

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und  
Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde I  
Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie  
und Onkologie  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

---

**Charakterisierung leukämischer Progenitorzellen im  
NOD/SCID-Mausmodell mittels Hoechst 33342**

---

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Reinhard Albrecht Hörrmann  
aus  
Schwäbisch Hall**

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. J. Lang

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. R. Salih



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Leukämie.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Einteilung der Leukämien .....	1
1.1.3 Epidemiologie akuter Leukämien im Kindesalter .....	2
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese.....	3
1.1.5 Diagnostik.....	3
1.1.6 Therapie der akuten Leukämie .....	4
1.2 Hämatopoetische Stammzellen (HSC).....	7
1.2.1 Eigenschaften von hämatopoetischen Stammzellen .....	7
1.2.2 Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen.....	9
1.3 Leukämische Stammzellen (LSC) .....	12
1.3.1 Erklärungsmodelle für die Entstehung einer Leukämie.....	13
1.3.2 Rolle der leukämischen Progenitorzellen bei der Therapie.....	16
1.3.3 Identifizierung der leukämischen Stammzellen.....	17
1.4 Das Xenotransplantationsmodell.....	19
1.5 Studienziel.....	20
<b>2 Patienten/ Mäuse und Material.....</b>	<b>22</b>
2.1 Herkunft der Leukämieproben und Einschlusskriterien .....	22
2.2 Versuchstiere .....	23
2.3 Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	23
2.4 Allgemeine Chemikalien.....	24
2.5 Stammlösungen .....	25
2.6 Stammzellreagenzien, Antikörper und Fluorochrome sowie Lebend-Tod-Marker .....	26
2.6.1 Stammzellreagenzien .....	26
2.6.2 Antikörper und Fluorochrome .....	26
2.6.3 Lebend-Tot-Marker .....	28
2.7 EDV-Software .....	28

<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1	Gewinnung und Aufbereitung von leukämischen Zellen vom Patienten .....	29
3.2	Aufbereitung der leukämischen Zellen aus der Maus .....	30
3.3	Dichtegradientenzentrifugation.....	30
3.4	Durchflusszytometrie.....	32
3.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie .....	32
3.4.2	Aufbau des Gerätes und Messtechnik.....	32
3.4.3	Konfiguration des LSR II Durchflusszytometers .....	33
3.4.4	Kompensation und Kalibrierung am LSR II Durchflusszytometer .....	35
3.5	Hoechst 33342 .....	37
3.5.1	Herstellung von Hoechst.....	37
3.5.2	Hoechst-Wirkung .....	37
3.6	Hoechst- und Antikörperfärbung .....	38
3.7	Verapamil-Färbung.....	39
3.8	Auswahl der zu färbenden Antikörper .....	39
3.9	Lebend-Tod-Färbung .....	40
3.10	Auswertung der Daten.....	41
3.11	Statistik.....	42
3.11.1	T-Test .....	42
3.11.2	Pearson-Korrelation.....	42
3.11.3	P-Wert .....	43
3.11.4	Varianzanalyse .....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisteil.....</b>	<b>44</b>
4.1	Auswertung der Proben.....	44
4.1.1	Gatingschritte.....	44
4.1.1.1	Aufreinigung der Zellen .....	44
4.1.1.2	Auftrennung der Zellen.....	46
4.1.1.3	Aufreinigung der Zellpopulationen.....	50
4.1.1.4	Darstellung der SP .....	50
4.1.1.5	Vergleich der SP mit CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> -Zellen .....	51
4.2	Einfluss der Leukämieart auf die leukämische SP .....	53
4.3	Einfluss des Mausmodells auf die leukämischen Zellen.....	54

4.3.1	Korrelation der SP aus murinem Knochenmark und Milz mit der SP aus Primärmaterial .....	54
4.3.2	Verlauf der SP während serieller Mastransplantationen .....	56
4.3.3	Korrelation der leukämischen SP aus der Maus mit der SP der Mäusezellen.....	58
4.4	Analyse der leukämischen Zellen, insbesondere der leukämischen Progenitorzellen.....	60
4.4.1	Vergleich der leukämischen SP aus dem Knochenmark mit der leukämischen SP aus der Milz der Maus .....	60
4.4.2	Korrelation der SP mit den CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> -Zellen .....	63
4.4.3	Einfluss der Engraftmentrate auf die SP.....	66
4.4.4	Unterschiede des Engraftment im Knochenmark und Milz der Maus.....	67
4.4.5	Einfluss der Anwachsdauer auf die leukämischen Zellen .....	68
4.4.5.1	Vergleich des Engraftment mit der Anwachsdauer .....	69
4.4.5.2	Vergleich der SP mit der Anwachsdauer.....	70
4.4.5.3	Vergleich der Anwachsdauer mit CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> -Zellen .....	70
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	71
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>74</b>
5.1	Einführung.....	74
5.2	Einflussfaktoren der zugrundeliegenden Leukämieart.....	78
5.3	Einflussfaktoren des Mausmodells .....	80
5.3.1	Korrelation der SP aus murinem Knochenmark und Milz mit der SP aus Primärmaterial .....	80
5.3.2	Korrelation der leukämischen SP mit der Transplantationshäufigkeit und der murinen SP.....	81
5.3.3	Allgemeine Beurteilung.....	82
5.4	Analyse der leukämischen Zellen.....	82
5.4.1	Vergleich des Engraftment und der SP aus dem Knochenmark mit der SP aus der Milz der Maus .....	82
5.4.2	Korrelation der SP mit CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> -Zellen .....	83
5.4.3	Einfluss der Engraftmentrate und der Anwachsdauer der Leukämie auf die leukämischen Zellen.....	84
5.5	Ausblick.....	85
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>

<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>96</b>
8.1	Eingeschlossene Patienten .....	96
8.2	Messergebnisse .....	98
8.3	Auswerteblatt (Worksheet) .....	103
8.4	Abbildungsverzeichnis.....	105
8.5	Tabellenverzeichnis.....	106
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>107</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>109</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>AF</b>	<b>AlexaFluor</b>
<b>AK</b>	<b>Antikörper</b>
<b>ALDH</b>	<b>Aldehyd-Dehydrogenase</b>
<b>ALL</b>	<b>akute lymphatische Leukämie</b>
<b>AML</b>	<b>akute myeloische Leukämie</b>
<b>APC</b>	<b>Allophycocyanin</b>
<b>B-ALL</b>	<b>B-Linien-ALL</b>
<b>CD</b>	<b>cluster of differentiation</b>
<b>CFU</b>	<b>colony forming unit</b>
<b>CLL-1</b>	<b>C-type lectin-like molecule-1</b>
<b>DNA</b>	<b>Desoxyribonukleinsäure</b>
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimethylsulfoxid</b>
<b>ED</b>	<b>Erstdiagnose</b>
<b>FACS</b>	<b>fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie</b>
<b>FSC</b>	<b>forward scatter</b>
<b>FITC</b>	<b>Fluoresceinisothiocyanat</b>
<b>FMO</b>	<b>Fluorescence minus one</b>
<b>HSC</b>	<b>hämatopoetische Stammzelle</b>
<b>KM</b>	<b>Knochenmark</b>
<b>LSC</b>	<b>leukämische Stammzelle</b>
<b>LSP</b>	<b>leucemic side population</b>



<b>MHC</b>	<b>Major Histocompatibility Complexes</b>
<b>MNC</b>	<b>mononukleäre Zelle</b>
<b>MRD</b>	<b>minimal residual disease</b>
<b>NK-Zellen</b>	<b>natürliche Killerzellen</b>
<b>NOD/SCID</b>	<b>non obese diabetic/severe combined immunodeficiency</b>
<b>PB</b>	<b>Pacific Blue</b>
<b>PE</b>	<b>Phycoerythrin</b>
<b>PerCP</b>	<b>Peridinin-Chlorophyll-Protein</b>
<b>PI</b>	<b>Propidium Iodid</b>
<b>RT</b>	<b>Raumtemperatur</b>
<b>SP</b>	<b>side population</b>
<b>SPF</b>	<b>spezifiziert pathogenfrei</b>
<b>SSC</b>	<b>side scatter</b>
<b>ZNS</b>	<b>zentrales Nervensystem</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Leukämie**

### **1.1.1 Definition**

Der Begriff Leukämie (griechisch: leukós - weiß und haima - das Blut) wurde 1845 von Virchow geprägt und bezeichnet eine Erkrankung des blutbildenden Systems. Dabei findet eine autonome ungehemmte Proliferation eines maligne transformierten Leukozyten statt. Durch die starke Expansion eines malignen Zellklons kommt es zur generalisierten Ausbreitung im blutbildenden Knochenmark. Dies kann zur Ausschwemmung von teilweise oder komplett unreifen Leukozyten vom Knochenmark ins Blut führen, mit eventueller Infiltration verschiedener Organe des lymphatischen Systems (z.B. Lymphknoten, Milz oder Mandeln) oder des Körpergewebes (Sitzmann 2007).

### **1.1.2 Einteilung der Leukämien**

Leukämien lassen sich zum einen nach der Schnelligkeit ihres Verlaufs einteilen: Akute Leukämien entwickeln sich rasch und gehen mit schweren Symptomen und Fieber einher. Chronische Leukämien entwickeln sich hingegen meist langsam, wobei anfangs nur selten Symptome bemerkbar sind.

Zum anderen werden Leukämien nach dem entarteten Zelltyp eingeteilt. Sind die Zelltypen der myeloischen Reihe betroffen (Zellen aus der Monozytopoese, Granulozytopoese, Erythropoese oder der Thrombozytopoese), handelt es sich um eine myeloische Leukämie. Wenn Zellen aus der Lymphozytopoese entarten, spricht man von einer lymphatische Leukämie.

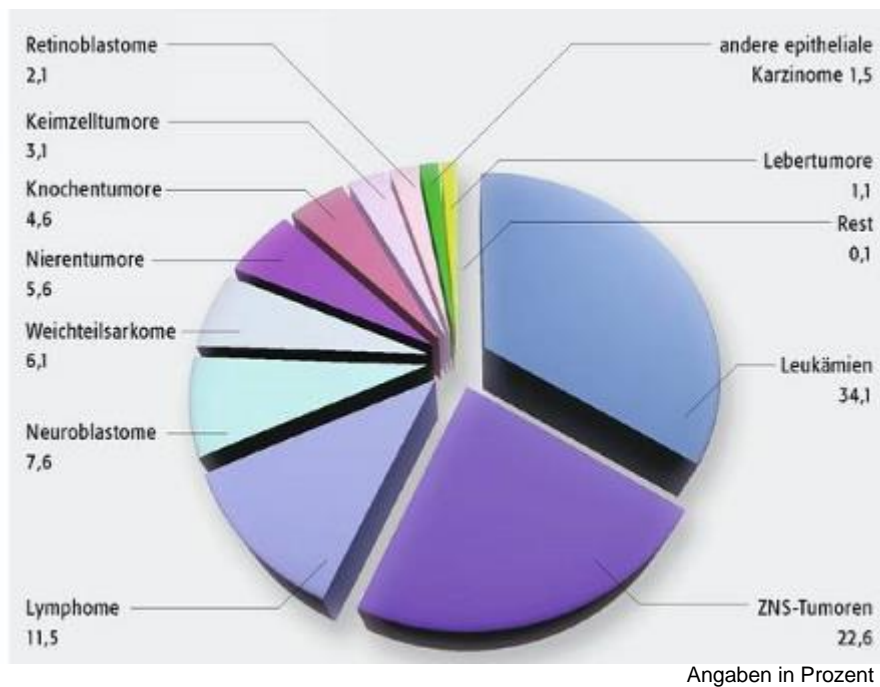
Daher gibt es 4 Krankheitsgruppen:

1. Akute lymphatische Leukämie (ALL)
2. Akute myeloische Leukämie (AML)
3. Chronisch myeloische Leukämie (CML)
4. Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Im Folgenden wird nur auf die akuten Leukämien im Kindesalter eingegangen, da sich die Arbeit nur auf diese bezieht.

### 1.1.3 Epidemiologie akuter Leukämien im Kindesalter

Mit einem Anteil von 35-40 % an den kindlichen Malignomen sind Leukämien die häufigsten bösartigen Erkrankungen im Kindesalter. Unter diesen Leukämien bei Kindern haben die akuten lymphatischen Leukämien einen Anteil von etwa 80%, die der akuten myeloischen von etwa 18 % und die chronisch myeloischen von etwa 2%. Die chronisch lymphatische Leukämie kommt bei Kindern praktisch nicht vor. Bei Erwachsenen macht die ALL weniger als 15 % aller akuten Leukämien aus. Dies bedeutet, dass über 85 % aller akuten Leukämien beim Erwachsenen myeloischen Ursprungs sind.



**Abbildung 1: Die häufigsten Krebserkrankungen bei Kindern**

Die häufigsten Krebserkrankungen bei Kindern unter 15 Jahren in Deutschland (1998 bis 2007). In diesem Zeitraum wurden im deutschen Kinderkrebsregister 18 217 Patienten erfasst (Quelle: Kinderkrebsregister Deutschland).

Bezogen auf alle Altersgruppen liegt die Inzidenz für akute Leukämien bei 1,5 Neuerkrankungen/100.000 im Jahr, wobei die Verteilung über die Altersgruppen ein ganz anderes Bild ergibt. Im Kindesalter zeigt sich ein deutlicher Gipfel (5,4/100.000 bei Kindern unter 15 Jahren) (Deutsches Kinderkrebsregister).

#### 1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Was genau die Ursachen für Leukämien sind, wird bis heute kontrovers diskutiert. Mehrere prädisponierende Faktoren sind bekannt. Diese Faktoren, die das Risiko, an einer Leukämie zu erkranken, nachweislich um ein Vielfaches erhöhen, umfassen unterschiedliche Einflüsse:

- Knochenmarksschädigungen durch Benzol, Zytostatika oder ionisierende Strahlung.
- Biologische Faktoren: bestimmte bakterielle und virale Infektionen (Buffler 2005).
- Genetische Faktoren: Erhöhtes Vorkommen der akuten Leukämie bei Trisomie 21 oder Klinefelter-Syndrom (Buffler 2005, Ross 2005).
- Entwicklung einer akuten Leukämie aus bestimmten Erkrankungen der Hämatopoese wie z.B. aus einem MDS (myelodysplastisches Syndrom), einer aplastischen Anämie oder einer myeloproliferativen Erkrankung (Osteomyelofibrose, Polycythaemia vera).

Beispielsweise stellt man sich die Pathogenese für den ersten Punkt wie folgt vor: Eine kausale Noxe (z.B. Knochenmarksschädigung durch ionisierende Strahlung) verursacht genetische Schäden in der Zelle. Dadurch kommt es zu einer neoplastischen Transformation der hämatopoetischen Stammzelle und einem unkontrollierten Wachstum unreifer hämatopoetischer Zellen (Blasten), die die normale Hämatopoese im Knochenmark verdrängen. Die klinische Symptomatik resultiert aus einer progredienten Knochenmarkinsuffizienz, wie z.B. Anämie, Thrombozytopenie oder Granulozytopenie. Sie äußert sich u.a. durch allgemeine Schwäche, Leistungsknick, Abgeschlagenheit, Spontanblutungen oder Hepatosplenomegalie.

#### 1.1.5 Diagnostik

Eine Verdachtsdiagnose kann oft schon aufgrund der klinischen Symptomatik gestellt werden. Die wichtigsten Untersuchungsschritte zum Nachweis einer Leukämie sind die körperliche Untersuchung, die Blutuntersuchung und die Knochenmarksuntersuchung.

Ausschlaggebend für die Wahl der Behandlung ist die Knochenmarksuntersuchung, da durch diese sehr genau festgestellt werden kann, an welcher Art von Leukämie der Patient erkrankt ist. Zu der Knochenmarksuntersuchung gehört die Beurteilung der Zytomorphologie der leukämischen Zellen durch eine mikroskopische Untersuchung und die Immunphänotypisierung, bei der mittels Durchflusszytometrie die Oberflächenmerkmale der leukämischen Zellen untersucht werden können (siehe 3.4).

### **1.1.6 Therapie der akuten Leukämie**

Da es sich bei der akuten Leukämie um eine lebensbedrohliche Erkrankung handelt, ist umgehend mit einer Therapie zu beginnen. Bereits bestehende Komplikationen, wie zum Beispiel Blutungen oder Infektionen, müssen jedoch zuerst oder parallel behandelt werden. Behandlungsziel ist die vollständige Vernichtung der gesamten Leukämiezellpopulation und somit die Heilung des Patienten (Sitzmann 2007).

Vor Beginn der Behandlung muss eine ausführliche Diagnostik erfolgen, da sich die Therapie der Leukämie dem Leukämietyp anpasst (Gutjahr 2003). Dazu gehört eine genetische und immunzytologische Diagnostik sowie die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis durch eine Lumbalpunktion und eine eventuell zusätzliche Magnetresonanztomographie-Untersuchung (MRT) des Zentralnervensystems (ZNS). Unmittelbar anschließend sollte die Behandlung begonnen werden. Dabei werden Kombinationen von Chemotherapeutika gegeben. Die Behandlung der akuten Leukämie erfolgt dann in mehreren Phasen (Gökbuget 2007):

1. Induktionsphase
2. Konsolidierungsphase
3. Re-Intensivierungsphase
4. Erhaltungstherapie

Die Induktionsphase, welche bei einem unkomplizierten Verlauf über 4 bis 6 Wochen durchgeführt wird, hat das Ziel einer kompletten Remission. Das heißt, die Blasten wurden so zurückgedrängt, dass sie am Ende der Induktionsphase

in der Knochenmarkpunktion mikroskopisch nicht mehr nachzuweisen sind (<5 % Blasten im Knochenmark).

Ziel der weiteren Phasen ist eine Remissionserhaltung. Obwohl die Leukämie mit den herkömmlichen Methoden nicht mehr nachweisbar ist, wird die Behandlung fortgesetzt, da ansonsten das Risiko eines frühen Rückfalls (Rezidiv) zu hoch wäre. An die Induktionsphase schließt sich die Konsolidierungsphase an, in der eine andere Medikamentenkombination von Zytostatika verabreicht wird, um die Blastenlast weiter zu senken. Anschließend wird dann die Re-Induktionstherapie (Re-Intensivierungsphase) durchgeführt. Diese Behandlung soll die Blasten weiter bekämpfen und dadurch das Rückfallrisiko reduzieren.

Induktions-, Konsolidierungs- und Re-Intensivierungsphase werden auch als Intensivphase der Behandlung bezeichnet. Diese Intensivphase dauert je nach Risikofaktoren und Komplikationen zwischen 6 und 12 Monaten.

Um das Rückfallrisiko so gering wie nur möglich zu halten, wird anschließend an die Intensivtherapie eine Erhaltungstherapie über einen Zeitraum von bis zu 24 Monaten nach Diagnosestellung durchgeführt. Diese Therapie soll diejenigen Zellen bekämpfen, die von der Intensivtherapie nicht abgetötet wurden, da sie sich zu diesem Zeitpunkt in der Ruhephase des Zellzyklus befunden haben. Die Erhaltungstherapie erfolgt mittels einer niedrigdosierten oralen Chemotherapie und greift die leukämischen Blasten an, sobald diese aus der Ruhephase in die Proliferationsphase eintreten.

Zusätzlich zu dieser eigentlichen Leukämiebehandlung müssen auch die daraus resultierenden möglichen Nebenwirkungen durch eine Supportivtherapie behandelt werden. Mögliche Komplikationen sind Blutungen, die mit Gabe von Thrombozytenkonzentrat und Frischplasma behandelt werden können, oder Infektionen, die dann durch Gabe von Antibiotika bei bakteriellen Infektionen und Gabe von Antimykotika bei Pilzinfektionen behandelt werden (Sitzmann 2007).

Bei einer ALL ist eine zusätzliche Behandlung des ZNS notwendig, um mögliche ZNS-Rezidive zu vermeiden, da die meisten Zytostatika die Bluthirnschranke nur schlecht oder gar nicht überwinden können. Bei Patienten mit gesicher-

tem Befall des ZNS zu Anfang der Behandlung oder mit mehr als 100.000 Blasten pro Mikroliter im peripheren Blut wird heutzutage noch eine ZNS-Bestrahlung durchgeführt. Bei allen anderen Patienten wird eine ZNS-Prophylaxe durch eine intrathekale Gabe von Zytostatika (i.d.R. Methotrexat) gemacht, da die ZNS-Bestrahlung bei Kindern und Jugendlichen oft Spätschäden hervorrufen kann (Langer 2002). Bei ausgewählten Hochrisikopatienten sollte eine Knochenmarktransplantation stattfinden, wenn die Patienten in erster Remission sind.

Von elementarer Bedeutung für die Entscheidung der Therapieansätze und Intensitäten der Chemotherapie sind neben der gründlichen Diagnosestellung die Abschätzung der Risikofaktoren und die Kontrolle des Therapieerfolgs. Etablierte Risikofaktoren sind die Höhe der Blastenzahl bei Diagnosestellung, genetische Nachweise von Fusionsgenen (wie z.B. des BCR-ABL-Fusionsgens, MLL-Fusionsgens) oder Translokationen, verzögertes Ansprechen auf die Therapie oder ZNS-Befall bei der ALL (Gutjahr 2003).

Um den Therapieerfolg zu beurteilen, hat sich mittlerweile die Messung der Minimal residual disease (MRD) etabliert. Mit diesem molekular- und zellbiologischen Verfahren können sehr niedrige Anteile an Leukämiezellen nachgewiesen werden, die man mit den herkömmlichen Untersuchungen, wie zum Beispiel der Knochenmarkpunktion, nicht mehr nachweisen kann. Es hat sich gezeigt, dass die im Verlauf gemessene Höhe der MRD-Last mit der Rückfallwahrscheinlichkeit korreliert (Steenbergen 1995). So kann man anhand der MRD-Last entscheiden, wie aggressiv und lange man die Behandlung wählen sollte (Brüggemann 2006, Nyvold 2002).

Die Prognose ist bei einer ALL in Abhängigkeit von den oben genannten Risikofaktoren und der durchgeführten Therapie gut. Die Rate kompletter Remission liegt bei 95 % und die 5-Jahres Überlebensrate bei 80 %. Die Prognose der AML ist etwas schlechter als die der ALL. Die 5-Jahres Überlebensrate liegt bei einer AML bei 60 %, wobei die Rate der Komplettremission 80 % beträgt.

## 1.2 Hämatopoetische Stammzellen (HSC)

Täglich müssen ca.  $2 \times 10^{11}$  Erythrozyten und  $10^{10}$  Lymphozyten beim Erwachsenen neu gebildet werden (Hämatopoese). Dies ist nötig, um eine konstante Anzahl von Blutzellen aufrechtzuerhalten, da viele Blutzellen nur eine kurze Überlebensdauer haben. Terminal ausdifferenzierte Blutzellen haben nicht die Möglichkeit sich selbst zu vermehren, da sie nur ein stark eingeschränktes Proliferationspotenzial haben. Da der menschliche Körper aber auf die Neubildung der zugrunde gehenden Blutzellen angewiesen ist, gibt es im Knochenmark hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (Progenitorzellen), die für die stetige Neubildung der neuen Blutzellen verantwortlich sind.

### 1.2.1 Eigenschaften von hämatopoetischen Stammzellen

Der erste experimentelle Nachweis von HSC gelang Till and McCulloch 1961. Sie zeigten, dass Knochenmarkszellen dazu fähig sind, myelo-erythroide Populationen zu bilden und wieder ein Immunsystem aufzubauen (Till 1961, Spangrude 1988).

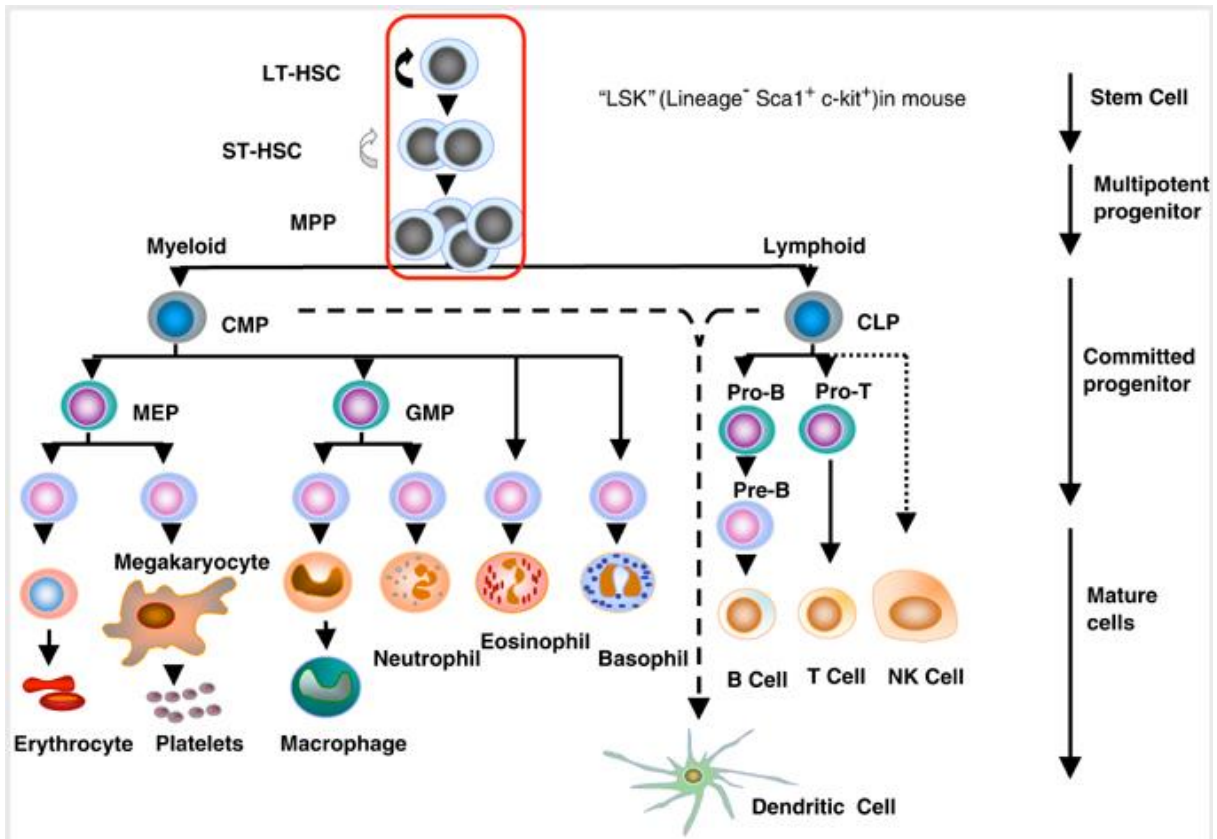
Hämatopoetische Stammzellen besitzen also die Fähigkeit, sowohl sich selbst zu erneuern und damit ein Leben lang ihre eigene Anzahl konstant zu halten, als auch sich in alle hämatopoetischen Zelllinien zu differenzieren (Ahmed 2007).

Auf dem Weg der HSC zu der ausdifferenzierten Blutzelle (z.B. Erythrozyt, T-Zellen, B-Zellen oder Mastzellen) durchlaufen sie verschiedene Vorläuferstadien (Abbildung 2). Ausgehend von Zellen mit multiplem Differenzierungspotenzial entwickeln sie sich zu unipotenten Vorläuferzellen, aus denen nur noch eine Zelllinie entstehen kann. Die HSC stellen einen sehr kleinen Anteil von Zellen im Knochenmark dar (nur ca. 0,05 %) (Morrison 1995). Als Erstes verlieren sie während der Differenzierung ihre Eigenschaft zur lebenslangen Selbsterneuerung, dagegen steigt aber die Proliferationsrate der entstehenden Vorläuferzellen (Progenitorzellen) stark an, was zu der enormen Expansionsfähigkeit von Blutzellen führt.



HSC können sich entweder symmetrisch oder asymmetrisch teilen. Symmetrisch bedeutet, dass zwei neue HSC entstehen. Asymmetrisch bedeutet, dass bei der Teilung eine pluripotente Tochterzelle entsteht, welche wieder die Möglichkeit hat, sich zu allen Blutzellen zu entwickeln und eine Progenitorzelle, die die Fähigkeit zur klonalen Expansion besitzt, was die Aufrechterhaltung der zirkulierenden Blutpopulation bedeutet. Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung hingegen geht ihr verloren. Sowohl die lymphoide (B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen) als auch die myeloide Linie (Granulozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Erythrozyten) entstehen somit aus den gleichen Vorläuferzellen. Oligopotente Stammzellen hingegen sind schon so weit ausdifferenziert, dass sie sich nur noch in Zellen einer Linie ausdifferenzieren können (lymphoide oder myeloide Linie). Dieser Prozess wird durch Faktoren aus dem zellulären Umfeld im Knochenmark bestimmt (auch Stammzellnische bezeichnet) (Heissig 2005). Dieses besteht aus einer Mischung von Stroma- und Endothelzellen, Osteoblasten und Adipozyten. Es spielen sowohl Zell-Zell-Kontakte, Zytokine und Kontakte zur extrazellulären Matrix eine Rolle (Moore 2006).

Außerdem lassen sich HSC anhand ihrer Teilungsaktivität in pluripotente Langzeit-HSC (LT (long-term) - HSC) und pluripotente transiente ST (short-term) - HSC einteilen. Langzeit HSC (Langzeitstammzellen) können das blutbildende System ein Leben lang aufrechterhalten (Rieger 2007, Sauerzweig 2008). Sie teilen sich nur sehr langsam und befinden sich zumeist in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus, in der sogenannten Ruhephase. Dies wird auch als Quieszenz bezeichnet. In dieser Phase teilen sich die Stammzellen nicht. Dieser Zustand stellt somit auch einen natürlichen Schutz gegen Substanzen dar, die in den Zellzyklus eingreifen (z.B. Zytostatika). Transiente HSC (Kurzzeitstammzellen) hingegen sind mitotisch viel aktiver als Langzeitstammzellen. Sie können sich schnell vermehren und ermöglichen so ein schnelles Wideranwachsen des hämatopoetischen Systems. Dies gelingt ihnen aber nur über wenige Wochen (Morrison 1994), da sie über ein geringes Selbsterneuerungspotential (self-renewal Potential) verfügen.



**Abbildung 2: Hämatopoese (Blutbildung)**

Hämatopoetische Stammzellen (LT-HSC und ST-HSC) entwickeln sich zu einer multipotenten Progenitorzelle (MPP) aus der gemeinsame Vorläuferzellen der lymphatischen und myeloiden Zelllinien hervorgehen (CLP: common lymphatic progenitor, CMP: common myeloid progenitor, MEP: megakaryocyte/erythroid progenitor, GMP: granulocyte-macrophage progenitor). Diese differenzieren dann zu reifen Zellen des peripheren Blutes aus (Larsson und Karlsson 2005).

### 1.2.2 Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen

Die Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen hat einen wichtigen Stellenwert, da man davon ausgeht, über dieselben Methoden auch leukämische Stammzellen identifizieren zu können (Siehe Punkt 1.3). Aufgrund der immer detaillierteren Charakterisierung ihrer Oberflächenantigene lassen sich die HSC zunehmend besser bzw. genauer nachweisen.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann man verschiedene Moleküle an der Zelloberfläche nachweisen, die systematisch als Cluster of Differentiation (CD) aufgegliedert sind. Dadurch kann man sowohl verschiedene Zellpopulationen, als auch differierende Entwicklungsstadien der verschiedenen Zellen nachweisen (Ahlers 2009). Um HSC zu identifizieren wird vor allem CD34 verwendet, da es sich zeigte, dass Zellpopulationen, die CD34 exprimieren, deutlich ver-

mehrt CFUs (colony forming units) besitzen. Für Zellen, die zusätzlich noch negativ für CD38 sind, konnte nachgewiesen werden, dass diese signifikant mehr Stammzeleigenschaften haben. Zusätzlich ist der Anteil an CFUs bei CD34<sup>+</sup> und CD38<sup>-</sup> Zellen um ca. das Vierfache erhöht gegenüber Zellen, die für CD34 und CD38 positiv sind (Conneally 1997). Es konnte gezeigt werden, dass CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen einer AML in einer nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) Maus angewachsen sind, während dies für CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> Zellen nicht möglich war (Bonnet 1997, Blair 1997).

Zur weiteren Selektion werden CD119, CD133 und Lineage-Marker verwendet. CD119 und CD133 sind vor allem auf bereits weit ausgereiften zu finden. Lineage-Marker sind nur auf Zellen vorhanden, die bereits für eine Zelllinie festgelegt sind. Somit lässt sich zusammenfassen, dass Stammzellen lange Zeit als CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> und lin<sup>-</sup> definiert wurden (Goodell 1997).

Jedoch auch schon 1997 konnte Goodell nachweisen, dass es HCS gibt, die CD34<sup>-</sup> sind, aber dennoch die Möglichkeit zur Koloniebildung besitzen. Ein Engraftment in der Maus von humanen leukämischen Zellen gelang jedoch nur mit CD34<sup>+</sup> Zellen. Mit CD34<sup>-</sup> Zellen war dies nicht möglich. In der Maus konnte man auch nachweisen, dass HSC durch Stimulation von Zytokinen (Tajima 2000) oder Interleukin 11 (Sato 1999) beginnen, CD34 an ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Zustand aktueller Diskussion ist, ob auch beim Mensch die Expression von CD34 von verschiedenen Einflüssen abhängt, beispielsweise vom Zustand der Aktivierung von HSC oder viel mehr vom Grad der Differenzierung, also der Naivität (Ishikawa 2003).

In der Praxis werden heute zur Stammzellgewinnung die Blutzellen auf CD34<sup>+</sup> selektiert, obwohl es auch Hinweise darauf gibt, dass es CD34<sup>-</sup> Zellen gibt, die die Fähigkeit zur Koloniebildung besitzen. Seit vielen Jahren werden so erfolgreich Stammzelltransplantationen durchgeführt, obwohl die CD34<sup>+</sup> Zellen eine sehr heterogene Gruppe von Zellen sind. Diese Zellen weisen ein ausreichend großes Potential auf, das Blutbildungssystem nach Chemotherapie zu erneuern und aufrecht zu erhalten, obwohl es eventuell noch naivere Zellen gibt (Ogawa 2002).

Ziel der aktuellen Forschung ist es, weitere Marker zu finden, welche die Population der HSC besser identifiziert und weiter eingrenzt. Dazu zählen insbesondere Untersuchungen von enzymatischen Eigenschaften der Stammzellen. Von großer Bedeutung ist vor allem die Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342. Dieser Farbstoff war lange als Zellzyklusmarker bekannt, bevor ihn Goodell et al. 1996 das erste Mal dazu benutzte, hämatopoetische Stammzellen zu identifizieren. Der Farbstoff bindet im Zellkern an DNA. Zellen mit Stammzeleigenschaften haben die Möglichkeit, diesen Farbstoff über spezielle Transporterproteine an der Zellmembran aus der Zelle zu transportieren (You 2006). Diese Zellen, die den Farbstoff über aktiven Efflux ausscheiden können, werden als Side population (SP) bezeichnet und können darüber identifiziert werden, dass sie weniger stark den Farbstoff Hoechst anreichern. Da nur Zellen mit Stammzeleigenschaften diese Transporterproteine besitzen, geht man davon aus, dass in der SP-Zellpopulation Zellen stark angereichert sind, die Eigenschaften von HSC aufweisen. Man konnte zeigen, dass die meisten Zellen der SP CD34<sup>-</sup> sind und genau diese die Fähigkeit zur Langzeit-Koloniebildung besitzen. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass diese Zellen bislang nicht mit Oberflächenmarkern zu identifizieren waren und somit als sehr naive LT-HSC betrachtet werden (Goodell 1996).

Eine andere Möglichkeit, HSC über ihre enzymatischen Eigenschaften zu identifizieren, ist die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH). Dies ist ein Enzym im Zytosol der Zelle, das die Aufgabe hat, intrazelluläre Aldehyde und Vitamin A zu oxidieren. Man geht davon aus, dass dieses Enzym ebenfalls eine wichtige Rolle für Resistenzen gegen Chemotherapeutika spielt, insbesondere von Cyclophosphamiden (Wang JS 2001, Duester G 2000). In HSC konnte eine erhöhte Aktivität dieser ALDH nachgewiesen werden (Kastan 1990). Zur Messung werden die Zellen mit einem Substrat der ALDH, Aldefluor®, inkubiert. Dies wird durch das Enzym umgesetzt und akkumuliert dann im Zellinneren. Die Akkumulation kann durch Farbumschlag per FACS-Analyse quantitativ untersucht werden (Storms 1999).

Pearce et al. zeigten 2005, dass die meisten der Lin<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup> Zellen positiv für ALDH sind. Sie wiesen ebenfalls nach, dass es eine signifikante Zellzahl von

CD34<sup>+</sup> Zellen gibt, die ebenfalls eine stark erhöhte ALDH-Aktivität besitzen, aber nicht den typischen CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> Phänotyp aufweisen. Dies bedeutet, dass durch die Analyse der ALDH-Aktivität bis jetzt unidentifizierte CD34<sup>+</sup> Stammzellen isoliert werden können (Pearce 2005). Ebenfalls zeigte sich bei Untersuchungen von Nabelschnurblut eine Population von Lin<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD38<sup>-</sup> Zellen, welche die Fähigkeiten besitzen, Langzeitkolonien zu bilden, wenn diese zusätzlich für ALDH positiv waren. Unter den Zellen, die Lin<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD38<sup>-</sup> und für ALDH<sup>-</sup> waren, wurden keine Langzeit-HSC gefunden. Durch die Untersuchung der ALDH-Aktivität lassen sich also primitive HSC finden, welche für CD34 negativ sind (Pearce 2005).

Diese zwei Methoden (Hoechst und ALDH) dienen dazu, HSC über deren spezielle enzymatische Eigenschaften zu identifizieren. Daher wurde angenommen, dass beide Methoden ähnliche Zellen nachweisen. Vor allem CD34<sup>-</sup> Zellen standen dabei im Fokus, da, wie zuvor beschrieben, über beide Methoden CD34<sup>-</sup> HSC zu identifizieren sind. Daraufhin wurden in Nabelschnurblut sowohl mit Hoechst als auch über die Untersuchung der ALDH-Aktivität naive HSC identifiziert und diese auf die Expression von CD34 untersucht. Dabei fiel auf, dass es lediglich bei den CD34<sup>+</sup> Zellen Überlappungen gab. Für die jeweils identifizierte CD34<sup>-</sup> Population konnte man keine Übereinstimmung finden (Pearce 2007).

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass es mehrere Ansätze gibt, um HSC zu identifizieren. Die verschiedenen Methoden weisen unterschiedliche HSC-Populationen nach. Die Standardselektion auf CD34<sup>+</sup> und CD38<sup>-</sup> Zellen, welche mit Erfolg für die Knochenmarktransplantation verwendet wird, identifiziert mit Sicherheit nicht alle HSC. Ob die Messung spezifischer enzymatischer Eigenschaften von HSC eine bessere Alternative für die Identifikation von Stammzellen darstellt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Auch hier lassen sich bis jetzt keine einheitlichen Populationen von HSC darstellen.

### **1.3 Leukämische Stammzellen (LSC)**

Seit über 50 Jahren ist bekannt, dass leukämische Zellen die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erneuern und stark zu proliferieren. In in-vitro-Versuchen

konnte dies nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass nicht alle leukämischen Zellen die Fähigkeit zur Koloniebildung besitzen. Nur eine von 10.000 bis eine von 100 leukämischen Zellen ist in der Lage, in vitro Kolonien zu bilden (Bruce 1963, Park 1971). Daraus wurde geschlossen, dass es wenige Zellen geben muss, die die Leukämie unterhalten (Bonnet 1997, Blair 1997). Diese Zellen müssen also leukämische Zellen mit Stammzeleigenschaften sein.

Man geht davon aus, dass eine Leukämie aus reifen leukämischen Zellen (Blasten) und leukämischen Stammzellen besteht. Die LSC haben ähnliche Eigenschaften wie die HSC. Das bedeutet, sie sind quieszent und haben die Fähigkeit zur Koloniebildung und Selbsterneuerung (Jordan 2004).

### **1.3.1 Erklärungsmodelle für die Entstehung einer Leukämie**

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Entstehung einer Leukämie vergleichbar ist mit der physiologischen Hämatopoese. Dies setzt wie unter 1.3 beschrieben voraus, dass die LSC ähnliche Eigenschaften wie HSC besitzen müssen. Der Auslöser der Erkrankung wurde in der Mutation einer HSC gesehen. Die dadurch entstandene LSC besitzt nun dieselben Eigenschaften einer HSC, das heißt, sie ist fähig zur Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung. Diese LSC differenziert zur leukämischen Zelle (leucemic blast) aus, analog zu den HSC, welche sich über Progenitorzellen zu normalen, funktionsfähigen Blutzellen entwickeln (Jordan 2004) (siehe Abbildung 3).

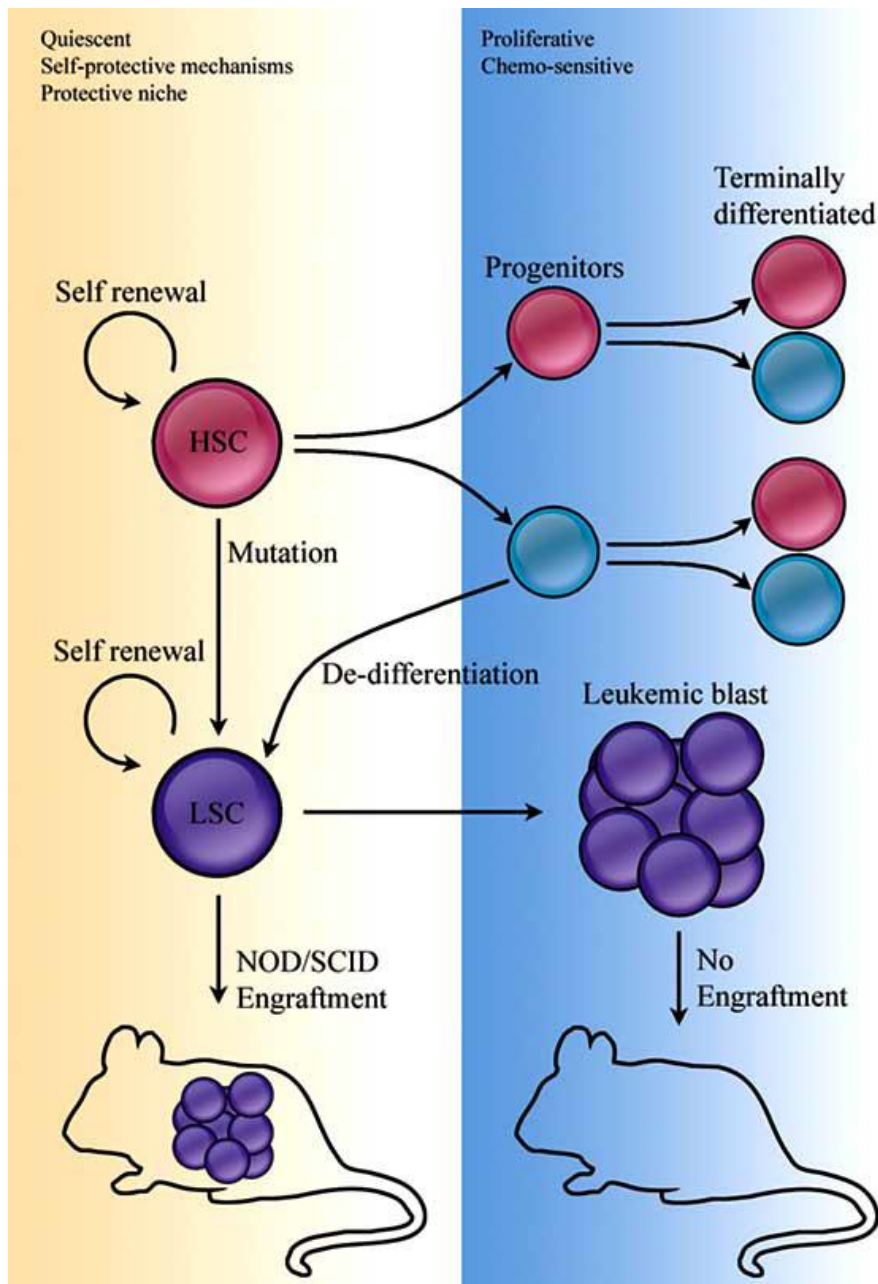
Diese Entwicklung zur ausdifferenzierten leukämischen Zelle verläuft jedoch im Gegensatz zur physiologischen Hämatopoese fehlerhaft. Deshalb unterscheiden sich die leukämischen Zellen von den physiologischen Blutzellen. Dies führte dazu, dass die Leukämien nach dem Grad der Differenzierung beschrieben und eingeteilt wurden (Guzman 2004).

Charakteristisch für dieses Erklärungsmodell ist also eine hierarchische Entwicklung und Aufrechterhaltung der Leukämie. Dies bedeutet, dass die Ursache für eine Leukämie in der Mutation der HSC zur LSC gesehen wird. Das heißt, dass die Entwicklung der Leukämie nur von der LSC zur ausdifferenzierten leukämischen Zelle hin möglich ist (siehe Abbildung 3). Für dieses Modell spricht,

dass die HSC an sich schon die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, im Gegensatz zu ausdifferenzierten Progenitorzellen, welche diese Fähigkeit zuerst wieder zurückerlernen müssten. Außerdem können HSC durch ihr langes Leben länger Mutationen akkumulieren als ausdifferenziertere Blutzellen, welche nur wenige Tage leben (Passegué 2003).

Eine neuere Theorie besagt, dass ausdifferenzierte leukämische Zellen, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wieder erlangen können. Dies bedeutet, dass durch bestimmte Ereignisse (z.B. Mutationen) ausdifferenzierte Zellen Stammzelleigenschaften und somit die Fähigkeit zur Koloniebildung zurückgewinnen (Dedifferenzierung). Dadurch kann aufgrund dieser dedifferenzierten Zellen eine Leukämie entstehen und von diesen Zellen unterhalten werden (Passegué 2003, Jamieson 2004) (Siehe Abbildung 3). Dieser Ansatz wird dadurch gestützt, dass verschiedene Gene, welche in LSC gefunden wurden, auch in ausdifferenzierten Blutzellen vorhanden sind, aber nicht in HSC (Lagasse 1992).

Im folgenden Schaubild sind beide Theorien dargestellt:



**Abbildung 3: Erklärungsmodelle für die Entstehung leukämischer Zellen**

Im Schaubild ist dargestellt, dass LSC durch Mutationen aus HSC entstehen können, oder durch „Dedifferenzierung“ ausdifferenziertere Zellen Stammzelleigenschaften zurückgewinnen. Diese LSC besitzen die Fähigkeit in NOD/SCID Mäusen zu engraften, während ausdifferenzierten leukämische Zellen (leucemic blasts) das Engraftment in der Maus nicht möglich ist (Quelle: ten Cate 2010).

Es ist weiter unklar, welche Theorie die Entstehung einer Leukämie am besten beschreibt. Die AML wird aber mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auf die durch genetische Aberrationen veränderte HSC oder auf Zellen, welche Eigenschaften von HSC wiedererlangen, zurückzuführen sein. Einige Studien konnten eine



ähnliche Stammzellhierarchie auch für kindliche ALL nachweisen (Cobaleda 2000, Cox 2004, Hong 2008). Vormoor et al. konnten jedoch zeigen, dass bei der ALL fast alle leukämische Zellen dazu fähig waren, die Leukämie in der Maus zum Engraften zu bringen (Vormoor 2009). Für die ALL scheint demnach die für die AML beschriebene LSC-Hypothese fraglich zu sein. Aus diesem Grund werde ich im Weiteren anstatt von LSC von leukämischen Progenitorzellen bzw. LSC-artigen Zellen sprechen. Diese Ergebnisse zeigen, dass man erst am Anfang steht, um die genauen Entstehungsmechanismen einer Leukämie zu verstehen und, dass es sich dabei wahrscheinlich um heterogene Prozesse handelt.

### **1.3.2 Rolle der leukämischen Progenitorzellen bei der Therapie**

Allen Theorien zugrunde liegt der Vergleich der leukämischen Zellen mit den Zellen der physiologischen Hämatopoese, insbesondere der HSC. Betrachtet man die Eigenschaften der HSC genauer, lassen sich damit bestimmte Probleme in der Behandlung und Therapie von Leukämien erklären. Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, befinden sich leukämische Progenitorzellen häufig im Zustand der Quieszenz (Guan 2003). Das heißt, sie sind in einem Art Ruhezustand und für Chemotherapeutika, welche nur rasch proliferierende Zellen abtöten, nicht zugänglich. Es wurde gezeigt, dass sich deshalb die leukämischen Progenitorzellen unter den residuellen Leukämiezellen unter Therapie anreichern können (Misaghian 2009). Diese überlebenden Zellen haben nun erneut das Potential, eine leukämische Zellpopulation zu generieren und somit einen Rückfall (Rezidiv) zu initiieren (Ravandi 2006). Außerdem besitzen leukämische Progenitorzellen Transporterproteine, mit welchen sie toxische Substanzen aktiv aus der Zelle transportieren können (You 2006). Dies ist ein weiterer Grund, der die leukämischen Zellen resistent gegen Zytostatika macht und für Therapieversagen verantwortlich ist. Es konnte zudem bei der ALL und der AML im Kindesalter gezeigt werden, dass die Höhe des Anteils der leukämischen Progenitorzellen mit dem Therapieansprechen signifikant korreliert (Ebinger 2010). Das heißt, je höher der Anteil der LSC-artigen Zellen an den Leukämiezellen bei Diagnosestellung ist, desto schlechter und langsamer schlägt die Behandlung an.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die leukämischen Progenitorzellen möglicherweise eine entscheidende Rolle beim klinischen Verlauf unter Therapie spielen, da sie sowohl für Therapieversagen als auch für Krankheitsrückfälle verantwortlich sein können.

### **1.3.3 Identifizierung der leukämischen Stammzellen**

Unabhängig davon, von welchem Ansatz zur Entstehung einer Leukämie ausgegangen wird, spielt die leukämische Progenitorzelle, bzw. leukämische Zellen mit Stammzeleigenschaften möglicherweise eine wichtige Rolle. Da diese Zellen für die Entstehung und Unterhaltung vieler Leukämien verantwortlich sind und möglicherweise einen wichtigen Faktor der Therapieresistenz darstellen, ist es von großer Bedeutung, diese Zellen besser identifizieren zu können.

Es wird davon ausgegangen, dass die leukämischen Progenitorzellen den HSC sehr ähnlich sein müssen. Deshalb wurden die Techniken, die für die Analyse der HSC benutzt werden, auch zur Identifizierung der leukämischen Progenitorzellen eingesetzt. Es wurde versucht, die LSC-artigen Zellen über die Analyse von Oberflächenmarker und stammzellspezifischen Enzymaktivitäten genauer zu identifizieren (siehe 1.2.2).

Dadurch konnte bei leukämischen Zellen einer AML nachgewiesen werden, dass zumindest ein Teil der leukämischen Progenitorzellen wie die HSC  $CD34^+$  und  $CD38^-$  sind (Costello 2000). Um zwischen den physiologischen und malignen  $CD34^+/CD38^-$ -Zellen zu unterscheiden, musste nach weiteren Oberflächenmarkern gesucht werden, welche auf LSC-artigen Zellen exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass maligne  $CD34^+/CD38^-$ -Zellen nicht oder nur wenig CD45 an ihrer Zelloberfläche exprimieren. Je größer die Population an  $CD34^+/CD38^-/CD45^{neg/low}$ -Zellen ist, desto häufiger kommt es zu Resistenzen gegen Chemotherapeutika (van Rhenen 2005). Zusätzlich konnten van Rhenen et al nachweisen, dass durch das C-type lectin-like molecule-1 (CLL-1) und leukämieassoziierte Lineage Marker die Möglichkeit besteht, zwischen HSC und leukämischen Progenitorzellen zu unterscheiden (van Rhenen 2007). Hosen et al konnte 2007 bei AMLs demonstrieren, dass CD96 auf vielen leukämischen Progenitorzellen zu finden ist und eventuell ein spezifischer thera-

peutischer Angriffspunkt sein könnte. In ALLs konnte nachgewiesen werden, dass die leukämischen Progenitorzellen einen CD133<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup> und CD38<sup>-</sup> Phänotyp aufweisen. Diese Zellpopulation hat ein hohes Selbsterneuerungspotential und ist zudem sehr resistent gegen die Therapie mit Chemotherapeutika (Cox 2009). Weiter konnte gezeigt werden, dass über die Testung der Aktivität der ALDH (Erklärung der ALDH siehe 1.2.2) eine kleine Population von leukämischen Zellen einer AML identifiziert werden kann, welche wahrscheinlich primitive LSC-artige Zellen darstellen (Cheung 2007). Wie bei den HSC wurde versucht, über die Eigenschaft der Stammzellen, Hoechst 33342 aus dem Zellinneren zu transportieren (siehe 1.2.2), leukämische Progenitorzellen zu identifizieren. Dabei wurde festgestellt, dass Zellen der SP aus der AML in der Lage waren, in NOD/SCID Mäusen eine AML auszulösen, während die anderen Zellen dies nicht konnten (Wulf 2001). Später konnte gezeigt werden, dass man diese AML SP Zellen über die Expression von CLL-1 und lineage Marker von den normalen SP Zellen unterscheiden kann (Moshaver 2008).

Wie man sieht, ist das Markermuster, das leukämischen Progenitorzellen beschreibt, sehr variabel. Mit großer Wahrscheinlichkeit gibt es keinen allgemeinen Phänotyp von LSC-artigen Zellen. Das Expressionsprofil wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Sowohl der Patient, als auch die zugrundeliegende Leukämieart und der jeweilige Leukämie-Subtyp spielen eine Rolle. Zudem geht man davon aus, dass leukämische Progenitorzellen Oberflächenmarker sehr inkonstant exprimieren, je nachdem in welchem Ausdifferenzierungsstadium die Progenitorzellen, bzw. die Zellen mit Stammzeleigenschaften sich befinden. Diese Variabilität im Expressionsprofil der leukämischen Progenitorzellen lässt sich daher besser mit einem Zustand beschreiben, in welchem sich die Stammzellen befinden, als dass man von einem allgemein gültigen Stammzellphänotyp reden könnte (Zipori 2004). Es ist daher wichtig, weiter nach leukämischen stammzellspezifischen Markern oder Enzymeigenschaften zu suchen, um leukämische Progenitorzellen noch besser identifizieren und analysieren zu können.

## 1.4 Das Xenotransplantationsmodell

Für die Untersuchung von leukämischen Progenitorzellen werden große Mengen von Probenmaterial benötigt. Da es aus ethischen Gründen nicht verantwortbar ist, an Leukämie erkrankten Kindern für Forschungszwecke umfangreiche Knochenmarksentnahmen durchzuführen, wurde nach Alternativen gesucht, um leukämische Zellen zu vermehren. Dazu wurde die Vermehrung in Form einer Zellkultur untersucht. Diese Versuche zeigten jedoch, dass sich in Zelllinien eine Vielzahl von Resistenzen und sekundären Mutationen entwickeln, welche den Phänotyp der leukämischen Zellen stark verändern. Die Aussagekraft dieser in vitro Untersuchungen ist somit stark eingeschränkt. Daher wurde nach alternativen in-vivo-Modellen gesucht. In Form des Xenotransplantationsmodelles fand man eine Lösung, die deutlich näher an der klinischen Realität ist. Dabei werden humane leukämische Zellen auf Mäuse übertragen (Lapidot 1997).

Durch die subkutane Übertragung von leukämischen Zellen in Nacktmäuse gelang die erste erfolgreiche Xenotransplantation. Nacktmäuse haben eine durch einen Rekombinase (RAG) 1 und 2 Defekt bedingte Immundefizienz (McCune 1988). Das Engraftment war jedoch zunächst noch ungenügend und verbesserte sich erst, als man neue Mausstämme etablierte. Dazu wurde ein Mausstamm entwickelt, welcher eine autosomal rezessive Mutation im scid Gen aufweist. Durch diese Mutation sind die Immunfunktionen, welche durch Lymphozyten vermittelt werden, ausgeschaltet (Bosma 1983, Lieber 1988). Doch auch bei diesem Mausstamm war das geringe Engraftment ein großes Problem. Erst als 1994 Shultz et al. die SCID-Mäuse mit NOD/Lt-Mäusen kreuzte, konnte ein gutes Engraftment erreicht werden. NOD (non obese diabetic)-Mäuse haben eine verminderte Funktion von NK-Zellen und weisen zusätzlich ein Fehlen von zirkulierendem Komplement auf (Kataoka 1983, Baxter 1993). Jedoch war es auch mit diesen extrem immundefizienten Mäusestämmen nur selten möglich, neben den ALLs auch AMLs zu engraften (Ailles 1999).

In den letzten Jahren wurden noch permissivere Stämme, wie NOD.Cg17-PrkdcscidB2mtm1Unc/J (NSB) (Feuring-Buske 2003) und NOD/LtSz-scid

IL2R<sup>Null</sup> (bzw. NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (NSG) (Shultz 2005, Ishikawa 2005), entwickelt. In der NSG-Maus befindet sich in der Gammakette des IL-2 Rezeptors ein Defekt. Die dadurch noch größere Immundefizienz ermöglicht ein noch schnelleres und effizienteres Engraftment von humanen Leukämien in der Maus (Agliano 2008). Bei der NSB Maus führt ein  $\beta$ 2-Mikroglobulin Defekt zum Verlust des „Major Histocompatibility Complexes“ (MHC) I und somit deutlich reduzierter NK-Zell Funktion (Shultz 2005). In diesen im Vergleich zu den NOD/SCID-Mäusestämmen noch immundefizienteren Mäusestämmen lassen sich auch mit hoher Effizienz AML-Proben engraften (Sanchez 2009).

## 1.5 Studienziel

1. Das erste Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines durchflusszytometrischen Essays zum Nachweis von Leukämiezellen mit Stammzeleigenschaften bzw. leukämischer Progenitorzellen mittels stammzelltypischer Enzymaktivitäten im NOD/ SCID-Mausmodell. Für diesen Nachweis wurde der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 eingesetzt, mit dem die sogenannte Side population (SP) nachgewiesen werden sollte: Die SP stellt eine distinkte Population dar, die mit naiven Stammzellen angereichert ist.
2. Das zweite Ziel bestand darin zu zeigen, wie gut sich das verwendete NSG Mausmodell dazu eignet, leukämische Zellen und die leukämische SP zu vermehren, ohne, dass sich die dabei gewonnenen Ergebnisse wesentlich von den an Primärmaterial erhobenen Resultaten unterscheiden. Folgende drei Punkte sollten dabei untersucht werden:
  1. Vergleich der leukämische SP aus den Mäuseproben mit der an Primärmaterial gemessenen SP.
  2. Einfluss der murinen Hämatopoese auf die humanen leukämischen Zellen.
  3. Einfluss der Anzahl der Retransplantationen auf die humanen leukämischen Zellen.
3. Das dritte Ziel dieser Arbeit bestand in der genaueren Analyse der leukämischen Zellen. Dazu sollte die durch Hoechst 33342 identifizierte SP, mit

den CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen der jeweiligen Probe verglichen werden. Zusätzlich sollte der Einfluss des Engraftment und der Anwachsdauer auf die leukämischen Zellen untersucht werden.

## **2 Patienten/ Mäuse und Material**

### **2.1 Herkunft der Leukämieproben und Einschlusskriterien**

Es wurden Zellen von Kindern verwendet, die an einer B-Linien-ALL (hier: B-ALL genannt), T-ALL oder AML erkrankt waren. Bis auf zwei Patienten wurden alle nach dem ALL-BFM-2000 Protokoll oder dem AML-BFM-2004 Protokoll behandelt. Einer der beiden anderen Patienten wurde nach dem Intenfant 1999 Protokoll und der andere Patient nach dem AML-15-Protokoll behandelt. Es wurden alle Patienten eingeschlossen, bei denen in den Jahren 2004 bis 2009 eine B-ALL, T-ALL oder AML zweifelsfrei diagnostiziert werden konnte und von denen genügend Material vorhanden war. Von zwei Patienten wurden neben den Zellen der Erstdiagnose auch Zellen vom Rezidiv verwendet. Eine Übersicht über die in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten findet sich in Tabelle 15 im Anhang.

Im Rahmen der Routinediagnostik wurde durch eine Knochenmarkspunktion bei einer Erstdiagnose oder bei einem Rezidiv primäre leukämische Zellen entnommen und in die Mäuse i.v. injiziert. Nach dem erfolgreichem Engraftment der humanen leukämischen Zellen in der Maus wurden die leukämischen Zellen aus dem Knochenmark und der Milz der Maus entnommen. Die genaue Beschreibung der Gewinnung und Aufbereitung der leukämischen Zellen vom Patienten und die Aufbereitung der humanen leukämischen Zellen aus der Maus findet sich unter 3.1 und 3.2.

Zu Beginn der Arbeit wurden die Zellen aus dem Knochenmark und der Milz der verschiedenen Mäuse mit derselben Leukämie, die nach Erstdiagnose oder Rezidiv in mehrere Mäuse übertragen wurden, in jeweils einer Probe gepoolt. Von mehreren Mäusen erhielt man so eine Milz- und eine Knochenmarkprobe. Später wurden dann nur noch die leukämischen Zellen aus dem Knochenmark gepoolt, da im Knochenmark meist weniger leukämische Zellen vorhanden waren. Die Zellen aus der Milz jeder einzelnen Maus wurden getrennt untersucht. Waren nach allen Untersuchungen noch Zellen übrig, wurden diese zum Teil in Mäuse retransplantiert und der Rest bei -80 °C kryokonserviert.

Die retransplantierten Zellen wurden nach dem im Methodenteil beschriebenen Schema wieder neu analysiert und erneut retransplantiert. So erhielten wir von einer Leukämie Proben von mehreren Mausgenerationen.

## 2.2 Versuchstiere

Es wurden NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ Mäuse (auch NOD/LtSz-scid IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> oder NOD scid Gamma (NSG) genannt) von „The Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, USA) verwendet (siehe 1.4). Diese Mauslinie entwickelt keine Thymuslymphome und erreicht eine Lebenserwartung von über 16 Monaten. Dadurch werden länger laufende Experimente ermöglicht (Shultz 2005). Die Tiere wurden unter spezifizierten pathogenfreien (SPF) Bedingungen in keimarmen, einzelventilierten Käfigen mit Einstreu im Tierstall der Universitätsklinik Tübingen gehalten. Sie wurden mit artgerechtem Futter ernährt und erhielten zum Trinken ab dem Zeitpunkt der Transplantation mit Trimethoprim/Sulfamethoxazol (CotrimK®) versetztes Wasser. Die in Deutschland gültigen gesetzlichen Bestimmungen zur Durchführung von Tierversuchen wurden eingehalten. Für die Untersuchungen mit den Tieren des NOD/LtSz-scid IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> Stammes lag eine Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen vor (Dipl. Biol. Kai Witte, Nr. K1/10).

## 2.3 Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Allgemeine Geräte, Glas und Kunststoffmaterial

Material	Hersteller
Sterile Werkbank Hera safe	Heraeus
Beheizbares Wasserbad	Memmert
Zentrifuge Rotixa RP	Hettich
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich
Zentrifuge Micro 22 R	Hettich
Blutanalysegerät Cellcounter Advia 120	Bayer
Durchflussszytometer LSR II	BD Bioscience
Kühlschrank profi-line (+4 °C)	Liebherr
Gefrierschrank (-25 °C)	Bosch
Gefrierschrank (-80 °C) -86 °C Freezer	Forma Scientific
Vortexer Reox Top	Heidolph
Feinwaage Typ AC210S-001	Sartorius
Waage 500 g Typ 1002MP9	Sartorius
Pipettiergerät Pipettboy Plus	Integra Bioscience



Sterile Plastikpipetten 1/2/5/10/25/50 ml	Costar
Verstellbare Pipetten Pipetman 10/20/100/200/1000 µl	Gilson
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym Scientific
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen Ultratip 1000 µl	Greiner bio-one
Transferpipetten Pasteurplastpipetten 170 mm, 2,5 ml	Ratiolab
Falcon-Röhrchen Cellstar PP-Test tubes 15/50 ml	Greiner bio-one
FACS-Röhrchen 5 ml, Rundboden	Becton Dickinson
FACS-Röhrchen 5 ml, Rundboden	Sarstedt
Zellsiebe für FACS-Röhrchen Cellstrainer Cap 12x75 mm style	Becton Dickinson
Parafilm „M“	American National Can
Safe-Lock-Tubes 0,5 ml	Eppendorf
Kryoröhrchen CryoTube™ Vials, 1,8 ml	Nunc A/S
Neubauer Kammer	Assistent
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one
Mikroskop CX 40	Olympus
Petrischalen 100x15 mm	Falcon Becton Dickinson

## 2.4 Allgemeine Chemikalien

Tabelle 2: Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Biocoll Separating Solution, Ficoll Density 1,077 g/ ml	Biochrom AG
Bovines Serum Albumin (BSA)	SIGMA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Lonza
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (DPBS)	Lonza
Einfrierlösung	Baxter
FACSFlow	Becton Dickinson
FACSClean	Becton Dickinson
FACSRinse	Becton Dickinson
Fötale Kälber Serum (FCS), inaktiviert (30 min bei 56 °C)	Biochrom AG
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Lonza
HEPES	Biochrom AG
Human-Albumin 20 %	Biotest
Natriumazid 10 % Lösung in H <sub>2</sub> O	SIGMA
Paraformaldehyd, Pulver	SIGMA
Trypanblau Lösung	SIGMA
VLE RPMI 1640	Biochrom AG

## 2.5 Stammlösungen

### **Auftaulösung:**

500 ml DMEM

+ 10 % FCS

### **DMEM +:**

500 ml DMEM

+ 5 ml HEPES 10 mmol

+ 10 ml hitzeinaktiviertes FCS

### **Einfriermedium alt:**

2 Teile RPMI

2 Teile FCS

1 Teil DMSO

### **Einfriermedium neu:**

4 Teile DMEM

3 Teile FCS

1 Teil DMSO

### **PBSA (Phosphat Buffered Saline + Bovines Serum Albumin):**

1,76 l H<sub>2</sub>O-dest.

+ 40 ml Na-Azid 10 % (in aqua bidest)

+ 4 g BSA

+ 200 ml 10x DPBS

### **PFA 0,5%:**

35 ml DPBS

+ 5 ml 4 % Paraformaldehydlösung

### **SP-Puffer:**

970 ml HBSS-Puffer

+ 2 % FCS hitzeinaktiviert

+ 10 mM HEPES

## 2.6 Stammzellreagenzien, Antikörper und Fluorochrome sowie Lebend-Tod-Marker

### 2.6.1 Stammzellreagenzien

Tabelle 3: Reagenzien zur Bestimmung der SP

Reagenz	Hersteller
Hoechst 33342	SIGMA
Verapamil	SIGMA
Monensin	SIGMA
Interleukin 2	Chiron

### 2.6.2 Antikörper und Fluorochrome

Tabelle 4: FITC-konjugierte Antikörper

FITC-Antikörper	Klon	Hersteller
CD3-FITC	UCHT1	Dako
CD7-FITC	4H9 MEM-186	Becton Dickinson Exbio
CD10-FITC	SS2/36	Dako
CD13-FITC	WM-47	Dako
CD15-FITC	MMA MEM158	Becton Dickinson Exbio
CD22-FITC	S-HCL-1	Becton Dickinson
CD33-FITC	WM-54	Dako
CD34-FITC	8G12	Becton Dickinson
CD38-FITC	T16	Beckman Coulter
CD45-FITC	2D1	Becton Dickinson
CD58-FITC	AICD58	Beckman Coulter
CD66c-FITC	KOR-SA3544	Beckman Coulter

Tabelle 5: PE-konjugierte Antikörper

PE-Antikörper	Klon	Hersteller
CD3-PE	UCHT1	Dako
CD5-PE	DK23	Dako
CD19-PE	SJ25C1	Becton Dickinson
CD38-PE	HB-7	Becton Dickinson
CD58-PE	MEM-63	Exbio
CD117-PE	104D2	Becton Dickinson
CD123-PE	AC145	Miltenyi Biotech
CD133-PE	AC133	Miltenyi Biotech
CD135-PE	4G8	Becton Dickinson
CD184-PE	12G5	R&D Systems
CD338-PE	5D3	R&D Systems

Tabelle 6: PerCP-konjugierte Antikörper

PerCP-Antikörper	Klon	Hersteller
CD3-PerCP	SK7	Becton Dickinson
CD34-PerCP	8G12	Becton Dickinson
CD45-PerCP	2D1 2D1	Dako Becton Dickinson

Tabelle 7: APC-konjugierte Antikörper

APC-Antikörper	Klon	Hersteller
CD3-APC	SK7	Becton Dickinson
CD19-APC	SJ25C1	Becton Dickinson
CD33-APC	P67.6	Becton Dickinson
CD34-APC	8G12	Becton Dickinson
CD56-APC	NCAM16.2	Becton Dickinson
CD117-APC	A3C6E2	Miltenyi Biotech
CD123-APC	AC145	Miltenyi Biotech
CD133-APC	293C3	Miltenyi Biotech
HLA-DR-APC	L243	Becton Dickinson

Tabelle 8: AF700-konjugierte Antikörper

AF700-konjugierte Antikörper	Klon	Hersteller
CD3-AF700	MEM-57	Exbio
CD16-AF700	LNK16	Exbio

Tabelle 9: PB-konjugierte Antikörper

PB-Antikörper	Klon	Hersteller
CD3-PB	MEM-57	Exbio
CD45-PB	MEM-28	Exbio

Tabelle 10: Tandem-Antikörper

Tandem-Antikörper	Klon	Hersteller
CD3-PE-Dy647	MEM-57	Exbio
CD3-PE-Cy7	SK7	Becton Dickinson
CD4-APC-H7	SK3	Becton Dickinson
CD10-PE-Dy590	MEM-78	Exbio
CD19-PE-Dy590	LT19	Exbio
CD19-APC-H7	SJ25C1	Becton Dickinson
CD33-PE-AF700	4D3	Caltag
CD33-PE-Cy7	P67.6	Becton Dickinson
CD34-PE-Cy7	8G12	Becton Dickinson
CD34-PE-Dy647	4H11	Exbio
CD38-PE-Dy590	HIT2	Exbio

CD38-PE-Dy647	HIT2	Exbio
CD45-PE-Cy7	HI30	Becton Dickinson
CD45-APC-AF750	HI30	Caltag

Tabelle 11: Mice CD45 – Antikörper

Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Hersteller
CD45-FITC	30F11	Miltenyi Biotec
CD45-PB	EM-05	Exbio
CD45-AF700	EM-05	Exbio
CD45-APC	EM-05	Exbio
CD45-APC-AF850	30-F11	Bioscience
CD45-q605	30-F11	Bioscience
mSca I APC	D7	Miltenyi Biotec
mGr I PE	RB6-8C5	Miltenyi Biotec

Tabelle 12: Antikörper (Fc Rezeptor Blocking)

Antikörper (FC Rezeptor Blocking)	Hersteller
Normal Rabbit Serum	Invitrogen
Gamunex Human Immunglobulin 10 %, verdünnt mit 1:5 PBSA (2 %ige humane IgG-Lösung)	Bayer

### 2.6.3 Lebend-Tot-Marker

Tabelle 13: Lebend-Tot-Marker

Reagenz	Hersteller
Propidium Iodid (mit Aqua dest. 200x verdünnt)	Fluka

## 2.7 EDV-Software

Tabelle 14: EDV-Software

Software	Hersteller
FACS Diva Software Version 6.1.2	Becton Dickinson

### 3 Methoden

#### 3.1 Gewinnung und Aufbereitung von leukämischen Zellen vom Patienten

Leukämische Zellen wurden durch Blut- oder Knochenmarksentnahme gewonnen. Diese wurden ausschließlich zu diagnostischen Zwecken durchgeführt. Entsprechend des von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigten Vorgehens erklärten sich die Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigte nach entsprechender Aufklärung damit einverstanden, leukämische Zellen für Forschungszwecke freizugeben. Blasten, die nicht für die Standarddiagnostik verwendet werden mussten, wurden unmittelbar nach Entnahme frisch in NSG-Mäuse transplantiert oder in DMSO Einfriermedium in Stickstofftanks kryokonserviert. Bei einem T-Zellanteil >10 % wurden CD3+ T-Zellen zur Vermeidung einer GvHD mittels CD3 Micro Beads depletiert.

Je nach Art der Leukämie wurden  $0,1-10 \times 10^6$  Blasten in 8-12 Wochen alte, unbestrahlte NSG-Mäuse i.v. injiziert. In jede Maus wurde die gleiche Anzahl von leukämischen Zellen übertragen. Abhängig vom vorhandenen Probenmaterial konnte die gleiche Anzahl von leukämischen Zellen eines Kindes in mehrere Mäuse transplantiert werden. Um zu kontrollieren, ob die Leukämie in den Mäusen anwächst, wurde ihnen ab der achten Woche nach Transplantation alle zwei Wochen retrobulbär Blut abgenommen und mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert. Zur Analyse wurde die entsprechende Probe mit den für diese Leukämie typischen Oberflächenmarkern angefärbt, um somit den Phänotyp und das Engraftment zu bestimmen bzw. zu überprüfen. Zeigte sich 20 Wochen nach Transplantation ein Anteil von weniger als 0,3 % humanen CD45 positiven Zellen im peripheren Blut der Maus, bewertete man die Leukämie als nicht angewachsen. Überschritt die Anzahl humaner CD45+ Blasten mehr als 60 % oder ging es den Tieren sichtlich schlecht („ruffled fur“, Gewichtsabnahme), wurden sie getötet und im Anschluss die Knochenmarks- und Milzzellen analysiert und ggf. Blasten in weitere Mäuse retransplantiert, um das Vorhandensein leukämieinduzierender Stammzellen nachzuweisen. Für die Retrans-

plantation wurden ebenfalls  $0,1 - 10 \times 10^6$  Blasten aus Knochenmark und Milz verwendet. Übrige Zellen aus Knochenmark und Milz wurden, wenn vorhanden, bei  $-80\text{ °C}$  kryokonserviert.

### **3.2 Aufbereitung der leukämischen Zellen aus der Maus**

Im Anschluss an eine Betäubung mit  $\text{CO}_2$  wurde den Tieren das Genick gebrochen. Danach wurde die Milz und das Knochenmark aus beiden Humerusknochen unter einer sterilen Werkbank der Maus entnommen. Das Knochenmark und die Milz wurden durch einen  $40\text{ }\mu\text{m}$  Filter gedrückt und mit DMEM- in ein  $50\text{ ml}$  Falcon gespült.

Proben, bei denen keine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt werden musste, überführten wir in ein jeweils separates FACS-Röhrchen und zentrifugierten dieses  $3\text{ min}$  bei RT und  $450\text{ G}$ . Im Anschluss füllten wir es mit DMEM auf  $4\text{ ml}$  auf und führten in einem Aliquot von  $250\text{ }\mu\text{l}$  die Zellzahlbestimmung durch. Danach erfolgte die Zellzahleinstellung von jeder Probe auf  $2\text{ Millionen}$  Zellen pro  $100\text{ }\mu\text{l}$ . Von jeder Maus wurde eine Milz und eine KM-Probe untersucht. Dadurch erhielten wir von drei Mäusen bis zu sechs Proben. Im Anschluss erfolgte die Hoechst-Färbung separat mit zwei Millionen Zellen von jeder Probe.

Eine Dichtegradientenzentrifugation wurde nur dann durchgeführt, wenn makroskopisch viel Detritus in der Probe zu sehen war, da ansonsten zu viele Zellen verloren gegangen wären.

### **3.3 Dichtegradientenzentrifugation**

Mit Hilfe dieses Verfahrens kann man die mononukleären Zellen, welche eine geringe Dichte haben, von Zellen höherer Dichte (Erythrozyten und Granulozyten) trennen.

Man benutzt dazu eine Ficoll-Lösung. Erythrozyten und Granulozyten durchdringen bei der Zentrifugation aufgrund der höheren Dichte diese Lösung und sammeln sich am Boden des Gefäßes an. Thrombozyten und das Plasma bleiben an der Oberfläche, während sich die mononukleären Zellen an der Grenze

zwischen Plasma und Ficoll-Lösung ansammeln. Diese lassen sich aus dieser sogenannten Interphase nach Zentrifugation entnehmen.

Im Folgenden wird die Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation im Einzelnen aufgeführt:

1. Menge des Probenvolumens mit einer sterilen Glaspipette bestimmen.
2. Verdünnen der Probenmenge mit PBS im Verhältnis 1:2.
3. Verdünnte Probe durch einen 40 µm Filter in ein neues 50 ml Falcon überführen.
4. 4 ml Ficoll in 15 ml Falcons füllen und danach die filtrierte und verdünnte Probe vorsichtig auf den Ficoll aufschichten bis max. 10 ml.
5. 30 min Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) und 400 G.
6. Die Schicht der mononukleären Zellen (mononuclear layer) mit einer Transferpipette abnehmen und in ein neues 15 ml Falcon geben. Dort mit PBSA bis auf 14 ml auffüllen.
7. 5 min bei RT und 450 G abzentrifugieren.
8. Falcon dekantieren, mit PBSA auf 3,5 ml auffüllen und gut resuspendieren.
9. Zellzahlbestimmung am Advia-Blutanalyse-Gerät mit einem 250 µl Aliquot.
10. Die 3,5 ml in ein FACS-Röhrchen überführen und 3 min bei RT und 450 G abzentrifugieren.
11. Dekantieren und Zellzahl auf 1 Mio. pro 50 µl einstellen.

Anschließend erfolgte die Hoechst-Färbung. Übrig gebliebene Zellen wurden eingefroren.



### **3.4 Durchflusszytometrie**

#### **3.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Mit der Methode der Durchflusszytometrie, auch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) genannt, kann man in kurzer Zeit Zellen oder mikroskopische Partikel auf verschiedene Eigenschaften wie Größe, Granularität, Oberflächenmerkmale oder andere morphologische und funktionelle Merkmale untersuchen.

Die Grundlage für dieses Verfahren beruht auf der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffmolekülen. Diese Farbstoffmoleküle, welche an monoklonale Antikörper gebunden sind, werden von Lasern mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Die Fluoreszenz der angeregten Farbstoffmoleküle ist direkt proportional mit der Menge der an der Zelle gebundenen Antikörper. Die von ihnen emittierte charakteristische Wellenlänge kann dann von Detektoren erfasst werden.

#### **3.4.2 Aufbau des Gerätes und Messtechnik**

Die in einer Suspension gelösten Zellen werden über eine Kanüle in das Innere des Gerätes gepumpt. Dort wird ihnen eine Trägersubstanz (FACSFlow™) beigemischt, welche es ermöglicht, dass die Zellen einzeln, „perlschnurartig“ aneinandergereiht in die Messkammer des Gerätes gelangen. In der Messkammer werden die Zellen an verschiedenen Lasern, die Licht in unterschiedlichen definierten Wellenlängen emittieren, vorbeigeleitet. So werden sowohl gefärbte Zellen (die mit farbstoffmarkierten Antikörpern beladen sind) und ungefärbte Zellen angeregt. Die Zellen emittieren bzw. streuen, je nach Beschaffenheit bzw. je nachdem, welcher Farbstoff an dem jeweiligen Antikörper gekoppelt ist, diese aufgenommene Energie in spezifischen Wellenlängen bzw. Richtungen. Dieses Fluoreszenzlichtsignal bzw. Streusignal wird dann über photoelektrische Detektoren gemessen.

Die für die Durchflusszytometrie eingesetzten Fluorochrome absorbieren Lichtenergie in einem für sie charakteristischen Wellenlängenbereich, dem sogenannten Absorptionsspektrum. Dabei werden Elektronen durch die aufgenommene Energie von dem Laserstrahl in ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Rücksprung der Elektronen in ihr Ausgangsniveau emittieren sie Photo-

nen. Dies bezeichnet man als Fluoreszenz. Da bei der Emission der Photonen weniger Energie frei wird, als zur Anregung der Elektronen benötigt wird, ist das abgegebene Licht stets energetisch niedriger und somit langwelliger.

Über ein System aus Spiegeln und Filtern, das die Strahlen nach ihrer Wellenlänge auftrennt, wird die Intensität der Fluoreszenz im jeweiligen Bereich von Detektoren erfasst, in ein elektrisches Signal umgewandelt und dann an einen angeschlossenen PC weitergeleitet und dort verarbeitet und gespeichert.

Damit die maximale Intensität eines Fluorochroms gemessen werden kann, muss die vorgeschaltete Filterkombination möglichst genau den Bereich des Emissionsmaximums selektieren. Wählt man diesen Bereich zu schmal, misst der Detektor ein zu schwaches Signal, ist der Bereich jedoch zu breit, führt die Streustrahlung anderer Fluoreszenzen zu verfälschten Ergebnissen.

Neben der Messung der Farbfluoreszenz wird auch zusätzlich das Streulicht gemessen. Dies erfolgt im sogenannten „forward- und side-scatter“ (FSC bzw. SSC). Der in horizontaler Richtung verlaufende Laserstrahl trifft auf die vertikal passierenden Zellen, wobei Licht in alle horizontalen Richtungen abgelenkt wird. Wenn die Lichtstrahlen durch Beugung in einem Winkel von weniger als 10 Grad abgelenkt werden, bezeichnet man sie als „forward-scatter“ (FSC). Dies ist ein Maß für die Zellgröße. Durch Lichtbrechung und Reflexion wird Licht auch in einem Winkel von 90 Grad abgelenkt. Die Ablenkung beruht auf der Anzahl der Membranschichten, auf welche der Laserstrahl trifft und ist proportional zu diesen. Dadurch kann mit Hilfe des „side-scatter“ (SSC) auf die Granularität von Zellen geschlossen werden.

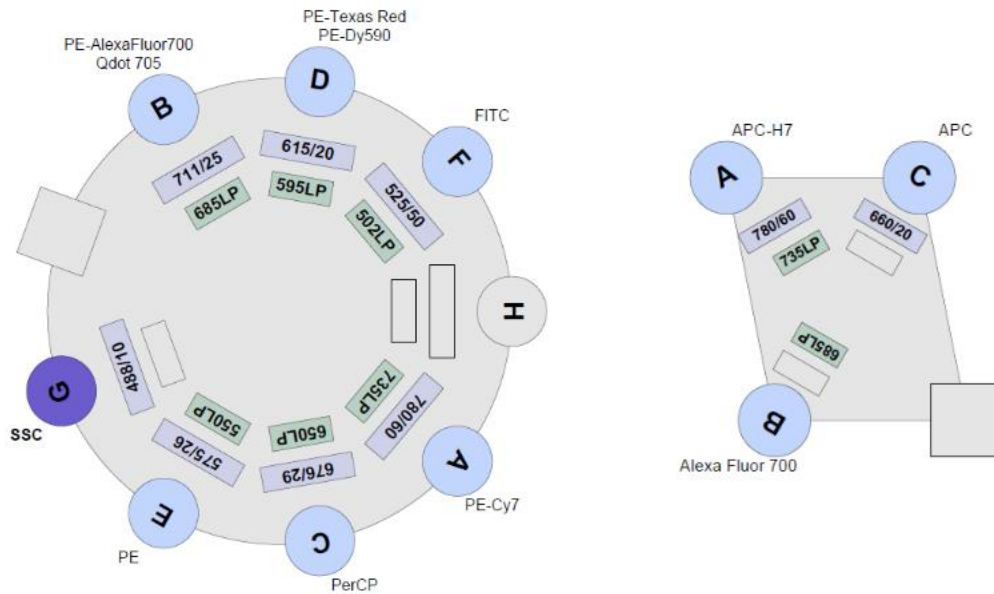
### **3.4.3 Konfiguration des LSR II Durchflusszytometers**

Wir arbeiteten mit einem LSR II Durchflusszytometer, das serienmäßig mit drei Lasern ausgestattet war:

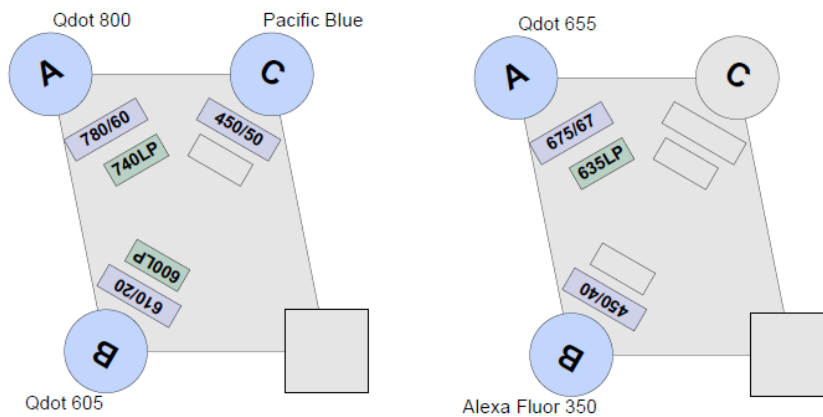
1. 405 nm Laser (violet)
2. 488 nm Laser (blue)
3. 633 nm Laser (red)

Damit wir gleichzeitig die Messung von Hoechst red/ blue durchführen konnten, wurde zusätzlich ein vierter 325 nm UV Laser eingebaut.

Folgende Abbildungen geben einen detaillierten Überblick über alle verwendeten Laser, Spiegel, Filter und Detektoren.



**Abbildung 4: Konfiguration des blauen (488 nm, links) und des roten (633 nm, rechts) Lasers**



**Abbildung 5: Konfiguration des violetten (405 nm, links) und des UV (325 nm, rechts) Lasers**

#### **3.4.4 Kompensation und Kalibrierung am LSR II Durchflusszytometer**

Damit die Qualität und die Reliabilität der gemessenen Daten gewährleistet ist, wurden in regelmäßigen Abständen eine Kalibrierung und Kompensation des LSR II durchgeführt.

Zur Kalibrierung wurden die hierfür vorgesehenen Cytometer Setup & Tracking Beads verwendet. Dies sind Mikropartikel, die eine bestimmte Größe und Morphologie haben. Sie sind entweder ungefärbt oder an bestimmte Fluorochrome gekoppelt. Die Kalibrierung wurde mithilfe des Kalibrierungstools CST Setup innerhalb der BD FACS Diva Software durchgeführt.

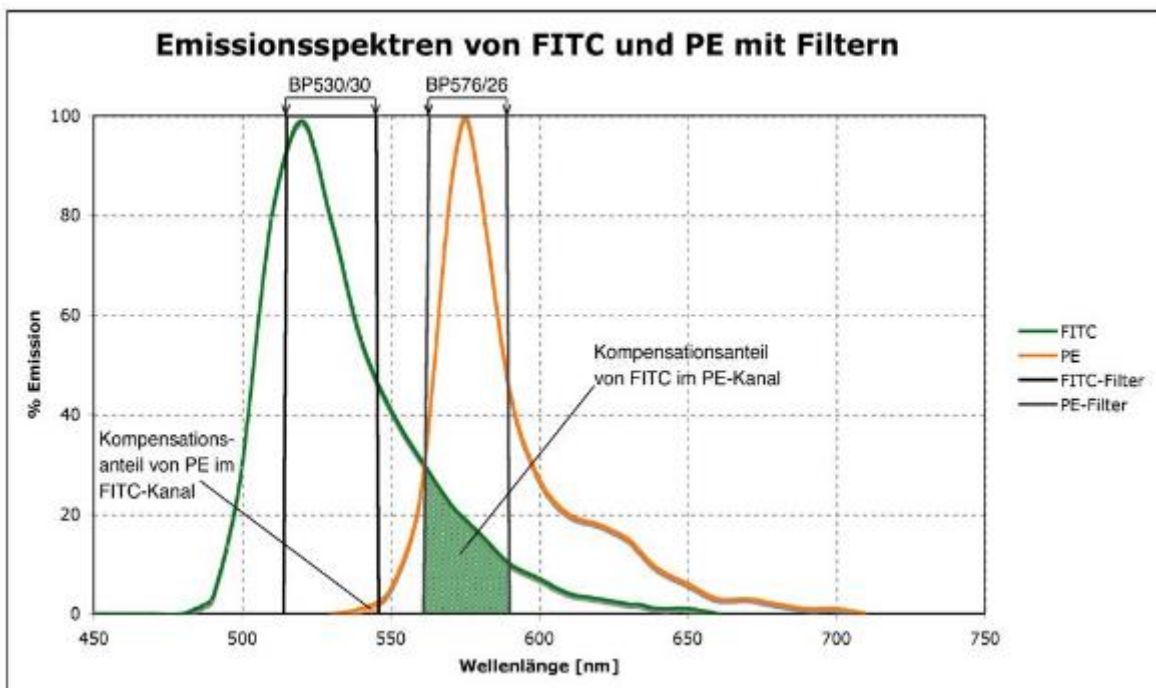
Die Kompensation dient dazu, die Streustrahlung, welche die Messergebnisse verfälscht, rechnerisch zu vermindern. Wie unter Punkt 3.9.2 dargestellt, emittieren die Fluoreszenzfarbstoffe nach Anregung durch den Laserstrahl Photonen mit einer charakteristischen Wellenlänge. Diese Lichtstrahlen haben alle ein bestimmtes Emissionsmaximum mit einem unterschiedlich breiten Spektrum verschiedener Wellenlängen. Damit die verschiedenen Detektoren nur Lichtstrahlen einer bestimmten Wellenlänge registrieren, werden ihnen dichromatische Filter vorgeschaltet. Die Filter werden so gewählt, dass sie nur den Wellenlängenbereich des Emissionsmaximums des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes passieren lassen. So erhält man das stärkste Signal für jede Farbe.

Jedes Fluorochrom emittiert neben dem charakteristischen Emissionsmaximum auch Licht mit geringeren Wellenlängen. Diese verfälschen die Ergebnisse, da sie von anderen Detektoren erfasst werden, die das Signal eines anderen Farbstoffes messen sollen. Das heißt, dass sich verschiedene Emissionsspektren von unterschiedlichen Fluorochromen überlappen. Um diesen Messfehler auszugleichen, versucht man nun, den Wert (in Prozent), der fälschlicherweise von einem Detektor für einen bestimmten Farbstoff erfasst wird, abzuziehen. Dies wird auf diese Art für alle Fluorochrome gemacht. So erhält man eine rechnerische Kompensation, die die Ergebnisse verbessert.

Je mehr sich die Emissionsspektren verschiedener Farben überlappen, umso schwieriger lässt sich die Kompensation berechnen und desto ungenauer wird diese.

Um die Kompensation zu bestimmen, haben wir zwei verschiedene Methoden angewandt:

1. Einzelfärbungen mit nur einem Farbstoff (single stain).  
Hierzu verwendeten wir entweder mononukleäre Zellen (MNC) aus peripherem Spenderblut oder sog. Beads (Mirkopartikel bestimmter Größe und Morphologie).
2. FMO („fluorescence minus one“)  
Dies bedeutet, dass die Probe mit allen Farbstoffen, mit Ausnahme eines Einzigen, angefärbt wird. Die Kompensation erfolgt dann automatisch durch die Software.



**Abbildung 6: Emissionsspektren von FITC und PR mit Filtern**

Bei Verwendung der Bandpassfilter P530/30 für FITC und BP576/26 für PE, zeigt die Abbildung den zu kompensierenden Teil der überlappenden Fluoreszenzspektren von FITC und PE (grüne Fläche). Da eine Zelle die mit FITC gefärbt wurde, wie hier zu sehen ist, im PE-Kanal positiv registriert wird, muss dieser überlappende Bereich im PE-Kanal abgezogen werden. Ansonsten würde eine falsch doppelt positive Population entstehen. (Quelle: Prof. Dr. Johannes H. Hege- mann, Universität Düsseldorf)

### **3.5 Hoechst 33342**

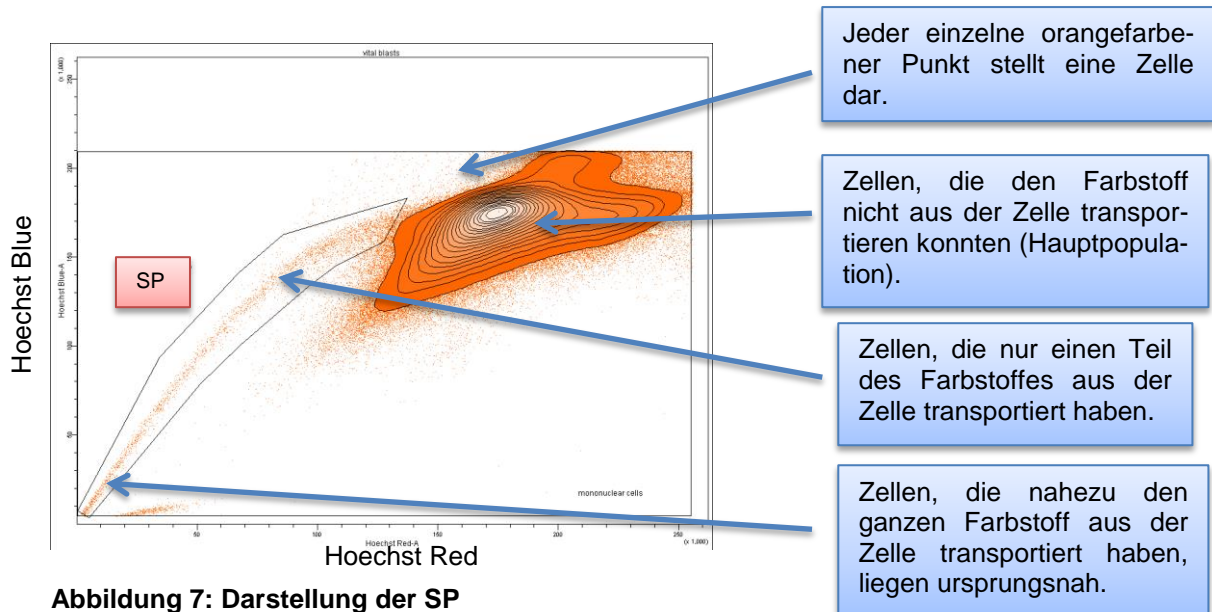
#### **3.5.1 Herstellung von Hoechst**

Wir stellten zu Beginn der Arbeit aus 100 mg Hoechst 33342 Pulver 50 Aliquots mit 1 ml Stocklösung her. Dazu lösten wir das Hoechst, welches in Form von Pulver geliefert wurde, in 4 ml DMSO. Damit sich das Pulver besser lösen konnte, behandelten wir die Lösung mit UV-Licht. In einem 50 ml Falcon fügten wir dann noch weitere 46 ml DMSO hinzu. Aus dieser Stocklösung wurden dann die 50 Aliquots zu je 1 ml abgefüllt und bei -20 °C eingefroren. Da wir mit einer 1:1 Lösung unsere Proben färben wollten, verdünnten wir die 2 mg/ ml Stocklösung mit einem weiteren Milliliter DMSO.

#### **3.5.2 Hoechst-Wirkung**

Bis-Benzimidazol Hoechst 33342 ist ein DNA-spezifischer Lebendfarbstoff, der an intrazellulärer DNA und RNA anhaftet und diese somit anfärbt. Stammzellen haben die Eigenschaft, diesen Farbstoff über „multi-drug-resistance transporters“ (MDR-Transporter) aus der Zelle zu transportieren. Dieser aktive biologische Prozess bedingt, dass Stammzellen im Vergleich zu anderen Zellen gering, bzw. gar nicht mit diesem Farbstoff angefärbt sind. Diese Zellen werden als SP bezeichnet. Die Messung des Farbstoffgehaltes erfolgt über ein Durchflusszytometer. Da Hoechst 33342 Licht im blauen Wellenlängenbereich bei 450 nm (Hoechst Blue) und im roten Wellenlängenbereich bei 675 nm (Hoechst Red) emittiert, werden diese Parameter in einem zweidimensionalen Diagramm aufgetragen. Die SP erscheint dabei als eine distinkte Population, die die Hauptpopulation seitlich zum Achsenursprung hin verlässt (siehe Abbildung 7).

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



### 3.6 Hoechst- und Antikörperfärbung

Die Proben wurden entsprechend dem von Goodell et al. veröffentlichten Protokoll gefärbt, das wie folgt modifiziert wurde. Wir hatten verschiedene Möglichkeiten ausprobiert (Waschen mit SP-Puffer, Inkubationszeiten von nur 90 min), hatten aber mit diesem Protokoll die besten Ergebnisse:

1. 2 Mio. Zellen (siehe 3.2 und 3.3) aus einer Probe entnehmen und mit DMEM+ auf 2 ml auffüllen.
2. 10 µl Hoechst dazu geben und gut mischen (Endkonzentration von 5 µl Hoechst/ ml).
3. 500 µl (entspricht ca. 0,5 Mio. Zellen) entnehmen und in einen neues FACS-Röhrchen mit 1,25 µl Verapamil pipettieren. Gründlich mischen.
4. Beide FACS-Röhrchen für 2 h im 37 °C warmen Wasserbad mit Schüttelstufe 6 inkubieren.
5. Nach diesen 2 h, FACS-Röhrchen direkt auf Eis legen und für ca. 2 min abkühlen lassen, damit die Hoechst-Reaktion nicht mehr weiter ablaufen kann.
6. Bei 4 °C und 450 G abzentrifugieren.
7. FACS-Röhrchen dekantieren und gut abtropfen lassen um ein möglichst kleines Volumen zu erreichen.

8. Vorpipettierter Antikörpermix auf die Zellsuspension in dem FACS-Röhrchen ohne Verapamil geben und gut mischen. Während dieses Vorgehens Proben immer auf Eis lagern.
9. Beide FACS-Röhrchen auf Eis im Kühlschrank für 30 min inkubieren lassen.
10. Zweimal mit jeweils 3 ml DMEM-, in der auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge, 3 min mit 450 G abzentrifugieren und dekantieren.
11. Nach dem letzten Waschschrift die Proben sofort mit LSR II-Durchflusszytometer messen.

Hoechst wird vom 325 nm UV Laser angeregt. Die Fluoreszenz kann am besten mit einem 450/20 BP Filter (Hoechst Blue) und einem 675 nm Longpassfilter (Hoechst Red) gemessen werden.

### **3.7 Verapamil-Färbung**

Wie im vorangegangenen Punkt beschrieben, wurde parallel zur Hoechst-Färbung eine Verapamilinhibition durchgeführt. Nachdem man der zu untersuchenden Probe Hoechst 33342 zugeführt hatte, wurde aus dieser Probe 500 µl entnommen und in ein neues FACS-Röhrchen überführt, in das 1,25 µl Verapamil vorpipettiert war. Verapamil hat die Eigenschaft, die „multi-drug-resistance transporters“, durch welche Stammzellen Hoechst 33342 aus dem Zellinneren transportieren können, zu inhibieren. Das heißt, in der Verapamilprobe konnte keine SP entstehen, da die Stammzellen sowie alle anderen Zellen nicht die Möglichkeit hatten, den Farbstoff aus dem Zellinneren zu schaffen. Dies sollte zur Kontrolle und als Hilfestellung zum Anlegen des SP-Gates dienen. Da durch Verapamil die Zellen mit einer anderen Intensität Hoechst 33342 emittierten, veränderte sich die Lage der Hauptpopulation, so dass man die Verapamilprobe zur Anpassung des Kontrollgates i.d.R. nicht verwenden konnte.

### **3.8 Auswahl der zu färbenden Antikörper**

Die Entscheidung, welche Antikörper wir zur Färbung der Zellen einsetzten, trafen wir mit anhand des Immunphänotyps der Erstdiagnose der Leukämie bei



dem entsprechenden Patienten und anhand eventuell vorausgegangener Untersuchungen an zuvor in der Maus engrafteten Zellen des Patienten. Dies war vor allem für die Auswertung und Trennung der humanen Zellen von den murinen Zellen von großer Bedeutung. Da wir anfangs keine mäuse-spezifischen Antikörper zur Verfügung hatten, konnten wir die Mäusezellen von den humanen Zellen nur über die entsprechenden Marker (AK für welche die Probe bei der Erstdiagnose oder bei vorherigen Mäuseproben positiv war) eindeutig abgrenzen und identifizieren. Zusätzlich zu den für die jeweilige Leukämie typischen Antikörpern verwendeten wir immer CD34 und CD38 Antikörper, um die SP weiter zu differenzieren und mit der Population von CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen vergleichen zu können.

### **3.9 Lebend-Tod-Färbung**

Bei wenigen Proben wurde eine Lebend-Tod-Färbung mit Propidium-Iodid (PI) durchgeführt. Durch zytotoxische Reagenzien, wie z.B. Hoechst, ist die Vitalität der Zellen deutlich vermindert. Diese toten Zellen können unsere Ergebnisse verfälschen, da sie unspezifisch Antikörper binden und Fluoreszenzfarbstoffe aufnehmen.

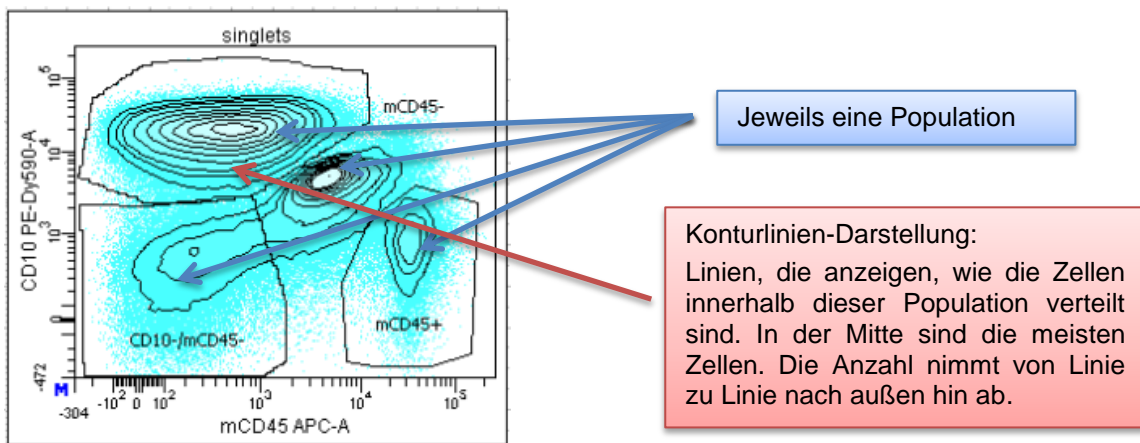
PI ist ein fluoreszierendes Molekül (AM/ EM: 535/617 nm). Es bindet intrazellulär an DNA und RNA. Es gelangt durch die beschädigte Zellmembran in das Zellinnere. Dies gelingt nur bei toten Zellen, da die Zellmembran von lebenden Zellen intakt sein muss. Dort akkumuliert PI, verstärkt die Fluoreszenz um das 20- bis 30-fache und verschiebt dadurch das Emissionsmaximum 15 nm in den blauen Bereich.

Es wurden 2 µl des mit Aqua dest. um das 200-fache verdünnte PI direkt vor (1-5 min) der Messung am Durchflusszytometer zugegeben und gut gemixt.

13 Proben teilten wir in zwei Proben auf und untersuchten beide parallel einmal mit und einmal ohne PI-Färbung. Dabei stellten wir fest, dass die in beiden Proben durchgeführten Aufreinigungsschritte der Zellpopulationen ausreichend sind und die mittels PI zusätzlich durchgeführte Lebend-Tod-Färbung keinen Vorteil für die Datenauswertung verschafft. Deshalb wurde die Färbung nur für wenige Proben angewendet.

### 3.10 Auswertung der Daten

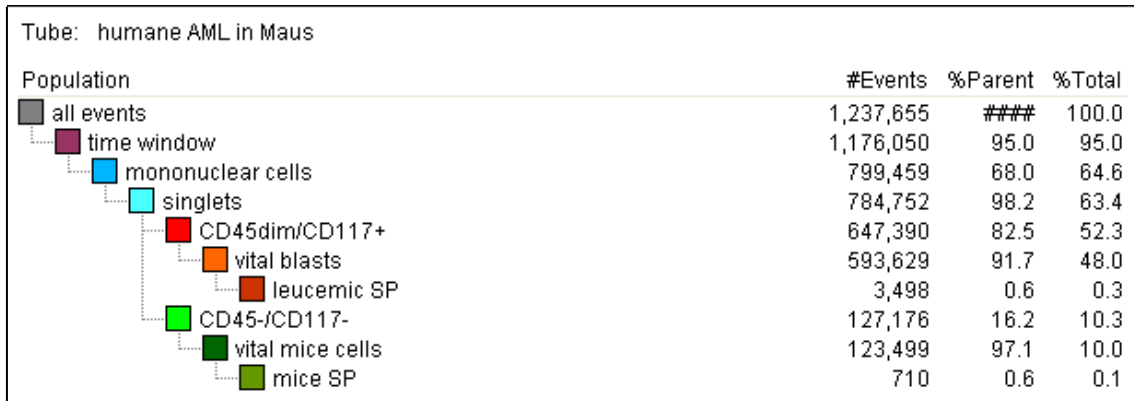
Alle gemessenen Daten wurden in einem angeschlossenen Computer gespeichert, verarbeitet und mit Hilfe der FACS Diva Software Version 6.1.2 ausgewertet. Im Programm lassen sich die Daten in Dot Plots (eindimensionale Streudiagramme) anzeigen. Dabei werden zwei Parameter (z.B. fluorochromgekoppelte Antikörper, SSC oder FSC) gegeneinander aufgetragen, wodurch sich verschiedene Populationen graphisch gegeneinander abgrenzen lassen. Innerhalb dieser Populationen sind Linien zu erkennen (Konturlinien-Darstellung). Diese verdeutlichen, wie die Anzahl der Zellen innerhalb dieser Population verteilt ist (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Dot Plot**

Auf der x- und y-Achse wird jeweils ein Parameter aufgetragen. In diesem Schaubild lassen sich dadurch vier Populationen abgrenzen.

Diese Populationen können nun immer weiter eingegrenzt werden und dadurch bei jedem Schritt mithilfe von verschiedenen Parametern besser charakterisiert werden. Durch dieses Vorgehen entsteht eine Gate-Hierarchie, welche die Abfolge der Gates übersichtlich darstellt. Zudem zeigt sie die Anzahl der Zellen, die in jedem Gate liegen, an. Diese Zahl wird sowohl in Relation zu der Anzahl der Zellen in dem übergeordneten Gate als auch in Relation zu der Gesamtzellzahl gesetzt und als Prozentzahl angezeigt (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Gating-Hierarchie**

Unter „Population“ ist dargestellt, wie alle vom Durchflusszytometer erfassten Ereignisse („all events“) bis zu „leucemic SP“ und „mice SP“ weiter eingegrenzt werden. Unter „#Events“ ist die absolute Anzahl der Ereignisse dargestellt. Diese Zahl wird sowohl in Relation zu der Anzahl der Zellen in dem übergeordneten Gate („%Parent“), als auch in Relation zu der Gesamtzellzahl gesetzt („%Total“) und als Prozentzahl angezeigt.

Um die verschiedenen Proben vergleichen zu können, erstellten wir für alle Proben ein Auswertblatt („Worksheet“). Nachdem alle Messungen am LSR II-Durchflusszytometer abgeschlossen waren, konnten wir mit der Auswertung beginnen.

Die Beschreibung der Auswertung erfolgt im ersten Punkt des Ergebnissteiles, da dies auch eine methodische Arbeit ist und somit die erarbeiteten Methoden Ergebnisse darstellen.

### 3.11 Statistik

#### 3.11.1 T-Test

Der T-Test ist eine Entscheidungsregel, mit deren Hilfe ein Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier untersuchter Stichproben dargestellt werden kann. Er liefert eine Entscheidungshilfe dafür, ob der Mittelwertunterschied zwischen zwei unabhängigen Stichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten rein zufällig entstanden ist, oder ob eine Signifikanz im statistischen Sinne vorliegt (Rasch 2010).

#### 3.11.2 Pearson-Korrelation

Der Pearson-Korrelationskoeffizient („r“) gibt die Stärke und die Richtung einer linearen Beziehung zwischen zwei Merkmalen an. Er ist ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs. Der Korrelationskoeffizient kann Werte zwi-

schen +1 und -1 annehmen. Ist der Wert positiv, bedeutet dies, dass die zwei Merkmale positiv miteinander korrelieren. Ist „r“ gleich Null, spricht man von einer Unkorrelation. Dies bedeutet, dass es keinen Zusammenhang zwischen den zwei Merkmalen gibt. Ist „r“ negativ, besteht eine negative Korrelation zwischen den beiden Merkmalen.

### **3.11.3 P-Wert**

Der aus dem Pearson-Korrelationskoeffizient („r“) und der Fallzahl resultierende p-Wert ist eine Kennzahl zur Auswertung von statistischen Tests. Er gibt an, ob eine statistische Signifikanz vorliegt oder nicht. Je höher der p-Wert, desto wahrscheinlicher ist, dass keine Signifikanz vorliegt. Ein p-Wert kleiner 0,05 entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % und gilt als „signifikant“. Ist der p-Wert unter 0,01, spricht dies für ein „hochsignifikantes“ Ergebnis, welches dementsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % entspricht.

### **3.11.4 Varianzanalyse**

Die Varianz beschreibt ein Maß für die Abweichung einer Zufallsvariable  $x$  von ihrem Erwartungswert  $E(x)$ . Die Varianzanalyse ist eine Art wissenschaftliche Form der Kausalattribution (Ursachenzuschreibung). Sie gibt Aufschlüsse über die hinter den Daten steckenden Gesetzmäßigkeiten. Dabei soll der Einfluss einer oder mehrerer Einflussvariablen (sogenannte Faktoren) auf eine oder mehrere Zielvariable(n) erklärt werden. Liegt ein Faktor vor, nennt man es einfaktorielle Varianzanalyse, bei mehreren Faktoren multifaktoriell. Als Voraussetzung für eine Varianzanalyse gelten die Varianzhomogenität und die Normalverteilung der Stichprobenvariablen. Erfüllen die Datensätze diese Voraussetzungen nicht, so sind die Ergebnisse unbrauchbar.

## 4 Ergebnisteil

Der folgende Ergebnisteil gliedert sich in vier Punkte. Zuerst soll die Strategie beschrieben werden, mit der die Proben ausgewertet wurden. Der zweite und dritte Punkt untersucht, welchen Einfluss die verschiedene Leukämiearten (B-ALL, T-ALL und AML) auf das Engraftment und die SP haben. Im Anschluss werden mögliche Wirkungen des Mausmodells auf die leukämischen Zellen beschrieben. Im vierten Punkt werden die leukämischen Zellen, insbesondere die SP, genauer betrachtet und analysiert.

### 4.1 Auswertung der Proben

Für die Auswertung der mit dem Farbstoff Hoechst gefärbten humanen leukämischen Zellen aus der Maus gab es keine vergleichbaren Vorarbeiten. Aus diesem Grunde soll im folgenden Abschnitt die erarbeitete Methode beschrieben werden. Ich orientiere mich dabei an dem Worksheet, welches erstellt wurde, um die Untersuchung der Daten zu systematisieren und vergleichbar zu machen.

#### 4.1.1 Gatingschritte

Aus der Vielzahl der Zellen müssen die gesuchten leukämischen Zellen herausgefiltert werden. Die Zellpopulationen werden durch Gates immer weiter aufgetrennt (Gatingschritte), bis am Ende die gewünschten Zellpopulationen übrig bleiben. Dadurch entsteht eine sogenannte Gate-Hierarchie (siehe Abbildung 9 unter Punkt 3.10).

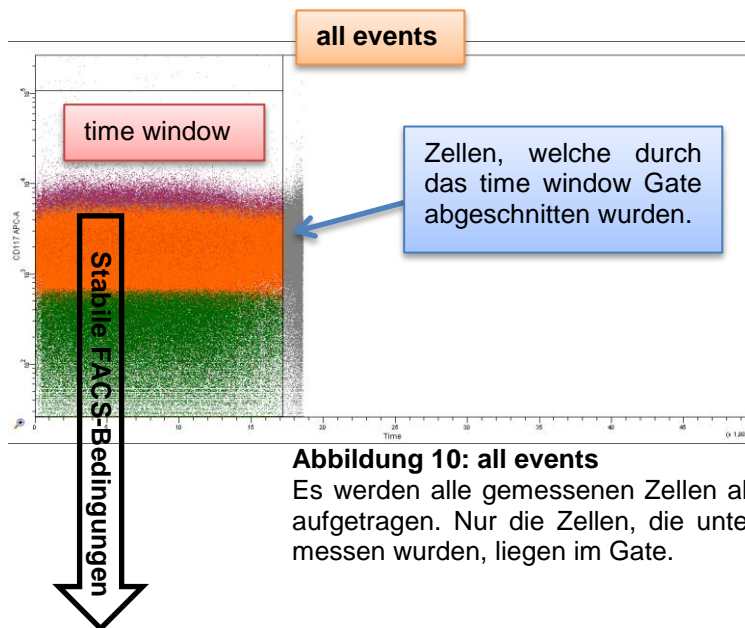
##### 4.1.1.1 Aufreinigung der Zellen

Die ersten drei Gatingschritte wurden zur Aufreinigung der Zellen verwendet, um diese von Störfaktoren und Fehlmessungen zu befreien. Im ersten Plot, „all events“, sind alle Zellen als Punkte über die Zeit aufgetragen, die der LSR II Durchflusszytometer gemessen hat. Das „time window Gate“ beinhaltet Zellen, die unter stabilen FACS-Bedingungen gemessen wurden. Da in das Messgerät am Ende der Messung häufig Luft angezogen wurde, wurden durch das „time window Gate“ die zuletzt gemessenen Zellen ausgeschieden (Abbildung 10).

Der darauffolgende Dot Plot zeigt nur die Zellen an, welche im „time window Gate“ liegen.

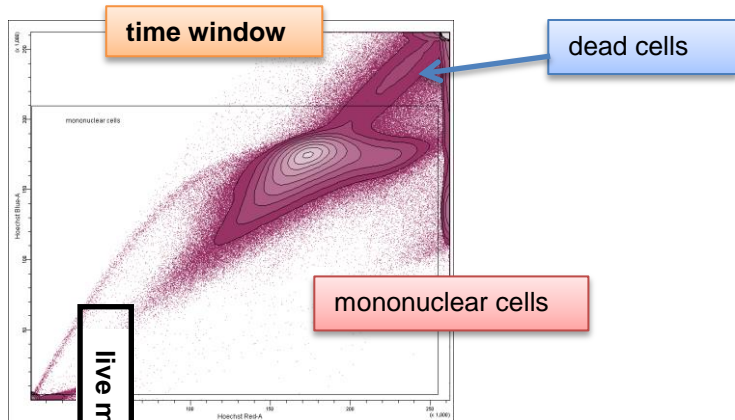
Das Gate „mononuclear cells“ dient dazu, die mononukleären Zellen mittels der Hoechst-Färbung herauszufiltern (Abbildung 11). Der Lebendfarbstoff Bis-Benzimidazol Hoechst 33342 (Hoechst), bindet spontan an DNA und RNA. Auf der x- und y-Achse der Abbildung ist die Intensität aufgetragen, mit der die Zellen durch diesen Farbstoff leuchten. Alle Zellen die im rechten oberen Quadranten der Abbildung liegen, leuchten mit einer sehr hohen Intensität. Der Grund dafür ist, dass diese Zellen tot sind und die DNA der Zelle somit besser für den Farbstoff zugänglich ist. Deshalb werden diese Zellen herausgegatet.

Im nächsten Schritt wurden sogenannte Dupletten herausgefiltert (Abbildung 12). Unter Dupletten versteht man Zellen, die im Moment der Messung aneinander haften und somit vom Gerät als eine Zelle erfasst werden und die Auswertung verfälschen (Gate „singlets“) (siehe Abbildung 10 bis Abbildung 12).



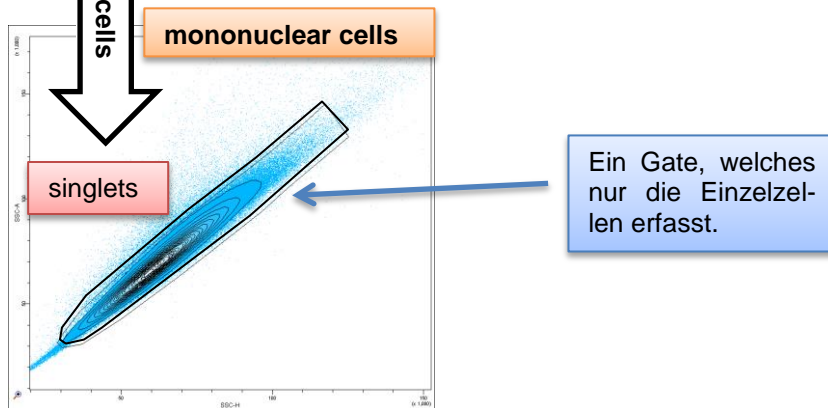
**Abbildung 10: all events**

Es werden alle gemessenen Zellen als Punkte über die Zeit (x-Achse) aufgetragen. Nur die Zellen, die unter stabilen Messbedingungen gemessen wurden, liegen im Gate.



**Abbildung 11: time window**

Es wird nur auf die für uns interessanten mononukleären Zellen gated.



**Abbildung 12: mononuclear cells**

Dupletten werden durch das Gate „singlets“ herausgefiltert

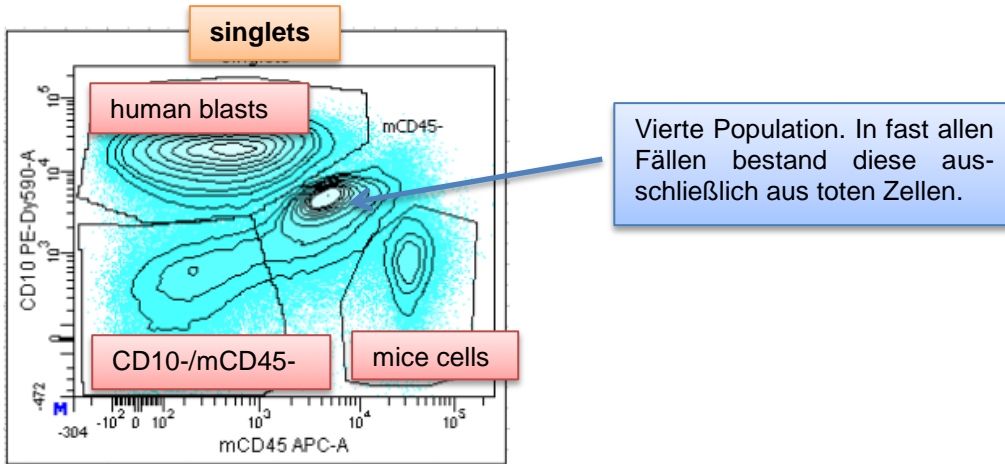
#### 4.1.1.2 Auftrennung der Zellen

Nach diesen sogenannten Aufreinigungsschritten folgte die Trennung der Zellen in humane Blasten, Mäusezellen und gelegentlich eine weitere Population, die keiner der beiden anderen Populationen zugeordnet werden konnte (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14). Dazu wurde auf der x-Achse die Intensität des Fluorochroms aufgetragen, welches an einen Antikörper gekoppelt war, der ganz speziell nur an Mäusezellen bindet. Auf der y-Achse wurde die Intensität eines Fluorochroms aufgetragen, welches an einen Antikörper gekoppelt war, von dem man wusste, dass er die leukämischen Zellen markiert. Dies war aus der Erstuntersuchung der leukämischen Zellen direkt nach der Knochenmarksentnahme nach Diagnosestellung bekannt. Zellen, die im rechten unteren Quadranten des Diagrammes liegen, sind negativ für den leukämiespezifischen Marker und positiv für den mäusepezifischen Antikörper. Diese Zellen können

somit sicher als Mäusezellen identifiziert werden („mice cells“). Die Zellpopulation, die im linken oberen Quadranten des Diagrammes liegt, ist dementsprechend positiv für den leukämiespezifischen Marker und negativ für den mäusespezifischen Marker. Somit sind diese Zellen sicher humane leukämische Zellen („human blasts“). Die dritte Population, die meist im linken unteren Quadranten des Diagrammes liegt, konnten wir weder den Mäusezellen noch den humanen leukämischen Zellen zuordnen. Diese Population war also sowohl negativ für den leukämiespezifischen als auch für den mäusespezifischen Antikörper (CD10<sup>-</sup>/mCD45<sup>-</sup>) (siehe Abbildung 13). In manchen Fällen war noch eine vierte Population sichtbar, die meist zwischen den leukämischen Zellen und den Mäusezellen lag. Diese Population bestand in allen Fällen ausschließlich aus toten Zellen. Zur Kontrolle legten wir ein Gate um diese Zellpopulation und ließen diese Zellen im Plot „blasts“ anzeigen. Dort lagen die Zellen im linken unteren Quadranten (vergleiche Abbildung 16: blasts). Meist verlief diese Population aus der doppelt negativen Population (in unserem Beispiel CD10<sup>-</sup>/mCD45<sup>-</sup>) heraus diagonal nach rechts oben.

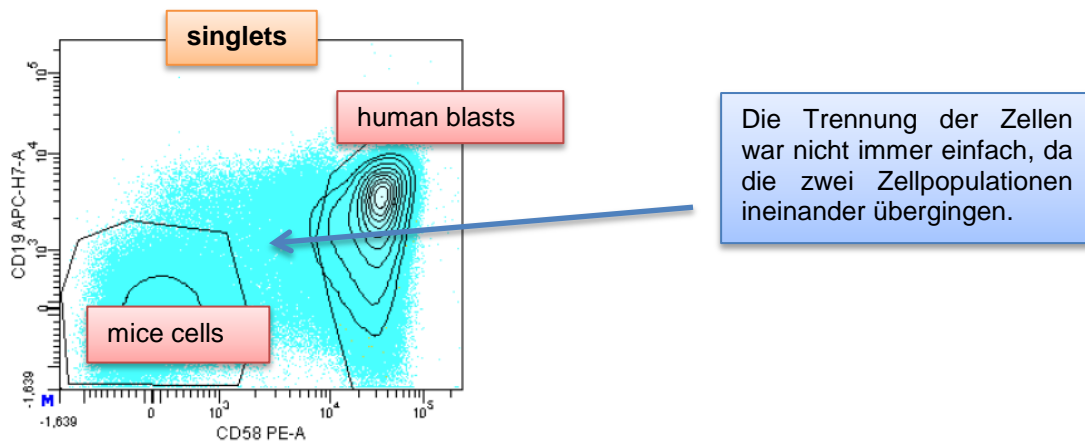
Zu Beginn der Messungen hatten wir noch keinen mäusespezifischen Antikörper. Bei diesen Proben trugen wir deshalb auf der x- und y-Achse leukämiespezifische Antikörper auf. Bei Diagnosestellung wurde von allen Leukämieproben der Immunphänotyp mit Expression von verschiedenen Antigenen bestimmt. Dadurch wusste man, für welche Antikörper die jeweilige Leukämie positiv oder negativ ist. Es wurden also zwei Antikörper verwendet, für die die leukämischen Zellen positiv waren. Daraus ergibt sich, dass die humanen leukämischen Zellen im rechten oberen Quadranten des Diagrammes zu liegen kommen (siehe Abbildung 14). Dementsprechend sind die Mäusezellen, welche für beide Marker negativ waren, im linken unteren Quadranten zu finden („mice cells“ siehe Abbildung 14).





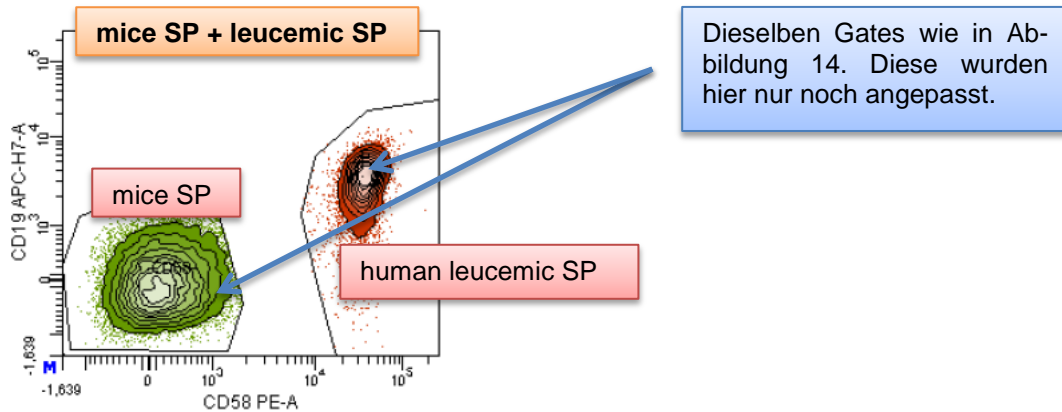
**Abbildung 13: singlets**

Auftrennung der Zellen in die Populationen „blasts“ und „mice cells“, indem auf der x-Achse ein mäusepezifischer AK und auf der y-Achse ein leukämiespezifischer AK aufgetragen ist. Die humanen Blasts sind im oberen linken Quadranten als distinkte Population zu sehen. Die Mauszellen liegen dementsprechend rechts unten in der Abbildung. Die dritte Zellpopulation, die für beide AK negativ konnte weder den humanen leukämischen Zellen noch den Mauszellen zuordnen werden.



**Abbildung 14: singlets**

Auftrennung der leukämischen Zellen (positiv für CD19 und CD58) und der Mäusezellen ohne mäusepezifischen Antikörper. Auf der x- und y-Achse wurden jeweils leukämiespezifische AK aufgetragen, für welche die leukämischen Zellen bei Diagnosestellung positiv bzw. schwach positiv waren. Die humanen Blasts sind im rechten oberen Quadranten zu finden und die Mauszellen ursprungsnah links unten.



**Abbildung 15: mice SP und leucemic SP**

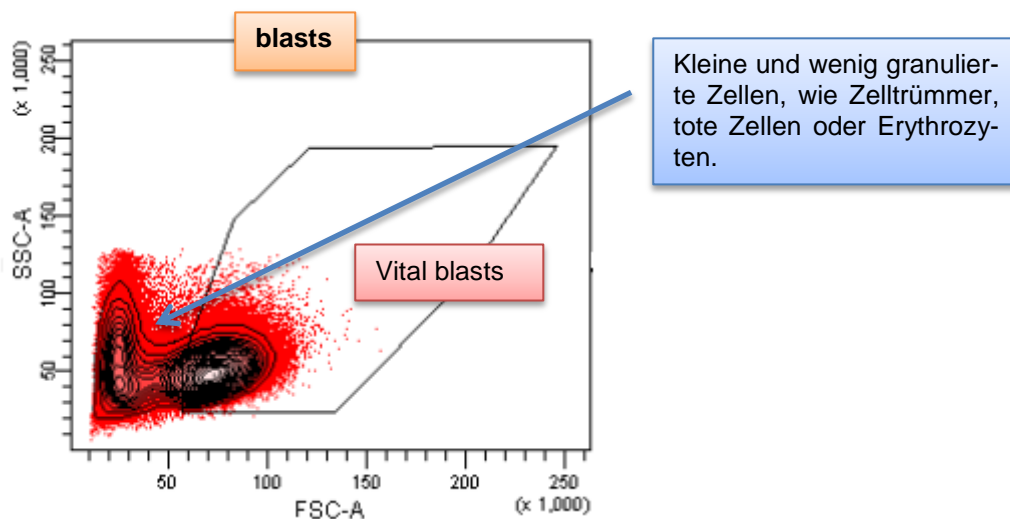
„Feineinstellung“ der Gates zur Trennung der Populationen. In dieser Abbildung ist nur die leukämische SP und die murine SP zusehen. Die in Abbildung 14 gelegten Gates werden hier anhand der jeweiligen SP eingestellt, um so eine bessere Trennung der leukämischen und murinen Zellen zu erreichen, ohne, dass dabei Zellen der SP verloren gehen.

Bei manchen Proben war diese Auftrennung der Zellen nicht einfach, da im Plot „singlets“ keine eindeutige Trennung der verschiedenen Populationen möglich war (siehe Abbildung 14). Dieses Problem lösten wir, indem wir ein grobes Gate orientierungsweise um jede der beiden Populationen legten und diese dann parallel auswerteten (siehe folgende Punkte). Am Ende der Auswertung wurden die Zellen der SP in einem neuen Dot Plot abgebildet, in welchem die gleichen Parameter auf der y-Achse und x-Achse aufgetragen waren wie im Plot „singlets“ (Plot „mice SP + leucemic SP“ siehe Abbildung 15). Die Gates, welche wir orientierungsweise zur Auftrennung der zwei oder drei Populationen gelegt haben, ließen wir uns nun dort anzeigen und führten dann die Feineinstellung der Gates durch. Wir orientierten uns also an den Zellen der SP, da es uns primär um diese Zellen ging. Die leukämischen Stammzellen lagen meist in der Mitte der jeweiligen Population und nahmen zum Rand des Gates hin immer mehr ab. Das Gate wurde relativ restriktiv um die Stammzellen gelegt, da immer mehr tote Zellen mit in das Gate gelangen (welche unsere Ergebnisse verfälschten), je größer das Gate um die distinkte Population gelegt wurde (Vergleiche Abbildung 14 und Abbildung 15). Mit dieser Methode konnten wir die Zellen aller Proben auftrennen.

Die folgenden Gating-Schritte wurden parallel für beide bzw. alle drei Populationen durchgeführt. So konnte die „leucemic SP (LSP)“ getrennt von der „mice SP (mSP)“ dargestellt werden.

#### 4.1.1.3 Aufreinigung der Zellpopulationen

Um tote Zellen und Erythrozyten, welche wie Stammzellen innerhalb der SP liegen, da sie ebenfalls weniger mit dem Hoechstfarbstoff angefärbt sind, auszuschließen, wurde ein Diagramm mit den Parametern SSC (y-Achse) und FSC (x-Achse) eingefügt (siehe Abbildung 16). Da diese Parameter ein Maß für die Zellgröße (FSC) und Granularität der Zellen (SSC) sind, erscheinen kleine und wenig granulierte Zellen somit ursprungsnah sowohl auf der x- als auch auf der y-Achse. Diese Zellen stellen meist Zelltrümmer, tote Zellen oder Erythrozyten dar. Um diese herauszufiltern, wurde hier das Gate „vital blasts“ eingefügt. Im darauffolgenden Plot wurden somit nur noch die lebenden Zellen angezeigt (siehe Abbildung 17).



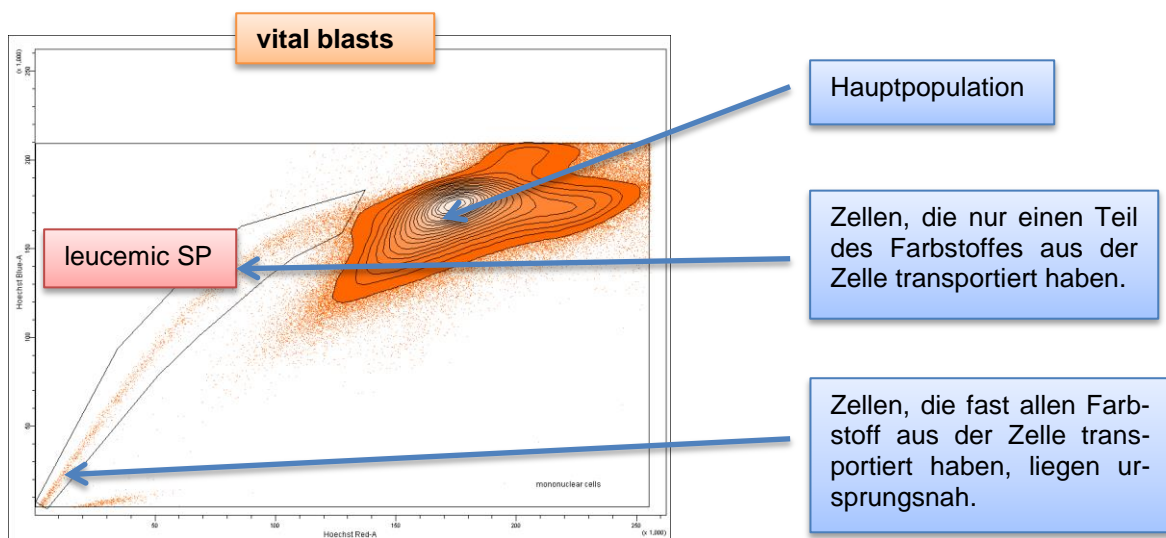
**Abbildung 16: blasts**

Kleine und wenig granulierte Zellen, wie Zelltrümmer, tote Zellen oder Erythrozyten liegen ursprungsnah und werden hier herausgefiltert.

#### 4.1.1.4 Darstellung der SP

Im folgenden Diagramm ist die SP dargestellt. Die Intensität von „Hoechst Blue“ ist auf der x-Achse und die Intensität von „Hoechst Red“ auf der y-Achse abgebildet. Die Hauptpopulation (Großteil der Blasten), welche durch den Farbstoff angefärbt wurde, liegt nun in der Mitte des Plots, während die SP wie ein Schweif auf den Ursprung zuläuft. Stammzellen besitzen - im Gegensatz zu anderen Zellen - die Eigenschaft, den Farbstoff Hoechst über spezielle Proteine („multi-drug-resistance transporters“) aus der Zelle zu transportieren (siehe Kapitel 3.5.2). Die Stammzellen sind deshalb weniger stark bis gar nicht mit

Hoechst gefärbt. Zellen, die den kompletten Farbstoff aus der Zelle transportiert haben, liegen somit ursprungsnah. Zellen, die noch einen Teil des Farbstoffes in sich haben, liegen, je nachdem wie viel Farbstoff dies ist, zwischen Ursprung und der Hauptpopulation in der Mitte des Diagrammes. Dadurch entsteht ein Schweif, welcher als SP („leucemic SP“) bezeichnet wird (siehe Abbildung 17). Aufgrund des beschriebenen Mechanismus reichern sich in der SP Stammzellen bzw. Zellen mit Stammzelleigenschaften an.



**Abbildung 17: vital blasts**

Darstellung der SP. Das Gate „leucemic SP“ wird nur auf den Schweif von Zellen gelegt, die auf den Ursprung zulaufen.

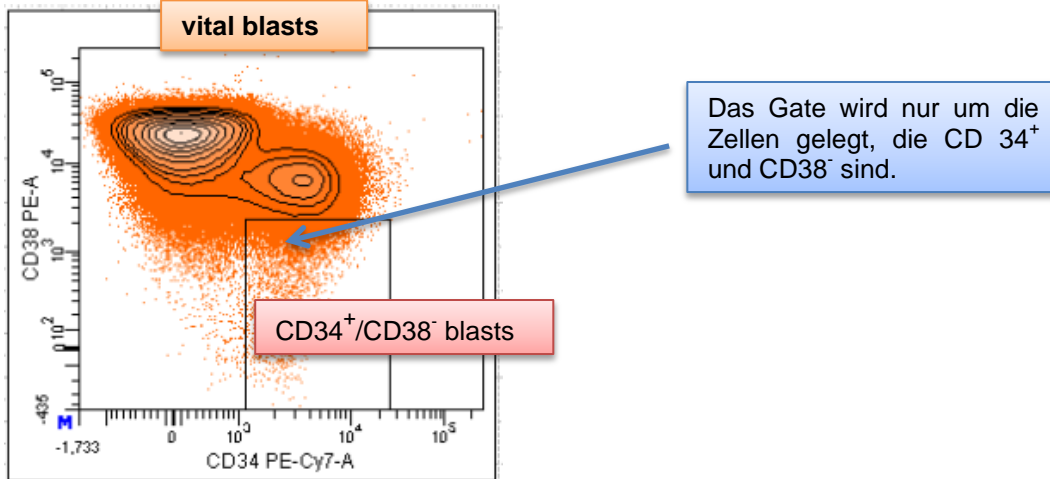
#### 4.1.1.5 Vergleich der SP mit CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen

Als letzter Schritt der Auswertung wurden die Zellen innerhalb der SP auf die Expression bezüglich CD34 und CD38 überprüft (Abbildung 18 und Abbildung 19). Wie in der Einleitung unter Punkt 1.2.2 „Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen“ beschrieben, besitzen Zellpopulationen, die CD34 exprimieren und für CD38 negativ bzw. schwach positiv (dim) sind, deutlich mehr Stammzelleigenschaften als andere Zellpopulationen (Conneally 1997).

Da die Hoechst-Färbung auch zur Identifikation von Stammzellen dient, wurden bei allen Proben die Zellen der SP auf die Expression von CD34 und CD38 hin untersucht.

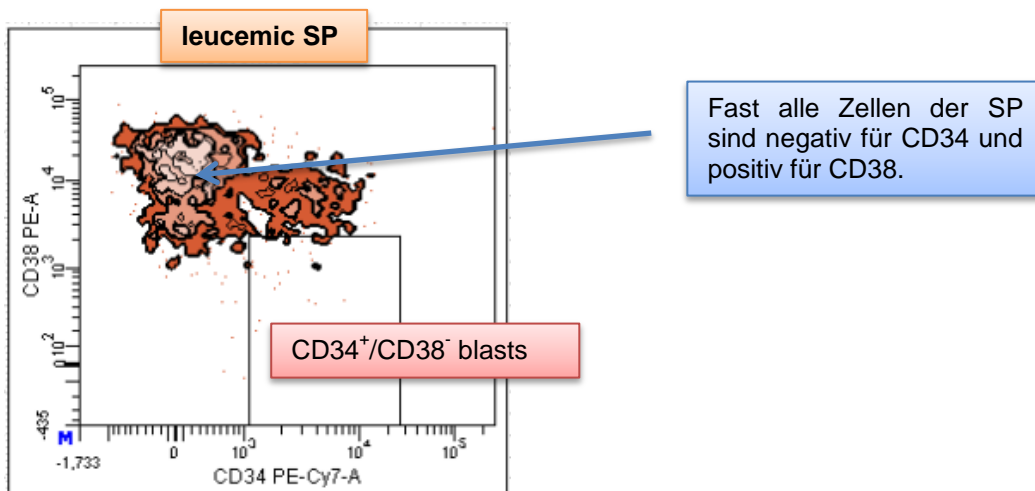
Im Plot „vital blasts“ (Abbildung 18) wurden alle lebenden Blasten angezeigt. Auf der x-Achse wurde CD34 und auf der y-Achse CD38 aufgetragen. Dadurch

überprüfen wir alle Blasten auf die Expression von CD34 und CD38. In Abbildung 19 ist nur noch die SP angezeigt, um beurteilen zu können, ob sich die leukämischen Stammzellen in der Expression von CD34 und CD38 von den Blasten unterscheiden.



**Abbildung 18: vital blasts**

Alle lebenden Blasten werden auf die Expression von CD34 (x-Achse) und CD38 (y-Achse) hin untersucht.



**Abbildung 19: leucemic SP**

Darstellung der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> SP. Zellen der SP, die CD34<sup>+</sup> und CD38<sup>-</sup> waren liegen im Gate rechts unten in der Abbildung.

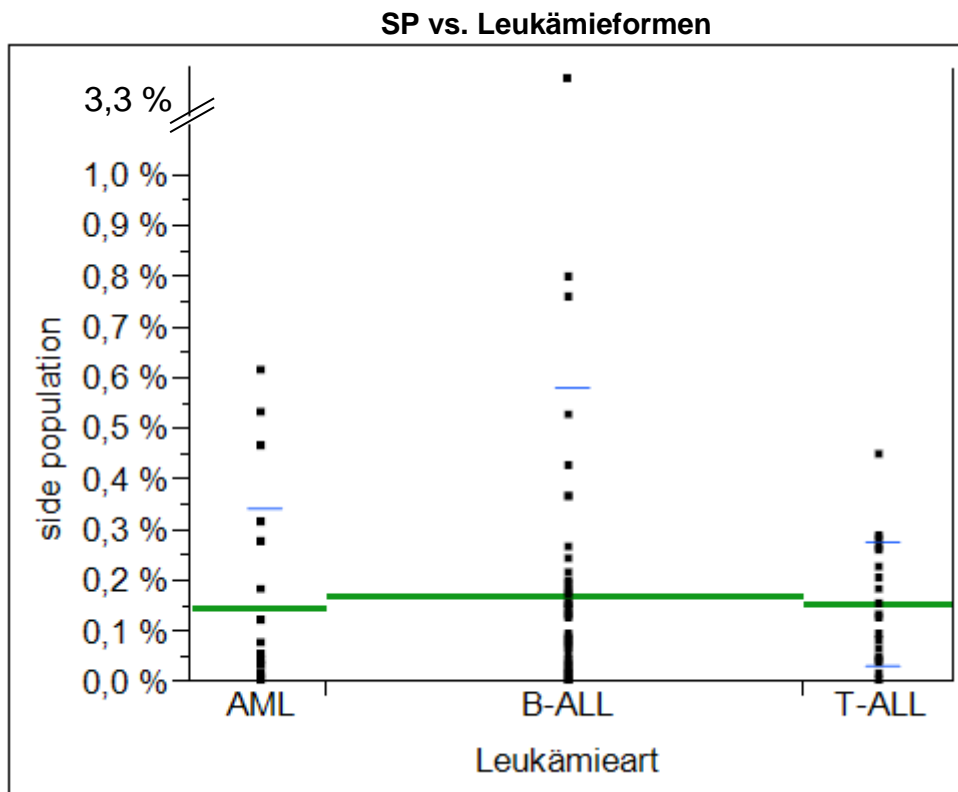
Zusammenfassend kann man sagen, dass es bei allen Proben (112), die in der Maus engraftet sind und mit der entsprechenden Antikörperkombination gefärbt wurden (siehe 3.8), möglich war, die humanen leukämischen Zellen von den murinen Zellen zu trennen. Um zu beweisen, dass eine Auftrennung in humane leukämische Zellen und murine Zellen ohne Antikörperfärbung nicht möglich war, färbten wir zwei Proben ohne Antikörper. Bei diesen Proben gelang es uns

nicht, die leukämischen Zellen von den murinen Zellen zu trennen. Zusätzlich konnten wir durch die beschriebene Methode in 102 von 112 Fällen getrennt eine leukämische und murine SP nachweisen. In 10 Fällen konnten wir keine LSP zeigen, jedoch war bei diesen Proben die Auftrennung in leukämische und murine Zellen trotzdem möglich.

## 4.2 Einfluss der Leukämieart auf die leukämische SP

Es wurden Zellen von Kindern untersucht, die an einer B-ALL, AML oder T-ALL erkrankt waren. In diesem Abschnitt soll dargelegt werden, ob Unterschiede zwischen den Anteilen der SP innerhalb der drei Leukämieformen bestehen (siehe Abbildung 20).

Dazu wurden von 112 Proben die Werte der SP aus der Milz und dem Knochenmark der Mäuse verwendet. 70 der 112 gemessenen Werte stammen von der B-ALL ab, 20 von der AML und 22 von der T-ALL.



**Abbildung 20: SP vs. Leukämieformen**

Der Anteil der SP an den gesamten leukämischen Zellen wird gegen die jeweiligen Leukämieformen aufgetragen, von denen die leukämischen Zellen abstammen. Eingezeichnet sind die Mittelwerte (AML: 0,15 %, B-ALL: 0,17 %, T-ALL: 0,15 %) und die Standardabweichung (AML: 0,19 %, B-ALL: 0,41 %, T-ALL: 0,12 %).

Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, ist der Anteil der SP an den gesamten vitalen leukämischen Zellen immer unter 1 %. Die Ausnahme bildet ein Wert der SP bei der B-ALL von 3,32 %. Es ist ein leichter Trend zu erkennen, der zeigt, dass die Höhe der SP von der B-ALL über die AML zur T-ALL abnimmt. Auffällig ist jedoch dabei, dass 90 % der Werte der SP unter 0,35 % liegen. (90 % bei B-ALL, 85 % bei AML und 95 % bei T-ALL). Die berechneten Mittelwerte der prozentualen Höhe der SP-Zellen an den vitalen leukämischen Blasten betrug bei den B-ALL-Proben 0,17 %, bei den AML-Proben 0,15 % und bei den T-ALL-Proben 0,15 %. Es lässt sich festhalten, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Anteil der SP und der jeweiligen zugrundeliegenden Leukämieform bestehen.

### **4.3 Einfluss des Mausmodells auf die leukämischen Zellen**

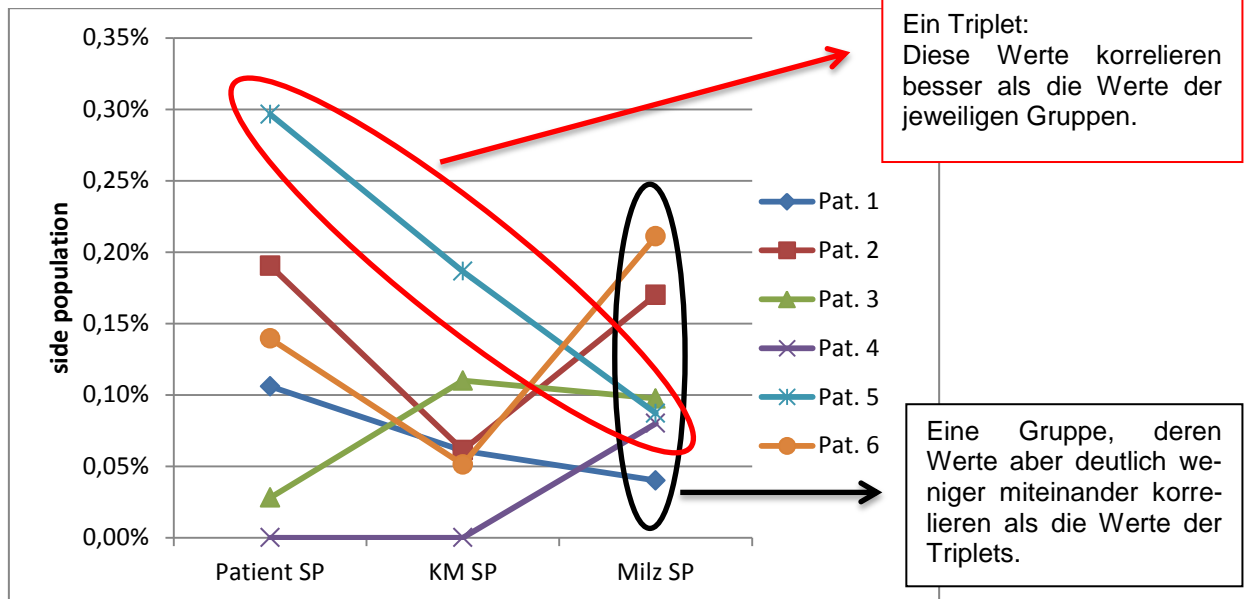
Die an Zelllinien durchgeführten Untersuchungen sind in ihrer klinischen Aussagekraft zumeist stark eingeschränkt, da Zelllinien in Kultur eine Vielzahl von sekundären Mutationen und Resistenzen entwickeln, die den Phänotyp substantiell beeinflussen. Nun stellt sich die Frage, ob die humanen leukämischen Zellen durch das Anwachsen und Vervielfältigen in der Maus ebenfalls ihren Phänotyp ändern und somit die Ergebnisse relevant beeinflussen. Eine weitere Frage ist, wie sich der Anteil der leukämischen Stammzellen durch die seriellen Reimplantationen verändert. Zuletzt soll auf den Einfluss der murinen SP auf die leukämische SP eingegangen werden.

#### **4.3.1 Korrelation der SP aus murinem Knochenmark und Milz mit der SP aus Primärmaterial**

Die physiologische Hämatopoese wird unter anderem von Faktoren aus dem zellulären Umfeld im Knochenmark bestimmt (Stammzellnische) (Heissig 2005). Durch die neue Umgebung, die die humanen leukämischen Zellen in der Maus vorfinden, könnte sich der Phänotyp der leukämischen Zellen also verändern. Dies hätte zur Folge, dass sich die Leukämiepopulationen mit den Methoden und Tests, welche man direkt nach der Knochenmarkentnahme beim Kind anwendet, (genaue Beschreibung dieser Methoden findet sich unter Punkt 1.3.3) nicht mehr detektieren lassen, oder die Werte sich so stark verändern, dass

diese nicht mehr die Ergebnisse der an Primärmaterial durchgeführten Untersuchungen widerspiegeln.

Um diese Frage zu klären, wurde die SP, die am Tag der Diagnose gemessen wurde, mit der SP aus Knochenmark und Milz der erstgemessenen Mäusegeneration verglichen. Von 6 Patienten lagen die entsprechenden Werte vor, so dass sich folgendes Schaubild ergibt:



**Abbildung 21: Leukämische SP aus der Maus vs. SP aus dem KM des Patienten**

Korrelation der SP aus murinem Knochenmark und der murinen Milz mit der SP aus humanem Knochenmark. Über „Patient SP“ sind alle sechs Werte der gemessenen SP bei Erstdiagnose aufgelistet. Unter „KM SP“ bzw. „Milz SP“ sind vergleichend alle Werte der gemessenen SP aus dem Knochenmark bzw. der Milz der Maus aufgeführt.

Um zu zeigen, von welchen Faktoren die Höhe der SP aus dem murinen KM und aus der murinen Milz abhängt, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Diese zeigt, dass der Ausgangswert der SP aus der direkten Patientenprobe auf den Wert der SP im KM und Milz der Maus den deutlich größten (50 %) Einfluss hat. Das jeweilige Kompartiment (Milz oder Knochenmark), aus welchem die Zellen entnommen wurden, beeinflusst die Höhe der SP nur mit 7 %. Die restlichen 43 % sind unbestimmte Einflussfaktoren, wie Auswertefehler oder Eigenschaften der Maus, die den Wert der SP beeinflussen. Dies bedeutet, dass der Wert der SP nach der Mauspassage sich ändert, aber trotzdem mit dem Ausgangswert, welcher direkt bei Erstdiagnose gemessen wurde, vergleichbar ist.



Ebenfalls in dem Schaubild zu erkennen ist, dass im Knochenmark und der Milz der Maus immer eine SP zu sehen war, wenn diese auch direkt im Patientenknochenmark gemessen werden konnte. Die SP bleibt also erhalten, auch wenn die leukämischen Zellen in die Maus übertragen werden und sich dort vervielfältigen. Eine Ausnahme davon bildet Patient 4, bei welchem keine SP in der Knochenmarksprobe direkt aus dem Patienten („Patient SP“) gemessen wurde, aber eine SP von 0,08 % aus der Probe der murinen Milz.

Eine Erklärung für diese leichten Schwankungen der Werte der SP liegt darin, dass die absolute Anzahl der SP meist in einem Bereich von 5-100 Zellen liegt. Das heißt, dass schon eine minimale Verschiebung der Gates einen deutlichen Unterschied in der prozentualen Höhe der SP machen kann. Trotz äußerst sorgfältiger Auswertung besteht daher die Möglichkeit, dass durch „statistisches Rauschen“ die Werte leicht variieren.

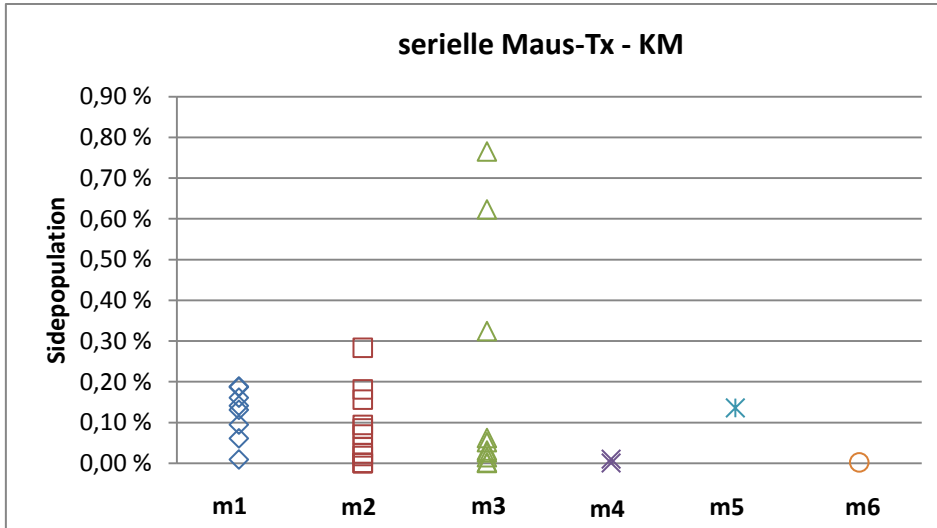
Alle diese Beobachtungen sprechen dafür, dass man das NSG-Mausmodell dazu verwenden kann, leukämische Zellen zu vervielfältigen, ohne dabei die Werte der SP so zu verändern, dass man sie nicht mit denen, welche sofort nach der Knochenmarksentnahme beim Kind gemessen wurden, vergleichen könnte. Dies ist von besonderer Bedeutung, da für die Analyse von leukämischen Stammzellen zu wenig Material zur Verfügung steht. Mit dieser Methode kann man also leukämische Zellen und insbesondere auch leukämische rogenitorzellen vermehren, um weitere Tests und Untersuchungen durchzuführen.

#### **4.3.2 Verlauf der SP während serieller Mastransplantationen**

Nachdem die humanen leukämischen Zellen aus dem Knochenmark und der Milz der Maus extrahiert wurden, wurde ein Teil der Zellen erneut in eine neue Maus retransplantiert. Dadurch entstanden weitere Mausgenerationen (m1, m2, m3, ...) mit Zellen von derselben Leukämie des gleichen Patienten.

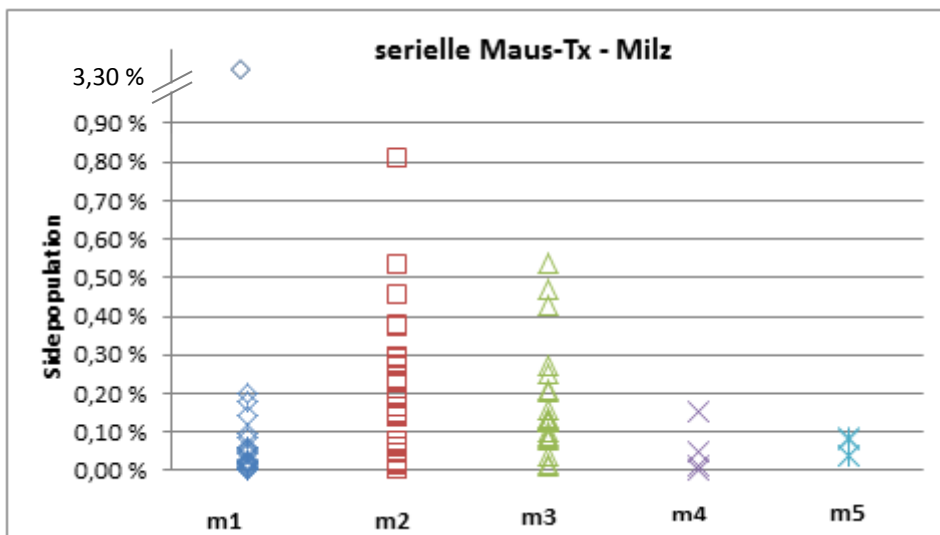
Es wurde nun untersucht, wie sich die SP von Generation zu Generation verhielt. Wie unter 4.1.1.4 dargestellt wurde, stellen die Zellen der SP leukämische Progenitorzellen dar. Diese sind für das Anwachsen und Vervielfältigen der leukämischen Zellen im neuen Organismus verantwortlich. So stellt sich die Frage, ob sich durch die häufigen Retransplantationen, also durch das häufige An-

wachsen der leukämischen Zellen in der Maus, die Höhe der SP von Mausgeneration zu Mausgeneration verändert. Dazu wurden zwei Diagramme erstellt, in denen der Anteil der leukämischen Stammzellen an den gesamten leukämischen Zellen (die Höhe der SP) über die jeweilige Mäusegeneration aufgetragen wurde.



**Abbildung 22: serielle Maus-Tx – KM**

Höhe der SP aus dem Knochenmark der Maus, gruppiert nach den Mäusegenerationen. Auf der y-Achse ist die Prozentuale Höhe der SP aufgetragen und auf der x-Achse die Mäusegenerationen m1-m6.



**Abbildung 23: serielle Maus-Tx – Milz**

Dasselbe Schaubild wie Abbildung 22, nur, dass hier die SP aus der Milz der Maus gegen die Mäusegenerationen aufgetragen sind.

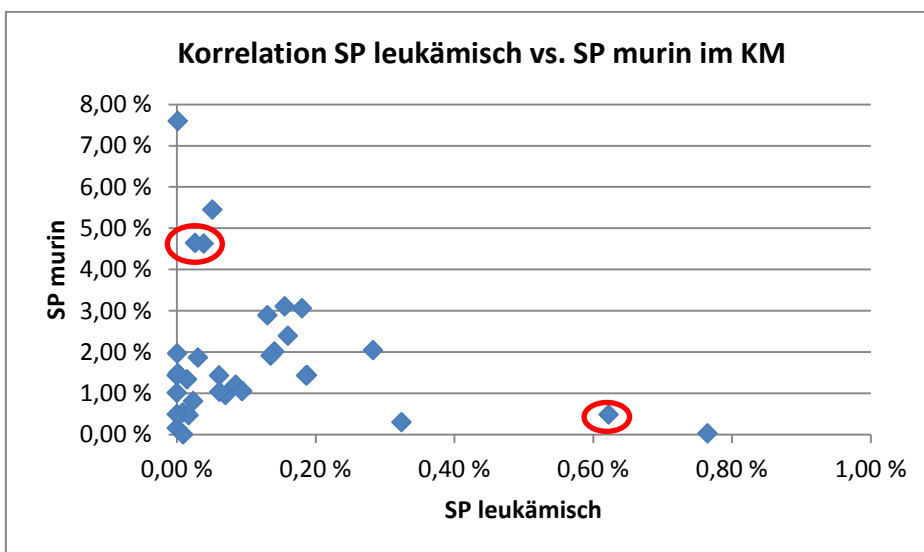
Mit dem Pearson-Korrelationskoeffizient wurde errechnet, ob die Höhe der SP mit der Häufigkeit der Transplantationen korreliert. Für beide Abbildungen ist der Pearson-Wert sehr klein (Abbildung 22:  $r = -0,024$  und Abbildung 23:  $r = -$

0,092). Dies spricht dafür, dass die Transplantationshäufigkeit die SP nicht beeinflusst. Wie in den Diagrammen zu erkennen ist, gab es in den Mäusegenerationen vier bis sechs (m4 bis m6) nur sehr wenige Proben, was die statistische Aussagekraft begrenzt.

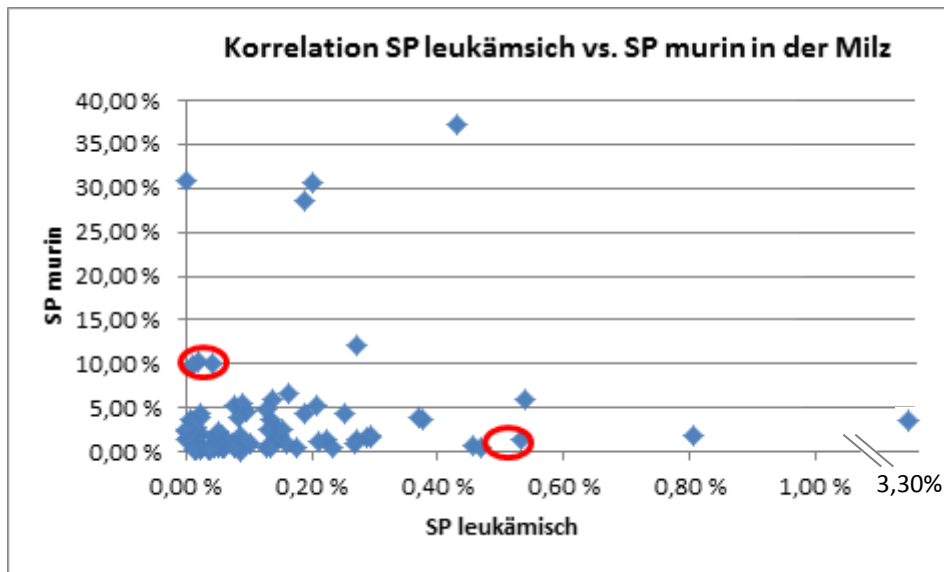
#### 4.3.3 Korrelation der leukämischen SP aus der Maus mit der SP der Mäusezellen

Eine Herausforderung der Arbeit war, die in den Proben noch vorhandenen Mäusezellen von den leukämischen humanen Zellen, die in der Maus herangewachsen sind, zu unterscheiden und zu trennen (siehe 4.1.1.2). Nachdem die Zellen aus der Maus sicher in eine humane und murine Population aufgeteilt waren, wurden beide Zellpopulationen auf ihre SP hin untersucht. Das heißt, dass bei allen Proben immer eine leukämische SP und eine murine SP vorhanden ist.

Um beurteilen zu können, ob diese beiden SP in dem Sinne miteinander korrelieren, dass bei einer hohen murinen SP ebenfalls eine hohe humane SP vorhanden ist bzw. umgekehrt, wurden folgende zwei Schaubilder (Abbildung 24 und Abbildung 25) erstellt. In Abbildung 24 ist die murine SP aus dem Knochenmark gegen die leukämische SP aus dem Knochenmark der Maus aufgetragen. In Abbildung 25 ist auf der y-Achse die murine und auf der x-Achse die leukämische SP jeweils aus der Milz der Maus zu sehen.



**Abbildung 24: Korrelation der leukämischen SP mit der murinen SP aus dem KM.** Die leukämische SP (x-Achse) wird gegen die murine SP (y-Achse) aufgetragen. Dabei werden nur die Werte aus dem KM miteinander verglichen.



**Abbildung 25: Korrelation SP leukämisch mit der SP murin jeweils aus der Milz.**

Die leukämische SP (x-Achse) wird gegen die murine SP (y-Achse) aufgetragen. Dabei werden nur die Werte aus der Milz miteinander verglichen.

Für beide Diagramme wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet (Abbildung 24:  $r = -0,253$  und Abbildung 25:  $r = 0,121$ ), welcher bestätigt, dass die Höhe der murinen SP nicht die Höhe der leukämischen SP beeinflusst. Ist der Wert der murinen SP hoch, heißt dies nicht automatisch, dass auch der Wert der leukämischen SP hoch ist (siehe rot umrandete Werte). Dies spricht dafür, dass die Ausbildung von leukämischer Progenitorzellen nicht signifikant durch die murine Blutzellbildung beeinflusst wird, was für das NOD/LtSz-scid IL2R $\gamma^{\text{null}}$ -Mausmodell eine wichtige Voraussetzung bildet.

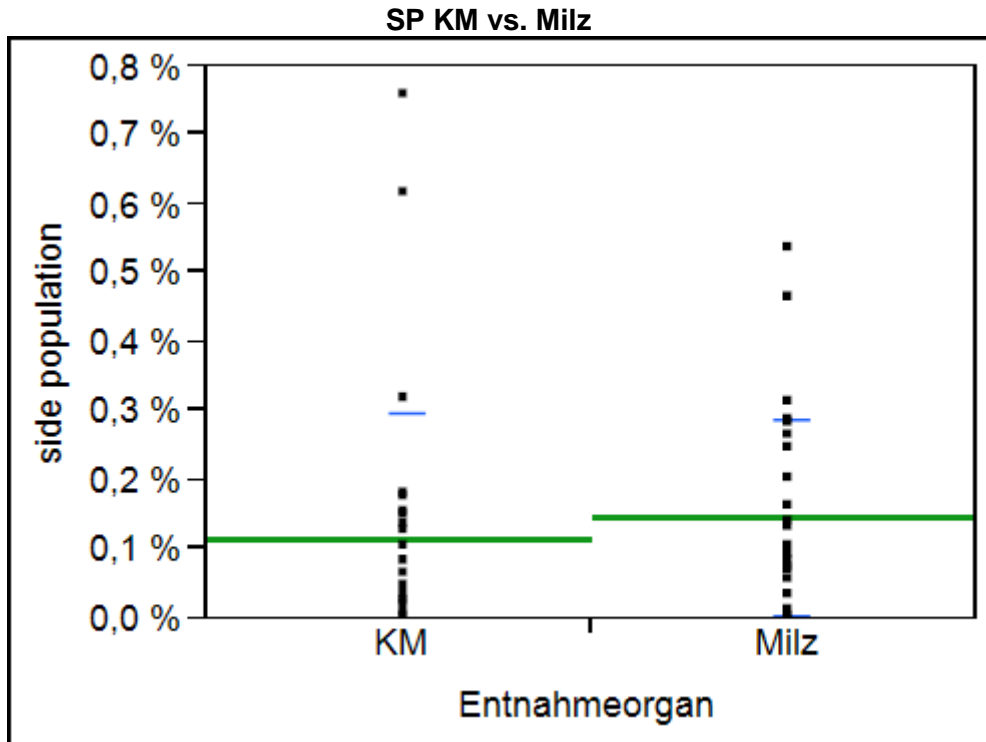
Zusammenfassend kann man sagen, dass das Mausmodell nach den durchgeführten Untersuchungen und Auswertungen keinen wesentlichen Einfluss auf die leukämischen Zellen hat. Ist in der Patientenprobe eine leukämische SP nachgewiesen worden, so konnten wir in allen Fällen auch eine SP in den Milz- und Knochenmarkproben aus der Maus detektieren. Auch durch die zum Teil häufigen Retransplantationen konnte keine signifikante Veränderung der SP festgestellt werden. Zudem scheint es, dass der Anteil von Blutstammzellen der Maus die Fraktion von leukämischen Progenitorzellen, welche durch die Hoechst-Färbung detektiert werden, nicht beeinflusst.

#### **4.4 Analyse der leukämischen Zellen, insbesondere der leukämischen Progenitorzellen**

Im letzten Abschnitt des Ergebnisteiles soll insbesondere auf die leukämische SP eingegangen werden. (In der Einleitung unter Punkt 1.3.3 wurde erklärt, was die SP genau darstellt.) Zuerst werden die leukämischen Progenitorzellen aus dem Knochenmark und der Milz der Maus verglichen. Danach soll die mögliche Korrelation der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen und der SP behandelt werden. Im dritten Punkt wird der Erfolg des Engraftment mit der Höhe der SP verglichen und zuletzt wird auf die Anwachsdauer und deren möglichen Auswirkungen auf die leukämischen Zellen eingegangen.

##### **4.4.1 Vergleich der leukämischen SP aus dem Knochenmark mit der leukämischen SP aus der Milz der Maus**

Um festzustellen, ob es in Abhängigkeit davon, aus welchem Entnahmeorgan (Knochenmark oder Milz der Maus) die leukämischen Zellen stammen, Unterschiede in der Höhe der SP gibt, wurden alle Proben gegenübergestellt, von denen sowohl Zellen aus der Milz als auch aus dem Knochenmark vorhanden waren (29 Proben) (siehe Abbildung 26: SP KM vs. Milz). Würde die SP der Zellen aus dem Knochenmark durchschnittlich höher sein als die der Zellen aus der Milz, wäre es von Vorteil, zur Retransplantation Zellen aus dem Knochenmark zu verwenden, da Zellen mit einem höheren Unreifeegrad, also Zellen mit Stammzeleigenschaften, besser und schneller anwachsen und sich dadurch schneller vermehren. Entsprechend wäre es von Vorteil zur Retransplantation Zellen aus der Milz der Maus zu verwenden, wenn dort der Anteil der leukämischen Progenitorzellen an den gesamten leukämischen Zellen höher wäre.

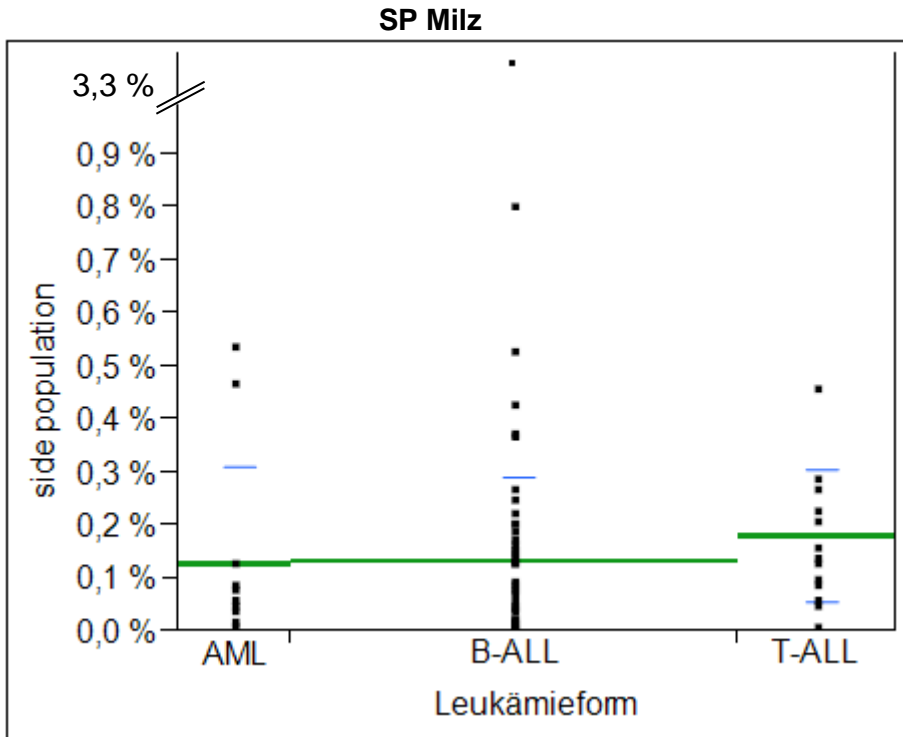


**Abbildung 26: SP KM vs. Milz**

Alle Werte der SP sind getrennt nach dem Herkunftsorgan Milz bzw. KM aufgetragen. Der Mittelwert der SP-Werte aus dem KM liegt bei 0,11 % und die Standardabweichung bei 0,18 %. Der Mittelwert der SP-Werte aus der Milz beträgt 0,14 % und die Standardabweichung 0,14 %.

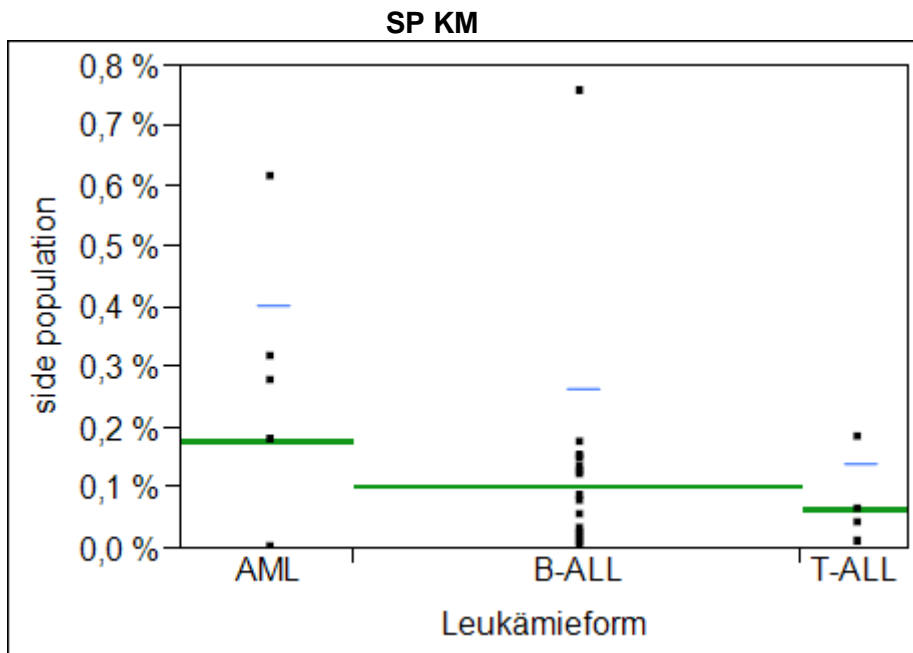
Der überwiegende Teil der Werte der SP aus dem Knochenmark und der SP aus der Milz befinden sich zwischen 0 und 0,4 Prozent. Jeweils nur zwei Werte überschreiten diesen Wert. Der T-Test, der den statistischen Zusammenhang zwischen den Werten der SP aus dem Knochenmark und der Milz der Maus untersucht, ergibt einen P-Wert von 0,5. Dieser zeigt, dass sich die SP aus der Milz und aus dem Knochenmark nicht unterscheiden. Die Pearson-Korrelation zwischen den jeweiligen Werten aus Milz und Knochenmark von 0,225 mit einem P-Wert von 0,12 zeigt, dass die Werte nur schwach korrelieren. Um eine bessere Aussage treffen zu können, ist die Anzahl der gemessenen Werte zu gering.

Da drei verschiedene Leukämieformen untersucht wurden, wurde in der folgenden Abbildung die Höhe der SP getrennt nach der jeweils zugrundeliegenden Leukämieform aufgetragen, um ebenfalls Unterschiede zwischen der Höhe der SP und dem jeweiligen Entnahmeorgan Milz oder Knochenmark feststellen zu können.



**Abbildung 27: SP Milz**

Der Anteil der SP an den gesamten leukämischen Zellen aus der Milz wird gegen die jeweiligen Leukämieformen aufgetragen, von denen die leukämischen Zellen abstammen. Eingezeichnet sind die Mittelwerte (AML: 0,13 %, B-ALL: 0,13 %, T-ALL: 0,18 %) und die Standardabweichungen (AML: 0,18 %, B-ALL: 0,16 %, T-ALL: 0,12 %).



**Abbildung 28: SP KM**

Der Anteil der SP an den gesamten leukämischen Zellen aus dem KM wird gegen die jeweiligen Leukämieformen aufgetragen, von denen die leukämischen Zellen abstammen. Eingezeichnet sind die Mittelwerte (AML: 0,18 %, B-ALL: 0,10 %, T-ALL: 0,06 %) und die Standardabweichungen (AML: 0,22 %, B-ALL: 0,16 %, T-ALL: 0,07 %).

Der durchgeführte T-Test zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Höhe der SP im Knochenmark und in der Milz (aufgetrennt nach den jeweiligen zugrundeliegenden Leukämieformen) gibt (B-ALL Milz vs. KM:  $p=0,388$ ; AML Milz vs. KM:  $p=0,573$ ). Ein Trend ergeben die Werte der T-ALL in Milz vs. KM, bei denen der T-Test ein  $p$  von  $0,065$  ergibt. In der Milz wurden in diesem Fall durchschnittlich deutlich höhere Werte gemessen. Problem hierbei ist, dass nur sehr wenige Werte der SP von T-ALLs aus dem KM der Maus vorliegen ( $n = 5$ ).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Anteil der SP an den Blasten nicht vom Entnahmeorgan der Maus, Knochenmark oder Milz, abhängt. Dies bedeutet, dass man bei den Leukämieformen der B-ALL und der AML sowohl Zellen aus der Milz als auch aus dem Knochenmark verwenden kann. Bei der T-ALL sind die Proben aus der Milz tendenziell mit LSC-artigen Zellen angereicht. Dies ist ein wichtiges Ergebnis, da man oft deutlich mehr Blasten aus der Milz gewinnen kann und man somit zu den durchzuführenden Untersuchungen und Tests mehr Blasten zur Verfügung hat, wenn man sich nicht auf das Knochenmark beschränken muss.

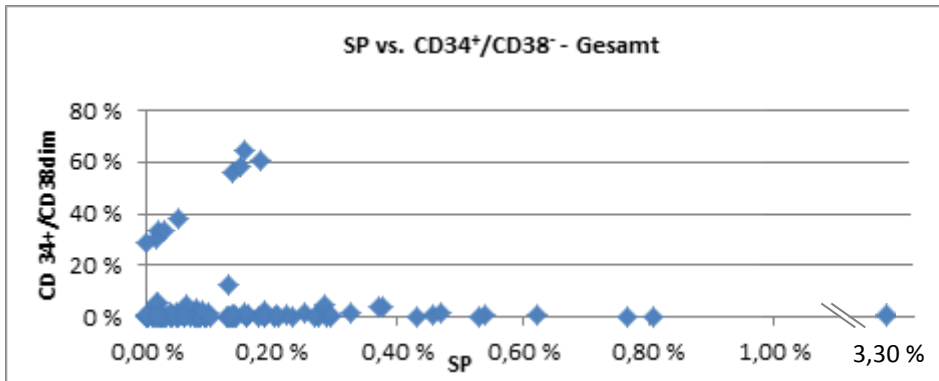
#### **4.4.2 Korrelation der SP mit den CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen**

Wie in der Einleitung unter Punkt 1.2.2 „Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen“ beschrieben, sind Zellpopulationen, die CD34 exprimieren und für CD38 negativ bzw. schwach positiv (dim) sind, deutlich mit Stammzellen angereicht (Conneally 1997).

Da die Hoechst-Färbung ebenfalls zur Identifikation von Stammzellen dient, wurde die Höhe der SP mit der Höhe der CD34<sup>+</sup> und CD38<sup>-</sup> bzw. schwach positiven (dim) Zellen in den folgenden sechs Abbildungen verglichen. Um eine mögliche Korrelation zwischen den Werten der SP und den Werten der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen statistisch nachzuweisen, wurde für jede Abbildung getrennt der Pearson-Korrelationskoeffizient und der  $p$ -Wert berechnet (siehe Beschreibung zur jeweiligen Abbildung).



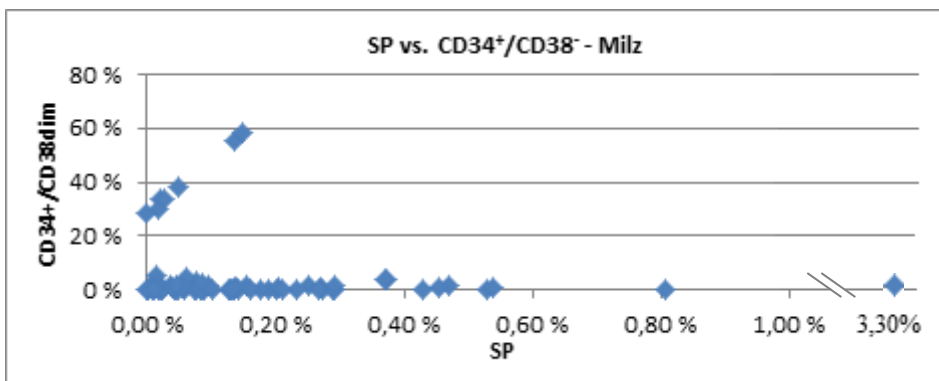
In dieser Abbildung sind die Werte der  $CD34^+/CD38^-$ -Zellen der SP aller Proben gegenübergestellt:



**Abbildung 29: SP vs.  $CD34^+/CD38^-$  Gesamt**

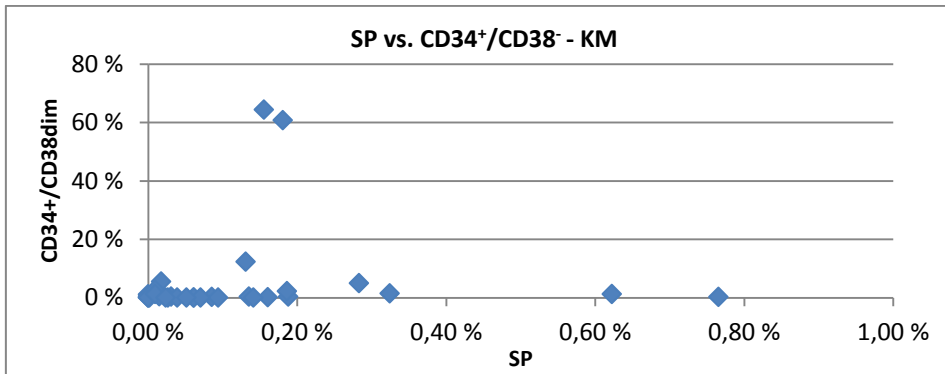
Die Höhe der SP (x-Achse) ist gegen die Höhe der  $CD34^+/CD38^-$ -Zellen aufgetragen. Dabei wurden alle Werte verwendet, ungeachtet des Entnahmeorgans bzw. der verschiedenen Leukämieformen. Pearson: -0,0589; p-Wert: 0,26

In den folgenden zwei Abbildungen wurden die Werte der Proben getrennt nach dem Herkunftsorgan Knochenmark (Abbildung 31) bzw. Milz (Abbildung 30) verglichen.



**Abbildung 30: SP vs.  $CD34^+/CD38^-$  Milz**

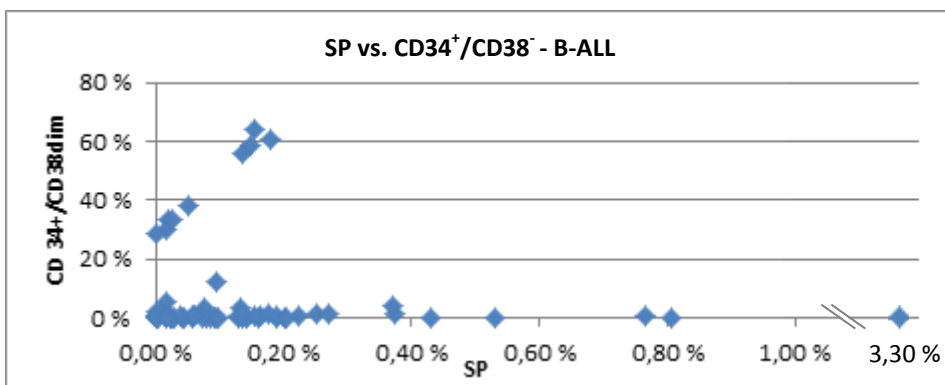
Die Höhe der SP (x-Achse) ist gegen die Höhe der  $CD34^+/CD38^-$ -Zellen aufgetragen. Dabei wurden nur die Werte der SP aus der Milz verwendet, ungeachtet der verschiedenen Leukämieformen. Pearson: -0,1448; p-Wert: 0,11



**Abbildung 31: SP vs. CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> KM**

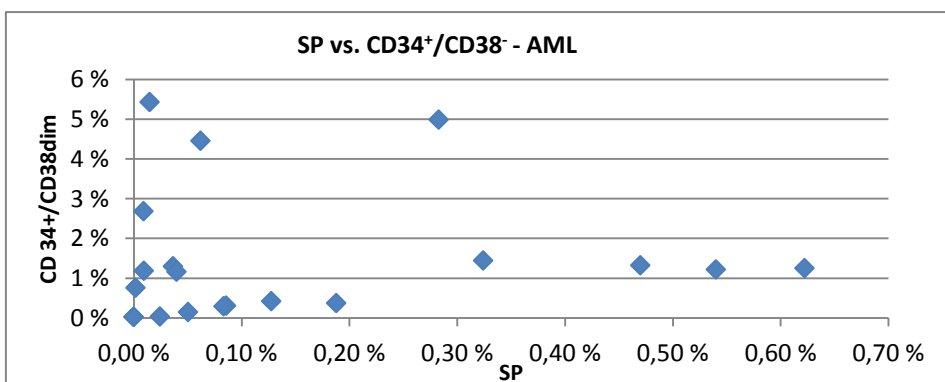
Die Höhe der SP (x-Achse) ist gegen die Höhe der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen aufgetragen. Dabei wurden nur die Werte der SP aus dem KM verwendet, ungeachtet der verschiedenen Leukämieformen. Pearson: 0,0858; p-Wert: 0,32

In den folgenden drei Abbildungen wurden die Werte der Proben getrennt nach den jeweils zugrundeliegenden Leukämieformen verglichen.



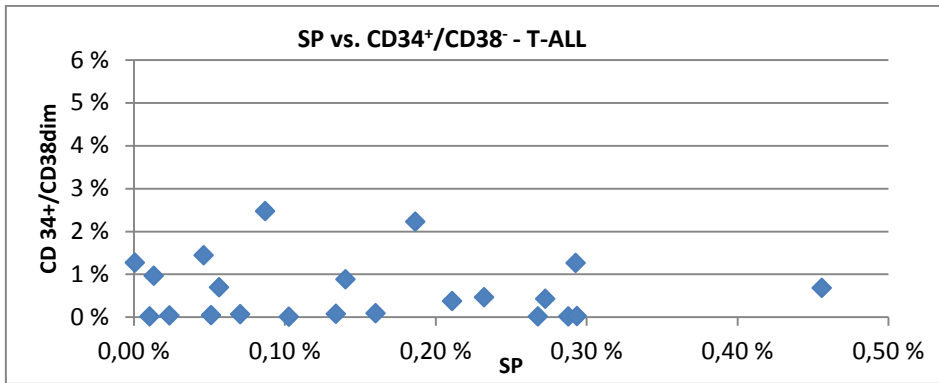
**Abbildung 32: SP vs. CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> B-ALL**

Die Höhe der SP (x-Achse) ist gegen die Höhe der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen aufgetragen. Dabei wurden nur die Werte der B-ALLs verwendet, ungeachtet des Herkunftorgans KM oder Milz. Pearson: -0,0679; p-Wert: 0,29



**Abbildung 33: SP vs. CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> AML**

Die Höhe der SP (x-Achse) ist gegen die Höhe der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen aufgetragen. Dabei wurden nur die Werte der SP der AMLs verwendet, ungeachtet des Herkunftorgans KM oder Milz. Pearson: 0,0526; p-Wert: 0,41



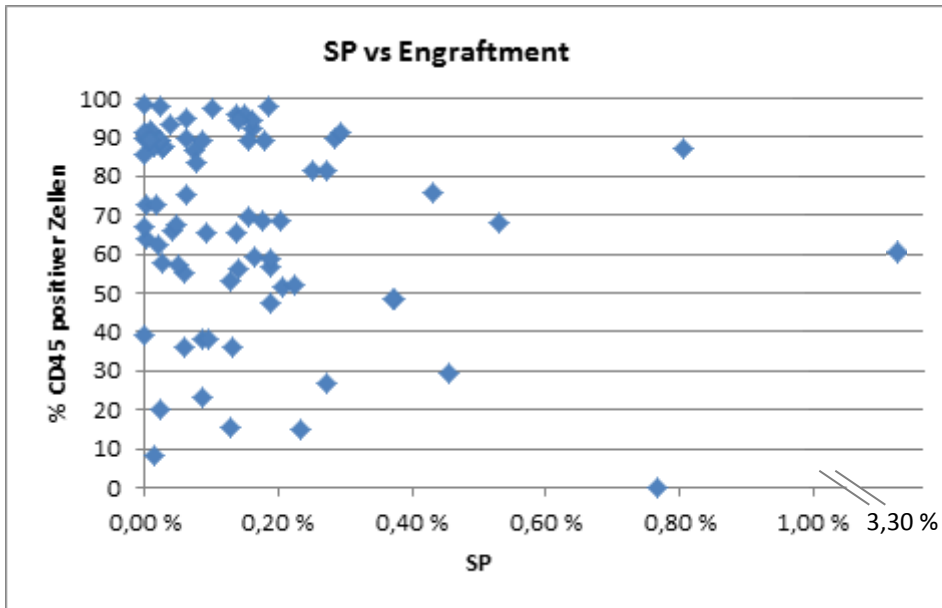
**Abbildung 34: SP vs. CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> T-ALL**

Die Höhe der SP (x-Achse) ist gegen die Höhe der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen aufgetragen. Dabei wurden nur die Werte der SP der T-ALLs verwendet, ungeachtet des Herkunftorgans KM oder Milz. Pearson: -0,0993; p-Wert: 0,33

Zusammenfassend kann kein Zusammenhang zwischen der SP und der Höhe der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen gezeigt werden. Somit muss mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgehen werden, dass die Höhe der Stammzellpopulation, die über Hoechst 33342 identifiziert wird, nicht mit der korreliert, die über die Oberflächenmarker CD34 und CD38 gemessen wird.

#### 4.4.3 Einfluss der Engraftmentrate auf die SP

In diesem Abschnitt wurde die Korrelation zwischen SP und der Höhe der humanen Blasten (dies entspricht dem Wert der humanen CD45 positiven Zellen, der in den Milz- bzw. Knochenmarkszellen gemessen wurde) untersucht. Die Höhe der Zellen, die für humanes CD45 positiv waren, wurde mit dem Erfolg des Engraftment gleichgesetzt.



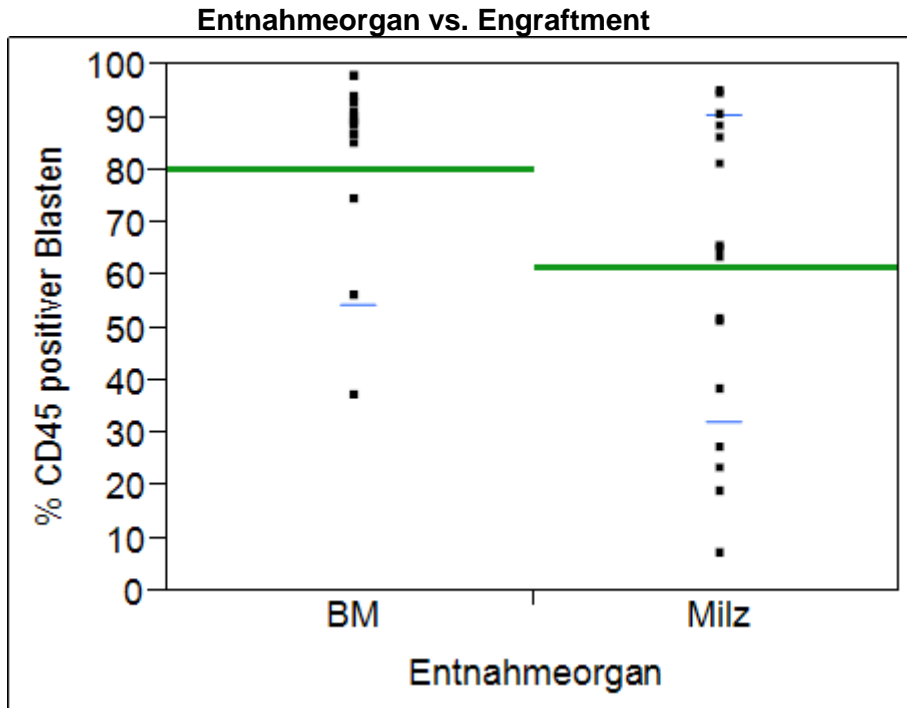
**Abbildung 35: SP vs. Blasten**

Auf der y-Achse ist die prozentuale Höhe der Blasten im peripheren Blut der Maus aufgetragen kurz bevor diese geschlachtet wurde. Die y-Achse zeigt die Höhe der jeweiligen SP an.

Die berechnete Pearsonkorrelation von  $-0,14$  zeigt, dass kein Zusammenhang zwischen Höhe der Blasten bei Schlachtung und der jeweiligen Höhe der SP besteht. Dies bedeutet, dass bei einer Leukämie, die sehr gut in der Maus engraftet ist, so dass fast nur noch humane leukämische Zellen im Knochenmark bzw. der Milz der Maus vorhanden waren, keine höhere SP nachzuweisen war, als bei Proben, bei welchen nur 50 % humaner Blasten in der Milz oder dem Knochenmark nachzuweisen waren.

#### 4.4.4 Unterschiede des Engraftment im Knochenmark und Milz der Maus

Da 98 % der Proben getrennt nach Herkunftsorgan (Knochenmark und Milz) untersucht wurden, wird im nachfolgenden Schaubild das Engraftment im Knochenmark und der Milz jeweils getrennt betrachtet. Der Prozentwert der CD45 positiven Zellen, welcher in der Zellsuspension aus dem Knochenmark und der Milz gemessen wurde, wird dabei über dem jeweiligen Herkunftsorgan der Zellen aufgetragen. Im Schaubild sind nur Proben aufgetragen, von denen sowohl Werte aus dem Knochenmark und der Milz vorhanden waren und zudem noch der Anteil der CD45 positiven Blasten sofort nach der Schlachtung in Milz und Knochenmark getrennt gemessen wurde. Von 17 Proben lagen diese Werte vor.



**Abbildung 36: Herkunftsorgan vs. Engraftment**

Auf der x-Achse ist das Entnahmeorgan aufgetragen, aus welchem die humanen leukämischen Zellen aus der Maus stammen. Auf der y-Achse ist die Engraftmentrate im jeweiligen Entnahmeorgan KM oder Milz aufgetragen. Eingezeichnet sind die Mittelwerte (BM: 80,2 %, Milz: 61,5 %) und die Standardabweichungen (BM: 25,9 %, Milz: 29,2 %).

Wie im Schaubild zu erkennen ist, liegen nur drei der 17 Werte (18 %) aus dem Knochenmark, aber zehn Werte (59 %) aus der Milz unter 70 %. Der berechnete T-Test zeigt einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,0089. Dies bedeutet, dass es signifikante Unterschiede zwischen dem Engraftment in der Milz und dem Knochenmark gibt. Durchschnittlich wächst die Leukämie besser im Knochenmark als in der Milz der Maus an. Doch wie in 4.4.1 beschrieben, hat dies keinen deutlichen Einfluss auf die Höhe der SP, welche man in der Milz oder dem Knochenmark der Maus misst.

#### 4.4.5 Einfluss der Anwachsdauer auf die leukämischen Zellen

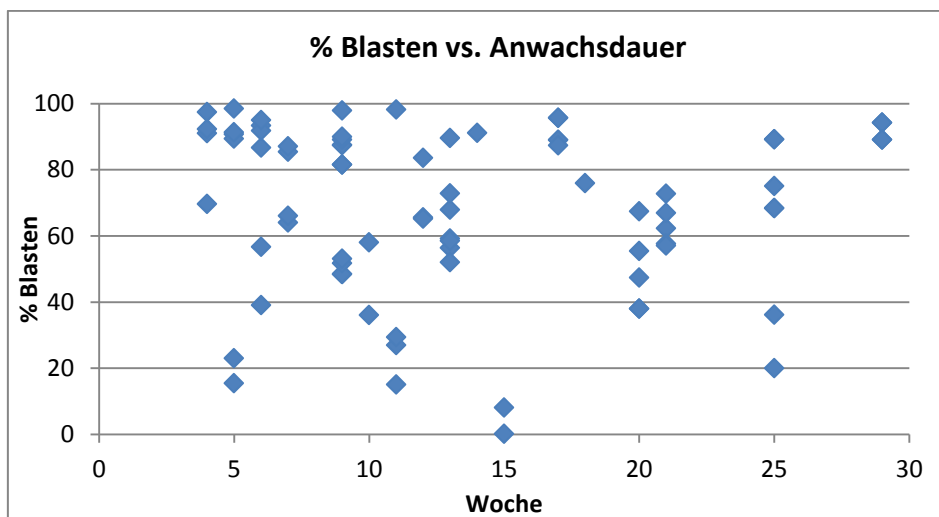
Im Folgenden wurde untersucht, ob die Zeitspanne eine Rolle spielt, die die Leukämie braucht, um in der Maus anzuwachsen. Dabei wurde erstens auf die Frage eingegangen, ob der Wert der humanen Blasten, der kurz nach der Schlachtung im Knochenmark oder der Milz der Maus gemessen wurde, abhängig von der Anwachsdauer ist. Zudem wurde zweitens dargestellt, ob bei aggressiven Leukämien, die nur eine kurze Zeit zum Anwachsen in der Maus

brauchten, die SP höher ist, als bei Leukämien, welche länger brauchten, um in der Maus zu engraften.

Den Mäusen wurde in regelmäßigen Zeitabständen Blut entnommen, um zu kontrollieren, wie hoch der Anteil an humanen CD 45 positiven Blasten in der Maus ist. Überschritt dieser den Wert von 60 % oder ging es den Mäusen sichtbar schlecht, wurden diese getötet. Dies bedeutet, dass Mäuse, die in sehr kurzer Zeit einen hohen Wert an CD45 positiven Blasten im Blut aufwiesen, schnell geschlachtet wurden, während Mäuse, in denen die Leukämie nur langsam anwuchs, spät geschlachtet wurden.

#### 4.4.5.1 Vergleich des Engraftment mit der Anwachsdauer

Die prozentuale Höhe der Blasten kurz vor der Schlachtung wurde mit dem Erfolg des Engraftment gleichgesetzt. Das heißt, Leukämien die innerhalb weniger Wochen im peripheren Blut in der Maus einen hohen Wert an humanen CD45<sup>+</sup> Zellen aufwiesen, haben ein schnelles Engraftment (Anwachsen der humanen Leukämie in der Maus). Die Frage war nun, ob Leukämien, die zum engraften länger brauchten, am Tag der Schlachtung einen höheren oder geringeren Anteil an humanen Blasten in der Maus aufwiesen.



**Abbildung 37: % Blasten vs. Anwachsdauer**

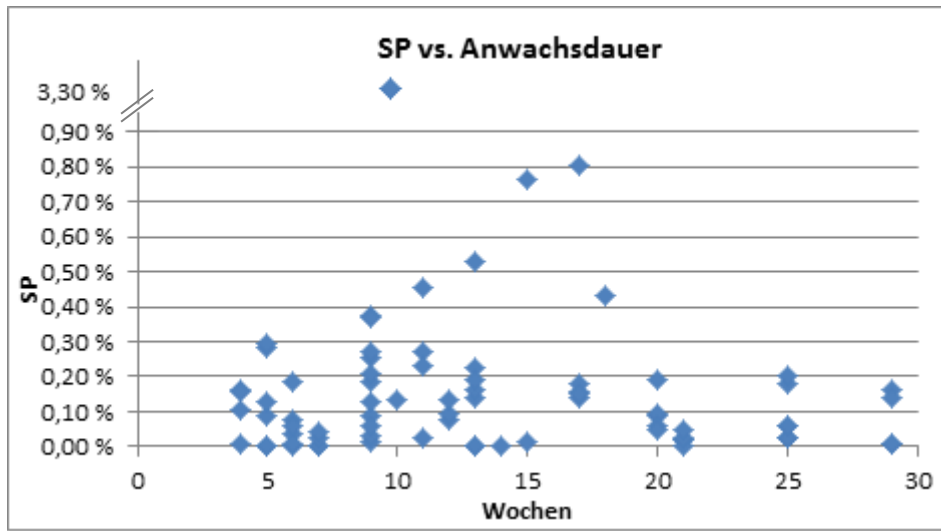
Die prozentuale Höhe der Blasten bei Schlachtung wird gegen die Wochen von Transplantation bis Schlachtung aufgetragen.

Wie in der Abbildung und durch den berechneten Pearsonwert von -0,0478 zu sehen ist, gab es keine Korrelation zwischen der Anzahl der Blasten und der Anzahl der Wochen bis zur Schlachtung. Dies bedeutet, dass sowohl Mäuse,

die nach einer kurzen Anwachsdauer geschlachtet wurden, als auch Mäuse die spät geschlachtet wurden, da sich die leukämischen Zellen nur langsam vermehrten, ähnlich hohe Engraftmentraten aufwiesen.

#### 4.4.5.2 Vergleich der SP mit der Anwachsdauer

Im folgenden Schaubild wird die Höhe der SP mit der Zeit verglichen, die die leukämischen Zellen brauchten, um in der Maus zu engraften:



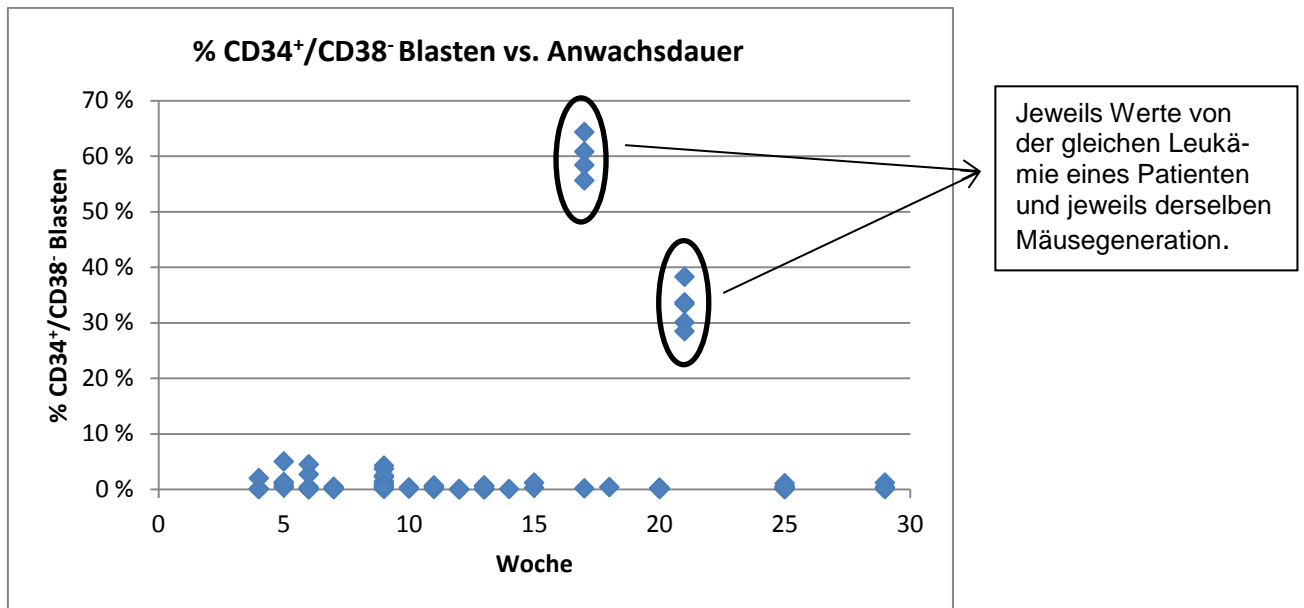
**Abbildung 38: SP vs. Anwachsdauer**

Auf der y-Achse ist die Höhe der SP aufgetragen und auf der x-Achse die Anzahl der Wochen von Transplantation der leukämischen Zellen in die Maus bis zur Schlachtung des Tieres.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Anwachsdauer und der Höhe der SP zu zeigen, wurde der Pearson-Koeffizient berechnet, welcher einen Wert von -0,07 ergab. Dies bestätigt, dass die beiden Werte nicht korrelieren. Daraus kann man schließen, dass die Höhe der SP nicht davon abhängt, wie schnell die Leukämie in der Maus angewachsen ist.

#### 4.4.5.3 Vergleich der Anwachsdauer mit CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen

Wie unter Punkt 4.4.5.2 beschrieben, hat die Anwachsdauer der Leukämie auf den prozentualen Anteil der SP an den vitalen Blasten keinen signifikanten Einfluss. Da die SP jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit eine andere Stammzellpopulation darstellt als die über die Oberflächenmarker CD34 und CD38 identifizierten Stammzellen (vergleiche Punkt 4.4.2), verglichen wir zusätzlich zu der SP auch die CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen mit der Anwachsdauer.



**Abbildung 39: % CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen vs. Anwachsdauer**

Der prozentuale Anteil der CD34 positiven und CD38 negativen Zellen wird gegen die Anzahl der Wochen zwischen Transplantation und Schlachtung aufgetragen.

Ebenso wie die prozentuale Höhe der SP an den vitalen Blasten und die Engraftmentrate, korreliert auch die Anzahl der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen nicht mit der Anwachsdauer. Die Pearsonkorrelation beträgt hier 0,224.

Zusammenfassend kann man sagen, dass kein Zusammenhang zwischen der Höhe der SP, den Blasten bei Schlachtung, dem Anteil von CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen und der Anzahl der Wochen zwischen Transplantation und Schlachtung festgestellt werden konnte. Dies bedeutet, dass die Anwachsdauer nach unseren Untersuchungen keinen Einfluss auf die untersuchten Eigenschaften von humanen leukämischen Zellen hat. Bemerkenswert ist, dass bei einer Leukämie, die sehr aggressiv ist, also schnell in der Maus anwächst, sich sowohl die SP als auch die Anzahl der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen nicht deutlich von einer langsam wachsenden Leukämie unterscheiden.

#### 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit der in Punkt 4.1 dargestellten Methode war es möglich, alle Proben, welche in der Maus engraften konnten, sicher in eine humane leukämische und murine Zellpopulation aufzuteilen. Anschließend gelang es mit Hilfe der Hoechst-Färbung sowohl bei der murinen als auch bei der leukämischen Zellpopulation eine SP nachzuweisen. Die Untersuchung der möglichen Einflussfaktoren der



zugrundeliegenden Leukämieart ergab, dass es keine signifikanten Unterschiede sowohl im Engraftment der unterschiedlichen Leukämiearten als auch zwischen dem Anteil der SP der zugrundeliegenden Leukämieform gab.

Die im Anschluss untersuchten Einflussfaktoren des Mausmodells auf die leukämischen Zellen zeigten, dass sich das Mausmodell gut zur Vermehrung der leukämischen Zellen und insbesondere der leukämischen Progenitorzellen, welche über den Farbstoff Hoechst 33342 identifiziert werden können, eignet. Der Wert der SP, den man aus den Mäuseproben misst, ist vergleichbar mit dem Wert, welcher direkt bei Erstdiagnose aus dem Knochenmark der Kinder gemessen wurde. Zudem beeinflusst nach unseren Untersuchungen die Transplantationshäufigkeit nicht den Wert der SP. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die murine Hämatopoese die leukämischen Zellen und insbesondere die SP nicht signifikant beeinflusst (siehe Punkt 4.3.3). Diese Untersuchungen sprechen deutlich dafür, dass das Mausmodell nur geringen Einfluss auf die leukämischen Zellen hat und eine gute Möglichkeit zur Vermehrung von leukämischen Zellen darstellt.

Die zuletzt durchgeführte Analyse der leukämischen Zellen und insbesondere der SP zeigte, dass der Anteil der SP an den leukämischen Zellen nicht davon abhängt, aus welchem Organ (Knochenmark oder Milz) die leukämischen Zellen stammen (siehe 4.4.1). Obwohl man signifikante Unterschiede im Engraftment zwischen der Milz und dem Knochenmark nachweisen konnte (siehe 4.4.4), hat dies keinen Einfluss auf die Höhe der SP. Die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen (Standarddefinition von humanen Stammzellen) und der SP ergab keine Korrelationen (siehe 4.4.2). Dies bedeutet, dass anhand des Farbstoffes Hoechst 33342 andere leukämische Progenitorzellen nachgewiesen werden, als über die Oberflächenmarker CD34 und CD38. Die zuletzt untersuchten Zusammenhänge zwischen Anwachsdauer und Höhe der verschiedenen leukämischen Zellpopulationen (SP, CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen, Blasten) ergab keinen Zusammenhang (siehe 4.4.5). Daraus schließen wir, dass sich die Werte der SP, der Blasten und der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen einer aggressiven Leukämie, die schnell in der Maus anwächst, nicht von den Werten

einer langsam wachsenden Leukämie unterscheiden. Somit die Anwachsdauer keinen Einfluss auf das Engraftment hat.

## 5 Diskussion

### 5.1 Einführung

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich das Verständnis über die Entstehung von Leukämien deutlich erweitert (siehe Kapitel 1). Parallel dazu hat sich die Therapie von akuten Leukämien im Kindesalter stark verbessert. Vor 40 Jahren lag die Heilungsrate einer ALL im Kindesalter noch zwischen 20 und 30 %, während heute über 80 % der an ALL erkrankten Kinder geheilt werden können. Dazu beigetragen haben vor allem zwei Punkte:

1. Immer effektivere Therapiestrategien im Rahmen von zytotoxischen Polychemotherapieprotokollen.
2. Die genaue Risikostratifizierung. Dabei spielen insbesondere folgende zwei Faktoren einen entscheidenden Beitrag zur Entscheidung über die Therapieintensität:
  - a. Typisierung von Leukämien: Anhand von Oberflächenmarkern und genetischen Eigenschaften der leukämischen Zellen können die Leukämien immer besser und genauer klassifiziert werden. Daraus resultiert ein zunehmend besseres Verständnis über die Entstehung einer Leukämie.
  - b. Bestimmung der MRD: Es hat sich gezeigt, dass die im Verlauf gemessene Höhe der MRD-Last mit der Rückfallwahrscheinlichkeit korreliert (Steenbergen 1995). So kann man anhand der MRD-Last entscheiden, wie aggressiv und lange man die Behandlung wählen sollte (Nyvold 2002, Brüggemann 2006).

Wie in Punkt eins beschrieben, ist es von entscheidender Bedeutung, dass in Deutschland mehr als 90 % der Kinder, welche an einer Leukämie erkrankt sind, in Behandlungsstudien, sogenannte Therapieoptimierungsstudien der Gesellschaft für Onkologie und Hämatologie, eingeschlossen werden (Ahlers 2009). Diese Studien werden regelmäßig ausgewertet und weiterentwickelt. Die aktuelle Therapieoptimierungsstudie, mit welcher Kinder mit einer ALL behan-

delt werden, ist die AIEOP-BFM-ALL 2009 Studie. Innerhalb dieser Studie werden die Patienten nach einheitlichen Therapiestandards behandelt und Therapiestrategien miteinander verglichen.

Um eine systematische Erhebung und Auswertung der klinischen Daten dieser Studien zu ermöglichen, werden die Patienten in drei Risikogruppen eingeteilt (Risikostratifizierung). Die Einteilung in die Risikogruppen findet anhand der unterschiedlichen Rückfallwahrscheinlichkeit statt. Daraus ergeben sich die Gruppen „Standard-Risiko“ (niedrige Rückfallwahrscheinlichkeit), „Mittel-Risiko“ (mittlere Rückfallwahrscheinlichkeit) und „Hoch-Risiko“ (hohe Rückfallwahrscheinlichkeit). Der wichtigste Faktor, der für die Rückfallwahrscheinlichkeit verantwortlich ist, ist das Ansprechen der Leukämie auf die Chemotherapie. Dies wird bestimmt, indem man das Ansprechen der Leukämie auf Prednison an Tag 8 kontrolliert und indem man das MRD-Level im Knochenmark, welches an Tag 33 und 78 gemessen wird, bestimmt. Da man das Ansprechen auf die jeweilige Chemotherapie erst nach Therapiebeginn kontrollieren kann, wäre es von Vorteil, bereits bei Diagnosestellung eine exaktere Risikostratifizierung durchführen zu können. Jedoch sollte sowohl eine zu intensive Therapie, welche Langzeitschäden mit sich bringt und lebensgefährliche Nebenwirkungen beinhaltet als auch eine Untertherapie mit der Folge eines Rezidives vermieden werden. Deshalb ist die Suche nach weiteren Faktoren zur Risikostratifizierung bei Diagnosestellung von großer Bedeutung, wozu diese Arbeit eine beitragen soll.

Bis heute ist der exakte Entstehungsmechanismus einer Leukämie ungeklärt. Jedoch geht man mit großer Wahrscheinlichkeit davon aus, dass bei der AML und bei der ALL leukämische Progenitorzellen bei der Entwicklung und Entstehung einer Leukämie eine entscheidende Rolle spielen. Deshalb wurde nach konkreten Zusammenhängen zwischen leukämischen Progenitorzellen und Prognose gesucht. Van Rhenen et al. konnten 2005 nachweisen, dass eine signifikante Korrelation zwischen der Stammzell-Population  $CD34^+/CD38^-$  bei Diagnosestellung und einem höheren MRD-Level, sowie schlechterem Überleben besteht. Zudem konnte bei der ALL und der AML im Kindesalter gezeigt werden, dass die Höhe des Anteils der leukämischen Progenitorzellen mit dem

Therapieansprechen signifikant korreliert (Ebinger 2010). Das heißt, je höher der Anteil der leukämischen Progenitorzellen an den Leukämiezellen bei Diagnosestellung ist, desto schlechter und langsamer schlägt die Behandlung an.

Von großem Vorteil ist, dass die Anzahl der leukämischen Progenitorzellen bereits bei Diagnosestellung gemessen werden kann. Deshalb wäre dies ein Faktor, der bereits bei Therapiebeginn zur Risikostratifizierung beitragen würde.

Wie beschrieben, wird davon ausgegangen, dass leukämische und hämatopoetische Stammzellen ähnliche Eigenschaften aufweisen. Darum versuchte man, die Techniken, die für die Analyse der HSC benutzt werden, zur Identifizierung der leukämischen Progenitorzellen einzusetzen. Es gelang, diese LSC-artigen Zellen über die Analyse von Oberflächenmarker und stammzellspezifischen Enzymaktivitäten genauer zu identifizieren (siehe 1.2.2 und 1.3.3). Dadurch konnte man nachweisen, dass leukämische Progenitorzellen, sowie HSC  $CD34^+$  und  $CD38^-$  sind (Costello 2000). Jedoch war schon zuvor bekannt, dass einzelne Leukämien kein  $CD34$  exprimieren (Blair 1998). Dazu passend konnte 2010 Taussig et al. zeigen, dass sowohl  $CD34^+$  also auch  $CD34^-$  Zellpopulationen leukämische Progenitorzellen enthalten. Zudem konnte gezeigt werden, dass  $CD34^+/CD38^+$  Zellen dazu in der Lage sind, in NOD/SCID Mäusen anzuwachsen und ein hohes Selbsterneuerungspotential aufweisen (Vormoor 2009, Le Viseur 2008, Kong 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse muss man die bisherige phänotypische Beschreibung der leukämischen Progenitorzellen ( $CD34^+/CD38^-$ ) neu überdenken und davon ausgehen, dass die Expression von CD-Markern in Leukämien aberrant und asynchron erfolgt.

Neben dem Nachweis leukämischer Progenitorzellen über Oberflächenmarker werden auch HSC-spezifische enzymatische Eigenschaften zum Nachweis genutzt. So entdeckte Goodell et al. 1996, dass man mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33342 eine distinkte Zellpopulation nachweisen kann, welche stark mit naiven Zellen angereichert ist, die Stammzeleigenschaften aufweisen (Goodell 1996). Diese Zellen, die den Farbstoff über aktiven Efflux ausscheiden können, werden als SP bezeichnet und können darüber identifiziert werden, dass sie weniger stark den Farbstoff Hoechst anreichern. 2001 konnte

Wulf et al. zeigen, dass die Zellen der SP in der Lage sind, in NOD/SCID Mäusen eine Leukämie zu initiieren (Wulf 2001). Über den Nachweis von CLL-1 und lineage Markern ist es möglich, die normale SP der hämatopoetischen Zellen von der SP der AML zu unterscheiden (Moshaver 2008).

Eines der wichtigsten Ziele all dieser Untersuchungen ist die genaue Charakterisierung der leukämischen Progenitorzellen, wodurch man sehr spezifische Therapien gegen diese unreife Blasten entwickeln und somit die Leukämie gezielter bekämpfen kann, indem zusätzlich zu den reifen Blasten auch die LSC-artigen Zellpopulationen angegriffen und abgetötet werden. Doch wie oben beschrieben, ist die Expression von Markern, welche für die leukämischen Progenitorzellen spezifisch sind, sehr variabel. Dies hat zur Folge, dass es bisher noch nicht gelungen ist, ein Expressionsmuster zu finden, das spezifisch für leukämische Progenitorzellen wäre. Ob die Messung spezifischer enzymatischer Eigenschaften von leukämischen Progenitorzellen, die für HSC charakteristisch sind, eine bessere Alternative für die Identifikation von Stammzellen darstellt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Auch hier lassen sich bis jetzt keine einheitlichen stammzellartigen Zellpopulationen identifizieren.

Um durch die exakte Charakterisierung von leukämischen Progenitorzellen einerseits eine sehr frühe Prognoseeinschätzung zu ermöglichen und andererseits mögliche spezifische Therapien zu entwickeln, die gezielt leukämische Progenitorzellen angreifen, ist es wichtig, genügend Probenmaterial zur Verfügung zu haben. Da es aus ethischen Gründen nicht zumutbar ist, an Leukämie erkrankten Kindern für Forschungszwecke umfangreiche Knochenmarksentnahmen durchzuführen, wurde nach Alternativen gesucht, um leukämische Zellen zu vermehren. Dazu versuchte man, leukämische Zelllinien in Kultur zu vervielfältigen. Es zeigte sich, dass sich in diesen Zelllinien eine Vielzahl von Resistenzen und sekundären Mutationen entwickelten, die den Phänotyp der leukämischen Zellen substanziell beeinflussen. Die Aussagekraft dieser in-vitro-Untersuchungen ist somit stark eingeschränkt. Deshalb wurde nach alternativen in-vivo-Modellen gesucht. In Form des Xenotransplantationsmodelles fand man eine Lösung, die deutlich näher an der klinischen Realität ist. Dabei werden humane leukämische Zellen auf Mäuse übertragen (Lapidot 1997) (Eine Be-

schreibung des Xenotransplantationsmodelles findet sich in der Einleitung unter Punkt 1.4).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen durchflusszytometrischen Essay zum Nachweis von leukämischen Stammzellen mittels stammzellspezifischen Enzymaktivitäten im NOD/SCID-Mausmodell zu etablieren. Im Anschluss daran galt es zu zeigen, in welchem Maße sich die Anzahl der leukämischen Zellen und insbesondere der Anteil der leukämischen Progenitorzellen durch die Übertragung auf die Maus und die seriellen Transplantationen verändern. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse verwendet, die direkt aus den entsprechenden Knochenmarkproben des Kindes stammten. Zudem wurde auf weitere Faktoren des Mausmodells und der zugrundeliegenden Leukämieart eingegangen, die die humanen leukämischen Zellen beeinflussen können. Dabei wurde die leukämische SP aus der Maus mit der SP der Mäusezellen verglichen, um mögliche Einflussfaktoren der murinen Hämatopoese auf die leukämische Hämatopoese zu entdecken. Zudem wurde der Verlauf der SP während den seriellen Maustransplantationen genau analysiert. Da an Primärmaterial erhobene bzw. verifizierte Forschungsergebnisse die klinische Relevanz in viel höherem Maße reflektieren, sollte damit gezeigt werden, wie die Resultate, welche aus den Proben der Maus gewonnen wurden, mit den Ergebnissen aus dem entsprechenden Primärmaterial korrelieren.

Zusätzlich sollte die durch den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 identifizierte SP der verschiedenen Leukämiearten vergleichsweise beurteilt, genauer charakterisiert und mit den CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen der jeweiligen Probe verglichen werden. Da, wie beschrieben, in Vorarbeiten eine signifikante Korrelation zwischen der Stammzell-Population CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> bei Diagnosestellung mit einem höheren MRD-Level gezeigt werden konnte (Ahlers 2009), untersuchten wir die Überschneidung der beiden Populationen (SP und CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> Zellpopulation), die mit leukämische Progenitorzellen angereicht sind.

## **5.2 Einflussfaktoren der zugrundeliegenden Leukämieart**

Wir konnten keine Korrelation zwischen dem Anteil der SP an den gesamten eukämischen Blasten und der jeweiligen zugrundeliegenden Leukämieart

nachweisen. 90 % der Werte der SP liegen unter 0,35 %, nur ein Wert der B-ALL liegt deutlich über 1 %. Die durchschnittliche Frequenz der SP in Bezug auf die vitalen Blasten liegt bei der B-ALL, der AML und der T-ALL im Bereich von 0,15 und 0,17 %. Dies bedeutet, dass es keinen Unterschied zwischen der Höhe der SP und der Leukämieart gibt. Goodell et al. beschrieb ähnlich hohe Wert für die SP-Zellen im gesunden Knochenmark (Goodell 1996). Die Werte liegen in derselben Größenordnung, wie wir sie aus Primärmaterial bestimmen konnten. Die durchschnittliche Frequenz der SP in Bezug auf die Blasten lag bei 0,089%. Jedoch wurde die SP direkt aus Patientenmaterial gemessen und die Fallzahl war mit  $n=17$  deutlich geringer als in der vorliegenden Arbeit mit  $n=112$ . Zudem wurde nicht zwischen den verschiedenen Leukämieformen differenziert. Moshaver et al. konnten in 48 untersuchten AML-Proben eine durchschnittliche Frequenz der SP-Zellen an den gesamten Blasten von 0,07 % nachweisen. Im Unterschied zu dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich Knochenmark bzw. peripheres Blut von erwachsenen Patienten benutzt (Durchschnittsalter: 49 Jahre) und die Untersuchungen wurden direkt aus Patientenmaterial durchgeführt (Moshaver 2008).

Wir konnten im Durchschnitt einen höheren Anteil an SP-Zellen im Verhältnis zu den vitalen Blasten als Moshaver et al. nachweisen. Während die SP-Werte aus Primärmaterial gut mit den SP-Werten von Moshaver et al. korrelieren sind die SP-Werte aus den Mäuseproben durchschnittlich höher, ohne, dass es signifikant ist. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass durch die Mauspassage die Zellen der SP angereichert werden. Wir konnten jedoch zeigen, dass die Anzahl der Re transplantationen keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil der SP-Zellen an den vitalen Blasten hat (siehe Kapitel 4.3.2 und 5.3.2). Somit gilt es als sehr unwahrscheinlich, dass die SP-Zellen durch die Mauspassage angereichert werden. Zudem führten Moshaver et al. ihre Untersuchungen, wie oben beschrieben, mit leukämischen Zellen von erwachsenen Patienten durch, was in diesem Fall der Grund für unsere höheren SP-Werte aus den Mäuseproben sein könnte.



### **5.3 Einflussfaktoren des Mausmodells**

#### **5.3.1 Korrelation der SP aus murinem Knochenmark und Milz mit der SP aus Primärmaterial**

Von sechs Proben hatten wir sowohl die SP, die am Tag der Diagnose aus Primärmaterial gemessen wurde und die SP aus jeweils Knochenmark und Milz der erstgemessenen Mäusegeneration. Unsere Untersuchungen zeigten, dass der SP-Wert aus Primärmaterial auf den Wert der SP nach der Mauspassage den deutlich größten Einfluss hat. Eine durchgeführte Varianzanalyse an diesen sechs Triplets (Primärmaterial – Milz – Knochenmark) ergab hierfür einen Wert von 50 %. Nur zu 7 % ist die SP vom Organ der Maus, aus dem die leukämischen Zellen gewonnen wurden (Milz oder Knochenmark), abhängig. Die restlichen 43 % stellen unbestimmte Einflussfaktoren dar, wie Eigenschaften der Maus oder Auswertefehler (siehe Punkt 4.3.1). Taussig et al. konnten nachweisen, dass einige leukämische Zellen durch die Mauspassage ihren Immunphänotyp änderten und nicht mehr CD34 exprimierten. Daraus schloss man, dass entweder leukämische Zellen CD34 nicht konstant exprimieren oder sich die Expression von Oberflächenantigenen durch die Mauspassage ändert (Taussig 2010). Grund dafür könnte die veränderte zelluläre Umgebung (Microenvironment) sein, in welche die humanen leukämischen Zellen kommen, wenn sie in die Maus transplantiert werden (Wie 2008). Die durch den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 identifizierte Stammzellpopulation jedoch scheint durch die Mauspassage nicht wesentlich beeinflusst zu werden.

Aus den von uns verglichenen sechs Proben konnten wir in jeder eine SP nachweisen, in der im Primärmaterial eine SP nachgewiesen wurde. Die durchschnittliche Höhe der sechs SP-Werte aus dem Primärmaterial betrug 0,127 %, die SP-Werte aus dem Knochenmark hatten einen durchschnittlichen Wert von 0,078 % und die SP-Werte aus der Milz von 0,114 %. Andere Arbeitsgruppen berichten über ähnliche Ergebnisse an primärem Material. Wie unter Punkt 5.2 beschrieben, erhielten Moshaver et al. eine durchschnittliche Frequenz der SP-Zellen an den gesamten Blasten von 0,07 % (Moshaver 2008) und Goodell et al. konnten einen durchschnittlichen Wert der SP von 0,1 % nachweisen (Goodell 1996). Die vorhandenen leichten Schwankungen der SP-Werte im

Vergleich zum Ausgangswert könnten durch „statistisches Rauschen“ verursacht sein, da die absolute Anzahl der SP meist in einem Bereich von 5 - 100 Zellen lag und somit schon minimale Verschiebungen der Auswertegates einen deutlichen Unterschied in der prozentualen Höhe der SP hervorriefen. Zudem kann, wie oben beschrieben, die Mauspassage die SP-Werte leicht beeinflussen.

Diese Ergebnisse sprechen deutlich dafür, dass das Mausmodell sich gut zur Vervielfältigung von leukämischen Zellen und insbesondere von leukämischen Progenitorzellen, welche durch die SP erfasst werden, eignet. Konnte im Primärmaterial eine SP gemessen werden, so konnte auch aus der Mäuseprobe eine SP im Knochenmark und der Milz nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die SP-Werte aus den Mäuseproben von den SP-Werten des Primärmaterials abhingen. Jedoch ist die untersuchte Fallzahl mit  $n = 6$  zu gering, um statistisch signifikante Aussagen zu erzielen. Deshalb müssten mehrere Proben untersucht werden, aus denen man den Wert der SP aus dem Primärmaterial mit dem Wert der SP aus der Mäuseprobe vergleicht.

### **5.3.2 Korrelation der leukämischen SP mit der Transplantationshäufigkeit und der murinen SP**

In unseren Untersuchungen konnten wir keine Korrelation zwischen Transplantationshäufigkeit und der Höhe der SP nachweisen. Das bedeutet, dass die Transplantationshäufigkeit nach unseren Untersuchungen keinen Einfluss auf die Höhe der SP nimmt: Wir konnten nicht zeigen, dass sich die Zellen der SP durch die häufigen Retransplantationen anreichern oder abnehmen. Jedoch wäre es sinnvoll aufgrund der geringen Fallzahlen in den höheren Mäusegenerationen (m4 bis m6) eine größer angelegte Studie durchzuführen, in der eine höhere Anzahl von Proben über mehrere Mäusegenerationen hinweg untersucht werden.

Weiter sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass die humanen leukämischen Zellen nicht signifikant durch die murine Hämatopoese beeinflusst werden. Wir stellten jeweils die humanen SP-Werte der Milz und des Knochenmarkes aus der Maus den murinen SP-Werten gegenüber. Wir konnten nach-

weisen, dass die leukämischen SP nicht mit der murinen SP korreliert. Jedoch muss man davon ausgehen, dass mittels Hoechst nicht alle Stammzellen identifiziert werden (Feuring-Buske 2001, Wulf 2001) und man somit nicht definitiv sagen kann, dass die murine Hämatopoese überhaupt keinen Einfluss auf die leukämischen Zellen hat.

### **5.3.3 Allgemeine Beurteilung**

Die unter Punkt 5.3 „Einflussfaktoren des Mausmodells“ dargestellten Ergebnisse stellen eine entscheidende Grundlage für die Verwendung des NSG-Mausmodells zur Vervielfältigung von humanen leukämischen Zellen und den anschließenden Untersuchungen mit diesen Zellen dar. Nur, wenn man sicher davon ausgehen kann, dass die durch die Vervielfältigung in der Maus gewonnenen Zellen im Wesentlichen mit den ursprünglichen leukämischen Zellen aus der direkten Patientenprobe übereinstimmen, lassen sich die daraus gewonnenen Ergebnisse mit den an Primärmaterial erhobenen Forschungsergebnissen vergleichen.

Wir konnten zeigen, dass alle von uns untersuchten Einflussfaktoren des Mausmodells die humanen leukämischen Zellen nicht signifikant beeinflussten. Weder die Transplantationshäufigkeit noch die murine Hämatopoese haben eine nachweisbare Einwirkung auf die leukämischen Zellen und insbesondere auf die leukämischen Progenitorzellen. Zudem konnten wir zeigen, dass die Werte der SP an den vitalen Blasten mit den an Primärmaterial gemessenen SP-Werten vergleichbar sind. Somit steht mit dem NOD/LtSz-scid IL2R $\gamma$ null (NSG) Mausmodell eine Möglichkeit zur Verfügung, um leukämische einschließlich der SP zu vervielfältigen und im Anschluss daran weitere Untersuchungen durchzuführen, deren Ergebnisse mit den an Primärmaterial gewonnene Ergebnissen vergleichbar sind.

## **5.4 Analyse der leukämischen Zellen**

### **5.4.1 Vergleich des Engraftment und der SP aus dem Knochenmark mit der SP aus der Milz der Maus**

Für die leukämischen Zellen, die aus einer B-ALL oder AML abstammen, konnten wir in unseren Untersuchungen keine Unterschiede der SP-Werte aus der

Milz und aus dem Knochenmark der Maus nachweisen. Ausnahme bilden die SP-Werte der T-ALL: In der Milz erhielten wir im Vergleich zum Knochenmark tendenziell höhere SP-Werte. Jedoch war die Fallzahl der T-ALL SP-Werte aus dem Knochenmark mit  $n = 5$  sehr gering, so dass daraus keine statistisch signifikante Aussage ableitbar ist. Aus den gewonnenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass sich der Anteil von SP-Zellen unter den Blasten nicht signifikant unterscheidet, unabhängig davon, ob man die Zellen aus dem Knochenmark oder der Milz der Maus verwendet. Somit kann man für Retransplantationen und Experimente die leukämischen Zellen aus dem Organ der Maus verwenden, in welchem die höchste Anzahl an humanen leukämischen Zellen nachgewiesen werden konnte, ohne, dass dies einen Einfluss auf den Anteil der SP-Zellen an den Blasten hat.

Für das Engraftment im Knochenmark und der Milz konnten wir signifikante Unterschiede nachweisen. Der berechnete T-Test zeigt einen p-Wert von 0,0089. Durchschnittlich wächst die Leukämie besser im Knochenmark als in der Milz der Maus an. Doch, wie zuvor beschrieben, hat dies keinen deutlichen Einfluss auf die Höhe der SP, welche man in der Milz bzw. dem Knochenmark der Maus misst.

#### **5.4.2 Korrelation der SP mit CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen**

Da es sich sowohl bei leukämischen CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen als auch bei der SP um putative Progenitorzellpopulationen handelt, analysierten wir beide Populationen. Unsere Ergebnisse zeigten keinen Zusammenhang zwischen der SP und der Höhe der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen. Wir untersuchten die Korrelation sowohl getrennt nach dem Entnahmeorgan der leukämischen Zellen aus der Maus, als auch getrennt nach der zugrundeliegenden Leukämieform, konnten aber keinen signifikanten Zusammenhang nachweisen. Die Pearsonkorrelation mit einem  $r$  zwischen -0,1448 und 0,0858 bestätigte dies. Diese Werte decken sich mit den Ergebnissen aus Vorarbeiten, bei denen leukämische Zellen aus Primärmaterial verwendet wurden. Es konnte ebenfalls weder für die leukämischen Zellen der AML noch der B-ALL ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD34/CD38 und den SP-Zellen nachgewiesen werden. Wulf et al. zeigte, dass

die SP-Zellen, welche man aus AML-Proben gewonnen hatte, hauptsächlich CD34<sup>-</sup> waren und keine Korrelation zwischen den CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen und den SP-Zellen bestand (Wulf 2001). Dieselben Ergebnisse erzielten Feuring-Buske et al., die SP-Zellen aus dem Knochenmark von an AML erkrankten Patienten untersuchten. Nur bei 12 % der untersuchten Proben konnte eine SP nachgewiesen werden, welche für CD34 positiv und für CD38 negativ war (Feuring-Buske 2001).

Wie dargestellt, decken sich unsere Ergebnisse mit denen der aktuellen Literatur. Somit muss man davon ausgehen, dass es sich bei der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Population und der SP-Population jeweils um unterschiedliche Populationen handelt, die mit Stammzellen angereichert sind.

#### **5.4.3 Einfluss der Engraftmentrate und der Anwachsdauer der Leukämie auf die leukämischen Zellen**

Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen der Engraftmentrate und der SP nachweisen. Das bedeutet, dass es für den Anteil der SP an den vitalen Blasten keine Rolle spielt, wie groß der Anteil der humanen leukämischen Zellen in der Maus ist. Weder bei einem guten Engraftment ist eine hohe SP nachweisbar noch bei einem schlechten Engraftment eine niedrige SP.

Zudem konnten wir keinen Einfluss der Anwachsdauer auf die prozentuale Höhe der SP an den vitalen Blasten nachweisen. Daraus kann man schließen, dass die Höhe der SP nicht davon abhängt, wie schnell die Leukämie in der Maus angewachsen ist. Eine aggressive Leukämie, die sehr schnell in der Maus anwächst, scheint keinen höheren Anteil an SP-Zellen zu haben als eine Leukämie, die nur langsam in der Maus anwächst. Zudem konnten wir keine Korrelation zwischen der Höhe der Blasten bei der Schlachtung der Mäuse und der Anzahl der Wochen bis zur Schlachtung nachweisen. Daraus schließen wir, dass sowohl Mäuse, die nach einer kurzen Anwachsdauer geschlachtet wurden, als auch Mäuse, die spät geschlachtet wurden, da sich die leukämischen Zellen nur langsam vermehrten, ähnlich hohe bzw. niedrige Prozentwerte an Blasten in der Milz und dem Knochenmark der Maus aufweisen. Zuletzt konnten wir auch keinen Zusammenhang zwischen den CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen in Bezug

zu der Anzahl der Wochen zwischen Transplantation und Schlachtung nachweisen.

Diese Ergebnisse bestätigen, wie unter Punkt 5.3 diskutiert, dass die Mauspassage keinen signifikanten Einfluss auf die leukämischen Zellen hat. Überraschend ist, dass der prozentuale Anteil der SP an den vitalen leukämischen Blasten und die Höhe der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen nicht mit der Anwachsdauer korreliert. Man hätte erwarten könnten, dass der Anteil der SP und der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen bei aggressiven (schnell wachsenden) Leukämien höher ist, da sich diese in kürzerer Zeit in der Maus vermehren und deshalb möglicherweise mehr Zellen mit Stammzeleigenschaften benötigen, da nur diese zur Koloniebildung fähig sind. Wie in 5.4.2 beschrieben, handelt es sich dabei aller Voraussicht nach um zwei verschiedene Populationen. Da beide nicht mit der Anwachsdauer korrelieren, scheint es, als ob der Anteil an leukämischen Zellen mit Stammzeleigenschaften an den gesamten leukämischen Blasten keinen Einfluss auf die Dauer der Vermehrung der leukämischen Zellen in der Maus hat. Damit ist jedoch keine Aussage über die Therapieresistenz oder die Häufigkeit von Rezidiven getroffen. Sowohl die Ergebnisse in Vorarbeiten (Ahlers 2009) als auch van Rhenen et al. zeigten, dass der Anteil der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen signifikant mit den MRD-Werten korreliert. Der Anteil der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen scheint also einen negativen Einfluss auf das Therapieansprechen zu haben, jedoch nicht mit der Vermehrungsdauer der leukämischen Blasten im Mausmodell zu korrelieren.

## 5.5 Ausblick

In den letzten Jahren wurde die Therapie von kindlichen Leukämien deutlich verbessert und dadurch gute Behandlungsergebnisse erzielt. Dazu beigetragen hat unter anderem eine genauere Risikostratifizierung, die die Entscheidung der Therapieintensität wesentlich beeinflusst. Wie in Vorarbeiten gezeigt, könnte die Frequenz der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellpopulation bei Diagnosestellung ein weiterer Faktor sein, der zur Risikoeinschätzung beiträgt. Da die Frequenz der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellpopulation schon bei Diagnosestellung gemessen werden kann, könnte dadurch eine frühere Abschätzung der Prognose erfolgen,

wodurch die Behandlung der Leukämien durch eine verfeinerte Stratifizierung verbessert werden könnte.

Jedoch gibt es immer noch Fälle, bei denen die Therapie nicht anschlägt, oder es zu Rezidiverkrankungen kommt und die Leukämie nicht geheilt werden kann. Deshalb ist es von elementarer Bedeutung, nach alternativen Therapiemöglichkeiten zu suchen. Ein vielversprechender Ansatz ist, Targets zur gezielten Elimination von leukämischen Progenitorzellen zu identifizieren und wiederum zu evaluieren. Um solche Studien durchzuführen, werden größere Mengen von Probenmaterial benötigt. Die benötigte Menge an leukämischen Zellen kann aus ethischen Gründen nicht durch Knochenmarkspunktionen bei Kindern gedeckt werden. Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Mausmodell könnte eine Lösung des Problems gefunden worden sein. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass sich leukämische Zellen und insbesondere leukämische Progenitorzellen im NSG-Mausmodell vermehren lassen. Zudem konnten wir zeigen, dass alle von uns untersuchten Einflussfaktoren des Mausmodells die humanen leukämischen Zellen nicht signifikant beeinflussen. Weder die Transplantationshäufigkeit noch die murine Hämatopoese haben einen nachweisbaren Einfluss auf die leukämischen Zellen und insbesondere auf die leukämischen Progenitorzellen. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass der Anteil der SP an den vitalen Blasten mit den an Primärmaterial gemessenen SP-Werten vergleichbar ist. Somit steht mit dem NOD/LtSz-scid IL2R $\gamma$ null (NSG) Mausmodell eine Möglichkeit zur Verfügung, um leukämische Zellen und insbesondere die leukämischen Progenitorzellen zu vervielfältigen und im Anschluss daran weitere Untersuchungen durchzuführen, deren Ergebnisse mit den an Primärmaterial gewonnenen Ergebnissen vergleichbar sind. Um jedoch eine endgültige Aussage treffen zu können, sind weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen nötig.

Damit auf Dauer genügend Material zur Verfügung steht, wäre es zudem sinnvoll, eine Xenotransplantationsbank von primären kindlichen AML- und ALL-Proben aufzubauen. Dadurch stünde für die Analyse von leukämischen Progenitorzellen ausreichend Material zur Verfügung. Leukämische Progenitorzellen könnten im Vergleich zu den Blasten ohne Stammzeleigenschaften immunologisch und molekularbiologisch charakterisiert werden, um mögliche Unterschie-

de in der Immunogenität zwischen leukämischen Progenitorzellen und ausdifferenzierten Blasten zu entdecken. Diese Targets könnten dann als Angriffspunkte von Medikamenten verwendet werden. Dadurch würden therapeutische Werkzeuge zur Verfügung stehen, die nicht mit intensiver Chemotherapie und damit höherer Toxizität in Verbindung stehen, sondern gezielt die Stoffwechselwege und Immuneigenschaften der leukämischen Progenitorzelle angreifen.



## 6 Zusammenfassung

Man geht davon aus, dass Leukämien auf genetisch veränderte HSC oder auf Zellen, welche Eigenschaften von HSC wiedererlangen, zurückzuführen sind. In vielen Fällen ist nur eine kleine Population von leukämischen Stammzellen zur Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung fähig. Das heißt, nur diese Zellen sind fähig, alle Zellen einer Leukämie zu generieren und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Erhaltung einer Leukämie. Für die AML scheint die LSC-Hypothese zuzutreffen. Neue Untersuchungen zeigen für die ALL, dass nicht nur eine kleine Population von leukämischen Stammzellen in der Lage ist, die Leukämie in immundefiziente SCID Mäuse zu übertragen, sondern fast alle untersuchten leukämischen Zellpopulationen der ALL diese Fähigkeit besitzen.

Dennoch sind die unreifen leukämischen Progenitorzellen durch bestimmte Eigenschaften, wie dem Verharren in einem Art Ruhezustand (G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus) und dem Besitz von membranständigen Transporterproteinen (Effluxpumpen), mit welchen sie toxische Substanzen aktiv aus der Zelle transportieren können, besonders widerstandsfähig gegen Chemotherapeutika. Somit scheinen die leukämischen Progenitorzellen auch einen entscheidenden Beitrag bei der Initiierung eines Rezidivs zu spielen. Daher ist es von besonderem Interesse und Bestandteil dieser Arbeit, die leukämischen Progenitorzellen nachzuweisen und dadurch mögliche Targets zu finden, über die man die leukämischen Progenitorzellen mittels Medikamente gezielt zerstören kann.

Zur Charakterisierung von leukämischen Progenitorzellen werden bis heute vor allem die Oberflächenantigene CD34/CD38 benutzt, doch ist dieses Vorgehen zum Nachweis von leukämischen Progenitorzellen in vielen Fällen unzuverlässig bzw. unzureichend untersucht. Der Grund dafür ist unter anderem, dass leukämische Zellen Oberflächenantigene aberrant und variabel exprimieren. Ziel der aktuellen Forschung ist es, weitere Marker zu finden, welche die Population der leukämischen Progenitorzellen besser identifiziert und weiter eingrenzt. In dieser Arbeit wurde der Farbstoff Hoechst 33342 zum Nachweis der

leukämischen Progenitorzellen benutzt. Dieses Molekül reichert sich intrazellulär an und bindet im Zellkern an DNA. Zellen mit Stammzeleigenschaften haben die Möglichkeit, diesen Farbstoff über spezielle Transporterproteine an der Zellmembran aus der Zelle zu transportieren. Diese Zellen können durchflusszytometrisch erfasst werden und bilden eine distinkte Population, die SP, welche mit frühen Stammzellen stark angereichert ist.

Um die leukämischen Zellen und insbesondere die leukämischen Progenitorzellen genauer charakterisieren zu können und dadurch mögliche spezifische Targets zu finden, die als Angriffspunkte von Medikamenten verwendet werden können, ist ausreichend Probenmaterial erforderlich. In der vorliegenden Arbeit vermehrten wir darum leukämische Zellen von an Leukämie erkrankten Kindern im NOD/LtSz-scid IL2R $\gamma$ null (NSG) Mausmodell. Im Anschluss analysierten wir die humanen leukämischen Zellen aus der Maus durchflusszytometrisch. Wir untersuchten Einflussfaktoren der Leukämiearten (wir verwendeten leukämische Zellen von Kindern, die an B-ALL, T-ALL und AML erkrankt waren) und des Mausmodells. Zudem verglichen wir die SP-Population mit der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellpopulation.

In unseren Ergebnissen konnten wir zeigen, dass der Anteil der SP an den leukämischen Zellen nicht von der Leukämieart abhängt. Zudem bestätigten wir die Vermutung aus Vorarbeiten, dass es sich bei der SP und der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellpopulation um verschiedene Stammzellpopulationen handelt. Die Untersuchungen der Einflussfaktoren des Mausmodells ergaben, dass die von uns untersuchten Faktoren die humanen leukämischen Zellen nicht signifikant beeinflussten: Weder die Transplantationshäufigkeit noch die murine Hämatopoese haben eine nachweisbare Einwirkung auf die leukämischen Zellen und insbesondere auf die leukämischen Progenitorzellen. Zudem konnten wir zeigen, dass der Anteil der SP an den vitalen Blasten mit den an Primärmaterial gemessenen SP-Werten vergleichbar ist. Somit steht mit dem NOD/LtSz-scid IL2R $\gamma$ null (NSG) Mausmodell eine Möglichkeit zur Verfügung, um leukämische Zellen und insbesondere die unreife LSC-artigen Zellen zu vervielfältigen und im Anschluss daran weitere Untersuchungen durchzuführen, deren Ergebnisse mit den an Primärmaterial gewonnenen Ergebnissen vergleichbar sind.

## 7 Literaturverzeichnis

Agliano, A.; Martin-Padura, I.; Mancuso, P.; Marighetti, P.; Rabascio, C.; Pruneri, G. et al. (2008): Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. In: *Int.J.Cancer*, Jg. 123, S. 2222-2227.

Ahlers, J (2009): Identifikation einer Zellpopulation mit Stammzellmarkern mit Korrelation zum klinischen Verlauf bei Diagnosestellung akuter kindlicher Leukämien. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen. Medizinische Fakultät.

Ahmed, F. (2007): Role of the ABC transporter ABCG2 in human haematopoiesis. Dissertation. Ludwig Maximilians Universität, München. Medizinische Fakultät.

Ailles, L. E.; Gerhard, B.; Kawagoe, H.; Hogge, D. E. (1999): Growth characteristics of acute myelogenous leukemia progenitors that initiate malignant hematopoiesis in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. In: *Blood*, Jg. 94, H. 5, S. 1761-1772.

Baxter, A.; Cooke, A. (1993): Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice. In: *Diabetes*, Jg. 42, S. 1574-1578.

Blair, A.; Hogge, D. E.; Ailles, L. E.; 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.

Blair, A.; Hogge, D. E.; Sutherland, H. J. (1998) Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR-. In: *Blood*, Jg. 92, S. 4325–4335.

Bonnet, D.; Dick, J. E. (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. In: *Nature Medicine*, Jg. 3, S. 730-737.

Bosma, G.; Custer, R.; Bosma, M. (1983): A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. In: *Nature*, Jg. 5900, S. 527-530.

Bruce, W. R.; Van der Gaag, H. (1963): A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. In: *Nature*, Jg. 199, S. 79-80.

Brüggemann, M. et al. (2006): Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. In: *Blood*, Jg. 107 H. 3, S. 1116–1123.

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.

Cate, B. ten; de Bruyn, M.; Wie, Y.; Bremer, E.; Helfrich, W. (2010): Targeted Elimination of Leukemia Stem Cells; a New Therapeutic Approach in Hemato-Oncology. In: *Current Drug Targets*, Jg. 11, H. 1, S. 95-110.

Cheung, A.; Wan, T.; Leung, J.; Chan, L.; Huang, H.; Kwong, Y.; Liang, R.; Leung, A. (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, S. 1423-1430.

Cobaleda, C.; Gutierrez-Cianca, N.; Perez-Losada, J.; Flores, T.; Garcia-Sanz, R.; Gonzalez, M. et al. (2000): A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. In: *Blood*, Jg. 95, S. 1007-1013.

Conneally, 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 USA*, Jg. 94, H. 18, S. 9836–9841.

Costello, R. T.; Mallet, F.; Gaugler, B.; Sainty, D.; Arnoulet, C.; Gastaut, J. A. et al. (2000): Human acute myeloid leukemia CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. In: *Cancer Res.*, Jg. 60, S. 4403-4411.

Cox, C. V.; Evely, R. S.; Oakhill, A.; Pamphilon, D. H.; Goulden, N. J.; Blair, A. (2004): Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. In: *Blood*, Jg. 104, S. 2919-2925.

Cox, C. V.; Diamanti, P.; Evely, R.S.; Kearns, P. R.; Blair, A. (2009): Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL. In: *Blood*, Jg. 113, H. 14, S. 3287-3296.

Duester, G. (2000): Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. In: *Eur J Biochem*, Jg. 267, S. 4315-4324.

Ebinger, M.; Witte, K.; Ahlers, J.; Schäfer, I.; André, M.; Kerst, G.; Scheel-Walter, H. G.; Lang, P.; Handgretinger, R. (2010): High frequency of immature cells at diagnosis predicts high minimal residual disease level in childhood acute lymphoblastic leukemia. In: *Leukemia Research*, Jg. 34, S. 1139-1142.

Feuring-Buske, M.; Gerhard, B.; Cashman, J.; Humphries, R. K.; Eaves, C. J.; Hogge, D. E. (2003): Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in beta 2-microglobulin-deficient NOD/SCID mice and in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors. In: *Leukemia*, Jg. 17, S. 760-763.

Gökbuget, N. (2007): *Akute lymphatische Leukämie*. 1. Auflage Bremen: UniMed-Verlag.

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.; 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.*, Jg. 3, H. 12, S. 1337-1345.

Guan, Y.; Gerhard, B.; Hogge, D. E. (2003): Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). In: *Blood*, Jg. 101, S. 3142-3149.

Gutjahr, P. (2003): *Krebs bei Kindern und Jugendlichen: Klinik und Praxis der Pädiatrischen Onkologie (Gebundene Ausgabe)*. 5. Aufl.: Deutscher Ärzte-Verlag.

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.

Heissig, B.; Ohki, Y.; Sato, Y.; Rafii, S.; Werb, Z.; Hattori, K (2005): A role for niches in hematopoietic cell development. In: *Hematology*, Jg. 10, H. 3, S. 247-253.

- Hong, D.; Gupta, R.; Ancliff, P.; Atzberger, A.; Brown, J.; Soneji, S. et al. (2008): Initiating and cancerpropagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. In: *Science*, Jg. 319, S. 336-339.
- Hosen, N.; Park, C. Y.; Tatsumi, N.; Oji, Y.; Sugiyama, H.; Gramatzki, M.; Krensky, A. M.; Weissman, I. L. (2007): CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. In: *Proc Natl Acad Sci*, Jg. 104, H. 26, S. 11008-11013.
- Ishikawa, F.; Livingston, A. G.; Minamiguchi, H.; Wingard, J. R.; Ogawa, M. (2003): Human cord blood long-term engrafting cells are CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>. In: *Leukemia*, Jg. 17, H. 5, S. 960–964.
- Ishikawa, F.; Yasukawa, M.; Lyons, B.; Yoshida, S.; Miyamoto, T.; Yoshimoto, G.; Watanabe, T.; Akashi, K.; Shultz, L. D.; Harada, M. (2005): Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. In: *Blood*, Jg. 106, H. 5, S. 1565-1573.
- Ishikawa, F.; Yoshida, S.; Saito, Y.; Hijikata, A.; Kitamura, H.; Tanaka, S.; Nakamura, R.; Tanaka, T. et al. (2007): Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. In: *Nat Biotechnol*, Jg. 25, H. 11, S. 1315-1321.
- Jamieson, C. H.; Ailles, L. E.; Dylla, S. J.; Muijtjens, M.; Jones, C.; Zehnder, J. L.; Gotlib, J.; Li, K.; Manz, M. G.; Keating, A.; Sawyers, C. L.; Weissman, I. L. (2004): Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. In: *N Engl J Med*, Jg. 351, H. 7, S. 657-667.
- Jordan, C. T.; Guzman, M. L. (2004): Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. In: *Oncogene*, Jg. 23, S. 7178-7187.
- Kastan, M. B.; Schlaffer, E.; Russo, J. E. et al. (1900): Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. In: *Blood*, Jg. 75, S. 1947-1950.
- Kataoka, S.; Satoh, J.; Fujiya, H. et al. (1983): Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. In: *Diabetes*, Jg. 32, S. 247-253.
- Kong, Y.; Yoshida, S.; Saito, Y.; Doi, T.; Nagatoshi, Y.; Fukata, M.; Saito, N.; Yang, S. M.; Iwamoto, C.; Okamura, J.; Liu, K. Y.; Huang, X. J.; Lu, D. P.; Shultz, L. D.; Harada, M.; Ishikawa, F. (2008): CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> as well as CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. In: *Leukemia*, Jg. 22, S. 1207–1213.
- Lagasse, E.; Weissman, I. L. (1992): Mouse MRP8 and MRP14, two intracellular calcium-binding proteins associated with the development of the myeloid lineage. In: *Blood*, Jg. 79, S. 1907-1915.
- Langer, T.; Martus, P.; Ottensmeier, H.; Hertzberg, H.; Beck, J. D.; Meier, W. (2002): CNS late-effects after ALL therapy in childhood. Part III: neuropsychological performance in long-term survivors of childhood ALL: impairments of concentration, attention, and memory. In: *Med Pediatr Oncol*, Jg. 38, H. 5, S. 320–328.
- Lapidot, T.; Sirard, C.; Vormoor, J.; Murdoch, B.; Hoang, T.; Caceres-Cortes, J. et al. (1994): A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. In: *Nature*, Jg. 367, S. 645-648.
- Lapidot, T.; Fajerman, Y.; Kollet, O. (1997): Immune-deficient SCID and NOD/SCID mice models as functional assays for studying normal and malignant human hematopoiesis. In: *J Mol Med.*, Jg.75, S. 664-673.
- Larsson, J.; Karlsson, S. (2005): The role of Smad signaling in hematopoiesis. In: *Oncogene*, Jg. 24, H. 37, S. 5676–5692.

Le Viseur, C.; Hotfilder, M.; Bomken, S.; Wilson, K.; Röttgers, S.; Schrauder, A.; Rosemann, A.; Irving, J.; Stam, R. W.; Shultz, L. D.; Harbott, J.; Jürgens, H.; Schrappe, M.; Pieters, R.; Vormoor, J. (2008): In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. In: *Cancer Cell*, Jg. 14, S. 47–58.

Lieber, M.; Hesse, J.; Lewis, S. et al. (1988): The defect in murine severe combined immune deficiency: joining of signal sequences but not coding segments in V(D)J recombination. In: *Cell*, Jg. 55, S. 7-16.

Lumkul, R.; Gorin, N. C.; Malehorn, M. T.; Hoehn, G. T.; Zheng, R.; Baldwin, B.; et al. (2002): Human AML cells in NOD/SCID mice: engraftment potential and gene expression. In: *Leukemia*, Jg. 16, S. 1818-1826.

McCune, J. M.; Namikawa, R.; Kaneshima, H.; Shultz, L. D.; Lieberman, M.; Weissman, I. L. (1988): The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. In: *Science*, Jg. 241, S. 1632-1639.

Misaghian, N.; Ligresti, G.; Steelman, L. S.; Bertrand, F. E.; Basecke, J.; Libra, M. et al. (2009): Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. In: *Leukemia*, Jg. 23, S. 25-42.

Moore, K. A. (2006): Stem Cells and Their Niches. In: *Science*, Jg. 311, H. 5769, S. 1880–1885.

Morrison, S. J.; Weissman, I. L. (1994): The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. In: *Immunity*, Jg. 1, S. 661–673.

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.

Moshaver, B.; van Rhenen, A.; Kelder, A.; van der Pol, M.; Terwijn, M.; Bachas, C.; et al. (2008): Identification of a Small Subpopulation of Candidate Leukemia Initiating Cells in the Side Population (SP) of Patients with Acute Myeloid Leukemia. In: *Stem Cells*, Jg. 26, S. 3059-3067.

Nyvold, C et al. (2002): Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. In: *Blood*; Jg. 99, H. 4, S. 1253–1258.

Ogawa, M (2002): Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. In: *Exp Hematol*, Jg. 30, H. 1, S. 3–6.

Park, C. H.; Bergsagel, D. E.; McCulloch, E. A. (1971): Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. In: *J Natl Cancer Inst*, Jg. 46, H. 2, S. 411–422.

Passegué, E; Jamieson, C. H. M.; Ailles, L. E.; Weissman, I. L. (2003): Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? In: *Proc Natl Acad Sci*, Jg. 100, S. 11842–11849.

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.

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.

Rasch, B.; Friese, M.; Hofmann, W.; Naumann, E.; (2010): *Quantitative Methoden. Einführung in die Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler*. München: Springer

Ravandi, F.; Estrov, Z. (2006): Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia. In: *Clin. Cancer Res.*, Jg. 12, S. 340-344.

Rhenen, A. van; Feller, N.; Kelder, A.; Westra, A. H.; Rombouts, 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, S. 6520-6527.

Rhenen, A. van; Moshaver, B; Kelder, A, et al. (2007a): Aberrant marker expression patterns on the CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> 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, S. 1700-1707.

Rhenen, A. van; van Dongen, G. A.; Kelder, A., et al. (2007b): The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. In: *Blood*, Jg. 110, S. 2659-2666.

Rieger, M. (2007): Hämatopoetische Stammzellen. In: *BIOspektrum*, Jg. 13, H. 3, S. 254–257.

Ross, J. A. et al. (2005): Epidemiology of leukemia in children with Down syndrome. In: *Pediatric Blood Cancer*, Jg. 44, H. 1, S. 8-12.

Sato, T.; Laver, J. H.; Ogawa, M. (1999): Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. In: *Blood*, Jg. 94, H. 8, S. 2548–2554.

Sanchez, P. V.; Perry, R. L.; Sarry, J. E.; Perl, A. E.; Murphy, K.; Swider, C. R. et al. (2009): A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. In: *Leukemia*, Jg. 23, S. 2109-2117.

Sauerzweig, S. (2008): Identifizierung einer Subpopulation von Stammzellen mit embryonalem und frühem neuronalen Phänotyp aus dem Knochenmark der Ratte. Dissertation. Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg. Naturwissenschaftliche Fakultät.

Shultz, L. D.; Lyons, B. L.; Burzenski, L. M.; Gott, B.; Chen, X.; Chaleff, S. et al. (2005): Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. In: *J.Immunol*, Jg. 174, S. 6477-6489.

Sitzmann, F. C.; Bartmann, P. (2007): Pädiatrie. Stuttgart: Thieme.

Spangrude, G. J.; Heimfeld, S.; Weissman, I. L. (1988): Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. In: *Science*, Jg. 241, S. 58–62.

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.; Trujillo, A. P.; Springer, J. B. et al. (1999): Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jg. 96, S. 9118-9123.

Tajima, F.; Sato, T.; Laver, J. H.; Ogawa, M. (2000): CD34 expression by murine hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor. In: *Blood*, Jg. 96, H. 5, S. 1989–1993.

Taussig, D. C.; Vargaftig, J.; Miraki-Moud, F.; Griessinger, E.; Sharrock, K.; Luke, T.; Lillington, D.; Oakervee, H.; Cavenagh, J.; Agrawal, S. G.; Lister, T. A.; Gribben, J. G.; Bonnet, D. (2010):

Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. In: *Blood*, Jg. 115, H. 10, S. 1976-1984

Till, J. E.; McCulloch, E. A. (1961): A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. In: *Radiat Res*, Jg. 14, S. 1419-1430.

Vormoor, H. J. (2009): Malignant stem cells in childhood acute lymphoblastic leukemia: the stem cell concept revisited. In: *Cell Cycle*, Jg. 8, S. 996–999.

Wang, J. S.; Fang, Q.; Sun, D. J. et al. (2001): Genetic modification of hematopoietic progenitor cells for combined resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide, vincristine, and daunorubicin. In: *Acta Pharmacol Sin*, Jg. 22, S. 949-955.

Wie, J.; Wunderlich, M.; Fox, C. et al.(2008): Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. In: *Cancer Cell*, Jg. 13, H. 6, S. 483-495.

Wulf, G. G.; Wang, R. Y.; Kuehnle, I. et al. (2001): A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. In: *Blood*, Jg. 98, S. 1166-1173.

You, G.; Morris, M. E. (2006): *Drug Transporters: Molekular Characterization and Role in Drug Disposition*. West Sussex: John Wiley & Sons.

Zipori, D. (2004): The nature of stem cells: state rather than entity. In: *Nat Rev Genet*, Jg. 5, S. 873-878.



## 8 Anhang

### 8.1 Eingeschlossene Patienten

Tabelle 15: Patientendaten

#	Diagnose	Erkr.-alter	Zeit bis Rez.	Tod	MRD-T-30	MRD-T-78	Risiko-gruppe	Therapie-protokoll	Pred-nison resp.	TPMT-Mutation	BCR /ABL	MLL/ AF4	TEL/ AML1	MLL/ ENL	MLL/ AF9	Therapie Rez.
1	B-ALL	10J 10Mon			negativ	negativ	SR1	ALL-BFM-2000	good	kein Nachweis	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
2	B-ALL	1J 4Mon.	2J 1Mon		1,00E-03	1,00E-04	HR	ALL-BFM-2000	poor	kein Nachweis	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ALL-Rez. BFM 2002
3	B-ALL	10J 8Mon	4J 6Mon	17J 7Mon	ND	ND	SR1	ALL-BFM-2000	good	k.A.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ALL-Rez. BFM 2002
4	k.A.	k.A.			ND	ND	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.						
5	B-ALL	2J 5Mon			negativ	negativ	SR	ALL-BFM-2000	good	kein Nachweis	neg.	neg.	pos	neg.	neg.	
6	B-ALL	11J 11Mon	3,5 Mon		1,00E-02	1,00E+00	HR	ALL-BFM-2000	good	kein Nachweis	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
7	B-ALL	6J 9 Mon	3J 4Mon		1,00E-02	vor F2	MR1	ALL-BFM-2000	good	kein Nachweis						ALL-REZ BFM 2002
8	AML M5	1J 5Mon			NA	NA	non-HR (Tris. 21)	AML-BFM 2004 Studie	k.A.	kein Nachweis	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
9	B-ALL	14J 6Mon	3J 4Mon		1,00E-02	1,00E-03	MR	ALL-BFM-2000	good	k.A.	neg.	neg.	neg.			ALL-Rez. BFM 2002
10	T-ALL	6J 6Mon			1,00E-01	1,00E-01	HR-2	ALL-BFM 2000	good	kein Nachweis	neg.	neg.	neg.			

11	T-ALL	3J 7Mon	1J 2Mon		negativ	negativ	SR	ALL-BFM-2000	good	Heterozygote TPMT-Mut.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ALL-Rez. BFM 2002
12	AML M5	3J 1Mon	1J 6Mon	5J 4Mon	NA	NA	HR	AML-BMF 2004/ IIR	k.A.	k.A.						AML interim BFM 2004
13	AML M0/M7	4Mon	5Mon	1J 4Mon	NA	NA	HR-refraktär	AML-15-Protokoll	k.A.	k.A.						relapsed AML 2
14	B-ALL	3J 5Mon			negativ	negativ	SR	ALL-BFM-2000	good	kein Nachweis	neg.		neg	neg	neg	
15	T-ALL	1J 11Mon	3J 11Mon		1,00E-03	negativ		ALL-BFM-2000	poor	k.A.						ALL-REZ-BFM 2002
16	B-ALL	3J 7Mon			negativ	negativ	SR	ALL-BFM-2000	good	kein Nachweis	neg.	neg.	neg	neg	neg	
17	B-ALL	3J			1,00E-03	1,00E-03	MR	ALL-BFM-2000	good	kein nachweis			pos.			
18	B-ALL	4Mon	2J 1Mon	5J 2Mon	ND	ND		Infant 1999 protocol	good	kein Nachweis						
19	B-ALL	12J 8Mon	1J 5Mon	14J 8Mon	1,00E-03	1,00E-01	HR	ALL-BFM-2000	good	kein Nachweis	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	

Abkürzungen: ND = Not done, NA = Not applicable, SR = Standard-Risikogruppe, MR = Mittlere-Risikogruppe HR = Hoch-Risikogruppe

## 8.2 Messergebnisse

Tabelle 16: Messergebnisse

#	Trans-plantation	Herkunfts-organ	Woche	Engraft-ment	Blasten	vitale Blasten		leukämische SP		CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>+</sup> Blasten		Mäuse-zellen		vitale Mäusezel-len		Murine SP	
						Anzahl	%-Wert der Blasten	Anzahl	%-Wert der vitalen Blasten	Anzahl	%-Wert der vitalen Blasten	Anzahl	Anzahl	%-Wert der Mäuse-zellen	Anzahl	%-Wert der vitalen Mäuse-zellen	
1	m2	BM			65.180	11.465	17,59%	2	0,02%	631	5,50%	20.954	18.129	86,52%	85	0,47%	
1	m1	S	25	89,2	72.058	62.471	85,84%	14	0,02%	23	0,04%	11.824	3.871	32,74%	149	3,85%	
1	m2	S			267.718	224.806	83,97%	0	0,00%			101.924	45.076	44,23%	401	0,89%	
1	m2	S			265.491	197.926	74,55%	34	0,02%			39.452	16.732	42,41%	325	1,94%	
1	m1	S	25	89,2	106.862	101.231	94,73%	23	0,02%	80	0,08%	12.586	6.671	53,00%	293	4,39%	
1	m2	S			321.063	232.470	72,41%	26	0,01%			41.407	14.445	34,89%	318	2,20%	
1	m3	S	12	83,6	279.338	119.569	42,80%	94	0,08%	2	0,00%	7.309	6.437	88,07%	360	5,59%	
1	m3	S	12	65,6	203.250	126.276	62,13%	115	0,09%	10	0,01%	19.135	16.112	84,20%	969	6,01%	
1	m3	S	12	65,2	174.998	88.772	50,73%	121	0,14%	0	0,00%	19.651	17.532	89,22%	751	4,28%	
2	m4	S	7	64,05	389.175	326.632	83,93%	4	0,00%	846	0,26%	28.267	24.145	85,42%	606	2,51%	
2	m4	BM	7	85,35	135.339	86.691	64,06%	0	0,00%	357	0,41%	1.678	1.426	84,98%	7	0,49%	
2	m3	BM	9	87,4	316.554	302.941	95,70%	45	0,01%	1.242	0,41%	11.860	10.892	91,84%	146	1,34%	
2	m3	BM	9	87,4	118.881	94.698	79,66%	29	0,03%	300	0,32%	4.129	3.492	84,57%	65	1,86%	
2	m2	BM	17	89	71.060	63.638	89,56%	99	0,16%	40.934	64,32%	2.913	2.450	84,11%	76	3,10%	
2	m2	BM	17	89	152.586	100.693	65,99%	182	0,18%	61.188	60,77%	16.704	4.152	24,86%	127	3,06%	
2	m2	S	17	95,7	249.300	222.936	89,42%	306	0,14%	123.977	55,61%	9.365	7.397	78,99%	142	1,92%	
2	m2	S	17	95,7	312.011	267.844	85,84%	398	0,15%	156.292	58,35%	29.800	9.225	30,96%	171	1,85%	
2	m3	S	9	81,5	562.350	547.149	97,30%	1.381	0,25%	7.658	1,40%	34.349	16.468	47,94%	2.010	12,21%	
2	m3	S	9	81,5	91.650	83.790	91,42%	227	0,27%	876	1,05%	6.732	2.687	39,91%	270	10,05%	
3	m3	S	7	66	233.573	217.072	92,94%	90	0,04%	110	0,05%	73.321	46.146	62,94%	1.199	2,60%	

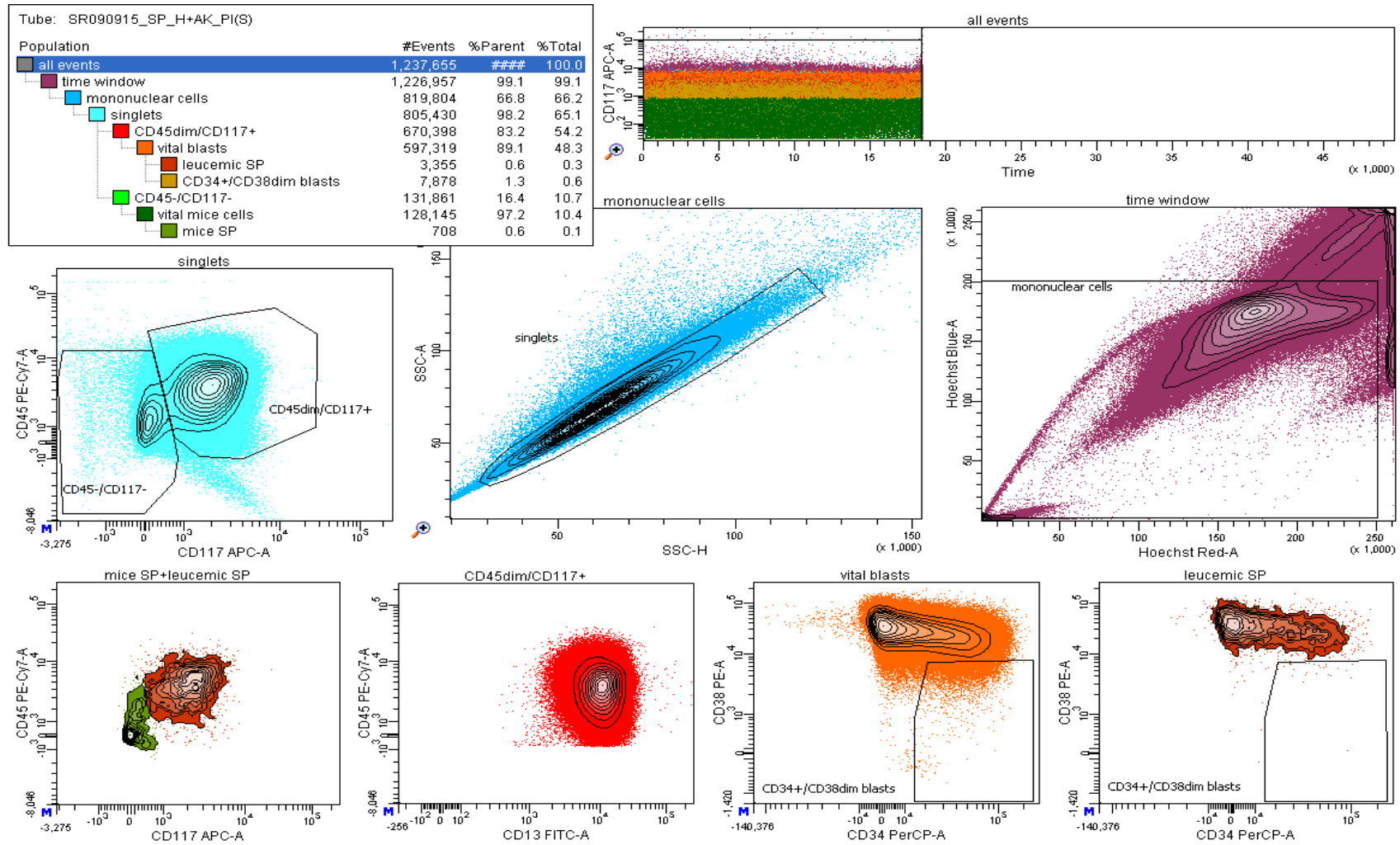
3	m2	S	17	87,3	979.141	769.446	78,58%	6.202	0,81%	1.106	0,14%	107.498	65.810	61,22%	18.784	28,54%
3	m3	BM	7	87	242.645	232.657	95,88%	62	0,03%	77	0,03%	31.359	30.352	96,79%	1.408	4,64%
4	m5	BM			368.583	302.301	82,02%	409	0,14%	979	0,32%	7.978	471	5,90%	9	1,91%
4	m5	S			356.899	267.435	74,93%	209	0,08%	9.144	3,42%	51.860	8.877	17,12%	353	3,98%
5	m2	BM	20	38	98.637	71.617	72,61%	61	0,09%	151	0,21%	140.426	124.392	88,58%	1.494	1,20%
5	m2	BM	20	38	116.300	70.147	60,32%	66	0,09%	34	0,05%	185.144	149.494	80,74%	1.574	1,05%
5	m2	S	20	67,4	73.092	23.559	32,23%	11	0,05%	30	0,13%	4.245	2.980	70,20%	31	1,04%
5	m1	S	21	72,7	26.037	5.973	22,94%	1	0,02%	1.797	30,09%	21.696	3.910	18,02%	50	1,28%
5	m1	S	21	66,9	51.289	6.405	12,49%	0	0,00%	1.824	28,48%	29.605	2.316	7,82%	34	1,47%
5	m1	S	21	57,6	153.318	78.889	51,45%	21	0,03%	26.322	33,37%	263.064	71.769	27,28%	336	0,47%
5	m1	S	21	57	108.072	85.639	79,24%	43	0,05%	32.733	38,22%	196.613	68.468	34,82%	387	0,57%
5	m2	S	20	47,4	49.061	12.731	25,95%	24	0,19%	32	0,25%	19.485	10.624	54,52%	54	0,51%
5	m2	S	20	55,4	89.679	23.790	26,53%	14	0,06%	37	0,16%	28.876	23.279	80,62%	88	0,38%
5	m1	S	21	62,3	479.779	331.456	69,09%	65	0,02%	111.518	33,64%	635.256	476.746	75,05%	49.576	10,40%
6	m2	S	6	86,7	484.285	419.431	86,61%	313	0,07%	27	0,01%	72.551	39.314	54,19%	1.454	3,70%
6	m2	BM	6	93,3	264.305	211.535	80,03%	82	0,04%	9	0,00%	17.994	15.065	83,72%	697	4,63%
6	m1	S	10	58	410.817	265.615	64,66%	8.811	3,32%	882	0,33%	229.545	117.846	51,34%	5.493	4,66%
7	m1	S			1.193	1.027	86,09%	1	0,10%	14	1,36%	80.373	56.427	70,21%	2.065	3,66%
7	m1	BM			95.664	71.018	74,24%	93	0,13%	8.702	12,25%	61.108	52.159	85,36%	1.506	2,89%
7	m1	BM			10.807	8.471	78,38%	8	0,09%	0	0,00%	118.049	104.204	88,27%	1.103	1,06%
8	m3	S	5	23	37.319	25.697	68,86%	22	0,09%	80	0,31%	13.536	10.937	80,80%	43	0,39%
8	m3	S	5	15,4	24.098	14.891	61,79%	19	0,13%	63	0,42%	25.140	13.123	52,20%	794	6,05%
8	m1	S	6	39	40.814	27.946	68,47%	0	0,00%	8	0,03%	271.146	111.479	41,11%	424	0,38%
8	m3	BM	5	90,75	150.335	113.735	75,65%	2	0,00%	860	0,76%	10.780	9.185	85,20%	136	1,48%
8	m1	BM	6	56,7	3.663	3.194	87,20%	6	0,19%	12	0,38%	5.757	5.079	88,22%	73	1,44%
9	m2	S	9	48,4	172.283	162.800	94,50%	610	0,37%	6.892	4,23%	22.212	12.833	57,78%	488	3,80%
9	m2	S	9	48,4	79.595	67.644	84,99%	251	0,37%	2.485	3,67%	13.648	6.506	47,67%	200	3,07%

9	m3	S	10	36	494.385	472.506	95,57%	621	0,13%	388	0,08%	3.662	2.466	67,34%	920	37,31%
10	m2	BM			869.989	746.460	85,80%	526	0,07%	478	0,06%	117.153	32.721	27,93%	313	0,96%
10	m1	S			329.196	91.915	27,92%	129	0,14%	810	0,88%	98.695	22.605	22,90%	409	1,81%
10	m1	S			193.761	111.284	57,43%	63	0,06%	773	0,69%	55.210	16.053	29,08%	280	1,74%
10	m2	S	11	26,9	33.800	19.802	58,59%	54	0,27%	84	0,42%	100.947	49.961	49,49%	284	0,57%
10	m2	S	11	15	38.624	23.260	60,22%	54	0,23%	108	0,46%	140.459	71.655	51,01%	575	0,80%
10	m2	BM	11	98,13	405.514	266.195	65,64%	63	0,02%	84	0,03%	10.559	8.989	85,13%	73	0,81%
10	m1	S			169.593	120.944	71,31%	16	0,01%	1.159	0,96%	101.308	38.426	37,93%	652	1,70%
10	m1	S			284.673	116.453	40,91%	54	0,05%	1.677	1,44%	114.764	40.071	34,92%	727	1,81%
10	m2	S			368.367	263.182	71,45%	758	0,29%	29	0,01%	585.917	194.290	33,16%	2.594	1,34%
10	m3	S			317.067	281.612	88,82%	377	0,13%	195	0,07%	344.923	205.194	59,49%	2.270	1,11%
10	m2	S	11	29,4	58.094	32.680	56,25%	149	0,46%	222	0,68%	86.439	47.934	55,45%	416	0,87%
11	m2	S			157.660	121.778	77,24%	326	0,27%	14	0,01%	149.874	120.440	80,36%	2.089	1,73%
11	m2	S			71.314	43.937	61,61%	129	0,29%	8	0,02%	47.440	36.493	76,92%	646	1,77%
11	m3	BM			893.069	831.129	93,06%	426	0,05%	361	0,04%	84.424	71.519	84,71%	3.896	5,45%
11	m3	S			436.997	390.089	89,27%	823	0,21%	1.455	0,37%	252.888	190.670	75,40%	18.919	9,92%
12	m3	BM	14	91,1	96.924	92.489	95,42%	0	0,00%	23	0,02%	45.700	20.521	44,90%	207	1,01%
12	m2	S			251.632	215.131	85,49%	52	0,02%	72	0,03%	165.296	72.631	43,94%	1.151	1,58%
12	m4	S			43.545	37.627	86,41%	19	0,05%	54	0,14%	298.096	173.887	58,33%	533	0,31%
12	m5	S			26.728	20.408	76,35%	17	0,08%	60	0,29%	163.977	78.275	47,74%	248	0,32%
12	m5	S			28.749	21.927	76,27%	8	0,04%	285	1,30%	819.108	327.140	39,94%	492	0,15%
12	m5	S			15.037	10.075	67,00%	4	0,04%	117	1,16%	537.822	219.155	40,75%	364	0,17%
13	m4	BM			32.009	10.623	33,19%	1	0,01%	126	1,19%	3.102	1.216	39,20%	0	
13	m1	S	6	95	607.076	549.426	90,50%	340	0,06%	24.494	4,46%	25.816	13.119	50,82%	321	2,45%
13	m2	BM	5	89,4	73.940	44.520	60,21%	126	0,28%	2.222	4,99%	7.797	4.500	57,71%	92	2,04%
13	m3	BM			69.190	59.234	85,61%	192	0,32%	854	1,44%	51.542	46.589	90,39%	138	0,30%
13	m1	BM	6	91,8	282.082	229.826	81,47%	21	0,01%	6.175	2,69%	22.222	11.504	51,77%	61	0,53%

13	m4	S			412.544	340.119	82,44%	50	0,01%	18.461	5,43%	2.292	986	43,02%	5	0,51%
13	m3	BM			196.517	169.998	86,51%	1.058	0,62%	2.126	1,25%	167.123	164.152	98,22%	791	0,48%
13	m3	S			663.520	590.888	89,05%	3.191	0,54%	7.193	1,22%	131.861	128.145	97,18%	708	0,55%
13	m3	S			113.083	100.239	88,64%	471	0,47%	1.324	1,32%	22.128	21.233	95,96%	92	0,43%
14	m2	BM	13	89,6	172.284	110.200	63,96%	0	0,00%	0	0,00%	12.460	10.899	87,47%	156	1,43%
14	m1	BM	29	94,2	312.620	298.773	95,57%	479	0,16%	357	0,12%	20.930	17.117	81,78%	409	2,39%
14	m1	BM	29	94,2	135.607	125.450	92,51%	177	0,14%	43	0,03%	10.420	7.619	73,12%	153	2,01%
14	m2	S	13	56,4	159.930	74.827	46,79%	106	0,14%	6	0,01%	36.711	24.848	67,69%	322	1,30%
14	m1	S	29	89,1	106.442	99.951	93,90%	6	0,01%	1.208	1,21%	21.047	12.189	57,91%	408	3,35%
14	m1	S	29	89,1	95.347	80.592	84,52%	7	0,01%	297	0,37%	25.989	11.962	46,03%	257	2,15%
14	m2	S	13	72,8	196.586	100.737	51,24%	3	0,00%	18	0,02%	23.942	16.341	68,25%	222	1,36%
14	m2	S	13	67,9	176.374	63.124	35,79%	335	0,53%	67	0,11%	23.010	14.503	63,03%	224	1,54%
14	m3	S	18	75,9	313.502	251.613	80,26%	1.084	0,43%	899	0,36%	5.114	3.956	77,36%	205	5,18%
15	m1	S	9	89,1	784.117	578.469	73,77%	504	0,09%	14.272	2,47%	156.245	90.291	57,79%	1.660	1,84%
15	m2	BM	5	98,5	1.554.586	1.412.007	90,83%	10	0,00%	17.863	1,27%	19.098	16.631	87,08%	327	1,97%
15	m3	S	4	91	443.320	209.213	47,19%	22	0,01%	33	0,02%	45.601	33.426	73,30%	338	1,01%
15	m3	S	4	92,3	238.728	23.086	9,67%	37	0,16%	20	0,09%	25.154	17.796	70,75%	159	0,89%
15	m3	S	4	97,4	337.295	26.289	7,79%	27	0,10%	2	0,01%	8.532	4.727	55,40%	120	2,54%
15	m1	BM	9	97,9	801.394	593.074	74,01%	1.106	0,19%	13.186	2,22%	46.046	19.626	42,62%	281	1,43%
15	m2	S	5	91,3	462.233	302.570	65,46%	886	0,29%	3.820	1,26%	7.387	4.698	63,60%	246	5,24%
16	m1	BM	25	75	191.432	137.713	71,94%	84	0,06%	88	0,06%	29.183	22.344	76,57%	319	1,43%
16	m1	S	25	20	57.975	30.698	52,95%	7	0,02%	171	0,56%	137.888	65.878	47,78%	260	0,39%
16	m1	S	25	36,1	64.292	8.420	13,10%	5	0,06%	91	1,08%	85.940	32.489	37,80%	157	0,48%
17	m3	BM	9	89,9	138.445	118.990	85,95%	73	0,06%	42	0,04%	163	97	59,51%	1	1,03%
17	m1	S	25	68,4	75.334	47.386	62,90%	84	0,18%	152	0,32%	12.695	4.737	37,31%	1.455	30,72%
17	m1	S	25	68,4	35.821	17.275	48,23%	35	0,20%	81	0,47%	9.727	2.079	21,37%	641	30,83%
17	m3	S	9	53,1	126.132	92.052	72,98%	119	0,13%	451	0,49%	6.473	5.110	78,94%	137	2,68%

17	m3	S	9	51,7	152.811	116.338	76,13%	240	0,21%	913	0,78%	5.482	4.190	76,43%	198	4,73%
17	m2	S	13	52	46.000	7.142	15,53%	16	0,22%	41	0,57%	8.681	967	11,14%	64	6,62%
17	m2	S	13	59,2	51.773	5.518	10,66%	9	0,16%	36	0,65%	14.855	1.018	6,85%	44	4,32%
17	m2	S	13	58,5	32.070	5.822	18,15%	11	0,19%	31	0,53%	17.586	2.800	15,92%	102	3,64%
18	m6	BM			359.451	318.249	88,54%	5	0,00%	37	0,01%	20.481	6.202	30,28%	471	7,59%
18	m4	S	4	69,6	344.312	321.341	93,33%	496	0,15%	6.365	1,98%	83.985	71.412	85,03%	1.587	2,22%
19	m3	BM	15	0,15	861	392	45,53%	3	0,77%	1	0,26%	977.580	847.772	86,72%	201	0,02%
19	m3	S	15	8,05	96.110	68.884	71,67%	11	0,02%	807	1,17%	416.573	360.407	86,52%	76	0,02%
19	m2	BM			5.779	2.467	42,69%	0	0,00%	27	1,09%	494.994	434.836	87,85%	671	0,15%
19	m2	S			32.923	16.944	51,47%	23	0,14%	98	0,58%	161.654	116.505	72,07%	222	0,19%
19	m2	S			56.758	39.487	69,57%	7	0,02%	144	0,36%	128.320	61.390	47,84%	132	0,22%

### 8.3 Auswertblatt (Worksheet)





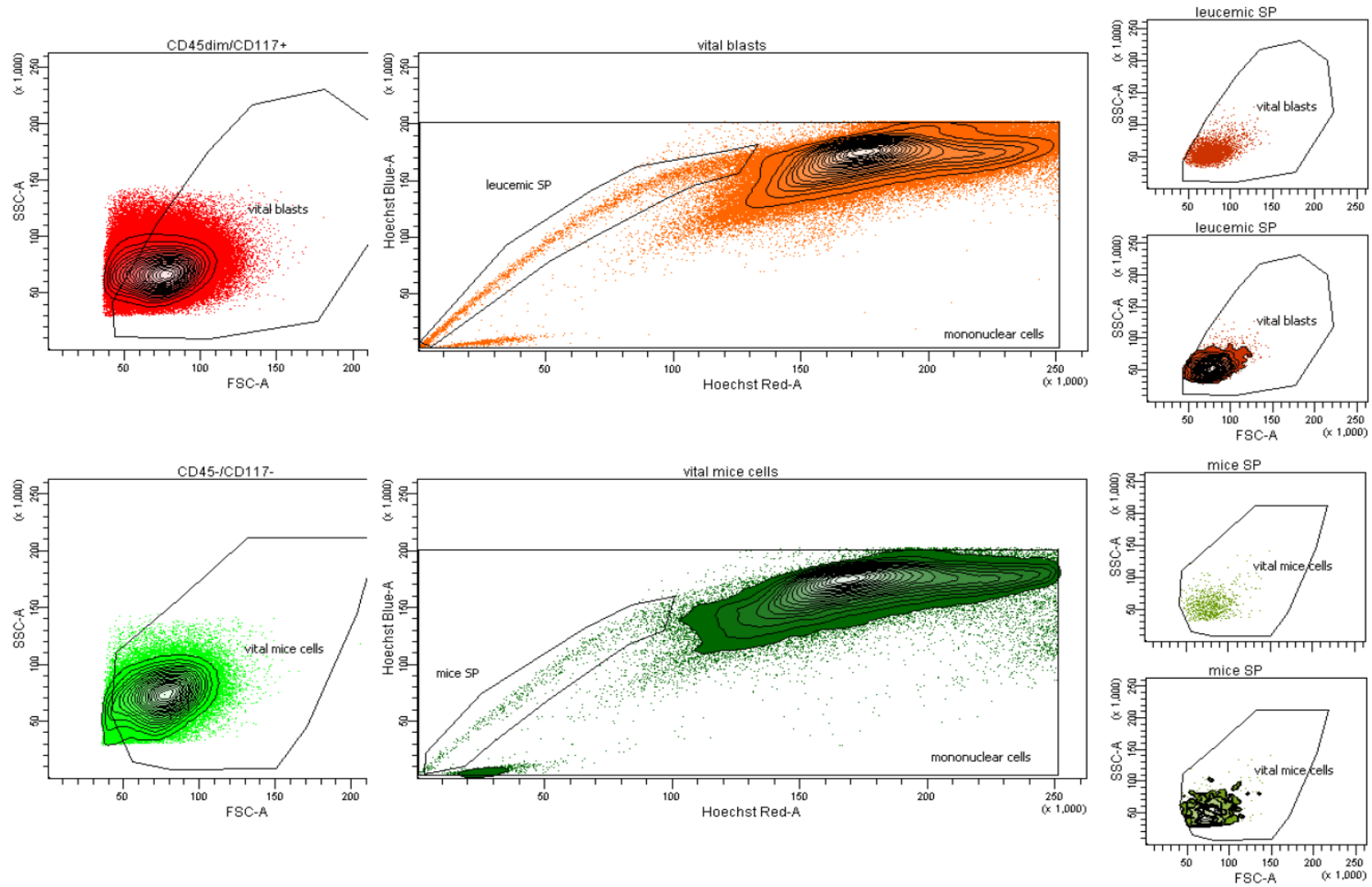


Abbildung 40: Auswertblatt

## 8.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die häufigsten Krebserkrankungen bei Kindern .....	2
Abbildung 2: Hämatopoese (Blutbildung) .....	9
Abbildung 3: Erklärungsmodelle für die Entstehung leukämischer Zellen .....	15
Abbildung 5: Konfiguration des blauen (488 nm, links) und des roten (633 nm, rechts) Lasers .....	34
Abbildung 6: Konfiguration des violetten (405 nm, links) und des UV (325 nm, rechts) Lasers .....	34
Abbildung 7: Emissionsspektren von FITC und PR mit Filtern .....	36
Abbildung 4: Darstellung der SP .....	38
Abbildung 8: Dot Plot.....	41
Abbildung 9: Gating-Hierarchie.....	42
Abbildung 10: all events .....	45
Abbildung 11: time window.....	46
Abbildung 12: mononuclear cells.....	46
Abbildung 13: singlets .....	48
Abbildung 14: singlets .....	48
Abbildung 15: mice SP und leucemic SP .....	49
Abbildung 16: blasts .....	50
Abbildung 17: vital blasts.....	51
Abbildung 18: vital blasts.....	52
Abbildung 19: leucemic SP.....	52
Abbildung 20: SP vs. Leukämieformen .....	53
Abbildung 21: Leukämische SP aus der Maus vs. SP aus dem KM des Patienten .....	55
Abbildung 22: serielle Maus-Tx – KM.....	57
Abbildung 23: serielle Maus-Tx – Milz.....	57
Abbildung 24: Korrelation der leukämischen SP mit der murinen SP aus dem KM. ....	58
Abbildung 25: Korrelation SP leukämisch mit der SP murin jeweils aus der Milz.....	59
Abbildung 26: SP KM vs. Milz .....	61
Abbildung 27: SP Milz .....	62
Abbildung 28: SP KM .....	62
Abbildung 29: SP vs. CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> Gesamt .....	64

Abbildung 30: SP vs. CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> Milz .....	64
Abbildung 31: SP vs. CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> KM .....	65
Abbildung 32: SP vs. CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> B-ALL.....	65
Abbildung 33: SP vs. CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> AML .....	65
Abbildung 34: SP vs. CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> T-ALL.....	66
Abbildung 35: SP vs. Blasten .....	67
Abbildung 36: Herkunftsorgan vs. Engraftment.....	68
Abbildung 38: % Blasten vs. Anwachsdauer .....	69
Abbildung 37: SP vs. Anwachsdauer .....	70
Abbildung 39: % CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> -Zellen vs. Anwachsdauer.....	71
Abbildung 40: Auswertebblatt.....	104

## 8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Geräte, Glas und Kunststoffmaterial .....	23
Tabelle 2: Allgemeine Chemikalien .....	24
Tabelle 3: Reagenzien zur Bestimmung der SP .....	26
Tabelle 4: FITC-konjugierte Antikörper.....	26
Tabelle 5: PE-konjugierte Antikörper.....	26
Tabelle 6: PerCP-konjugierte Antikörper .....	27
Tabelle 7: APC-konjugierte Antikörper .....	27
Tabelle 8: AF700-konjugierte Antikörper .....	27
Tabelle 9: PB-konjugierte Antikörper.....	27
Tabelle 10: Tandem-Antikörper .....	27
Tabelle 11: Mice CD45 – Antikörper.....	28
Tabelle 12: Antikörper (Fc Rezeptor Blocking) .....	28
Tabelle 13: Lebend-Tot-Marker .....	28
Tabelle 14: EDV-Software .....	28
Tabelle 15: Patientendaten .....	96
Tabelle 16: Messergebnisse.....	98

## 9 Danksagung

Zuerst möchte ich meinen Dank an Herrn Prof. Dr. R. Handgretinger für die Aufnahme in seine Klinik und an Herrn Prof. Dr. P. Lang für die Annahme als Doktorrand richten.

Mein weiterer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Martin Ebinger, der mir zu jeder Zeit mit Hilfe und Unterstützung zur Seite stand und mich so freundlich in die Arbeitsgruppe aufnahm. Vielen Dank für die Bereitstellung des Themas, die inhaltliche Begleitung, die Beantwortung meiner vielen Fragen und die Hilfestellungen beim Verfassen der Arbeit. Ich bedanke mich sehr für die Ehrlichkeit und Zuverlässigkeit.

Weiter geht mein herzlicher Dank an Kai Witte und Iris Schäfer für die Einarbeitung, Begleitung und vor allem die praktische Unterstützung, ohne die ich die vielen Versuche nicht geschafft hätte. Sie standen mir vor Ort bei Fragen immer gerne zu Verfügung. Vielen Dank für die nette und herzliche Atmosphäre im Labor. Zudem möchte ich mich bei dem Team des KMT- und Routinelabors für die Bereitstellung und Einweisung in die Geräte bedanken.

Bei Dr. Maya André bedanke ich mich für ihre Daten über die Anwachsdauer und die Engraftmentrate. Dadurch konnte ich Zusammenhänge untersuchen, was sonst nicht möglich gewesen wäre. Zudem stammten die meisten leukämischen Zellen aus der Maus von ihren Tieren. Vielen Dank für die Bereitstellung dieses Probenmaterials.

Vanessa Heinrich und Barbara Goecke aus Dr. Andrés Arbeitsgruppe unterstützen mich bei der Zellgewinnung aus den Mäusen und stellten mir zudem Probenmaterial bereit. Vielen Dank dafür.

Mein weiterer Dank geht auch an Christina Haug, die mir ihre Ergebnisse aus Untersuchungen mit Primärmaterial bereitstellte. Dadurch konnte ich meine Daten aus der Maus mit Daten aus Primärmaterial vergleichen. Zudem richtet sich mein Dank an Martin Philippek für die Bereitstellung seiner Methoden.

Bedanken möchte ich mich bei allen, die mich in irgendeiner Form unterstützt haben:

- Bei meiner Ehefrau für das geduldige Zuhören, Motivieren und die Unterstützung beim Schreiben der Arbeit.
- Danke an Almut und Daniel, dass sie sich so viel Zeit genommen haben, die vielen Seiten so gründlich zu korrigieren.
- Ein großer Dank geht auch an meine Freunde und Familie, bei denen ich zu jeder Zeit meine zwischenzeitlichen Klagen loswerden konnte.

Einen tiefen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, die mir mein Studium ermöglicht haben und bei denen ich immer einen sicheren Rückhalt gefunden habe.

Mein besonderer Dank geht an Gott, meinen Vater und Freund, der mir jeden Tag neu die Fähigkeiten zum Gelingen dieser Arbeit geschenkt hat. Ihm gebührt alle Ehre.

## 10 Lebenslauf

### Persönliches

Name: Reinhard Hörrmann  
 Geburtsdatum: 30.06.1985  
 Geburtsort: Schwäbisch Hall  
 Eltern: Albrecht Hörrmann  
 Johanna Hörrmann, geb. Knecht

### Schulbildung

Sept. 1992 bis Juli 1996: Grundschule in Schwäbisch Hall-Bibersfeld  
 Sept. 1996 bis Juli 2002: Erasmus-Widmann-Gymnasium Schwäbisch Hall  
 Sept. 2002 bis Juli 2005: Wirtschaftsgymnasium Schwäbisch Hall  
 Juli 2005: Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

Sept. 2005 bis Mai 2006: Diakonie-Klinikum Schwäbisch Hall

### Hochschulbildung

Oktober 2006 bis 2012: Humanmedizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
 Herbst 2008: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 30. Oktober 2012: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Famulaturen

März 2009: Abteilung Gefäßchirurgie  
 Diakonie-Klinikum Schwäbisch Hall  
 März 2010: Abteilung Kinderheilkunde  
 Universitätsklinik Tübingen  
 August bis Sept. 2010: Abteilung Innere Medizin  
 Diakonie-Klinikum Schwäbisch Hall  
 Sept. 2010: Unfallchirurgische Ambulanz  
 Diakonie-Klinikum Schwäbisch Hall  
 März bis April 2011: Radiologische Ambulanz  
 Universitätsklinik Tübingen

### Praktisches Jahr

Seit August 2011: Anästhesie, Chirurgie und Innere Medizin  
 Klinikum Stuttgart – Bad Cannstatt