebnisses sind auch hier weitere Untersuchungen nötig. Der Grenzwert von 1 % wurde in Anlehnung an die Ergebnisse von Pearce et al. willkürlich gewählt und kann somit optimiert oder bestätigt werden. Auch die Unterschiede zu den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe sollten verifiziert und insbesondere durch Transplantationsversuche analysiert werden. Darüber hinaus wäre es von Interesse, durch genauere Charakterisierung der $ALDH^{br}$ -Populationen, evtl. per Oberflächenantikörper, zwischen LSC und Blasten mit intrinsisch erhöhter ALDH-Aktivität unterscheiden zu können.

5.4 AML

5.4.1 Messergebnisse

Im Wesentlichen ähneln unsere Ergebnisse für AML-Patienten denen der ALL. Der Anteil ALDH^{br} Zellen an den MNC betrug durchschnittlich 14,98 % ($\pm 24,8$ %). Cheung et al. erzielten für AML bei Erwachsenen ähnliche Werte, wenngleich die Studien wegen verschiedener Gating-Strategien nicht direkt vergleichbar sind. (Cheung 2007) In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Mehrheit dieser Zellen CD34 koexprimieren. Dies hat sich in unseren Versuchen nicht bestätigt. Bei einem Anteil der CD34-Expression unter ALDH^{br}-Zellen von 40,56 % und zusätzlich breiter Streuung der einzelnen Werte war kein direkter Zusammenhang zwischen den beiden Markern zu erkennen.

Für Leukämien mit niedriger ALDH-Aktivität konnten wir wie schon bei der ALL eine Korrelation von Aldefluor®-Werten und der Population CD34⁺/CD38⁻ nachweisen. Da hierbei der Anteil CD34⁺ Zellen an der ALDH^{br}-Population gegenüber der Grundgesamtheit nicht erhöht war, handelt es sich um verschiedene Populationen, für die jeweils bereits Stammzeleigenschaften nachgewiesen wurden. Wie bei der ALL ist dieses Ergebnis dadurch erklärbar, dass bei Proben mit hoher ALDH-Aktivität diese eine Eigenschaft der jeweiligen Leukämie darstellt, im gegenteiligen Fall Stammzellen nachweist. Pearce et al. stellten dagegen fest, dass bei Proben mit geringer ALDH-Aktivität (<1 %) die ALDH^{br}-Zellen größtenteils ebenfalls positiv für CD34 sind (88,7 % \pm 9,2 %). Allerdings wurden in dieser Arbeit nur lin⁻ Zellen (vgl. 1.2.2) analysiert, so dass die Ergebnisse nicht vergleichbar sind (Pearce 2005). In derselben Studie wird für Proben mit hoher ALDH-Aktivität eine ähnlich geringe Koexpression von CD34 unter den ALDH^{br}-Zellen (38,0 % \pm 33,7 %) beschrieben. Zudem wurde ebenfalls die breite Streuung der ALDH^{br}-Prozentwerte im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (mit relativ konstanten Werten) beschrieben, was auch in unserer Untersuchung beobachtet wurde.

5.4.2 Korrelation mit klinischen Parametern

Als Parameter für den klinischen Verlauf wurden bei der AML die Ereignisse Rezidiv oder Tod des Patienten verwendet. Dies war möglich, da bei der AML im Gegensatz zur ALL wesentlich häufiger derartige Ereignisse auftreten. Eine MRD-Messung liegt für die AML-Patienten nicht vor.

5.4.2.1 Korrelation mit Aldefluor®

Die Vergleiche zeigten für die Population mit ALDH-Aktivität wiederum keinen signifikanten Zusammenhang. Die beiden Gruppen „ohne“ (Gruppe 1) und „mit Ereignis“ (Gruppe 2) unterschieden sich in den ALDH^{br}-Werten nicht signifikant. Auch hier differierten die einzelnen Werte in beiden Gruppen sehr stark. Eine nach ALDH-Aktivität getrennte Auswertung konnte aufgrund zu geringer Fallzahl nicht sinnvoll durchgeführt werden.

Auch Pearce et al. konnten keine Korrelation zwischen ALDH-Aktivität und klinischem Verlauf feststellen (Pearce 2005). Cheung et al. beschrieben dagegen, dass in AML mit einer ALDH^{br}-Population >5 % signifikant häufiger zytogenetische Aberrationen mit ungünstiger Prognose zu finden waren (Cheung 2007). Warum die Ergebnisse von Cheung et al. nicht mit denen von Pearce et al. und unseren Untersuchungen übereinstimmen, mag verschiedene Gründe haben. Zum einen wiesen Cheung et al. nicht direkt eine Korrelation mit klinischem Verlauf, sondern mit dem Surrogatparameter zytogenetischer Aberrationen mit ungünstiger Prognose nach. Zudem wurden die AML-Patienten unserer Studie aufgrund von Risikoeinschätzung und AML-Subtyp in unterschiedliche Therapieschemata stratifiziert. Eine getrennte Auswertung nach Therapiearmen war aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass erwachsene Leukämien, wie von Cheung und Pearce untersucht, möglicherweise andere biologische Eigenschaften aufweisen als kindliche Leukämien.

5.4.2.2 Oberflächenantikörper

Auch im Bezug auf die Anzahl CD34⁺ Zellen unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Review von Kanda et al., die feststellten, dass die Höhe von CD34-positiven Zellen bei Diagnosestellung nach derzeitigen Forschungsergebnissen nicht als Anzeichen für eine schlechtere Prognose gesehen werden kann (Kanda 2000). Dies wurde von neueren Studien bestätigt (van Rhenen 2005).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der ALL-Proben fand sich bei den AML auch keine Korrelation der CD34⁺/CD38⁻ Population mit klinischen Parametern. Brachte die zusätzliche Selektion der CD45^{dim/neg} Zellen bei den ALL-Proben keine Verbesserung der Ergebnisse, verhielt sich dies bei der AML anders. Lediglich für die Population CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} konnten wir einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen ($p = 0,042$). Wie bereits erwähnt fanden van Rhenen et al. für AML im Erwachsenenalter, dass der Anteil der CD34⁺/CD38⁻ Zellen an der CD45^{dim}/SSC^{lo} Population signifikant mit den MRD-Werten korreliert (van Rhenen 2005). Aufgrund des hohen prognostischen Wertes der MRD können die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen als Bestätigung dieser Arbeit gesehen werden. Kritisch anzumerken ist, dass in der vorliegenden Arbeit die Fallzahl wie erwähnt niedrig und die Standardabweichung in beiden Gruppen relativ groß ist (Gruppe 1: 0,61; Gruppe 2: 1,52), so dass das Signifikanzniveau nur knapp erreicht wird. Andererseits führt das Gating auf CD45^{dim/neg} zu einer zusätzlichen Selektion von leukämischen Zellen, da gesunde Stammzellen CD45 stark exprimieren (vgl. 3.4.1). Somit liegt der höheren Aussagekraft der Kombination CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} eine starke Rationale zugrunde. Die Kombination des enzymatischen Markers ALDH-Aktivität mit Oberflächen-merkmalen führte nicht zu einer erhöhten Aussagekraft hinsichtlich der Prognose.

5.4.2.3 Allgemeine Beurteilung

Aus den Ergebnissen der AML-Analysen lässt sich folgern, dass mit der Messung der

ALDH-Aktivität kein neuer Test zur Verfügung steht, der generell bereits bei Diagnosestellung eine Abschätzung der klinischen Prognose erlaubt. Ähnlich den ALL-Untersuchungen bleibt die Frage, ob es sich bei der ALDH^{br}-Population bei kindlichen AML um LSC handelt, die über eine erhöhte ALDH-Aktivität verfügen oder wiederum in bestimmten Fällen um eine intrinsische Eigenschaft spezifischer AML-Formen. Für letzteres spräche einmal mehr, dass der Zusammenhang zwischen einer höheren LSC-Fraktion und der klinischen Prognose mehrfach nachgewiesen werden konnte (Cheung 2007, van Rhenen 2005). Da allerdings bei niedriger ALDH-Aktivität eine Korrelation von ALDH^{br}-Werten und stammzelltypischen Oberflächenmarkern nachgewiesen wurde, besteht in Anlehnung an die Auswertung der ALL-Proben Anlass zur Vermutung, dass auch hier eine diesbezügliche Korrelation mit dem klinischen Verlauf positive Ergebnisse zeigen würde. Die Annahme, dass auch bei der AML für geringe ALDH-Aktivität diese Stammzellen nachweist während sie bei hoher Aktivität eine intrinsische Eigenschaft einer spezifischen Leukämieform darstellt, muss in weiteren Versuchen geprüft werden. Mit CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} wurde zudem eine Population identifiziert, die sowohl für die ALL als auch die AML signifikant mit dem Verlauf der Erkrankung korreliert. Nachfolgende Studien mit höherer Fallzahl werden zeigen müssen, ob sich dieser Zusammenhang erhärten lässt, wie groß der prognostische Wert des Nachweises dieser Population ist und ob weitere Marker wie z.B. CLL-1 bei der AML existieren, die die Korrelation zum klinischen Verlauf weiter erhöhen.

Zu beachten ist weiterhin die Tatsache, dass mit Aldefluor® lediglich die ALDH-1 nachgewiesen wird. Neben diesem Isoenzym der ALDH existiert mit der ALDH-3 ein weiteres, das mit in unseren Versuchen nicht nachgewiesen werden konnte. Da jedoch sowohl die ALDH-1 als auch die ALDH-3 nachgewiesenermaßen an der Chemoresistenz beteiligt sind, wäre es von Interesse, mit neuen Reagenzien auch spezifisch andere Isoformen der ALDH zu erfassen und deren Vorkommen und Bedeutung bei Leukämien zu eruieren (Bunting 1996, Moreb 2000).

5.5 Ausblick

Die Therapie kindlicher Leukämien wird weiterhin stetig verbessert. Ein Ziel der Weiterentwicklung ist die Möglichkeit, zu einem sehr frühen Zeitpunkt Aussagen über Verlauf und Prognose der Erkrankung treffen zu können, damit so ein optimales Therapieschema ausgewählt wird. Der Nachweis der ALDH-Aktivität weist gesunde Stammzellen zuverlässig nach. In der Annahme, dass diese Methode auch LSC identifiziert, stünde bei erwähnter Relevanz dieser Zellen für die klinische Prognose ein neues Werkzeug für eine frühe Verlaufseinschätzung zur Verfügung.

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Menge der Zellen mit hoher ALDH-Aktivität nicht generell mit der klinischen Prognose korreliert, wohl aber bei ALL-Proben mit einer ALDH-Aktivität $<1\%$. Dieser Grenzwert ist in weiteren Versuchen noch zu optimieren. Zudem wurde für die Population $CD34^+/CD38^-$ bei ALL bzw. $CD34^+/CD38^-/CD45^{dim/neg}$ bei AML eine Korrelation mit dem klinischen Verlauf nachgewiesen. Aufgrund der geringen Fallzahl und der z.T. großen Streuung der Messungen sind diese Ergebnisse noch nicht sicher als Kausalität zu interpretieren, sondern bilden die Grundlage für ausführlichere Studien dieses Zusammenhangs.

Diesbezüglich ist in Zukunft nachzuweisen, ob die Populationen, die sich in dieser Arbeit als putative LSC erwiesen haben, tatsächlich Stammzellqualität besitzen. Dies könnte etwa in Kolonigenizitätsversuchen oder per Xenotransplantation im Mausmodell erreicht werden. Zusammen mit weiteren Korrelationsstudien bezüglich der klinischen Prognose ließe sich evtl. eine neue diagnostische Methode finden, die aufgrund der einfachen Durchführbarkeit in Zukunft die aktuelle Routinediagnostik unterstützen und durch eine frühere Abschätzung der Prognose die Behandlung der Leukämien durch eine verfeinerte Stratifizierung verbessern könnte. Im weiteren Verlauf wäre es von Interesse, Targets zur gezielten Elimination dieser Zellen zu identifizieren und wiederum im Mausmodell zu evaluieren. Hierdurch würden neue Wege zu einer alternativen Therapie von Leukämien gebahnt.

6. Zusammenfassung

Die Entstehung von Leukämien lässt sich auf genetische Aberrationen von entweder hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen – mit Verlust der Regulationsmechanismen – oder von reiferen hämatopoetischen Zellen – mit Rückgewinnung von Stammzeleigenschaften – zurückführen. In vielen Fällen geht dies mit der Ausbildung einer Population von leukämischen Stammzellen (LSC) einher. Diese LSC sind durch ihre Fähigkeit, alle Zellen einer Leukämie zu generieren, von großer Bedeutung bei der Entstehung, dem Erhalt und ggf. dem erneuten Hochwachsen einer leukämischer Blastenpopulation. Zudem scheinen sie aufgrund bestimmter Resistenzmechanismen, wie z.B. membranständiger Effluxpumpen, besonders widerstandsfähig gegenüber Chemotherapie zu sein. Daher ist ein möglicher Zusammenhang zwischen dem qualitativen und quantitativen Nachweis von LSC und dem klinischen Verlauf von Interesse. Dies sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Hierzu wurden Proben von Kindern, die in den vergangenen acht Jahren an Leukämie erkrankten, durchflusszytometrisch bezüglich bestimmter Stammzell-Marker untersucht und mit dem klinischen Verlauf bzw. dem MRD- (minimal residual disease) Verlauf assoziiert.

Leukämische Zellen folgen nicht der physiologischen Differenzierung und exprimieren somit auch Oberflächenantigene variabel und häufig asynchron. Herkömmlicherweise werden diese in Kombination von z.B. CD34+/38- zur Charakterisierung von Stammzellen verwendet, doch ist dieses Vorgehen zum Nachweis von LSC allein zwar gebräuchlich, in vielen Fällen aber auch unzuverlässig bzw. unzureichend untersucht. Deswegen sollte eine neue Methode etabliert werden. Hierzu wurden die intrazellulären Fluoreszenz-Farbstoffe Hoechst 33342 und Aldefluor® getestet. Bei Hoechst 33342 handelt es sich um ein Molekül, das sich intrazellulär anreichert und an DNA bindet. Bestimmte Zellen exprimieren membranständige Effluxpumpen, die den Farbstoff aktiv aus dem Zelllumen

eliminieren. Diese Zellen bilden die so genannte Side Population (SP), die mit sehr frühen Stammzellen stark angereichert ist. Aus technischen Gründen gelang in dieser Arbeit der Nachweis der SP nicht.

Aldefluor® ist ein Substrat der Aldehyddehydrogenase (ALDH), dessen Fluoreszenz bei Umsetzung durch dieses Enzym deutlich zunimmt. ALDH-Aktivität konnte ebenfalls als Charakteristikum von HSC nachgewiesen werden, wenngleich diese Zellen nach derzeitigem Wissensstand bereits differenzierter sind als die der SP. Mit Hilfe einer Marker-Kombination aus Aldefluor®, CD34, CD38 und CD45 wurden bei Diagnosestellung kryokonservierte Knochenmark-Proben von 24 AML- und 54 ALL-Patienten untersucht.

Die Ergebnisse der ALL-Patienten wurden mit dem MRD-Verlauf verglichen, da für den MRD-Level ein hoher Zusammenhang mit der klinischen Prognose nachgewiesen wurde. Es zeigte sich, dass Aldefluor® nicht generell mit der Prognose korreliert, weder als alleiniger Marker noch in Kombination mit Oberflächenantigenen. Dagegen konnten wir nachweisen, dass für Leukämien mit niedriger ALDH-Aktivität diese hoch signifikant mit den MRD-Werten und konsekutiv mit der klinischen Prognose korreliert ($p < 0,001$). Somit handelt sich bei der Expression der ALDH vermutlich nur bei Leukämien mit insgesamt geringer ALDH-Aktivität eher um eine stammzellspezifische Eigenschaft, bei hoher Aktivität dagegen um eine intrinsische Eigenschaft einer spezifischen Leukämieform. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen der Population $CD34^+/CD38^-$ und dem MRD-Level nachgewiesen werden ($p = 0,02$). Inwieweit es sich bei diesen Populationen um LSC handelt, muss in weiteren Versuchen gezeigt werden. Sowohl mit $ALDH^{br}$ (für Gesamtaktivität $<1\%$) als auch mit $CD34^+/CD38^-$ scheint eine Population gefunden, die – sollten sich die Ergebnisse bestätigen – bereits bei Diagnosestellung Aussagen über die Prognose zulässt.

Bei den untersuchten AML-Proben wurden die Patienten in die Gruppen „ohne“ und „mit“ Ereignis (Rezidiv/Tod) eingeteilt und bezüglich ALDH- und Oberflächenantigen-Expression verglichen. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der ALL-Proben. Aldefluor® korreliert ebenfalls nicht generell mit dem

klinischen Verlauf und zeigt auch als zusätzlicher Parameter ergänzend zu den Oberflächenmarkern keinen Vorteil. Wie bei der ALL korreliert bei Proben mit geringer ALDH-Aktivität diese mit der Population $CD34^+/CD38^-$ signifikant ($p = 0,048$). Diesbezügliche Korrelation mit dem klinischen Verlauf konnte aufgrund zu geringer Fallzahl nicht durchgeführt und muss in Zukunft untersucht werden. Wiederum scheint es sich bei der Enzymexpression im Fall hoher ALDH-Aktivität am ehesten um ein intrinsisches Charakteristikum der jeweiligen Leukämieform zu handeln, im gegenteiligen Fall um eine Stammzelleigenschaft. Zudem konnte für die Population $CD34^+/CD38^-/CD45^{dim}$ eine Korrelation nachgewiesen werden. Patienten, bei denen im Verlauf ein Ereignis auftrat, hatten bei Diagnosestellung für diese Zellegruppe signifikant höhere Werte ($p = 0,042$). Wie bei den Ergebnissen der ALL werden auch hier weitere Versuche diese Population genauer charakterisieren müssen.

7. Literaturverzeichnis

ADAMS, J. M.; STRASSER, A. (2008): *Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones.* In: *Cancer Res*, Jg. 68, H. 11, S. 4018–4021.

AHMED, FARID (2007): *Role of the ABC transporter ABCG2 in human haematopoiesis.* Dissertation. Betreut von Prof. Dr. med. Stefan Bohlander. München. Ludwig-Maximilians-Universität, Medizin.

ANTIBODIES-ONLINE: *Produktdetails für CD34 antibody.* In: <http://www.antikoerper-online.de/antibody/110251/CD34+/> (22.01.2009).

BALDUZZI, A.; GAIPA, G.; BONANOMI, S.; DASSI, M.; PERSEGHIN, P.; BUSCEMI, F. ET AL. (2001): *Purified autologous grafting in childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission: evidence for long-term clinical and molecular remissions.* In: *Leukemia*, Jg. 15, S. 50–56.

BLAIR, A.; DE HOGGE; LE AILLES; LANSDORP, P. M.; SUTHERLAND, H. J. (1997): *Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo.* In: *Blood*, Jg. 89, H. 9, S. 3104–3112.

BUFFLER, P. A.; KWAN, M. L.; REYNOLDS, P.; URAYAMA, K. Y. (2005): *Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence.* In: *Cancer Invest*, Jg. 23, H. 1, S. 60–75.

BUNTING, K. D.; TOWNSEND, A. J. (1996): *Protection by transfected rat or human class 3 aldehyde dehydrogenase against the cytotoxic effects of oxazaphosphorine alkylating agents in hamster V79 cell lines. Demonstration of aldophosphamide metabolism by the human cytosolic class 3 isozyme.* In: *J Biol Chem*, Jg. 271, H. May 17, S. 11891–11896.

BUNTING, K. D.; ZHOU, S.; LU, T.; SORRENTINO, B. P. (2000): *Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo.* In: *Blood*, Jg. 96, H. 3, S. 902–909.

CHARBONNEAU, H.; TONKS, N. K.; WALSH, K. A.; FISCHER, E. H. (1988): *The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase.* In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jg. 85, H. 19, S. 7182–7186.

CHEN, C. J.; CHIN, J. E.; UEDA, K.; CLARK, D. P.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M.; RONINSON, I. B. (1986): *Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells.* In: *Cell*, Jg. 47, H. 3, S. 381–389.

CHEUNG, A. M. S.; WAN, T. S.; LEUNG, J. C.; CHAN, L. Y.; HUANG, H.; KWONG, Y. L. ET AL. (2007): *Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of*

acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. In: *Leukemia*, Jg. 21, H. 7, S. 1423–1430.

CONNELLY, E.; CASHMAN, J.; PETZER, A.; EAVES, C. (1997): *Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice.* In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jg. 94, H. 18, S. 9836–9841.

COSTELLO, R.; MALLET, F.; CHAMBOST, H.; SAINTY, D.; ARNOULET, C.; GASTAUT, J. A.; OLIVE, D. (1999): *The immunophenotype of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-Mo): reduced immunogenicity and high frequency of CD34+/CD38- leukemic progenitors.* In: *Leukemia*, Jg. 13, H. 10, S. 1513–1518.

DEAGLIO, S.; MEHTA, K.; MALAVASI, F. (2001): *Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors.* In: *Leuk Res*, Jg. 25, H. 1, S. 1–12.

EAKER, S. S.; HAWLEY, T. S.; RAMEZANI, A.; HAWLEY, R. G. (2004): *Detection and enrichment of hematopoietic stem cells by side population phenotype.* In: *Methods Mol Biol*, Jg. 263, S. 161–180.

ELBERS, SANDRA (2007): *TEL-AML1 – Spleißvarianten und sequentielle Untersuchung zum Therapieansprechen von TEL-AML1 positiven ALL-Rezidiven im Kindesalter.* Dissertation. Betreut von Dr. med. Dr. h. c. G. Henze. Berlin. Charité - Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Fakultät.

FALLON, P.; GENTRY, T.; BALBER, A. E.; BOULWARE, D.; JANSSEN, W. E.; SMILEE, R. ET AL. (2003): *Mobilized peripheral blood SSCloALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation.* In: *Br J Haematol*, Jg. 122, H. 1, S. 99–108.

FELLER, N.; VAN DER POL, M. A.; VAN STIJN, A.; WEIJERS, G. W.; WESTRA, A. H.; EVERTSE, B. W. ET AL. (2004): *MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukaemia.* In: *Leukemia*, Jg. 18, H. 8, S. 1380–1390.

GENTRY, T.; FOSTER, S.; WINSTEAD, L.; DEIBERT, E.; FIORDALISI, M.; BALBER, A. (2007): *Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy.* In: *Cytotherapy*, Jg. 9, H. 3, S. 259–274.

GOODELL, M. A.; BROSE, K.; PARADIS, G.; CONNER, A. S.; MULLIGAN, R. C. (1996): *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo.* In: *J Exp Med*, Jg. 183, H. 4, S. 1797–1806.

GOODELL, M. A.; ET AL (1999): *Hoechst 33342 HSC Staining and Stem Cell Purification Protocol.* In: www.bcm.edu/labs/goodell/protocols/goodell_hoechst.pdf (22.01.2009).

GOODELL, M. A.; ROSENZWEIG, M.; KIM, H.; MARKS, D. F.; DEMARIA, M.; PARADIS, G. ET AL. (1997): *Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species.* In: *Nat Med*.

- GREAVES, M. (2002): *Childhood leukaemia*. In: *BMJ*, Jg. 324, H. 7332, S. 283–287.
- GRIFFIN, J. D.; LÖWENBERG, B. (1986): *Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia*. In: *Blood*, Jg. 68, H. 6, S. 1185–1195.
- GUTJAHR, PETER (2003): *Krebs bei Kindern und Jugendlichen: Klinik und Praxis der Pädiatrischen Onkologie (Gebundene Ausgabe)*. ISBN: 978-3769104288. 5. Auflage, Deutscher Ärzte-Verlag, S. 293-296.
- GUZMAN, M. L.; JORDAN, C. T. (2004): *Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia*. In: *Cancer Control*, Jg. 11, H. 2, S. 97–104.
- HOPE, K. J.; JIN, L.; DICK, J. E. (2004): *Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity*. In: *Nat Immunol*, Jg. 5, H. 7, S. 738–743.
- INVITROGEN STEMCELL TECHNOLOGIES INC. (2004): *Identification of Viable Stem and Progenitor Cells with ALDEFLUOR®*. Technical Bulletin.
- INVITROGEN STEMCELL TECHNOLOGIES INC. (2007): *LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kits*. Manuals & Product Inserts.
- KANDA, Y.; HAMAKI, T.; YAMAMOTO, R.; CHIZUKA, A.; SUGURO, M.; MATSUYAMA, T. ET AL. (2000): *The clinical significance of CD34 expression in response to therapy of patients with acute myeloid leukemia: an overview of 2483 patients from 22 studies*. In: *Cancer*, Jg. 88, H. 11, S. 2529–2533.
- LACOMBE, F.; DURRIEU, F.; BRIAIS, A.; DUMAIN, P.; BELLOC, F.; BASCANS, E. ET AL. (1997): *Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia*. In: *Leukemia*, Jg. 11, H. 11, S. 1878–1886.
- LE VISEUR, C.; HOTFILDER, M.; BOMKEN, S.; WILSON, K.; RÖTTGERS, S.; SCHRAUDER, A. ET AL. (2008): *In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties*. In: *Cancer Cell*, Jg. 14, H. 1, S. 47–58.
- MÄHRLEIN, SUSANNE (2004): *Klinischer Vergleich verschiedener Diuretika bei niereninsuffizienten Patienten*. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades. Betreut von PD Dr. med. H. J. Deuber. Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg.
- MOORE, K. A.; LEMISCHKA, I. R. (2006): *Stem cells and their niches*. In: *Science*, Jg. 311, H. 5769, S. 1880–1885.
- MOREB, J. S.; MACCOW, C.; SCHWEDER, M.; HECOMOVICH, J. (2000): *Expression of antisense RNA to aldehyde dehydrogenase class-1 sensitizes tumor cells to 4-hydroperoxycyclophosphamide in vitro*. In: *J Pharmacol Exp Ther*, Jg. 293, H. No. 2, S. 390–396.
- MORRISON, S. J.; UCHIDA, N.; WEISSMAN, I. L. (1995): *The biology of hematopoietic stem cells*. In: *Annu Rev Cell Dev Biol*, Jg. 11, S. 35–71.
- OGAWA, M. (2002): *Changing phenotypes of hematopoietic stem cells*. In: *Exp Hematol*, Jg. 30, H. 1, S. 3–6.

- PEARCE, D. J.; BONNET, D. (2007): *The combined use of Hoechst efflux ability and aldehyde dehydrogenase activity to identify murine and human hematopoietic stem cells.* In: *Exp Hematol*, Jg. 35, H. 9, S. 1437–1446.
- PEARCE, D. J.; TAUSSIG, D.; SIMPSON, C.; ALLEN, K.; ROHATINER, A. Z.; LISTER, T. A.; BONNET, D. (2005): *Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples.* In: *Stem Cells*, Jg. 23, H. 6, S. 752–760.
- RAVANDI, F.; ESTROV, Z. (2006): *Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia.* In: *Clin Cancer Res*, Jg. 12, H. 2, S. 340–344.
- RIEGER, MICHAEL (2007): *Hämatopoetische Stammzellen. Unter Mitarbeit von Timm Schroeder.* In: *BIOSpektrum*, Nr. 03, S. 254–257.
- SACK, U.; TARNOK A.; ROTHE G. (2006): *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.* 1. Aufl.: Karger Publishers (S. 165ff, 173ff).
- SCHRAPPE, MARTIN STUDIENLEITER (2007): *ALL-BFM 2000 - zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit Akuter Lymphoblastischer Leukämie.* Therapieprotokoll. Herausgegeben von Campus Kiel Univ.-Klinikum Schleswig-Holstein. Klinik für Allgemeine Pädiatrie.
- SIKIC, B. I. (2006): *Multidrug resistance and stem cells in acute myeloid leukemia.* In: *Clin Cancer Res*, Jg. 12, H. 11 Pt 1, S. 3231–3232.
- SIMPSON, C.; PEARCE, D. J.; BONNET, D.; DAVIES, D. (2006): *Out of the blue: a comparison of Hoechst side population (SP) analysis of murine bone marrow using 325, 363 and 407 nm excitation sources.* In: *J Immunol Methods*, Jg. 310, H. 1-2, S. 171–181.
- SMITH, L. J.; CURTIS, J. E.; MESSNER, H. A.; SENN, J. S.; FURTHMAYR, H.; MCCULLOCH, E. A. (1983): *Lineage infidelity in acute leukemia.* In: *Blood*, Jg. 61, H. 6, S. 1138–1145.
- STEENBERGEN, E. J.; VERHAGEN, O. J.; VAN LEEUWEN, E. F.; VAN DEN BERG, H.; BEHRENDT, H.; SLATER, R. M. ET AL. (1995): *Prolonged persistence of PCR-detectable minimal residual disease after diagnosis or first relapse predicts poor outcome in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia.* In: *Leukemia*, Jg. 9, H. 10, S. 1726–1734.
- STORMS, R. W.; GREEN, P. D.; SAFFORD, K. M.; NIEDZWIECKI, D.; COGLE, C. R.; COLVIN, O. M. ET AL. (2005): *Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34.* In: *Blood*, Jg. 106, H. 1, S. 95–102.
- STORMS, R. W.; TRUJILLO, A. P.; SPRINGER, J. B.; SHAH, L.; COLVIN, O. M.; LUDEMAN, S. M.; SMITH, C. (1999): *Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity.* In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jg. 96, H. 16, S. 9118–9123.
- SUTHERLAND, H. J.; BLAIR, A.; ZAPF, R. W. (1996): *Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells.* In: *Blood*, Jg. 87, H. 11, S. 4754–4761.

TELFORD, W. G.; BRADFORD, J.; GODFREY, W.; ROBNEY, R. W.; BATES, S. E. (2007): *Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye*. In: *Stem Cells*, Jg. 25, H. 4, S. 1029–1036.

TELFORD, W. G.; FROLOVA, E. G. (2004): *Discrimination of the Hoechst side population in mouse bone marrow with violet and near-ultraviolet laser diodes*. In: *Cytometry A*, Jg. 57, H. 1, S. 45–52.

VAN DONGEN, J. J.; SERIU, T.; PANZER-GRÄNYMAYER, E. R.; BIONDI, A.; PONGERS-WILLEMSE, M. J.; CORRAL, L. ET AL. (1998): *Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood*. In: *Lancet*, Jg. 352, H. 9142, S. 1731–1738.

VAN RHENEN, A.; FELLER, N.; KELDER, A.; WESTRA, A. H.; ROMBOUITS, E.; ZWEEGMAN, S. ET AL. (2005): *High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival*. In: *Clin Cancer Res*, Jg. 11, H. 18, S. 6520–6527.

VAN RHENEN, A.; MOSHAVER, B.; KELDER, A.; FELLER, N.; NIEUWINT, A. W.; ZWEEGMAN, S. ET AL. (2007): *Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission*. In: *Leukemia*, Jg. 21, H. 8, S. 1700–1707.

8. Anhang

8.1 Patientengut und Messergebnisse

Die Tabellen beinhalten lediglich diejenigen Patienten, die bei der Auswertung berücksichtigt wurden.

J = Jahr(e), M = Monat(e), T = Tag(e)

Kontroll-Patienten

Tab. 8.1: Kontrolle-Patientengut.

Interne Fallnummer #	Geschlecht	Alter bei Punktion	Diagnose
1	m	13 J	gesunder KM-Spender
2	w	14 J	Systemischer Lupus erythematodes
3	m	12 J	Juvenile idiopathische Arthritis
4	m	7 J	Reiter-Syndrom
5	w	30 J	Rheumatisches Fieber, (poststreptokokken)

Tab. 8.2: Kontrolle-Messergebnisse

#	ALDH ^{br}	CD 34 ⁺	34 ⁺ /38 ⁺	34 ⁺ /38 ⁺ /45 ^{dim}	ALDH ^{br} / 34 ⁺ /38 ⁺
1	3,58	4,72	0,03	0,03	0,02
2	7,64	12,93	0,21	0,2	0,19
3	7,05	12,43	0,08	0,08	0,06
4	8,15	7,6	0,08	0,08	0,06
5	8,21	2,26	0,05	0,03	0

ALL-Patienten

Tab. 8.3: ALL-Patientengut.

Interne Fallnummer #	Geschlecht	Diagnose	Alter bei ED	Rezidiv (Zeit n. ED)	Tod (Zeit n. ED)	sensitive Marker
2	w	ALL	19J 0M			3
3	w	ALL	7J 11M			4
4	m	ALL	4J 4M			4
5	w	ALL	2J 8M			4
6	w	ALL	3J 5M			2
7	m	ALL	16J 3M			4
8	w	ALL	2J 5M			4
9	m	ALL	14J 11M			2
10	w	ALL	15J 3M			1
11	m	ALL	4J 3M			3
12	m	ALL	6J 1M			4
13	m	ALL	13J 2M			2
15	w	ALL	5J 9M			2
19	m	ALL	1J 11M			2
20	m	ALL	14J 2M		12M	2
21	w	ALL	15J 2M			3
22	w	ALL	6J 7M			3
24	m	ALL	14J 5M	16M		2
25	m	ALL	9J 9M			1
26	w	ALL	3J 4M	3J 1M	4J 9M	2
27	m	ALL	5J 10M			2
28	w	ALL	9J 2M			3
29	m	ALL	14J 6M			1
30	w	ALL	5J 9M			3
31	m	ALL	2J 10M			2
33	w	ALL	1J 5M			2
34	m	ALL	13J 1M			2
35	w	ALL	11J 4M	5 M	1J 5M	2
36	m	ALL	15J 2M	1J 8M		2
37	m	ALL	5J 9M			2
38	m	ALL	3J 11M			2
39	m	ALL	15J 2M	8 M	9 M	2
40	m	ALL	7J 0M			2
42	w	ALL	5J 10M			1
43	m	ALL	3J 1M			2
45	m	ALL	6J 2M			3
46	w	ALL	6J 4M			2
47	m	ALL	13J 5M			1
48	m	ALL	5J 1M			1
49	w	ALL	9J 0M			3
55	m	ALL	24T			2
56	m	ALL	22T			2

Tab. 8.4: ALL-Messergebnisse.

#	MRD Tag 33	ALDH ^{br}	CD 34 ⁺	34 ⁺ /38 ⁻	34 ⁺ /38 ⁻ /45 ^{dim}	ALDH ^{br} / 34 ⁺ /38 ⁻
2	5	30,6	93,52	30,11	30,03	7,56
3	4	0,17	38,69	0,67	0,66	0,05
4	0	0,05	96,45	0,03	0,03	0
5	4	0,39	91,71	2,03	2,02	0,01
6	4	0,52	37,12	4,95	4,92	0,04
7	2	15,44	80,37	2,41	2,33	0,22
8	4	49,4	34,18	0,21	0,21	0,16
9	3	0,06	10,58	0,01	0,01	0,01
10	1	18,19	60,52	1,21	1,15	0,14
11	4	3,46	62,97	0,93	0,86	0,05
12	0	11,05	9,95	0,03	0,02	0,01
13	3	1,93	2,19	0,16	0,16	0,01
15	3	0,38	37,89	0,01	0,01	0,01
19	4	5,79	0,83	0,04	0,04	0,03
20	1	23,35	91,49	82,14	81,94	22,96
21	0	13,06	3,98	0,49	0,49	0,47
22	4	0,5	94,9	0,03	0,03	0,03
24	0	0,16	46,33	0,07	0,07	0,06
25	0	82,61	0,14	0,02	0,01	0,01
26	2	0,32	87,68	3,5	3,48	0,01
27	3	2,04	78,87	2,63	2,6	0,06
28	3	2,21	92	0,94	0,89	0,1
29	3	0,63	95,5	0,13	0,13	0,04
30	3	0,14	90,67	0,29	0,29	0,01
31	0	0,06	95,63	0	0	0
33	4	44,24	0,53	0,02	0,01	0,01
34	3	46,91	1,18	0,29	0,28	0,25
35	2	1,7	14,94	0,16	0,16	0,02
36	4	0,2	0,13	0	0	0
37	4	0,25	87,35	0,08	0,07	0,06
38	0	3,07	93,63	0	0	0
39	1	0,81	72,93	8,09	7,96	0,06
40	0	0,12	11,16	0,04	0,04	0,01
42	0	0,08	93,22	0,02	0,02	0,01
43	0	10,55	3,99	0,02	0,01	0,01
45	0	85,49	1,04	0,02	0,02	0
46	0	85,44	0,71	0,01	0,01	0
47	0	6,97	0,74	0,15	0,14	0,13
48	3	1,75	66,29	1,8	1,79	0,05
49	4	0,69	43,93	7,64	7,53	0,07
55	4	8,93	1,65	0,08	0,08	0,07
56	4	1,81	0,62	0,11	0,11	0,11

AML-Patienten

Tab. 8.5: AML-Patientengut

interne Fallnummer #	Geschlecht	Diagnose	Alter bei ED	Rezidiv (Zeit n. ED)	Tod (Zeit n. ED)
2	w	AML-M2	10J 3M		
3	w	AML extram.	2J 7M	1M	
4	m	AML-M4	4J 8M		3T
5	w	AML-M6	3M		
6	w	AML-M5	1J 3M	10M	
8	w	AML-M2	12J 10M	1J 9M	
9	m	AML-M6	12J 9M	2J 10M	3J 7M
10	w	AML-M0	9J 9M		
11	m	AML-M3	11M	7J 5M	
12	w	AML-M?	15J 5M		
13	m	AML-M0	13J 11M		7M
14	w	AML-M5	1J 9M		
18	m	AML-M7	1J 9M		
19	w	AML-M2	14J 8M		
20	m	AML-M1	14J 2M	1J 9M	
21	w	AML-M2	14J 2M	7M	12M
24	m	AML-M2	15J 3M		

Tab. 8.6: ALL-Messergebnisse

#	Ereignis	ALDH ^{br}	CD 34 ⁺	34 ⁺ /38 ⁻	34 ⁺ /38 ⁻ /45 ^{dim}	ALDH ^{br} / 34 ⁺ /38 ⁻
2		0,2	85,87	0,02	0,01	0
3	x	0,21	81,23	2,34	2,25	0,02
4	x	3,12	15,54	4,5	4,46	0,04
5		70,19	1,98	0,4	0,39	0,21
6	x	0,09	4,17	0,51	0,1	0,01
8	x	0,12	20,19	0,28	0,07	0
9	x	10,49	17,47	1,29	1,27	0,4
10		43,99	50,57	0,69	0,44	0,24
11	x	0,77	4,01	1,3	1,27	0,03
12		1,2	1,36	0,73	0,68	0,09
13	x	3,88	93,65	3,26	3,23	0,77
14		0,09	1,49	0,02	0,02	0,01
18		67,8	18,83	0,16	0,16	0,07
19		0,22	55,53	0,06	0,05	0,02
20	x	44,97	6,43	0,2	0,19	0,1
21	x	6,71	25,92	0,87	0,83	0,25
24		0,64	58,4	3,88	1,84	0,13

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Relative Häufigkeit onkologischer Erkrankungen	2
Abb. 1.2:	Stammzellen und Hämatopoese	7
Abb. 3.1:	Darstellung der Sidepopulation	26
Abb. 3.2:	ALDH ^{br} -Population	30
Abb. 3.3:	Schematische Darstellung der Filter und Detektoren	43
Abb. 3.4:	Gating	45
Abb. 3.5:	Auswertung.....	45
Abb. 3.6:	Streustrahlung am Beispiel von Aldefluor® und PE.	47
Abb. 3.7:	Verschiebung der ALDH ^{br} -Population	52
Abb. 3.8:	Setzen der Gates bei PE und APC.	53
Abb. 3.9:	Setzen der Gates bei Pacific Blue.....	53
Abb. 4.1:	Hoechst-Sidepopulation bei UV- Laser	56
Abb. 4.2:	Hoechst 33342 bei violetterm Laser, 620 nm LP-Filter.....	57
Abb. 4.3:	Hoechst 33342 bei violetterm Laser, 655nm LP-Filter.....	57
Abb. 4.4:	DCV bei violetterm Laser	58
Abb. 4.5:	Aldefluor®-Puffer vs. PBS.....	59
Abb. 4.6:	Vergleich von selbst- mit kommerziell konjugierten Antikörpern	60
Abb. 4.7:	Vergleich von PE und PE-Dy 590	61
Abb. 4.8:	Vergleich Pacific Blue mit Pacific Orange.	62
Abb. 4.9:	Vergleich von Alexa Fluor 700 und PE	63
Abb. 4.10:	ALL-Proben: Darstellung der Aldefluor®-Werte bezogen auf MNC	65
Abb. 4.11:	ALL-Proben: Darstellung des Anteils der CD34 ⁺ Zellen an den ALDH ^{br} -Zellen ..	66
Abb. 4.12:	ALL-Proben: Darstellung der CD34-Werte bezogen auf MNC.....	66
Abb. 4.13:	ALL-Proben: Korrelation zwischen ALDH ^{br} -Aktivität und CD34 ⁺ /CD38 ⁻ (ALDH ^{br} - Werte <1 %).	68
Abb. 4.14:	ALL-Proben: Korrelation zwischen ALDH ^{br} -Aktivität und MRD-Werten (ALDH ^{br} - Werte <1 %),	70
Abb. 4.15:	AML-Proben: Darstellung der Aldefluor®-Werte bezogen auf MNC.....	72
Abb. 4.16:	AML-Proben: Darstellung des Anteils der CD34 ⁺ Zellen an den ALDH ^{br} -Zellen ..	73
Abb. 4.17:	AML-Proben: Darstellung der CD34 Werte bezogen auf MNC.....	73
Abb. 4.18:	AML-Proben: Darstellung verschiedener Populationen als Anteil der MNC.....	74

Abb. 4.19: AML-Proben: Korrelation zwischen ALDH ^{br} -Aktivität und CD34 ⁺ /CD38 ⁻ (ALDH ^{br} -Werte <1 %)	75
Abb. 4.20: AML-Proben: Darstellung der Aldefluor®-Werte bezogen auf MNC	76
Abb. 4.21: AML-Proben: Darstellung der CD34-Werte bezogen auf MNC	77
Abb. 4.22: Vergleich der AML-Gruppen „ohne“ und „mit“ Ereignis im Bezug auf die Population CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CD45 ^{dim/neg}	77
Abb. 4.23: Verteilung der CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CD45 ^{dim/neg} -Werte innerhalb der beiden AML-Gruppen.....	78

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Allgemeine Geräte sowie Glas-und Kunststoff-Material	17
Tab. 2.2:	Allgemeine Chemikalien	19
Tab. 2.3:	Stammzellreagenzien	20
Tab. 2.4:	Konjugierte Antikörper, verwendet bei Analyse der Patientenproben	21
Tab. 2.5:	Konjugierte Antikörper, testweise verwendet bei Etablierung der Kombination	21
Tab. 2.6:	Monoklonale Antikörper, testweise verwendet bei Etablierung der Antikörper- Kombination	22
Tab. 2.7:	Fluorochrome, testweise verwendet bei Etablierung der Antikörper- Kombination	22
Tab. 2.8:	Lebend/Tot-Marker	22
Tab. 2.9:	Beads	23
Tab. 2.10:	EDV-Programme	23
Tab. 3.1:	Zellvolumina bei Aldefluor®-Färbung.....	48
Tab. 3.2:	Zellvolumina bei Antikörper-Färbung.....	49
Tab. 4.1:	MRD-Level bei ALL – Übertragung in lineare Skala	68
Tab. 4.2:	ALL-Ergebnisse: Korrelation von Aldefluor® mit MRD.....	69
Tab. 4.3:	ALL-Ergebnisse: Korrelation verschiedener Populationen mit MRD.....	71
Tab. 4.4:	AML-Ergebnisse: Analyse der klinischen Gruppen bezüglich Aldefluor®.....	76
Tab. 4.5:	AML-Ergebnisse: Analyse der klinischen Gruppen bezüglich verschiedener Populationen.....	78
Tab. 8.1:	Kontrolle-Patientengut.	101
Tab. 8.2:	Kontrolle-Messergebnisse	101
Tab. 8.3:	ALL-Patientengut.....	102
Tab. 8.4:	ALL-Messergebnisse.....	103
Tab. 8.5:	AML-Patientengut.	104
Tab. 8.6:	ALL-Messergebnisse.....	104

9. Vielen Dank!!

Mein Dank an dieser Stelle gilt zunächst Kai Witte und Iris Schäfer für die Einarbeitung, Begleitung und praktische Unterstützung im Labor über den gesamten Zeitraum der Arbeit. Danke für die wirklich freundschaftliche Atmosphäre in unzähligen Stunden gemeinsamer Arbeit und die vielen großen und kleinen Hilfestellungen.

Herzlicher Dank geht an Dr. Martin Ebinger für die Bereitstellung des Themas, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die inhaltliche Begleitung. Die stets freundliche Art und schnelle Beantwortung meiner Fragen, die Hilfestellungen beim Verfassen und besonders das Gefühl, mich immer auf ihn verlassen zu können, trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei und werden mir in positiver Erinnerung bleiben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Michael Schumm für unterstützende Ratschläge und dem gesamten Team des KMT-Labors der Kinderklinik Tübingen für die gute Zusammenarbeit sowie die vielen kleinen Dienste, die sie mir erwiesen haben. Ebenso bedanke ich mich beim freundlichen Personal des Routinelabors der Tübinger Kinderklinik für die Bereitstellung ihrer Geräte.

Für die Aufnahme in sein Institut bedanke ich mich bei Prof. Dr. R. Handgretinger und für die Annahme als Doktorand bei meinem Doktorvater PD. Dr. P. Lang.

Ein großes Dankeschön gilt allen, die auf unterschiedliche Art zum Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben, durch Ratschläge, Motivation oder einfach nur das Anhören meiner zwischenzeitlichen Klagen.

Dankeschön Franz und Petra, für das Korrekturlesen der vielen Seiten.

Danke Andreas, für die Rettung der fertigen Arbeit auf deiner Festplatte, als mein Computer gestohlen wurde.

Ein tiefer Dank richtet sich an meine Eltern, die mich in meinem Studium so lange unterstützt haben.

Danke an meinen himmlischen Vater, Gott und Freund, der immer da war und ist, der mein Leben so beschenkt und meine Hände und Gedanken so reichlich gesegnet hat.