

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

**Minimal Residual Disease und leukämische
Progenitorzellen bei der akuten Leukämie des
Kindesalters**

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

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

vorgelegt von

Andreas Michael Herbster

aus

Freudenstadt

- 2013 -

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. J. Lang

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. R. Salih

Was wir wissen, ist ein Tropfen;
was wir nicht wissen, ein Ozean.

SIR ISAAC NEWTON

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die kindliche Leukämie	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie.....	1
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.1.4 Klassifikation	2
1.1.5 Klinik.....	3
1.1.6 Diagnostik.....	4
1.1.7 Therapie	4
1.1.8 Akute Leukämien im Kindesalter	5
1.2 Minimal Residual Disease	9
1.3 Hämatopoetische Stammzellen	10
1.3.1 Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen.....	10
1.3.2 Identifizierung hämatopoetischer Stammzellen	12
1.4 Leukämische Stammzellen	14
1.5 Studienziel.....	17
2 PATIENTENPROBEN UND MATERIAL.....	18
2.1 Patientenproben.....	18
2.1.1 Allgemeines.....	18
2.1.2 Auswahl der Patienten.....	19
2.1.3 Kontrollproben	20
2.1.4 Zusammensetzung der Patientenproben.....	20
2.2 Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.3 Verwendete Chemikalien.....	24
2.4 Verwendete Stammlösungen.....	25

2.5	Stammzellreagenzien, Antikörper, Lebend-/Tot-Marker	26
2.5.1	Stammzellreagenzien	26
2.5.2	Fluorochrom-konjugierte Antikörper	26
2.5.3	Lebend/Tot-Marker	27
2.5.4	Beads	27
2.6	EDV-Software	27
3	METHODEN	28
3.1	Herstellung der Stammlösungen	28
3.1.1	Einfriermedium	28
3.1.2	Auftaulösung	28
3.1.3	PBSA	28
3.2	Vorbereitung der Patientenproben	29
3.2.1	Isolierung mononukleärer Zellen	29
3.2.2	Kryokonservierte Proben	30
3.3	Aldefluor® – Färbung	32
3.3.1	Allgemeines	32
3.3.2	Aktivierung	32
3.3.3	Färbung mit Aldefluor®	33
3.3.4	FACS-Analyse	34
3.4	Färbung der Zellen mit Oberflächen-Antikörpern	35
3.4.1	Allgemeines	35
3.4.2	Fluoreszenzfarbstoffe	35
3.4.3	Antikörper	38
3.4.4	Färbung mit Antikörpern	39
3.5	Lebend/Tot-Differenzierung	41
3.6	Messtechnik	42
3.6.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	42
3.6.2	Konfiguration und Ausstattung des Messgerätes	44
3.6.3	Kalibrierung und Kompensation des Messgerätes	45
3.7	Datenauswertung	47
3.8	Statistik	54
3.9	Korrelation mit klinischem Verlauf	54

4	ERGEBNISSE.....	55
4.1	Analyse unreifer Populationen bei Diagnosestellung	55
4.1.1	Messergebnisse	56
4.1.2	Korrelation mit dem MRD-Level	63
4.2	Analyse unreifer Populationen im Verlauf unter Therapie	67
4.3	Vergleichende Messungen.....	70
4.3.1	Tumorzellsuspension eines Lymphknotens.....	70
4.3.2	Peripheres Blut bei Erstdiagnose einer c-ALL	72
4.4	Kontrollproben	73
5	DISKUSSION	76
5.1	Diskussion der Messergebnisse	77
5.2	Korrelation mit dem MRD-Level.....	82
5.3	Verlaufsproben	85
5.4	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	87
6	ZUSAMMENFASSUNG	88
7	LITERATURVERZEICHNIS	90
8	ANHANG.....	98
8.1	Datentabellen	98
8.1.1	Kontroll-Patienten.....	98
8.1.2	ALL-Patienten Erstdiagnosen.....	99
8.1.3	Verlaufsproben	102
8.1.4	Vergleichsproben	104
8.1.5	Zytometer-Einstellungen.....	104
8.2	Auswertebogen.....	105
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	107
8.4	Tabellenverzeichnis.....	109
9	DANKSAGUNG.....	111
10	LEBENS LAUF	112

Abkürzungsverzeichnis

Abs.-Max	Absorptions-Maximum
AF	Aldefluor [®]
AF-700	AlexaFluor 700
AIEOP	Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ALDH ^{br}	Population mit stark positiven Aldefluor [®] -Werten
ALL	akute lymphatische Leukämie
AM	Auftaumedium
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
Aq. Dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
AVSD	Atrio-ventrikulärer Septumdefekt
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BP	Bandpass-Filter
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	cluster of differentiation
CFU	colony forming unit
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CSC	Cancer Stem cell
DEAB	Diethylaminobenzaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid
ED	Erstdiagnose
Em.-Max	Emissions-Maximum
FAB	French-American-British-Group
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälber-Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter

HSC	hämatopoetische Stammzelle
KM	Knochenmark
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LIZ	Leukämie-induzierende Zelle
LK	Lymphknoten
LP	Longpass-Filter
LSC	leukämische Stammzelle
LT-LSC	Longterm - LSC
min	Minute(n)
MNC	mononukleäre Zelle
MRD	minimal residual disease
MW	Mittelwert
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NOD-SCID	Nonobese diabetic – severe combined immunodeficiency
PB	Pacific Blue
PBS	phosphate buffered saline
PBSA	PBS, 0,01% NaAzid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-Protein
PI	Propidiumiodid
pMNC	periphere mononukleäre Zelle
RPMI 1640	Zellkulturmedium (Entwickelt am Roswell Park Memorial Inst.)
RT	Raumtemperatur (20 °C)
SA	Standartabweichung
SP	side population
SSC	side scatter
SSC ^{low}	Population mit niedrigem side scatter
ST-LSC	Short-term-LSC
VLE	very low endotoxin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die kindliche Leukämie

1.1.1 Definition

Im Jahre 1845 beobachteten der schottische Arzt John Bennett und der deutsche Pathologe Dr. Rudolf Virchow etwa zeitgleich das Phänomen einer starken Vermehrung der weißen Blutkörperchen. Virchow bezeichnete die Beobachtung als weißes Blut und führte 1847 den Begriff Leukämie ein. Im Jahre 1860 beschrieb Michael Anton Biermer, ein Schüler Virchows, den ersten Fall akuter lymphatischer Leukämie bei einem Kind.

Zur heutigen Zeit wird als gemeinsames Charakteristikum der Leukämien die Proliferation unreifer hämatopoetischer Zellen verstanden. Sie verdrängen durch ihr Wachstum die normale Hämatopoese im Knochenmark und führen so zu Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie. Zudem können die entarteten Zellen extramedulläre Organe infiltrieren [1].

1.1.2 Epidemiologie

Als häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter bilden die Leukämien einen Anteil von 35-40% aller kindlichen Malignome. Davon wiederum formen akute lymphatische Leukämien (ALL) einen Anteil von 80% und die akuten myeloischen Leukämien (AML) einen Anteil von 18%. Die seltene Form der chronisch myeloischen Leukämie (CML) macht einen Anteil von 2% aus. Im Kindesalter kommt die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) praktisch nicht vor [1]. In Deutschland erkranken jährlich etwa 600 Kinder bis zum 15. Lebensjahr an Leukämien. Die standardisierte Inzidenz beträgt 5,2 / 100 000 [2]. Neben Leukämien gehören Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) und maligne Lymphome zu den häufigsten Malignomen des Kindesalters [1]. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Häufigkeit der verschiedenen Tumorentitäten bei Kindern.

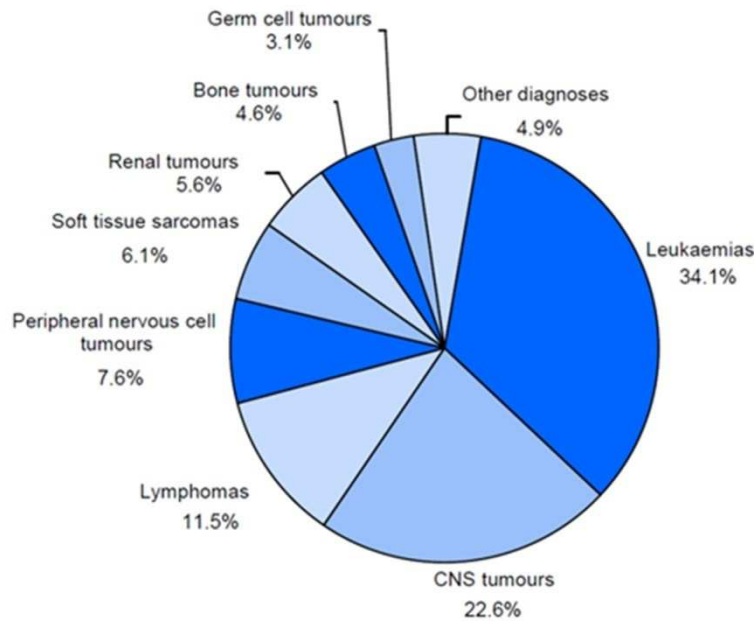


Abb. 1.1: Häufigkeitsverteilung maligner Erkrankungen im Kindesalter

Verteilung maligner Erkrankungen im Kindesalter bis zum 15. Lebensjahr in Deutschland (1998-2007) (n=18.217). Quelle: Deutsches Kinderkrebsregister, Jahresbericht 2008 [3].

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die genaue Ätiologie der Leukämien ist unbekannt. Mehrere Risikofaktoren wie radioaktive Strahlung, Benzol, alkylierende Substanzen und Procarbazin erhöhen die Wahrscheinlichkeit, an einer Leukämie zu erkranken [4]. Auch bakterielle und virale Infektionen könnten bei der Entstehung von Bedeutung sein [5, 6]. Darüber hinaus sind mehrere chromosomale Anomalien wie das Down-Syndrom und die Fanconi-Anämie oder Immundefekte, beispielsweise das Wiskott-Aldrich-Syndrom und die Agammaglobulinämie als prädisponierende Erkrankungen bekannt [1, 4].

1.1.4 Klassifikation

Die genaue Klassifikation von Unterformen der Leukämie ist wichtig für eine risikostratifizierte Planung der Therapie. So können aufgrund morphologischer, zytochemischer, immunologischer, biochemischer, zytogenetischer und molekulargenetischer Merkmale die verschiedenen Leukämien in ALL, AML, CML und CLL eingeteilt werden. Für ALL und AML gibt es weitere Subtypen, die sich in der Prognose deutlich unterscheiden. Zytomorphologisch werden die Leukämien nach der FAB (French-American-British-Group)-Klassifikation

eingeteilt. Sie richtet sich nach der Zellgröße, der Zellkernform, dem Chromatin, den Nukleoli, dem Zytoplasma-Anteil, der Basophilie des Zytoplasmas, sowie den Granula und den Vakuolen im Zytoplasma. So werden ALLs lichtmikroskopisch in FAB Typen L1 - L3, AMLs in M0 - M7 eingeteilt. Zur genaueren Klassifikation der Unterformen ist die immunologische Zuordnung die wichtigste Methode. Mithilfe verschiedener Antikörper wird die ALL weiter aufgrund der Expression von intrazellulären Besonderheiten und Oberflächen-Antigenen unterteilt [1].

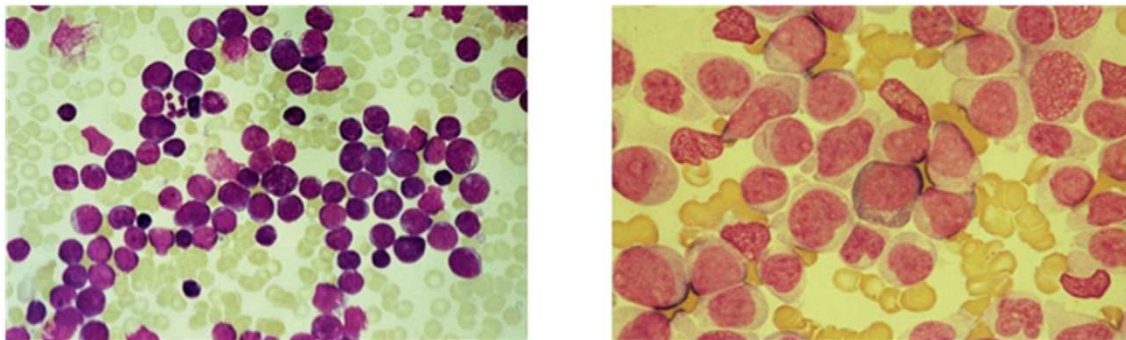


Abb. 1.2: Knochenmarkausstrich bei ALL und AML

Links: ALL mit Lymphoblasten vom Typ FAB L1/L2. Rechts: AML mit myeloischen Blasten vom Typ FAB M2. Quelle: Sitzmann FC. Pädiatrie. Thieme: Duale Reihe, 2007 [1].

1.1.5 Klinik

Meist entwickeln sich die Symptome der Erkrankung sehr rasch innerhalb weniger Wochen. Betroffene Kinder fühlen sich schlapp und müde. Allgemeinsymptome wie Gewichtsabnahme und Schweißneigung können auftreten. Häufig besteht Fieber durch rezidivierende Infekte bei Granulozytopenie. Schleimhautblutungen (Nasenbluten) oder Hämatomneigung sind Anzeichen der Thrombozytopenie. Viele Kinder geben Knochenschmerzen an und insbesondere Kleinkinder wollen plötzlich wieder getragen werden. Bei 2/3 der Kinder ist eine generalisierte Lymphknotenschwellung zu beobachten. Die Lymphknoten sind häufig derb und fest verbacken. Gelegentlich sind Leber und Milz geschwollen. Durch die Verdrängung der Zellen der normalen Hämatopoese entstehen die typischen Symptome Blutungsneigung, Blässe und Infektanfälligkeit. Weil sich Blasten in vielen Organen absiedeln können, sind die klinischen Manifestationen sehr unterschiedlich. Bei ZNS-Infiltration können

beispielsweise Sehstörung, Hirndruckzeichen und Krampfanfälle auftreten und damit Anzeichen für eine Meningeosis leucaemica sein [1].

1.1.6 Diagnostik

Mittels Differentialblutbild und Knochenmark-Ausstrich kann die Diagnose gestellt werden. Der Leukozytenanteil im Peripherblut kann massiv erhöht auf über 100 000 Zellen / μl oder normal sein. Das Zellbild ist monomorph. Im Knochenmark ist die normale Hämatopoese zugunsten leukämischer Blasten verdrängt. Es finden sich über 25% Blasten bezogen auf die Gesamtzellzahl. Zytologische Liquoruntersuchungen sind durchzuführen, um einen ZNS-Befall nachzuweisen. Andere Organmanifestationen sind durch entsprechende Bildgebungsverfahren wie Sonographie des Abdomens und MRT zu eruieren. Serumwerte für LDH, Kalium, Harnsäure, Phosphat und Kalzium weisen vermehrten Zelluntergang nach und können bei Beginn der Therapie durch Verstärkung des Zelluntergangs zu einem Tumorlysesyndrom führen [1].

Auszuschließen sind Differentialdiagnosen wie Immunthrombozytopenie, schwere aplastische Anämie, myelodysplastisches Syndrom, rheumatische Erkrankungen, Morbus Pfeiffer, Osteomyelitis und andere maligne Erkrankungen mit Infiltration des Knochenmarks [1].

1.1.7 Therapie

Ziel der Behandlung von Leukämien ist die dauerhafte Heilung durch Vernichtung aller bösartigen Zellen. Die Therapien erfolgen meist in größeren Krankenhäusern, die auf die Behandlung von kindlichen Leukämien spezialisiert sind. Patienten werden zum überwiegenden Teil in Therapieoptimierungsstudien behandelt, deren Ziel eine optimale Behandlung der Krankheit unter möglichst geringen Nebenwirkungen ist. Supportiv müssen neben der antileukämischen Chemotherapie weitere Medikamente und Maßnahmen ergriffen werden, um die Nebenwirkungen der aggressiven Behandlung sowie leukämiebedingte Komplikationen zu behandeln und vorzubeugen [1].

In den letzten Jahrzehnten konnten große Erfolge in der Behandlung erzielt werden. Dementsprechend ist die einst immer tödlich verlaufende Erkrankung nun bei vielen Patienten mit dem realistischen Ziel der Heilung behandelbar [7].

1.1.8 Akute Leukämien im Kindesalter

1.1.8.1 Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die akute lymphatische Leukämie ist die häufigste Leukämieform im Kindesalter und mit 25% aller malignen Erkrankungen, die häufigste maligne Erkrankung bei Kindern. Der Altersgipfel liegt im Kleinkindesalter zwischen 2 und 5 Jahren. Jungen erkranken etwas häufiger als Mädchen im Verhältnis 1,2 : 1. Die Inzidenz liegt bei 4,3 / 100 000 Kinder unter 15 Jahren [1, 2].

Es entarten unreife lymphatische Zellen, Lymphoblasten genannt, welche morphologisch nach der FAB-Klassifikation (L1 – L3) und immunologisch je nach Antigenmuster in verschiedene Unterformen eingeteilt werden:

ALL Hauptform	% von kindlicher ALL	Subtypen
B-Vorläufer-Zell-ALL	84%	prä-prä-B-ALL (pro-ALL) common-ALL (c-ALL) prä-B-ALL
B-ALL	3%	
T-ALL	13%	frühe T-ALL kortikale T-ALL reife T-ALL
AUL (unklassifizierbar)		
ALL mit Koexpression myeloischer Marker		

Tab. 1.1: Formen der akuten lymphatischen Leukämie

Formen und Subtypen kindlicher ALL, sowie deren Anteil in % [1].

Weitere Untersuchungen, die auf zyto- oder molekulargenetische Besonderheiten abzielen, helfen Formen mit ungünstigerer Prognose frühzeitig zu erkennen. Folglich können diese Patienten einer intensiveren Behandlung

zugeführt werden. Bei der ALL zählen dazu Chromosomen-Translokationen wie das Philadelphia-Chromosom t(9;22) oder die typischerweise bei Säuglingen vorkommende Translokation t(4;11) [1]. Günstigere Prognosen haben dagegen Kinder mit der Translokation t(12;21), welche bei einem Viertel der Fälle festgestellt werden kann [8, 9].

Alle Patienten sollten in Therapieoptimierungsstudien eingeschlossen werden. Dort erfolgt die Behandlung nach Risikogruppen hinsichtlich der Rezidivgefahr. Bis auf die B-ALL werden allen genannten Unterformen ähnlich behandelt. An der Kinderklinik des Universitätsklinikum Tübingen erfolgt die Behandlung kindlicher ALL durch die Protokolle der ALL-BFM-Gruppe (AIEOP ALL-BFM 2000 und AIEOP ALL-BFM 2009). Die Therapie findet in mehreren Phasen statt und dauert insgesamt etwa 2 Jahre: Induktions-, Konsolidierungs-, Reintensivierungs- und Erhaltungstherapie. Durch die Induktionstherapie soll eine komplette Remission erzielt werden, welche durch die weiteren Phasen erhalten bleiben soll. Wichtige Chemotherapeutika sind Kortison, Vincristin, Anthracycline, Asparaginase, Cytarabin, Cyclophosphamid, Methotrexat, 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin. Sie werden während den genannten Therapiephasen kombiniert verabreicht. Intrathekale Methotrexat-Gaben ersparen bis auf wenige Ausnahmen die Ganzschädelbestrahlung und sind zur Vermeidung von ZNS-Rezidiven notwendig. Knochenmarktransplantationen, die erheblicher mit Risiken verbunden sind, werden zunächst nur bei Hochrisikopatienten durchgeführt. Sie können aber zudem bei frühen Rezidiven zur Heilung führen [1].

Die Prognose der ALL ist insgesamt gesehen gut und abhängig vom jeweiligen Subtyp. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei über 80%. Komplette Remissionen können in 95% der Fälle erzielt werden. Dennoch ist die individuelle Prognose von den genannten und weiteren Risikofaktoren abhängig. Ungünstigere Prognosen haben Säuglinge und Kinder über 10 Jahre, sowie das männliche Geschlecht. Initialer ZNS-Befall und eine hohe Leukämiezellmasse stellen weitere Risiken dar. Eine gute Prognose versprechen dagegen eine deutliche Reduktion der Blastenlast nach 8-tägiger

Kortison-Gabe und niedrige Blastenzahlen bei den MRD (Minimal Residual Disease)-Bestimmungen [1]. Näheres zur MRD in Kapitel 1.2.

1.1.8.2 Akute myeloische Leukämie (AML)

Mit einem Anteil von 18% der kindlichen Leukämien ist die AML die zweithäufigste Entität. Am häufigsten sind Säuglinge und Kleinkinder bis 2 Jahren betroffen. Das Geschlechterverhältnis beträgt 1,1 : 1, Jungen erkranken etwas häufiger. Die Inzidenz bei Kindern unter 15 Jahren beträgt 0,7 / 100 000 [2].

Bei der AML entarten Zellen der Myelopoese, welche durch die FAB-Klassifikation morphologisch in 8 Gruppen eingeteilt werden:

AML Subtyp (FAB)	% von AML	Zytogenetische Aberrationen
M0: Minimal differenzierte AML	5%	-
M1: AML ohne Ausreifung	15%	-
M2: AML mit Ausreifung	25%	t(8;21)
M3: Akute Promyelozyten Leukämie (APL) M3V: Variante mikrogranuläre APL	10%	t(15;17)
M4: Akute myelomonozytäre Leukämie M4Eo: mit Eosinophilie	25%	
M5: Akute monozytäre Leukämie a) Undifferenziert b) Differenziert	10%	inv(16)
M6: Akute Erythroleukämie	5%	
M7: Akute megakaryozytäre Leukämie	5%	

Tab. 1.2: FAB-Klassifikation der AML

FAB-Klassifikation (French-American-British-Group) nach morphologischen Kriterien bei der AML, sowie deren Anteil in % [10].

Unterschiedliche Risikofaktoren ermöglichen die Einschätzung der Prognose hinsichtlich der Gefahr eines Rezidivs [1]. Neben der Anzahl an Blasten, der Subgruppe und der Blastenreduktion am Tag 15 unter Therapie <5%, sind ebenso wie bei der ALL die zytogenetischen Besonderheiten der entarteten Zellen bei der AML relevant. Günstig sind die Translokationen t(8;21) und

t(15;17) oder die Inversion inv(16), schlechtere Prognosen bestehen für Monosomie 7 oder komplexere Karyotypen. Generell gute Prognosen bestehen bei Morbus Down und FAB M3 [11].

Die Therapie der AML sollte wie bei der ALL in Therapiezentren erfolgen. Das derzeitige Behandlungsschema richtet sich nach dem Protokoll der AML-BFM 2004 und besteht aus einer Induktions-, Konsolidierungs- und Reintensivierungstherapie, welche sich insgesamt über einen Zeitraum von 4-6 Monaten erstrecken. Im Anschluss daran erfolgt eine meist ambulant durchführbare Erhaltungstherapie. Dazu werden mildere Medikamente zur Zerstörung verbleibender Blasten über einen Zeitraum von 12 Monaten verabreicht. Sofern keine Blasten im ZNS nachweisbar sind, erfolgt die Behandlung durch intrathekale Polychemotherapie, andernfalls muss eine ZNS-Bestrahlung durchgeführt werden. Aktueller Datenlage zufolge sind Stammzelltransplantationen in der ersten Remission nicht mehr indiziert, stellen aber dafür bei Rezidiven eine wichtige Option dar [11].

Die 5-Jahres-Überlebensrate für die Gesamtgruppe der AML liegt derzeit bei 66% [2]. Leider erreichen 10-20% der Kinder keine Remission infolge Therapieresistenz oder Versterben an frühen Komplikationen. Etwa 1/3 der Patienten erleiden ein Rezidiv, wovon wiederum nur jedes dritte Kind durch erneute Chemotherapie und Knochenmarktransplantation geheilt werden kann [12]. Bei Kindern mit Down-Syndrom liegen die Heilungsraten dank erhöhter Toxizität der Zytostatika trotz reduzierter Therapie bei 80% und darüber. Gleiches gilt für die Promyelozytenleukämie (FAB M3), deren Prognose durch die Gabe von Retinoiden erheblich verbessert werden konnte [1].

Im Fokus der aktuellen Forschung liegt die weitere Verbesserung der antileukämischen Therapie durch zielgerichtete Zerstörung leukämischer Blasten unter Schonung gesunder Zellen. Es bleibt zu hoffen, dass dadurch die Heilungsraten weiter gesteigert, die Toxizität für den Organismus und die Langzeitfolgen dagegen deutlich reduziert werden können.

1.2 Minimal Residual Disease

Die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) verfolgt als primäres Ziel die Identifizierung von Patienten mit erhöhtem Risiko für einen ungünstigen Krankheitsverlauf und das frühzeitige Erkennen eines möglichen Rezidivs. Da die morphologische Nachweisgrenze für Blasten bei lichtmikroskopisch untersuchten Knochenmarkausstrichen bei etwa 5% liegt, muss bei der Bestimmung der Blastenlast im Therapieverlauf auf sensitivere Nachweismethoden zurückgegriffen werden [13]. Dafür stehen grundsätzlich Durchflusszytometrie (DCM) und Real-Time-PCR (RT-PCR) zur Verfügung. Gemeinsames Prinzip bei beiden Methoden ist der Nachweis leukämiespezifischer zellulärer und/oder molekularer Veränderungen, um leukämische Blasten von normalen hämatopoetischen Zellen zu differenzieren [14, 15]. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die schnelle Analyse mehrerer Parameter gleichzeitig und erlaubt zudem deren Quantifizierung [13]. Dabei beruht die Methode hauptsächlich auf dem Nachweis von Leukozyten mit aberrantem Immunophänotyp, einer Kombination von Oberflächenantigenen die auf normalen hämatopoetischen Zellen nicht vorkommt [16]. Die alternative Nachweismethode mittels PCR nutzt entweder Gen-Rearrangements von Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Proteinen oder die Amplifikation von Fusionstranskripten und Rearrangements, um quantitative Aussagen zur Zellzahl zu treffen.

In mehreren Studien konnte sowohl für die ALL, als auch für die AML eine enge Korrelation der MRD-Last mit dem klinischen Verlauf, der Prognose und dem Rezidivrisiko gezeigt werden [17-23]. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie war eine MRD-Last von $< 0,01\%$ (untere Nachweisgrenze) mit einem signifikant niedrigerem 5-Jahres-Rezidivrisiko verbunden [18, 20]. Die MRD-Ergebnisse stellten sich dabei als wichtigster prognostischer Faktor heraus [18]. Vor diesem Hintergrund erklärt sich, dass die MRD-Bestimmung Bestandteil in vielen heute etablierten Behandlungsprotokollen akuter und chronischer Leukämien ist. Diese erfordern Knochenmarkspunktionen zu bestimmten Zeitpunkten, um Patienten mit erhöhtem Rezidivrisiko zu identifizieren. Diese Patienten können einer intensiveren Therapie ausgesetzt werden um die

klinische Remission (CR) zu erhalten [24]. Umgekehrt werden bei Niedrig-Risikopatienten Optionen zur Therapiereduktion untersucht [25].

1.3 Hämatopoetische Stammzellen

1.3.1 Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen

Ausgereifte Zellen im peripheren Blut haben nur eine begrenzte Lebensdauer und sind bis auf Ausnahme der Lymphozyten nicht mehr zur Zellteilung fähig. Sie müssen stets durch neue Zellen ersetzt werden. Pluripotente hämatologische Stammzellen (HSCs) sind in der Lage, über Zellteilung und Ausdifferenzierung alle Zellen des hämatologischen Systems zu erneuern und deren Homöostase aufrecht zu erhalten [26]. Die Proliferationsfähigkeit lässt sich experimentell mittels Kolonogenizitäts-Assays messen. Stamm- und Progenitorzellen bilden dabei „Kolonien“ aus, die sich als colony forming units (CFUs) quantifizieren lassen [27]. Im Gegensatz zur Pluripotenz der Stammzellen, beschreibt der Begriff Oligopotenz die Fähigkeit von Progenitorzellen, sich nur noch in Zellen einer bereits determinierten Linie zu differenzieren. Sie entstehen durch asymmetrische Zellteilung einer HSC, wobei eine HSC und eine oligopotente Tochterzelle hervorgehen. Durch symmetrische Zellteilung resultieren zwei identische pluripotente HSCs. Somit halten HSCs neben der Ausdifferenzierung die wichtige Funktion der Selbsterneuerung inne und können die Blutbildung lebenslang aufrecht halten [28].

Es wird angenommen, dass sich HSCs im Knochenmark in Stammzellnischen befinden. Durch vielfältige Interaktion mit spezialisierten Osteoblasten, Endothelzellen, Stromazellen, extrazellulären Matrixproteinen und Zytokinen regulieren sie ihre Zellzyklusfunktion und passen sie auf die aktuellen Anforderungen des Organismus an [28-30]. Häufig befinden sie sich im Stadium der Quieszenz und reagieren dadurch weniger sensitiv auf die Auswirkungen von Chemotherapie und Bestrahlung [31, 32]. Zusammenfassend sind die wichtigsten Funktionen der HSCs ihre Fähigkeit zur Ausdifferenzierung, die Selbsterneuerung und das Stadium der Quieszenz [27]. Insgesamt macht ihre Anzahl mit bis zu 0,05% nur einen kleinen Teil der Population im menschlichen

Knochenmark aus [33]. Dabei handelt es sich um eine heterogene Population, bei der funktionell zwischen Langzeit-HSC (LT-HSC) und Kurzzeit-HSC (ST-HSC) unterschieden wird [28]. Lebenslang wird die Blutbildung durch die LT-HSCs aufrechterhalten, wohingegen ST-HSCs dies wegen schwächerem Potential zur Selbsterneuerung nur über wenige Wochen bewerkstelligen können [34, 35]. Dafür ermöglichen ST-HSCs im Vergleich zu LT-HSCs aber ein schnelleres Wiederheranwachsen des hämatopoetischen Systems [36]. Wilson et al. geht von einer Hierarchie aus, an deren Spitze sich in Ruhe befindende Stammzellen stehen, welche wiederum aktive Stammzellen hervorbringen. Die aktiven Stammzellen bewältigen mit hohen Zellteilungsraten ihre Selbsterneuerung und Differenzierung in reife hämatologische Zellen [37].

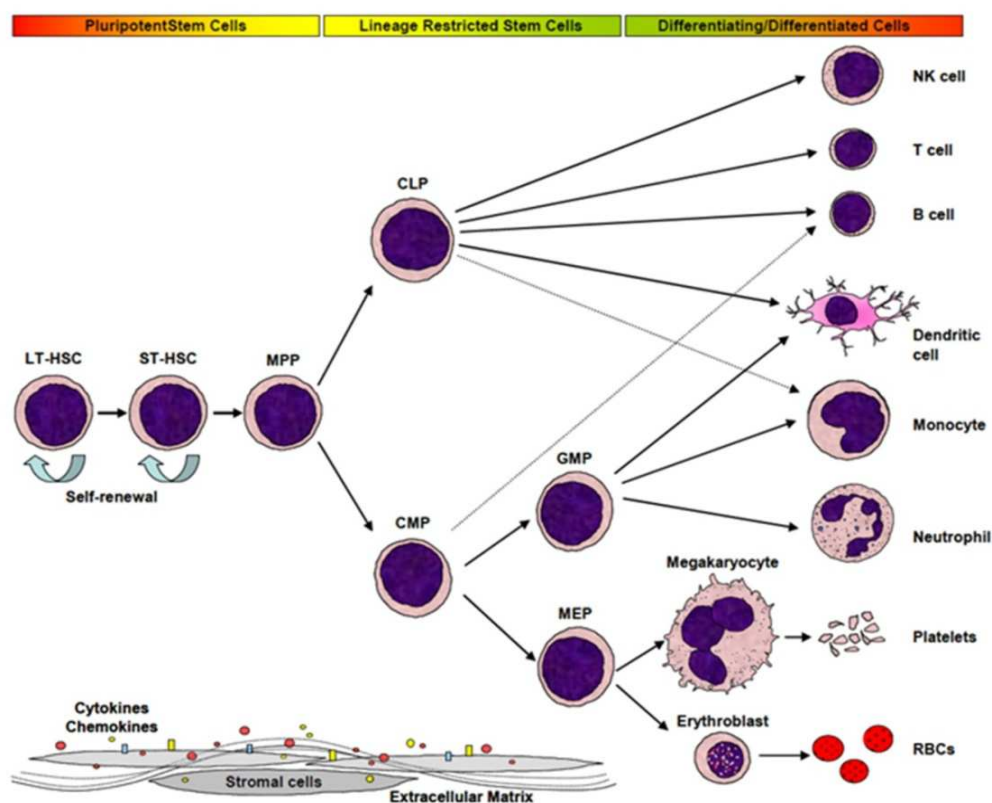


Abb. 1.3: Ontogenese hämatopoetischer Zellen aus Stammzellen

Darstellung der Ausdifferenzierung der Zellen des peripheren Blutes. Ausgehend von Langzeit-HSCs (LT-HSCs) entwickeln sich über Kurzzeit-HSCs (ST-HSCs) zunächst multipotente Progenitorzellen (MPP) aus denen gemeinsame Vorläuferzellen der myeloischen und lymphatischen Linie hervorgehen (CLP: common lymphatic progenitor, CMP: common myeloid progenitor). Diese entwickeln sich sukzessive weiter zu reifen Blutzellen. Schematisch sind am unteren Bildrand intrinsische und extrinsische Einflussfaktoren dargestellt, welche die Ausdifferenzierung beeinflussen. Quelle: Ahmed F. Role of the ABC transporter ABCG2 in human haematopoiesis. Dissertation: LMU München, 2007 [38].

1.3.2 Identifizierung hämatopoetischer Stammzellen

Die eindeutige Identifizierung von HSCs ist nach wie vor eine Herausforderung. Mehrere grundlegend unterschiedliche Methoden sind in Gebrauch. Eine Methode basiert auf Kombination von Oberflächenmarkern, um Stamm- und Progenitorzellen zu identifizieren, eine andere nutzt die Fähigkeit von Stammzellen, Farbstoffe (z.B.: Hoechst 33342) aktiv nach außen zu transportieren. Eine dritte Möglichkeit stellt der Nachweis erhöhter Aktivität des Enzyms Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) in Stammzellen dar [39].

Die Identifizierung anhand von Oberflächenmarkern basiert auf dem Nachweis von Molekülen der Zelloberfläche, welche systematisch als Cluster of Differentiation (CD) nummeriert und beschrieben sind und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können. Aktuell ist jedoch kein Oberflächen-Molekül bekannt, welches exklusiv auf Stammzellen exprimiert wird. Dennoch kann über Kombination dieser Marker eine Zellpopulation identifiziert werden, welche mit Stamm- und Progenitorzellen angereichert ist [39]. Der häufigste benutzte Marker für humane HSCs ist CD34. Es konnte nachgewiesen werden, dass CD34 positive ($CD34^+$) Zellen mit CFUs angereichert sind [40]. In Patienten, die einer myeloablativen Behandlung unterzogen wurden, haben diese Zellen die Fähigkeit langfristig das hämatopoetische System wieder herzustellen. Dabei handelt es sich jedoch nicht um eine reine Population von Stammzellen, sondern um eine heterogene Mischung, bei der eine geringe Anzahl Zellen von etwa 1% zur Langzeit-Koloniebildung fähig sind. Conneally et al. beschreibt 1997, dass die Anzahl an koloniebildenden Zellen im Nabelschnurblut in der Subpopulation $CD34^+/CD38^-$ etwa vierfach erhöht sei gegenüber der Subpopulation $CD34^+/CD38^+$ [41]. Dennoch ist davon auszugehen, dass bestimmte $CD34^-$ -Zellen existieren, die zur Langzeit-Koloniebildung fähig sind und eventuell eine Gruppe noch primitiverer HSCs kennzeichnen [42]. Über den Ausschluss reiferer Zellen über linien-determinierende Marker (Lin^-) kann die Population nochmals aufgereinigt werden. Weitere Epitope zur Positivauswahl sind CD90 (Thy-1), CD123 (IL3R α), CD 10 und CD45RA. Durch die Kombination dieser Antigene kann eine große Anzahl von HSCs und Progenitorzellen identifiziert werden [43-50].

Folgende Tabelle gibt einen Überblick gebräuchlicher Marker-Kombinationen zur Identifizierung der unterschiedlichen Stamm- und Progenitorzellen:

Zell-Population	Marker Kombination
HSC gesamt	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻
Langzeit-HSC (LT-HSC)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD90 ⁺
Kurzzeit-HSC (ST-HSC)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD90 ⁻
Common lymphoid progenitors (CLP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD10 ⁺ CD45RA ⁺
Myeloid progenitors, gesamt	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺
Common myeloid progenitors (CMP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD123 ⁺ CD45RA ⁻
Granulocyte-monocyte progenitors (GMP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD123 ⁺ CD45RA ⁺
Megakaryocyte-erythrocyte progenitors (MEP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD123 ⁻ CD45RA ⁻

Tab. 1.3: Stamm- und Progenitorzell-Marker

Gebräuchliche Marker-Kombinationen zur Identifizierung von Stamm- und Progenitorzellen [39].

Das Potential, intrazelluläre Farbstoffe wie Hoechst 33342 aktiv ausströmen zu lassen, charakterisiert eine weitere Fähigkeit von Stammzellen [51]. Diese Funktion verdanken sie der außerordentlich hohen, selektiven Expression an ABC/G2- und ABC/B1-Transportproteinen [52, 53]. Sie sind Produkte des BCRP1-Gens (breast cancer resistance protein), beziehungsweise des MDR1-Gens (multi drug resistance), die für P-Glykoproteine kodieren. Verantwortlich für die Pumpfunktion sind Regionen, die als ATP-binding cassette (ABC) bezeichnet werden. Es wird angenommen, dass sie eine wichtige Rolle in der Resistenz primitiver HSCs und Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika spielen [54]. Infolge des Farbstoffefflux zeigen sich diese Zellen im typischen Dot-Plot am Rande der Hauptpopulation, was zu dem Namen „Side-Population“ (SP) geführt hat. Verapamil und Reserpin blockieren den Transport-Kanal und können deshalb als Negativkontrolle herangezogen werden. Allerdings enthalten menschliche SP-Zellen sowohl CD34⁺, als auch CD34⁻-Zellen, wobei nur die Gruppe der CD34⁺-Zellen zur Koloniebildung fähig zu sein scheint [55]. Um eine möglichst reine Population humaner Stamm- und Progenitorzellen

identifizieren zu können, ist es ratsam, die verschiedenen Verfahren zu kombinieren. Da gezeigt werden konnte, dass SP-Zellen auch mutmaßliche Krebs- und Leukämie-Stammzellen enthalten, ist die Hoechst-Färbung eine wichtige Option um diese anzureichern [56, 57].

Eine erhöhte Enzymaktivität der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) in Stamm- und Progenitorzellen, aber auch in mutmaßlichen Krebs-Stammzellen, stellt eine dritte Möglichkeit dar, Stammzellen zu identifizieren. Gesteigerte Aktivität dieses Enzyms verleiht den entsprechenden Zellen vermehrte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid [58, 59]. Das käufliche Kit mit dem Namen Aldefluor[®] (Aldagen) enthält einen fluoreszierenden Farbstoff, welcher Substrat der ALDH ist. In seiner primitiven Form diffundiert der Farbstoff ins Zellinnere. Nach der Umsetzung durch das Enzym verbleibt das Reaktionsprodukt dank seiner hohen Ladung längere Zeit in der Zelle und akkumuliert [60, 61]. Im entsprechenden Dot-Plot werden darum Zellen mit hoher Enzymaktivität mit hohen Fluoreszenzwerten dargestellt (ALDH^{bright}). Typischerweise erreichen diese Zellen niedrige Werte im SSC (SSC^{low}). In Transplantations-Experimenten mit immundefizienten NOD-SCID Mäusen, waren menschliche Lin⁻-Zellen mit hoher ALDH-Aktivität besonders geeignet, um eine Repopulation zu erzielen [62]. Wie bei der Hoechst-Färbung ist es sinnvoll, die ALDH-Methode mit anderen Verfahren wie der Linage-Depletion zu verbinden, um eine vernünftige Anreicherung von Stamm- und Progenitorzellen zu erreichen. Die simultane Aldefluor[®]-Färbung mit Hoechst 33342 und anderen Oberflächen-Markern scheint die Stammzell-Population weiter aufzureinigen [63].

1.4 Leukämische Stammzellen

Es werden unterschiedliche Modelle der Leukämie-Entstehung diskutiert. Eine bedeutende Rolle spielt dabei die Krebsstammzell (CSC)-Hypothese in der gegenwärtigen Forschung. Das Modell wurde ursprünglich in malignen hämatologischen Erkrankungen postuliert und anschließend auf eine Vielzahl solider Tumore übertragen [64]. Experimente mit myeloischen Blasten haben ergeben, dass nur einige Zellen unter der Masse zur Koloniebildung fähig sind [65]. Diese

Beobachtung hat die Vermutung nahe gelegt, dass es unter der Blastenpopulation einzelne Zellen mit Stammzeleigenschaften geben müsse, so genannte leukämische Stammzellen (LSC) [66].

Die CSC-Hypothese geht von Tumorstammzellen aus, die an der Spitze einer hierarchisch organisierten Zellpopulation stehen, die vergleichbar der normalen Gewebeorganisation ist (s. Abb. 1.4 A) [67]. Ihre herausragende Eigenschaft als Stammzelle, inklusive Selbsterneuerung, Hervorbringen von Tochterzellen, Quieszenz, sowie Resistenz gegenüber Standard-Chemotherapie und ionisierender Strahlung rückt die Tumorstammzelle in den Mittelpunkt möglicher neuer Therapieansätze [64, 68]. Reifere leukämische Blasten, deren Differenzierungsgrad traditionell zur Beschreibung und Einteilung der Leukämie führt, wären demnach nicht mehr zur Teilung fähig. Besonders für die AML ist dieses Modell im Gegensatz zur ALL recht gut etabliert [69]. Lapidot et al. konnte bei der AML zeigen, dass nur Zellen der Population $CD34^+/CD38^-$ zur Bildung großer Kolonien fähig sind [70].

Neuere Ansätze gehen jedoch davon aus, dass bestimmte reife leukämische Zellen unter Selektionsdruck Stammzeleigenschaften durch Aktivierung spezieller Gene zurückerlangen können, um die Krankheit aufrecht zu erhalten [27, 67]. Da diese Zellen in einem zuvor gesunden Organismus eine Leukämie auszulösen vermögen, werden sie auch Leukämie-induzierende Zellen (LIZ) genannt. Dabei handelt es sich aber nicht um einen spezifischen Phänotyp, sondern eher um einen Zustand, in dem sich die Zellen befinden.

Eine andere Theorie ist das klonale Expansions-Modell (s. Abb. 1.4 B). Bei dieser Hypothese besitzen sowohl differenzierte Blasten als auch LSCs die Fähigkeit zur Proliferation. Obwohl nachgewiesen werden konnte, dass Zellen mit speziellen Oberflächen-Merkmalen ($CD34^+/CD38^-$ oder $CD34^+/CD19^-$) ein deutlich höheres Potential zur Tumorentstehung in transplantierten NOD-SCID Mäusen besaßen, könnte diese Beobachtung auch wegen der Spezies überschreitenden Implantation überschätzt werden. Bei Versuchen mit Maus-eigenen Leukämien und Lymphomen schienen die meisten Tumore bei Transplantation in syngene Tiere von der dominanten Zellpopulation aufrecht-

erhalten zu werden [71]. Dies wurde von Vormoor et al. auch für die menschliche ALL des Kindesalters nachgewiesen, indem Blasten verschiedener Reifungsstufen, Leukämien in NOD-SCID Mäusen erzeugen konnten [72, 73].

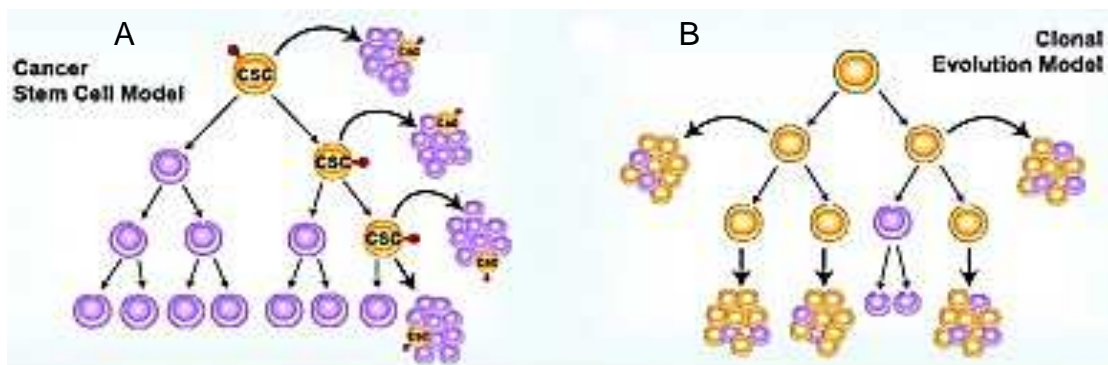


Abb. 1.4: Cancer Stem Cell vs. Clonal Evolution Modell

Während beim CSC-Modell (A) die Population von Stamm- und Progenitorzellen erzeugt wird, sind beim klonalen Expansions-Modell (B) die meisten Zellen zur Teilung befähigt. Quelle: Adams, JM. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res*, 2008 [71].

Welche dieser Theorien die Entstehung von Leukämien am besten beschreibt, ist weiterhin unklar. Wahrscheinlich befinden sich die meisten Leukämien zwischen den beiden Extremen. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass leukämische Zellen mit Stammzeleigenschaften eine wichtige Rolle in der Erkrankung und der Entstehung von Rezidiven spielen. Deshalb könnte deren Charakterisierung und Identifizierung für die Verbesserung der Therapie von großer Bedeutung sein [27, 68].

Leider ist die genaue Identifikation der LSC noch schwieriger als die der HSC. Die Expression bestimmter Oberflächen-Marker folgt bedingt durch den aberranten Immunphänotyp leukämischer Zellen nicht dem physiologischen, konstanten Schema. Funktionelle Nachweismethoden mit Farbstoffen wie Hoechst 33342 und Aldefluor[®] sind erstrebenswert, um die Unzuverlässigkeit der Oberflächenmarker zu umgehen. Die entscheidende Frage bleibt jedoch bei diesen Methoden ebenso offen: Handelt es sich um intrinsische Eigenschaften, die von bestimmten Leukämiesubgruppen unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen exprimiert werden oder weisen diese funktionellen Methoden LSCs nach? Mehrere Publikationen wurden in diesem Zusammenhang bereits veröffentlicht die bei bestimmten Erkrankungen eine Beziehung zwischen LSC und erhöhter ALDH-Aktivität bzw. Hoechst-SP nachweisen konnten [57, 61, 74].

1.5 Studienziel

In dieser Studie sollten Analysen an primären Zell-Proben von Patienten mit kindlicher ALL-Erkrankung durchgeführt werden. Nach der Vorarbeit in unserer Arbeitsgruppe von Ahlers [40], der hauptsächlich kryokonservierte Erst-diagnose-Proben untersucht hatte, galt unser Interesse zunächst dem Nachweis der Reliabilität der Methode bei Durchführung der Versuche durch einen anderen Experimentator und der Verwendung frischer Patientenproben.

Erneut sollten verschiedene Verfahren zur Identifizierung von Zellen mit Stammzeleigenschaften untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen werden. Hierfür nutzten wir Aldefluor[®] zum Nachweis der ALDH-Aktivität und eine Kombination mit Oberflächenmarkern, wobei insbesondere die Populationen CD34⁺, CD34⁺/CD38⁻ und CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} analysiert werden sollten.

In einem weiteren Schritt sollte analysiert werden, ob bei der ALL im Kindesalter eine Korrelation zwischen der Frequenz der Zellen mit Stammzeleigenschaften und dem klinischen Verlauf festgestellt werden kann, bzw. ob sich die von Ahlers ermittelten Ergebnisse verstärken.

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Fragestellung, ob sich mit unserer Methode eine Zellpopulation mit Stammzeleigenschaften identifizieren lässt, mit deren Höhe sich im Verlauf der Therapie Rückschlüsse auf die individuelle Prognose des Patienten ziehen lassen. Um dem Problem der spärlichen Zellzahlen während der Induktionsphase der Chemotherapie zu begegnen, versuchten wir, die Proben stets frisch weiter zu verarbeiten. Dieses Vorgehen erforderte deutlich geringere Zellzahlen als es bei der Verarbeitung kryokonservierter Proben der Fall gewesen wäre, war aber aufgrund der unvorhergesehenen Knochenmark-Punktionsterminen mit erheblich mehr Zeitaufwand verbunden.

2 Patientenproben und Material

2.1 Patientenproben

2.1.1 Allgemeines

Die im Rahmen dieser Studie untersuchten Patientenproben wurden unselektioniert in die Studie aufgenommen. Es handelt sich um Knochenmark von Kindern, die an einer akuten Leukämie erkrankt sind. Dieses wurde im Rahmen der Routine-Diagnostik entnommen. Neben Neuerkrankungen und Rezidiv-Verdacht wird Knochenmark auch als geplante Folgeprobe gemäß den Therapieprotokollen der ALL-BFM-Gruppe für die Bestimmung des Therapieansprechens entnommen.

Sofern eine Einwilligung zur Verwendung der Patientenproben zu Forschungszwecken vorlag und genug Material nach der Routinediagnostik und sonstigen priorisierten Untersuchungen vorhanden war, konnten die Studienuntersuchungen durchgeführt und die Patienten in die Studie aufgenommen werden. Größtenteils war es möglich, das Knochenmark am selben Tag direkt weiter zu verarbeiten. In einigen Fällen, besonders zur Komplettierung fehlender Proben bei Erstdiagnose, erfolgte die Einbeziehung von 9 kryokonservierten Proben.

Das frische Knochenmark wurde zunächst mittels der Ficoll-Dichtezentrifugation (siehe 3.2.1) verarbeitet. Damit erreicht man eine Abtrennung der mononukleären Zellen (MNCs) von den übrigen Bestandteilen des Blutes und des Knochenmarks. Anschließend wurden die MNCs in Pufferlösung für die Experimente bereitgestellt.

Neben der überwiegenden Analyse von Knochenmark untersuchten wir zu Vergleichszwecken vereinzelt auch peripheres Blut. In einem Fall untersuchten wir eine Lymphknoten-Zellsuspension eines Patienten mit Verdacht auf ein Rezidiv einer T-ALL oder eines Lymphoms. Die peripheren Blutproben wurden analog des Vorgehens für Knochenmark ebenfalls mittels Ficoll-

Dichte-zentrifugation verarbeitet. Dies führt zur Separierung der peripheren mononukleären Zellen (pMNCs). Diese wurden anschließend wieder in Pufferlösung für die Versuche bereitgestellt. Die Lymphknoten-Zellsuspension wurde direkt in Puffer bereitgestellt.

Die kryokonservierten Proben waren nach Ficoll-Auftrennung in Medium eingefroren worden (siehe 3.2.2). Lag nur eine kurze Zeitspanne zwischen Kryokonservierung und Weiterverarbeitung, genügte die Aufbewahrung bei -80°C , ansonsten erfolgte die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -180°C .

2.1.2 Auswahl der Patienten

Es konnten nicht alle untersuchten Proben in die Statistik aufgenommen werden. Insgesamt wurden 72 Proben von 36 unterschiedlichen Patienten analysiert. Für die vorliegende Arbeit waren folgende Proben von Interesse: Zum einen verwendeten wir 17 Proben von ALL-Erstdiagnosen und akuten Rezidiven zur Erweiterung der Studie über die Korrelation von leukämischen Progenitorzellen zur Prognose der Krankheit [40] (vgl. 4.1). Zum anderen konnten 21 Proben von 9 verschiedenen Patienten untersucht werden, bei denen uns eine Probe der Erstdiagnose mit Folgeproben vorlag (vgl. 4.2). Weiter untersuchten wir eine Lymphknotensuspension mit zeitgleicher KM-Probe (vgl. 4.3.1), eine periphere Blutprobe zum Vergleich mit Knochenmark einer Patientin mit Erstdiagnose einer c-ALL (vgl. 4.3.2) und 2 Kontrollproben von Patienten mit rheumatischer Erkrankung (vgl. 4.4).

Insgesamt nahmen wir somit 36 der 72 gemessenen Patientenproben in die Analyse auf. Bei den 36 übrigen Proben handelt es sich um 13 ALL-Patientenproben, die nur in der MRD-Phase ohne Erstdiagnose gemessen werden konnten. Weitere 10 MRD-Patientenproben mussten entfallen, weil der Abstand der Proben mehr als 40 Tage nach Diagnosestellung betrug (vgl. 4.2). Bei 9 ALL-Rezidiven konnte keine eindeutige Zuordnung zu akutem Rezidiv oder Folgeprobe getroffen werden, insbesondere betraf dies die therapierefraktären Fälle und deren Folgeproben. Zudem gab es 4 Patientenproben von anderen Diagnosegruppen, darunter 1 AML-Erstdiagnose, 2 AML-Patientenproben, die

nur in der späteren MRD-Phase gemessen werden konnten und 1 KM-Probe eines Patienten mit B-Lymphom am Tag 54 nach Diagnosestellung.

2.1.3 Kontrollproben

Zur internen Kontrolle wurden 2 KM-Proben von nicht leukämieerkrankten Patienten untersucht (vgl. 4.4). Es handelt sich hierbei um eine 7 Jahre alte Patientin mit Morbus Down (AVSD) bei Verdacht auf rheumatisches Fieber und einen 30 Jahre alten Patienten mit Arthritis. Sie wurden vor Therapiebeginn zum Ausschluss einer Leukämie punktiert. Eine Punktion gesunder Probanden zu Forschungszwecken wäre ethisch nicht vertretbar gewesen.

2.1.4 Zusammensetzung der Patientenproben

2.1.4.1 Erstdiagnosen und akute Rezidive

Die 17 ALL-Erstdiagnosen und akuten Rezidive setzten sich aus folgenden Diagnosegruppen zusammen:

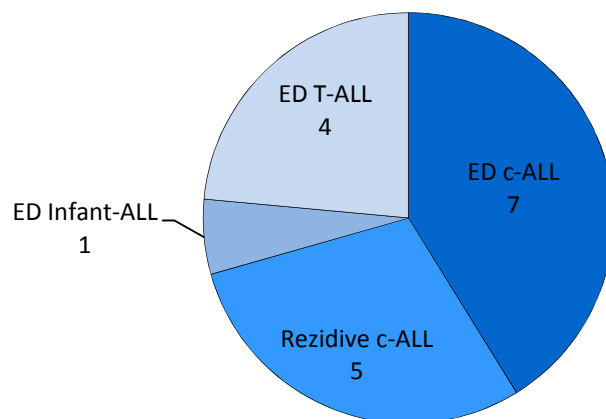


Abb. 2.1: Verteilung der Erstdiagnosen und akuten Rezidive

Das Kreisdiagramm stellt die Zusammensetzung der ausgewerteten Erstdiagnosen (ED) und akuten Rezidive dar (n=17).

In der nachstehenden Tabelle sind die Patientencharakteristika der einzelnen Proben aufgeführt. Das Ersterkrankungsalter ist nicht bei allen Patienten mit akutem Rezidiv bekannt, da die Patienten teilweise zuvor in einem externen Krankenhaus behandelt worden sind.

Nr.	Interne Fallnummer	Diagnose	Geschlecht	Alter bei Diagnose (Jahre)	ED der Rezidivpatienten (Jahre)
1	9	c-ALL	m	16 5/12	-
2	28	c-ALL	m	17 6/12	-
3	64	c-ALL	w	3 7/12	-
4	65	c-ALL	w	11 1/12	-
5	68	c-ALL	w	11 11/12	-
6	70	c-ALL	m	3 10/12	-
7	71	c-ALL	w	4 11/12	-
8	22	c-ALL Rez.	m	6 1/12	unbekannt
9	44	c-ALL Rez.	m	26	unbekannt
10	67	c-ALL Rez.	m	14 6/12	7 7/12
11	69	c-ALL Rez.	m	11 5/12	10 4/12
12	73	c-ALL Rez.	m	10	5 1/12
13	17	Infant-ALL	m	0	-
14	4	T-ALL	m	3 8/12	-
15	40	T-ALL	m	13 4/12	-
16	62	T-ALL	w	11 4/12	-
17	72	T-ALL	w	9	-

Tab. 2.1: Charakterisierung der Erstdiagnosen und akuten Rezidive
Interne Fallnummer, Diagnose, Geschlecht, Erkrankungsalter und Ersterkrankungsalter der Patienten mit c-ALL Rezidiv, soweit bekannt.

Das Geschlechterverhältnis lag bei 11 männlichen zu 6 weiblichen Patienten. Die Altersspanne lag zwischen 0 und 26 Jahren mit einem Mittelwert von 10 3/12 Jahren.

2.1.4.2 Erstdiagnosen mit Folgeproben

Die Charakteristika der 9 Erstdiagnosen mit Folgeproben sind ebenfalls nachstehend aufgelistet. Bei den Rezidivpatienten mussten wir teilweise andere Proben als akutes Rezidiv deklarieren. Patient Nr. 5 wurde bei der Auswahl der Erstdiagnosen zunächst nicht berücksichtigt. Er erlitt bei rezidivierender Erkrankung nach morphologischer Remission ein erneutes Rezidiv und konnte somit in die Studie der Folgeproben aufgenommen werden. Bei Patient Nr. 6 handelt es sich um ein erneutes akutes Rezidiv des Patienten Nr. 11 in Tabelle 2.1. Für die Analyse der Folgeproben verwendeten wir das erneute Rezidiv als ED, da hierfür die Abstände der Folgeproben innerhalb der 40 Tage lagen.

Nr.	Int. Fallnr.	Diagnose	Geschlecht	Alter bei Diagnose (Jahre)	ED der Rezidivpatienten (Jahre)	Anzahl Folgeproben
1	9	c-ALL	m	16 5/12	-	1
2	28	c-ALL	m	17 6/12	-	2
3	68	c-ALL	w	11 11/12	-	1
4	70	c-ALL	m	3 10/12	-	1
5	26	c-ALL Rez.	m	8 5/12	unbekannt	1
6	27	c-ALL Rez.	m	11 5/12	10 4/12	2
7	67	c-ALL Rez.	m	14 6/12	7 7/12	1
8	4	T-ALL	m	3 8/12	-	2
9	72	T-ALL	w	9	-	1

Tab. 2.2: Charakterisierung der Erstdiagnosen mit Folgeproben

Interne Fallnummer, Diagnose, Geschlecht, Erkrankungsalter und Ersterkrankungsalter der Patienten mit c-ALL Rezidiv, soweit bekannt. Anzahl der analysierten Folgeproben.

Das Geschlechterverhältnis lag bei 7 männlichen und 2 weiblichen Patienten. Die Altersspanne lag zwischen 3 8/12 und 17 6/12 Jahren mit einem Mittelwert von 10 9/12 Jahren.

Die nachstehende Darstellung zeigt die Zusammensetzung der Folgeproben. Auf der horizontalen Ebene sind die verschiedenen Patienten in fortlaufender Nummerierung aufgetragen. Die Höhenachse gibt den MRD-Tag im Bezug zum Diagnosezeitpunkt wieder und die Tiefenachse beschreibt numerisch die aufeinanderfolgenden MRD-Proben.

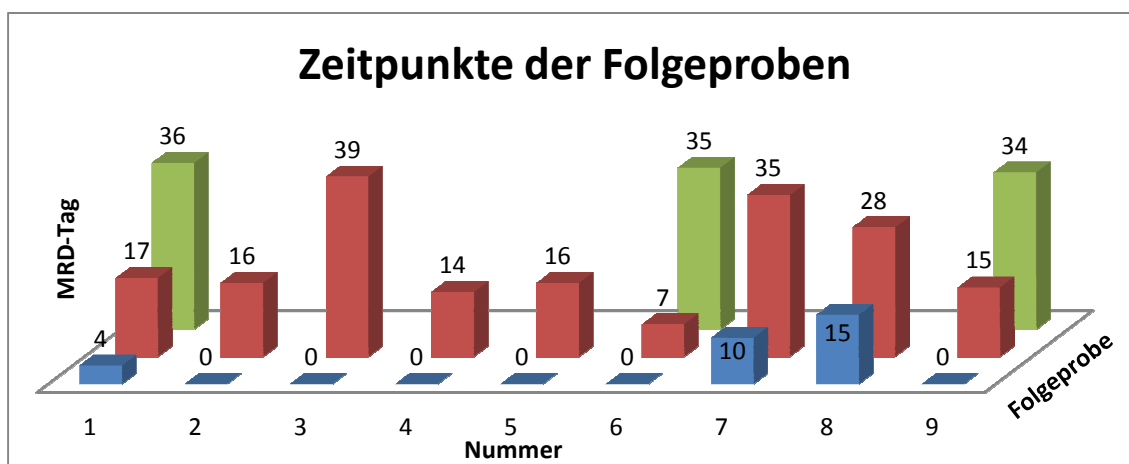


Abb. 2.2: Zeitpunkte der Folgeproben

Hintereinander dargestellt sind die Zeitpunkte der jeweiligen Folgeproben bezogen auf den Tag der letzten Erstdiagnose bzw. Rezidivdiagnose (MRD-Tag). Die Nummer steht für den jeweiligen Patienten. Die gewertete Erstdiagnose ist blau markiert. Die Folgeproben sind hintereinander rot (1. Folgeprobe) bzw. blau (2. Folgeprobe) dargestellt. Die Höhe der Säulen visualisiert die Tage nach ED.

2.2 Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien

Aufgrund der großen methodischen Ähnlichkeit der Forschungsprojekte innerhalb unserer Arbeitsgruppe, wurden Teile aus den entsprechenden Abschnitten der Dissertationen meiner Vorgänger Jörg Ahlers und Timo Sugg in den folgenden Abschnitten 2.2 bis 2.6 mit einbezogen [24, 40].

In unserem Labor wurden die nachstehenden Geräte und Verbrauchsmaterialien verwendet:

Material	Hersteller
Sterile Werkbank Hera safe Typ HS12	Heraeus
Beheizbares Wasserbad Typ WB7	Memmert
Zentrifuge Rotixa RP	Hettich
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich
Zentrifuge Micro 22R	Hettich
Blutanalysegerät Cellcounter Advia 120	Bayer
Durchflusszytometer FACSAria	BD Biosciences
Kühlschrank profi-line (+4 °C)	Liebherr
Gefrierschrank (- 25 °C)	Bosch
Gefrierschrank -86°C Freezer (- 80 °C)	Forma Scientific
Vortexer Reox Top	Heidolph
Schüttler MTS 2	Janke & Kunkel
Feinwaage Typ AC210S-001	Sartorius
Waage 500 g Typ 1002MP9	Sartorius
Pipettiergerät Pipetboy Plus	Integra Biosciences
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
Spritzen, steril 5/10/20 ml	Braun
Kanülen Sterican 20/22 G	Braun
Zellsiebe Falcon Cell Strainer 40 µm Nylon	Becton Dickinson
Butterfly 19/20 G	Venisystems
Vakuum-Filtersystem Vacuum Driven Disposable Filtration System	Millipore

Tab. 2.3: Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.3 Verwendete Chemikalien

Nachfolgend genannte Chemikalien wurden für unsere Experimente und Messungen benötigt:

Produkt	Hersteller
FCS (fetales Kälber-Serum) inaktiviert (30 min bei 56 °C)	Biochrom AG
BSA (Bovines Serum Albumin)	SIGMA
Natriumazid 10% Lösung in H ₂ O	SIGMA

Biocoll Separating Solution, Ficoll Density 1,077 g/ml	Biochrom AG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogen
VLE RPMI 1640	Biochrom AG
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (DPBS) 1x/10x	Lonza
FACSFlow FACSClean FACSRinse	Becton Dickinson

Tab. 2.4: Verwendete Chemikalien

2.4 Verwendete Stammlösungen

Zur Durchführung der Experimente waren verschiedene Stammlösungen in Gebrauch. Als Lösungen verschiedener Stoffe in unterschiedlicher Verdünnung mussten sie in regelmäßigen Abständen neu angesetzt werden. Die folgende Tabelle gibt die Namen der Stammlösungen und deren Inhaltsstoffe wieder. Genauer zu deren Zusammensetzung findet sich im Methodenteil (siehe 3.1):

Stammlösung	Inhaltsstoffe
Auftaulösung	RPMI 10 % FCS
Einfriermedium	RPMI 1640 FCS DMSO
PBSA	10x DPBS H ₂ O dest. BSA Natriumazid

Tab. 2.5: Stammlösungen und Inhaltsstoffe

2.5 Stammzellreagenzien, Antikörper, Lebend-/Tot-Marker

2.5.1 Stammzellreagenzien

Reagenz	Hersteller
Aldefluor [®] (AF)	Aldagen Inc., Durham, NC, USA
DEAB (Diethylaminobenzaldehyd)	Aldagen
Aldefluor [®] -Puffer	Aldagen

Tab. 2.6: Stammzellreagenzien

2.5.2 Fluorochrom-konjugierte Antikörper

Folgende fluorochrom-konjugierten Antikörper wurden bei der Analyse der Patientenproben, sowie für die Kompensationsmessungen verwendet:

Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3 – APC	SK7	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD3 – FITC	UCHT1	Mouse IgG1	Dako
CD3 – PE	UCHT1	Mouse IgG1	Dako
CD3 – PerCP	SK7	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD34 – APC	8G12	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD38 – PE	HB-7	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD45 – Pacific Blue	MEM-28	Mouse IgG1	Exbio
	HI30	Mouse IgG1	Caltag
CD45 – AF700	MEM-28	Mouse IgG1	Exbio

Tab. 2.7: Fluorochrom-konjugierte Antikörper

2.5.3 Lebend/Tot-Marker

Um zwischen lebenden und toten Zellen zu differenzieren verwendeten wir folgenden Farbstoff:

Reagenz	Hersteller
Propidiumiodid (1:200 mit Aq. dest. verdünnt)	Fluka

Tab. 2.8: Lebend/Tot-Marker

2.5.4 Beads

Als Beads bezeichnet man Mikropartikel aus Kunststoff, an die Fluorochrome gekoppelt sind. Wir setzten sie zur gelegentlichen Kalibrierung unserer Durchflussszytometer ein:

Reagenz	Hersteller
BD Cytometer Setup & Tracking Beads™ (CST-Beads) 08401 / 28574	Becton Dickinson

Tab. 2.9: Cytometer-Beads zur Gerätekalibrierung

2.6 EDV-Software

Programm	Hersteller
FACS Diva Software Version 6.1.2	Becton Dickinson
FCS Express V3 Research Edition	De Novo Software
FCS Express 4 Plus Research Edition	De Novo Software
MedCalc® v12.2.1	MedCalc Software bvba

Tab. 2.10: EDV-Software

3 Methoden

3.1 Herstellung der Stammlösungen

Die in diesem Kapitel beschriebenen Methoden sind teilweise von Vorgängern in unserer Arbeitsgruppe übernommen und nur leicht abgeändert [24, 40].

3.1.1 Einfriermedium

Zur Herstellung des Einfriermediums mischten wir 2 Teile RPMI Medium ohne Additive mit 2 Teilen FCS unter sterilen Bedingungen. Daraufhin gaben wir 1 Teil DMSO zu. Nach gründlicher Durchmischung füllten wir das fertige Einfriermedium steril in 50 ml Falcon-Röhrchen um und lagerten es bei +4 °C im Kühlschrank.

3.1.2 Auftaulösung

Ebenfalls unter sterilen Bedingungen mischten wir 500 ml RPMI Medium nach Zugabe von 10% FCS (v/v). Analog zum Einfriermedium aliquotierten wir die Auftaulösung in 50ml Falcon-Röhrchen und lagerten sie bei +4 °C im Kühlschrank.

3.1.3 PBSA

Aufgrund seiner häufigen Verwendung als Puffer- und Waschlösung in unserem Labor stellten wir PBSA in engen Abständen und großen Mengen regelmäßig her. Um 2 Liter dieser Lösung zu erhalten, lösten wir 4 g BSA (bovines Serum-Albumin) mit 40 ml 10%ige Natriumazid-Lösung in 0,4 l destilliertem Wasser. Diesen Schritt führten wir bei Raumtemperatur mithilfe eines Magnetrührers durch. Nach ca. 3 Stunden waren die Stoffe nach Zugabe von 200 ml 10x-PBS unter Rühren vollständig gelöst. Unter leichtem Schütteln gaben wir diese Lösung im nächsten Schritt in eine 2 Liter fassende Vorratsflasche, die zuvor mit 1,4 l destilliertem Wasser befüllt worden war. PBSA lagerten wir lichtgeschützt bei Raumtemperatur und nahmen nach Bedarf Aliquots in 50 ml-Falcon-Tubes ab [24]. Um die Zellen nach der Aldefluor[®]-Färbung möglichst

gekühlt zu halten, kühlten wir kleinere Portionen davon zur Zellwäsche und Resuspension bei +4 °C im Kühlschrank.

3.2 Vorbereitung der Patientenproben

3.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Im ersten Schritt der Verarbeitung einer Knochenmarkprobe erfolgte die Isolierung der für die Experimente benötigten mononukleären Zellen (MNC). Dafür verwendeten wir ein Zentrifugationsverfahren welches die Zellen aufgrund eines Dichtegradienten separiert. In unserem Labor hatten wir folgende Methode unter Verwendung einer käuflichen Ficoll-Lösung in Anlehnung an ein Protokoll von Boyum et al. [75] etabliert:

1. *Bestimmung des Probenvolumens (KM) mit einer sterilen Glaspipette.*
2. *Überführung des Probenmaterials in ein 50 ml-Falcon-Tube und Verdünnen mit PBS bis zu einem Verhältnis von 2:1, bei älterem Knochenmark auch bis 3:1, bei peripherem Blut im Verhältnis 1:1. Dabei Auswaschen des ursprünglichen Probenröhrchens mit PBS, um alle Zellen überführen zu können.*
3. *Verdünnte Lösung durch einen 40 µm Filter in ein neues 50 ml-Falcon-Tube filtrieren um evtl. Verklumpungen oder Gerinnsel herauszufiltern.*
4. *Je nach Menge an Material zwei oder mehr 15 ml Falcons mit je 4 ml Ficoll-Lösung befüllen und vorsichtiges Aufsichten des Probenmaterials um grobe Vermengungen zu vermeiden. Probenmaterial gleichmäßig auf die Ficoll-Röhrchen verteilen.*
5. *Zentrifugation für 30 Minuten (min) bei 400 G und Raumtemperatur (RT).*
6. *Pro Falcon-Tube ein neues Falcon-Tube vorbereiten und dieses nach der Zentrifugation mit der durch eine Transferpipette abgenommenen Schicht mononukleärer Zellen über der Ficoll-Schicht befüllen.*
7. *Auffüllen der Falcon-Röhrchen mit PBSA bis 14 ml.*
8. *Zentrifugation für 5 min bei 450 G und RT.*
9. *Überstand von jedem Röhrchen abkippen und die Röhrchen auf 1 ml auffüllen, anschließend alle Zellsuspensionen in einem Falcon-Röhrchen zusammenführen (pooling).*
10. *Auffüllen auf 7,5 ml mit PBSA, resuspendieren mit Transferpipette und Bestimmung der Zellzahl am Advia-Blutanalyse-Gerät mittels eines*

250 µl-Aliquots.

- 11. Berechnung der Zellzahl und Zentrifugation des Falcons für 5 min bei 450 G, RT.*
- 12. Röhrchen abkippen und Zugabe von 3,5 ml PBSA, anschließend resuspendieren.*
- 13. Überführen in ein 5 ml-FACS-Röhrchen und erneute Zentrifugation für 3 min bei 450 G.*
- 14. Röhrchen abkippen und Konzentrationseinstellung durch Zugabe einer entsprechenden Menge von PBSA: 1×10^6 Zellen pro 50 µl für MRD- und Aldefluor[®]-Messungen.*

Wenn verfügbar, wurden bis zu 3 Mio Zellen pro Patient für die Färbung mit Aldefluor[®] weiterverarbeitet. Dafür wurden die Zellen in ein separates 5 ml FACS-Röhrchen transferiert und bis zu einem Volumen von 200 µl mit AldefluorPuffer[®] aufgefüllt.

Für alle folgenden Arbeitsschritte der Aldefluor[®]-Färbung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

3.2.2 Kryokonservierte Proben

Die für unsere Experimente verwendeten kryokonservierten MNCs wurden von Mitarbeitern der Routinediagnostik oder von unserem Labor eingefroren. Es handelt sich dabei um MNCs aus Knochenmark, welche sofern genug vorhanden, im Gefrierschrank (- 80 °C) oder in flüssigem Stickstoff konserviert wurden. Sie konnten somit für spätere Experimente genutzt werden.

3.2.2.1 Einfrieren

Die Zellen wurden in Vials zu je 1 - 1,8 ml Einfriermedium eingefroren und enthielten zwischen 10^6 und 20×10^6 Zellen/ml. Das Einfrieren fand nach folgendem Protokoll statt:

- 1. Zugabe von 3 ml RPMI zu den einzufrierenden Zellen im FACS-Tube.*
- 2. Zentrifugation für 3 Minuten bei 450 G und Raumtemperatur (RT).*
- 3. Dekantieren und Resuspension .*
- 4. Zweimalige Wiederholung der Schritte 1 - 3.*
- 5. Beschriften der Kryoröhrchen.*

6. Gewaschene Zellsuspension mit Einfriermedium auf gewünschte Konzentration verdünnen und in Kryoröhrchen überführen.
7. Kryoröhrchen invertieren und in Styroporständler stellen.
8. Mit Tüchern umwickeln und in den -80 °C -Gefrierschrank stellen um eine langsame Temperatursenkung zu erreichen.

Bei längerfristiger Lagerung wurden die Proben zu einem späteren Zeitpunkt vom -80 °C -Gefrierschrank in flüssigen Stickstoff umgelagert.

3.2.2.2 Auftauen

Um die Zellen aufzutauen musste beachtet werden, dass das Einfriermedium bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkt und andererseits osmotische Prozesse bei zu schneller Verdünnung zum Lysieren der Zellen führen können [76]. Wir hatten als Kompromiss für die Auftaugeschwindigkeit folgendes Protokoll in unserem Labor etabliert:

1. ml Auftaumedium (AM) in 15 ml Falcon vorlegen.
2. Kryoröhrchen im Wasserbad antauen, bis Eisklumpen schwimmt.
3. Ca. 2 ml AM in 5 ml-Pipette: Auftropfen, die Hälfte aufnehmen, wieder Auftropfen, 2 – 3-mal wiederholen.
4. Erste Hälfte des Kryoröhrchens so in 15 ml Falcon überführen.
5. Wiederholen von Schritt 3 für die zweite Hälfte.
6. Kryoröhrchen nachspülen und Falcon auf 15 ml auffüllen.
7. Zentrifugation für 5 Minuten bei 450 G und Raumtemperatur.
8. Überstand absaugen, mit 1 ml-Pipette in 1 ml AM gründlich resuspendieren.
9. In FACS-Tube überführen und 3ml AM zugeben.
10. Zentrifugation für 3 Minuten bei 450 G und Raumtemperatur.
11. Abkippen, Resuspendieren und Auffüllen auf 4,25 ml mit AM.
12. Bestimmung der Zellzahl am Advia-Blutanalyse-Gerät mittels eines 250 μl -Aliquots.
13. Zentrifugation für 3 Minuten bei 450 G und Raumtemperatur.
14. Abkippen, Resuspendieren.
15. Gewünschte Zellzahl ($1 - 3 \times 10^6$) für Aldefluor[®]-Färbung in separates FACS-Tube überführen und auf 200 μl mit Aldefluor-Puffer einstellen.

3.3 Aldefluor[®] – Färbung

3.3.1 Allgemeines

Wie in der Einleitung beschrieben handelt es sich bei Aldefluor[®] um ein Reagenz, welches das Enzym Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) nachweist (siehe 1.3.2). Mittlererweile sind mehrere Isoformen dieser Enzyme bekannt wobei das von uns verwendete Aldefluor[®]-Reagenz auf die Isoform ALDH1 optimiert wurde. Hohe Aktivität dieses Enzyms schützt hämatologische Stamm- und Progenitorzellen vor toxischen Effekten von Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid.

Bei dem aktivierten Aldefluor[®]-Reagenz handelt es sich um ein Substrat des Enzyms ALDH. Es diffundiert als BODIPY[®]-Aminoacetaldehyd (BAAA) in lebende Zellen und wird durch das Enzym ALDH in BODIPY[®]-Acetacetat (BAA) umgewandelt. Dieses bleibt in der Zelle erhalten, wobei die Menge des fluoreszierenden Reaktionsprodukts abhängig von der ALDH-Aktivität ist. Durch einen Inhibitor im Aldefluor-Puffer wird das Ausströmen des Reaktionsprodukts aus der Zelle verhindert. Die Fluoreszenz kann mit dem Zytometer gemessen werden. Dabei stellen sich Zellen mit sehr starker ALDH-Aktivität mit höheren Werten dar. Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) wird als spezifischer Inhibitor der ALDH zur Kontrolle der Hintergrundfluoreszenz bei den Kontrollproben verwendet [77].

3.3.2 Aktivierung

Das Aldefluor[®]-Reagenz ist als komplettes Kit von Aldagen erhältlich. Es wird in einer trockenen, inaktiven Form geliefert und muss zur Verwendung aktiviert werden. Wir folgten dabei den Angaben des Herstellers. Nach Aktivierung wurde das fertige Reagenz in kleinen Portionen zu je 5 µl im Gefrierschrank (-80 °C) eingefroren. Für die Untersuchungen überführten wir kleinere Mengen in den -20 °C-Gefrierschrank und Entnahmen diese jeweils unmittelbar vor den Versuchen.

1. *Vor Beginn alle Kit-Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmen.*
2. *25 µl DMSO dem trockenen Aldefluor[®] zugeben. Gut mischen und 1 min ruhen lassen.*
3. *25 µl 2N HCl zufügen und gut mischen.*
4. *15 Minuten bei RT inkubieren.*
5. *360 µl Aldefluor[®]-Puffer zugeben und mischen.*

Das aktivierte Reagenz sollte von nun an während des Gebrauchs auf 2 – 8 °C gekühlt werden.

3.3.3 Färbung mit Aldefluor[®]

Die Aldefluor[®]-Färbung der nach 3.2 vorbereiteten MNCs erfolgte ebenfalls weitgehend nach den Angaben des Herstellers. Die pro Versuchsansatz 1-3.6 Mio Zellen befanden sich in 200 µl Lösung im FACS-Röhrchen, deren Lösung aus PBSA oder AM mit mindestens 50 µl Aldefluor-Puffer bestand. Zu Beginn wurden pro Versuch 4 FACS-Röhrchen beschriftet. Das Röhrchen mit dem Gesamtansatz (200 µl) wurde für die Färbung mit Aldefluor[®] allein (AF) beschriftet. Ein weiteres für die Kontrolle der Aldefluor[®]-Färbung mit DEAB (AF + DEAB) und für jeden dieser Ansätze ein FACS-Röhrchen für die Antikörper-Färbung (AF + Ak, AF + Ak + DEAB). Außerdem wurde frühzeitig das Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

1. *Vorlage von 0,5 µl DEAB für die Aldefluor[®]-Kontrolle (AF + DEAB).*
2. *Zugabe von 1 µl Aldefluor[®] zum Gesamtansatz (AF) und mischen.*
3. *Unmittelbar 50 µl vom Gesamtansatz (AF) zur Aldefluor[®]-Kontrolle (AF + DEAB) mit dem vorgelegten DEAB geben und mischen. Diese Schritte ohne Verzögerung durchführen, da zum einen das sehr geringe Volumen von 0,5 µl DEAB sich sehr schnell verflüchtigt, zum anderen die Reaktion mit dem Aldefluor[®] sofort nach dessen Zugabe mit hoher Geschwindigkeit beginnt.*
4. *Inkubation im 37 °C warmen Wasserbad für 40 min unter sanftem Mischen alle 10 min.*
5. *Die Reaktion durch Lagerung der Röhrchen in Eiswasser (4 °C) zum Stoppen bringen.*

Alle weiteren Schritte der Probenverarbeitung erfolgten nun bei möglichst 4 °C in gekühltem Zustand. Zur Minimierung der Hintergrundfluoreszenz erfolgte vor der FACS-Analyse die Zugabe von 3 ml kaltem (4 °C) PBSA zur Waschung und anschließende Zentrifugation bei 4 °C (300 G, 4 min, An-/Auslaufzeit: 7/0 sec). Nach Abkippen des Überstands wurde die Probe ggf. in 100 µl PBSA resuspendiert und zeitnah analysiert.

Die Antikörper-Färbung erfolgte direkt nach Schritt 5 ohne Unterbrechung. Für den Ansatz AF + Ak wurden 125 µl des Ansatzes AF verwendet, für den Ansatz AF + Ak + DEAB verwendeten wir 25 µl des Kontrollansatzes AF + DEAB.

3.3.4 FACS-Analyse

Im möglichst direkten Anschluss an die Färbung wurden die Zellen mit dem FACS-Aria Durchflusszytometer gemessen.

- Abs-Max: 496 nm / Em-Max: 512 nm
- Verwendeter Laser: 488 nm (blau)
- Verwendete Filterkombination: 502 nm Longpass (LP) + 530/30 nm Bandpass (BP)

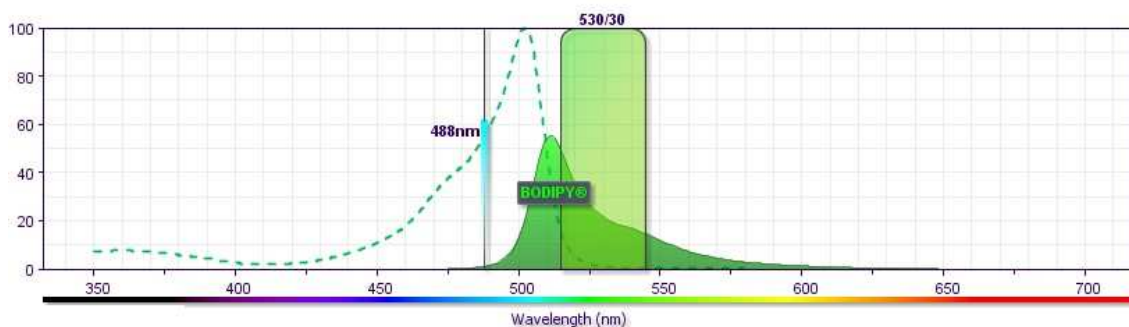


Abb. 3.1: Spektrum von Aldefluor®

Absorptions-(gestrichelt)/ und Emissionsspektrum (flächig) von Aldefluor®. Der Farbstoff wird von der Laserquelle bei 488 nm angeregt und kann mit dem Bandpass-Filter 530/30 nm detektiert werden. (Quelle: BD Biosciences [78])

3.4 Färbung der Zellen mit Oberflächen-Antikörpern

Zur weiteren Differenzierung der mit Aldefluor[®] gefärbten Zellen führten wir im Anschluss an die Färbung mit Aldefluor[®] (siehe 3.3.3) eine Färbung bestimmter Oberflächen-Antigene durch. Alle bekannten Oberflächen-Antigene sind im CD-System (Cluster of Differentiation) katalogisiert und entsprechend nummeriert. Ein Antikörper, der sich gegen ein bestimmtes Antigen richtet, wird mit der gleichen Nummer bezeichnet, gegen welches er sich richtet. Für unsere Experimente nutzten wir die Antikörper CD34, CD38 und CD45.

3.4.1 Allgemeines

Bei Fluoreszenz handelt es sich um die Eigenschaft verschiedener Moleküle, Licht eines definierten Wellenlängenbereichs zu absorbieren und kurz darauf Licht mit größerer Wellenlänge zu emittieren.

Physikalisch erklärt, absorbieren bestimmte Elektronen dieser Moleküle die Photonen und gelangen dadurch auf ein höheres Energieniveau. Da sie dieses höhere Energieniveau nicht halten können, fallen sie sofort wieder zurück und setzen die aufgenommene Energie frei. Die freigesetzte Energie wird neben einem Photon auch in Wärme abgegeben. Deshalb ist die Energie der abgegebenen Lichtstrahlung energieärmer und somit langwelliger.

Die Differenz der Wellenlängen zwischen Absorptionsmaximum und Emissionsmaximum nennt man Stokes-Differenz, die Eigenschaft, dass kurzwelliges Licht absorbiert und längerwelliges Licht emittiert wird, nennt sich Stokes-Regel [79].

Die Charakteristika der verwendeten Farbstoffe sollen nachfolgend näher beschrieben werden. Kennzahlen für die Fluoreszenzeigenschaft stellen das Absorptions-Maximum (Abs-Max) und das Emissions-Maximum (Em-Max) dar.

3.4.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Die Auswahl der Fluorochrome basierte auf Vorversuchen innerhalb der Arbeitsgruppe [40]. Die verwendete Auswahl zeigte sich als günstigste

Kombination, um bei guter Auftrennung von positiven zu negativen Zellen die Überlappung der Absorptions-Spektren gering zu halten (siehe 3.6.3.2).

3.4.2.1 APC

Allophycocyanin (APC) stammt aus einer blaugrünen Algenart mit einem Molekulargewicht von 105 kDa. In der Natur spielt der Farbstoff eine Rolle bei der Photosynthese, in der Zytometrie ist das besonders hell leuchtende APC zur Markierung schwacher Antigene beliebt.

- Abs-Max: 650 nm / Em-Max: 660 nm
- Verwendeter Laser: 633 nm (rot)
- Verwendete Filterkombination: 735 nm LP + 660/20 nm BP

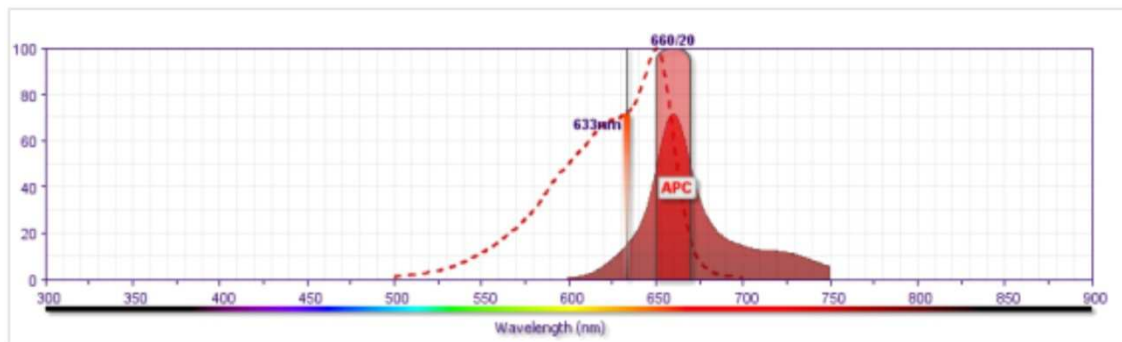


Abb. 3.2: Spektrum von APC

Absorptions-(gestrichelt)/ und Emissionsspektrum (flächig) von APC. Der Farbstoff wird von der Laserquelle bei 633 nm angeregt und kann mit dem Bandpass-Filter 660/20 nm detektiert werden. (Quelle: BD Biosciences [78])

3.4.2.2 PE

Phycoerythrin (PE) stammt aus einer roten Alge und fungiert ebenfalls akzessorisch in der Photosynthese. Das in der Zytometrie verwendete Molekül besitzt ein Molekulargewicht von 240 kDa und ist durch seine hohe Konzentration an fluoreszierenden Bestandteilen der hellste Farbstoff in der Zytometrie.

- Abs-Max: 496 nm und 565 nm / Em-Max: 578 nm
- Verwendeter Laser: 488 nm (blau)
- Verwendete Filterkombination: 556 nm LP + 575/26 nm BP

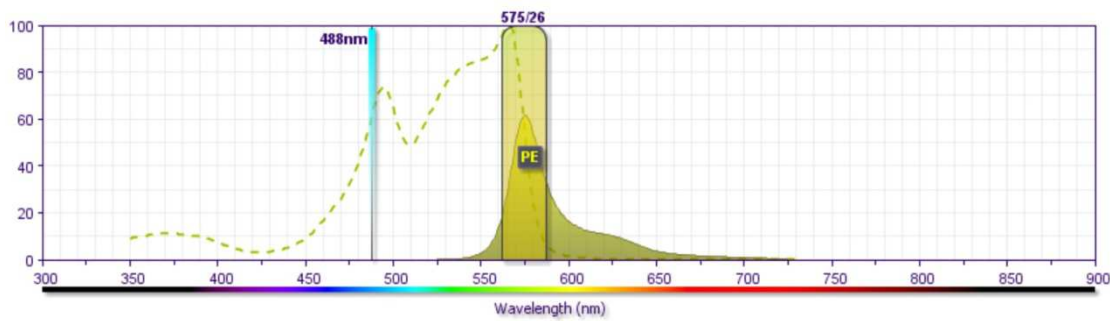


Abb. 3.3: Spektrum von PE

Absorptions-(gestrichelt)/ und Emissionsspektrum (flächig) von PE. Der Farbstoff wird von der Laserquelle bei 488 nm angeregt und kann mit dem Bandpass-Filter 575/26 nm detektiert werden. (Quelle: BD Biosciences [78])

3.4.2.3 PB

Pacific Blue™ (PB) ist ein synthetischer Farbstoff und besitzt ebenfalls gute Fluoreszenz-Eigenschaften. Er besteht aus einem 6,8-Difluoro-7-hydroxycoumarin. Der Hauptvorteil ist sein Absorptionsmaximum im violetten Bereich.

- Abs-Max: 401 nm / Em-Max: 452 nm
- Verwendeter Laser: 407 nm (violett)
- Verwendete Filterkombination: 502 nm LP + 450/40 nm BP

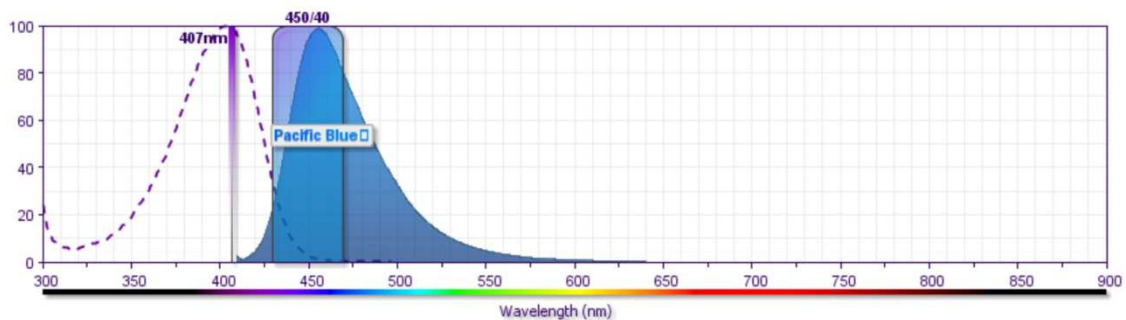


Abb. 3.4: Spektrum von PB

Absorptions-(gestrichelt)/ und Emissionsspektrum (flächig) von PB: Der Farbstoff wird von der Laserquelle bei 407 nm angeregt und kann mit dem Bandpass-Filter 450/40 nm detektiert werden. (Quelle: BD Biosciences [78])

3.4.2.4 Aldefluor®

Siehe 3.3 Aldefluor® – Färbung

3.4.2.5 PI

Siehe 3.5 Lebend/Tot-Differenzierung

3.4.3 Antikörper

Wir wählten die Antikörper mit dem Ziel, unreife hämatopoetische und leukämische Progenitorzellen zu identifizieren, die möglicherweise mit LSC angereichert sind. Wie in der Einleitung beschrieben (siehe 1.3.2), ist die Kombination von CD34 und CD38 eine gebräuchliche Methode dafür. CD45 kann zur Diskriminierung von Blasten dienen, weil es von leukämischen Zellen signifikant geringer exprimiert wird als von normalen Leukozyten. Die Blasten stellen sich als CD45-negativ oder schwach positiv ($CD45^{dim/neg}$) dar gegenüber den stark positiven normalen Leukozyten [80].

Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
CD34 - APC	8G12	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD38 - PE	HB-7	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD45 - Pacific Blue	MEM-28	Mouse IgG1	Exbio
	HI30	Mouse IgG1	Caltag

Tab. 3.1: Verwendete Antikörper bei den Versuchen

CD34:

CD34 ist ein gebräuchlicher Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen und Endothelien und wird deshalb häufig als hämatopoetisches Vorläuferzell-Antigen bezeichnet. Klinisch wird CD34 eingesetzt, um lymphohämatologische Progenitorzellen für Transplantationszwecke zu identifizieren. Das Protein spielt vermutlich eine Rolle in der Adhäsion der hämatopoetischen Stammzellen mit der extrazellulären Matrix des Knochenmarks. Gleichfalls soll die zytokinvermittelte Differenzierung und Proliferation durch CD34 herunter reguliert werden. Seine Rolle als Marker von frühen Stamm- und Progenitorzellen steht dennoch in Frage und ist Gegenstand gegenwärtiger Forschung [81, 82].

CD38:

CD38 stellt als Oberflächenmarker einen Teil eines Enzyms mit vielen Funktionen dar und wird auch als ADP-Ribosylcyclase-1 bezeichnet. Neben vielfältigen anderen Funktionen im NAD- [83] und Calciumstoffwechsel [84], wird das Protein als Aktivierungsmarker auf den meisten hämatologischen Zellen angesehen [81]. Eine Population mit $CD34^+/38^-$ soll besonders viele Stammzellen enthalten (siehe 1.3.2).

CD45:

CD45 wird gerne als Leukozyten Common Antigen (LCA) bezeichnet, weil es auf den meisten kernhaltigen hämatologischen Zellen in starkem Ausmaß exprimiert wird. Dabei handelt es sich um ein großes Transmembranprotein, welches intrinsische Tyrosin-Phosphatase-Aktivität besitzt. Neben seiner Regulatoraktivität in der T- und B-Zell-Aktivierung, kann ein gestörtes Gleichgewicht seiner Funktion in Immunschwäche oder das Entstehen maligner Erkrankungen führen [81, 85]. Wie vorangestellt beschrieben, exprimieren die meisten leukämischen Blasten eine geringere Anzahl des LCA als gesunde Leukozyten.

3.4.4 Färbung mit Antikörpern

Für die Antikörperfärbung im Anschluss an die Aldefluor[®]-Färbung bei 4°C waren insgesamt längere Inkubationszeiten als bei Raumtemperatur nötig. Wir etablierten dafür 30 min Inkubationszeit. Die Menge der benötigten Antikörper ist jeweils abhängig vom Gesamtvolumen der zu färbenden Zellen und von den fluoreszierenden Eigenschaften der Farbstoffe. Über Vorversuche ermittelten wir die optimale Menge. Wir setzten folgende Konzentrationen für unsere Versuche ein:

- CD34 - APC: 2 µl /100 µl
- CD38 - PE: 5 µl /100 µl
- CD45 - PB: 5 µl /100 µl

Für jeweils 4 Versuche stellten wir einen Mastermix (MM) dieser Antikörper her, wovon wir 12 µl /100 µl Ansatz einsetzten:

1. *Vorbereiten der FACS-Röhrchen und Lagerung auf Eiswasser:*
2. *AF + Ak: Vorlage von 15 µl MM für 125 µl Ansatz*
3. *AF + Ak + DEAB: Vorlage von 3 µl MM für 25 µl Ansatz*
4. *Pipettieren von 125 µl des Ansatzes aus dem FACS-Röhrchen AF in den Ansatz AF + Ak*
5. *Pipettieren von 25 µl des Ansatzes aus dem FACS-Röhrchen AF + DEAB in den Ansatz AF + Ak + DEAB*
6. *Inkubation für 30 min lichtgeschützt bei 4 °C auf Eiswasser*
7. *Zellwäsche durch Zugabe von 3 ml kaltem PBSA (4°C), mit Parafilm invertieren und direkte Zentrifugation bei 4°C (300 G, 4 min, An-/Auslaufzeit: 7/0 sec).*

Nach Abkippen des Überstands wurde die Probe ggf. in 100 µl PBSA resuspendiert und zeitnah analysiert.

3.5 Lebend/Tot-Differenzierung

Tote Zellen können die Ergebnisse verfälschen indem sie unspezifisch an Antikörper binden oder Fluoreszenzfarbstoffe aufnehmen. Daher war es nötig, sie mithilfe eines geeigneten Gatings von der Auswertung auszuschließen. Zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen nutzten wir in unseren Experimenten Propidiumiodid (PI), ein fluoreszierender Nukleinsäure-interkalator. Das Molekül bindet intrazellulär an DNA und RNA, wodurch seine fluoreszierende Eigenschaft um das 20-30 fache verstärkt und sein Emissionsmaximum um ca. 15 nm in den kürzeren blauen Wellenlängenbereich verschoben wird. Lebende Zellen besitzen Zellmembranen, die für PI nicht passierbar sind. Sie reichern folglich PI intrazellulär nicht an. Bei toten Zellen, deren Membranen nicht mehr intakt sind, kommt es zu den beschriebenen Effekten. Sie zeigen in der FACS-Analyse hohe Fluoreszenzwerte und können durch ein entsprechendes Gate von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden. Problematisch ist das breitgipflige Emissionsspektrum, wodurch mit PI gefärbte Zellen relativ stark in andere Kanäle einstrahlen. (siehe 3.6.3.2).

Die Zugabe von PI erfolgt als letzter Arbeitsschritt der Färbung direkt (ca. 1 - 5 min) vor der Messung am Durchflusszytometer. Pro 100 µl Ansatz werden ca. 0,5 µl der 200 fach mit Aqua dest. verdünnten PI Lösung zugefügt.

- Abs-Max: 535 nm / Em-Max: 617 nm
- Verwendeter Laser: 488 nm (blau)
- Verwendete Filterkombination: 655 nm LP + 695/40 nm BP

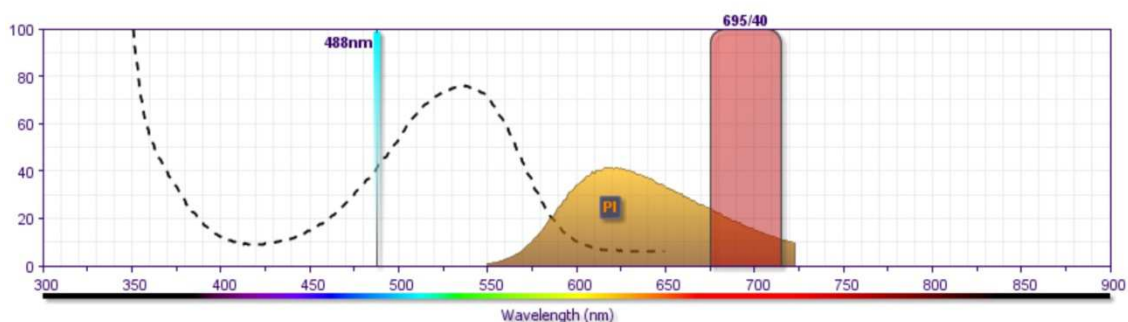


Abb. 3.5: Spektrum von PI

Absorptions-(gestrichelt)/ und Emissionsspektrum (flächig) von PI. Der Farbstoff wird von der Laserquelle bei 488 nm angeregt und kann mit dem Bandpass-Filter 695/40 nm detektiert werden. (Quelle: BD Biosciences [78])

3.6 Messtechnik

3.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein wichtiges Werkzeug in der klinischen Forschung und Diagnostik. Die neueren Geräte können in kurzer Zeit eine hohe Anzahl von Zellen, einzeln auf die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Vielzahl von Eigenschaften untersuchen. Mithilfe der Fluoreszenz von an Zellen gebundener Farbstoffe und der Lichtstreuung können Rückschlüsse auf die Morphologie der jeweiligen Zellen gezogen werden. Kernbestandteil ist eine Art Fluoreszenzmikroskop, welches Lichtsignale von den durchfließenden Zellen sammelt und ausgibt. Um die Zellen einzeln aufzureihen, werden die in Suspension befindlichen Partikel über eine Kapillare angesaugt und anschließend von einer Hüllflüssigkeit, dem *FACSFlow™*, umgeben. Es entsteht eine fokussierte laminare Strömung deren Flussrate durch Druckunterschiede zwischen den beiden Flüssigkeitsströmen gesteuert werden kann. Durch eine kleine Düse entsteht ein schmaler Flüssigkeitsstrahl an der Luft, welcher sequentiell von einem oder mehreren Laserstrahlen senkrecht geschnitten wird. Die Laserstrahlen sind derart fokussiert, dass sie eine einzelne Zelle zu einem Zeitpunkt beleuchten. Für nähere Informationen und Skizzen zum Aufbau des Zytometers sei an dieser Stelle auf das „FACSAria User's Guide“ von BD verwiesen [86].

Die durch Beugung und Streuung des Laserstrahls entstandenen Lichtsignale werden über ein System von Linsen und optischen Filtern von Photomultipliern (PMT) detektiert und weiter elektronisch verarbeitet. Enthalten die durchströmenden Zellen oder Teilchen Fluoreszenzfarbstoffe, die durch die Laserstrahlen angeregt werden können, entstehen messbare Impulse in Form von Photonen. Sie werden mit einer spezifischen Wellenlänge emittiert. Die Intensität der Emission ist bei konstanter Laserleistung abhängig von der Anzahl der Fluorophore und gibt dadurch qualitative sowie quantitative Hinweise auf die jeweilige Zelle. Werden mehrere Laser mit verschiedenen Wellenlängenbereichen in Reihe verwendet, steigt dadurch die Anzahl an möglichen Farbstoffen für die Analyse. Bei entsprechender Kalibrierung des

Zytometers können die Daten der verschiedenen Laser auf die einzelne Zelle vereint werden. Die Fluoreszenzsignale sind wegen geringerer Energie stets langwelliger als die Laserquelle. Darüber hinaus wird jedoch immer auch Licht der gleichen Wellenlänge gestreut. Gestreutes Licht in Vorwärtsrichtung wird Forward Scatter (FSC) genannt. Es wird in einem kleinen Winkel bezogen auf den einfallenden Laserstrahl abgelenkt und ist proportional zur Zellgröße. Senkrecht, im 90° Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreutes Licht wird Side Scatter (SSC) genannt. Dieser korreliert zur intrazellulären Granularität. Somit können schon durch die Lichtstreuung allein, wertvolle Informationen über die Beschaffenheit der Zellen herausgefunden werden [87].

3.6.1.1 FACS

Bei den Durchflusszytometern wird weiterhin zwischen einfachen Analysegeräten und Zellsortierern, häufig als FACS (Fluorescence activated cell sorter) bezeichnet, unterschieden. Werden die gemessenen Zellen bei den Analysegeräten verworfen, so haben Sortiergeräte die Fähigkeit, einzelne Zellen aufgrund ihrer Eigenschaften in der Streuung und Fluoreszenz gezielt auszuwählen und in eine Auffangvorrichtung zu lenken. Bei dem von uns verwendeten Gerät (FACS Aria) geschieht dies durch ladungsabhängige Ablenkung der Zelltropfen in einem elektrischen Feld [88].

3.6.1.2 Auswertung

Die gesammelten Daten werden über spezielle Software am Computer ausgegeben. Meist nutzt man Histogramme oder bivariate Darstellungen der gemessenen Parameter. Im Histogramm wird üblicherweise auf der x-Achse die Intensität des gewählten Parameters und auf der y-Achse die Anzahl der gemessenen Partikel der jeweiligen Intensität angezeigt. Bei den bivariaten Darstellungen werden zwei verschiedene Parameter gegeneinander aufgezeigt. Mithilfe farblicher Kodierung (Colour Dot Plots) oder Dichtelinien (Contour Plots), ähnlich geographischer Höhenlinien, werden die Darstellungen der Zellen um eine zusätzliche Dimension erweitert.

Zur weiteren Analyse der Daten können bestimmte Zellpopulationen durch sogenanntes Gating für die Statistik ausgewählt oder davon ausgeschlossen

werden. Es können Hierarchien von Gates gebildet werden, indem nur ausgewählte Zellen in der nachfolgenden Darstellung anderer Parameter angezeigt werden. So ist es mithilfe der Durchflusszytometrie möglich geworden in kurzer Zeit mehrere Millionen Zellen auf bestimmte Eigenschaften und deren Kombination zu untersuchen. Die Ergebnisse können sowohl graphisch als auch statistisch hochwertig dargestellt und ausgewertet werden.

3.6.2 Konfiguration und Ausstattung des Messgerätes

Das von uns verwendete Zytometer FACS Aria besitzt drei Laserquellen:

- Coherent sapphire Solid State: 488 nm (blau)
- JDS Uniphase HeNe Air Cooled: 633 nm (rot)
- Point Source Violet Solid State: 407 nm (violett)

Die von uns genutzte Filterkonfiguration (siehe Abbildung) lässt die Messung von maximal neun verschiedenen Farben zu.

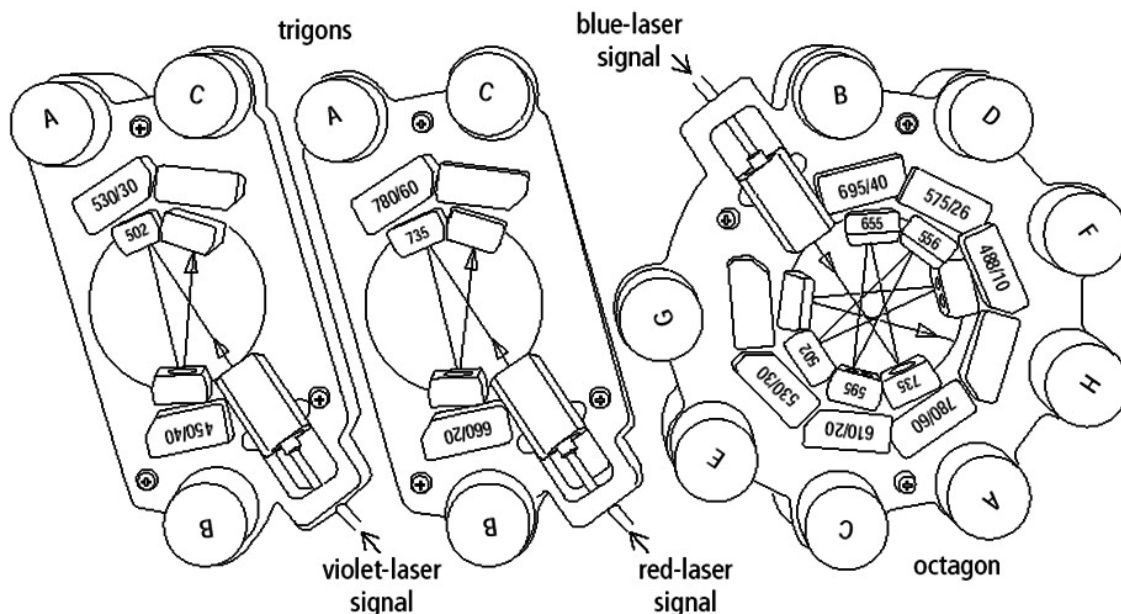


Abb. 3.6: Filterkonfiguration am FACS Aria.

Die Signale vom roten und violetten Laser werden in "Trigonen" gemessen, die Signale des blauen Lasers in einem „Oktagon“. Lichtsignale treffen über die gekennzeichnete Stelle ein und werden vom Filtersystem nach Wellenlänge getrennt an die jeweiligen Photomultiplier (A-H bzw. A-C) weitergegeben. Der Kanal F im Oktagon misst SSC-Signale. (Quelle: BD Bioscience [86])

Lässt sich ein Fluorophor, durch die spezifischen Wellenlängen der Laser anregen, emittiert es Licht in einem für den Fluorophor typischen Wellenlängenbereich. Zur Messung der maximalen Intensität der Farbstoffe muss die Filterkombination gut gewählt werden. Deckt der Filter einen zu schmalen Wellenlängenbereich ab, ist das Signal zu schwach, ist er zu breit, führt Streustrahlung von anderen Farbstoffen zu undeutlichen Ergebnissen.

3.6.3 Kalibrierung und Kompensation des Messgerätes

3.6.3.1 Kalibrierung

Die Kalibrierung am FACS Aria erfolgte in regelmäßigen Abständen automatisiert mithilfe den Anweisungen der FACSDiva-Software mit den dafür vorgesehenen CST-Beads (Cytometer Setup & Tracking-Beads). Das Gerät ermittelt dabei die nötige Anpassung der PMTs aufgrund bestimmter Zielbereiche für die Intensität der Beads.

3.6.3.2 Kompensationsfärbungen

Folgende Abbildung verdeutlicht das Problem in der Durchflusszytometrie, dass die verwendeten Farbstoffe häufig überlappende Emissionsspektren besitzen. Vor allem PI mit seinem breiten Spektrum überlappt zu hohen Anteilen in das Spektrum von PE.

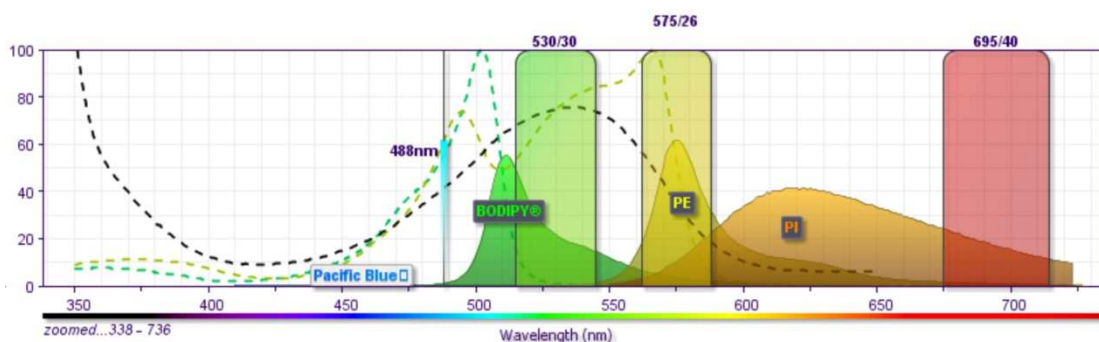


Abb. 3.7: Spektrum der am 488 nm-Laser gemessenen Fluorophore

Darstellung der Emissionsspektren (gestrichelt), Absorptionsspektren (flächig) und Filterkonfiguration (Rechtecke) der Fluorochrome Bodipy (Aldefluor®), PE und PI bei Anregung durch eine 488 nm Laserquelle. Die Darstellung veranschaulicht die Notwendigkeit einer suffizienten Kompensation. (Quelle: BD Biosciences [78])

Mithilfe der Kompensation versucht man, diesem Problem rechnerisch zu begegnen. Einzelfärbungen von jedem Farbstoff werden am Durchflusszytometer gemessen und in jedem Kanal die Werte an den PMTs registriert. Richtigerweise sollten Fluoreszenzsignale nur in dem Kanal registriert werden, in welchem sie gemessen werden wollen. Durch die Überlappung der Spektren werden jedoch auch Signale in anderen Kanälen erzeugt. Diese unspezifischen Signale können in Bezug zum gewollten Signal gesetzt und subtrahiert werden.

Zur Veranschaulichung soll folgendes Beispiel gelten. Bei Färbung der Zellen mit PI entsteht am PMT von PI ein Signal der Intensität 1000. Gleichzeitig entsteht am PMT von PE ein Signal der Intensität 400. Um das fälschlicherweise entstandene Signal zu neutralisieren, muss immer, wenn am PI-Kanal ein Signal gemessen wird, 40% davon im PE-Kanal abgezogen werden. In diesem Beispiel sind 40% von 1000 gleich 400. Im PE-Kanal wurde die Signalstärke 400 gemessen und 400 muss abgezogen werden, sodass die Signalstärke am PE-Kanal nach Kompensation gleich 0 beträgt beim alleinigen Messen von PI.

Für die Einzelmessungen mit jedem Farbstoff nutzten wir neben übrigem Knochenmark teilweise auch periphere MNCs von freiwilligen Spendern. Die Färbungen mit Aldefluor[®] und PI wurden analog zu den beschriebenen Vorgehensweisen durchgeführt. Die Antikörperinkubation erfolgte in PBSA bei RT für 10 min. Dabei verwendeten wir neben den eingesetzten Antikörpern CD45-PB und CD38-PE meist CD3-APC, um viele stark angefärbte Zellen zu erhalten (siehe 2.5.2). Ein weiteres Problem stellt die Autofluoreszenz der Zellen dar. Kontrollmessungen von ungefärbten Zellen sind zur Abgrenzung zwischen positiven und gerade noch negativen Zellen erforderlich.

3.7 Datenauswertung

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte im Anschluss an die Messungen mit dem Programm FCS Express 3.0. Zu Beginn wurden alle Zellen als Density-Plot in einem Zeitfenster gegen CD34-APC dargestellt, um Unregelmäßigkeiten im Messverlauf festzustellen. Indem ein Gate um alle gemessenen Zellen mit konstantem Farbverlauf gelegt wurde, schlossen wir die abweichenden Zellen von der weiteren Auswertung aus. Im nächsten Dot-Plot diente zunächst die Darstellung FSC-W gegen FSC-A zum Aussondern der Dubletten. Sie zeigten sich in dieser Darstellung rechts der Hauptpopulation. Das gleiche Schema konnte für die Darstellung SSC-W gegen SSC-A angewandt werden, ebenfalls zum Ausschluss von Zellhaufen.

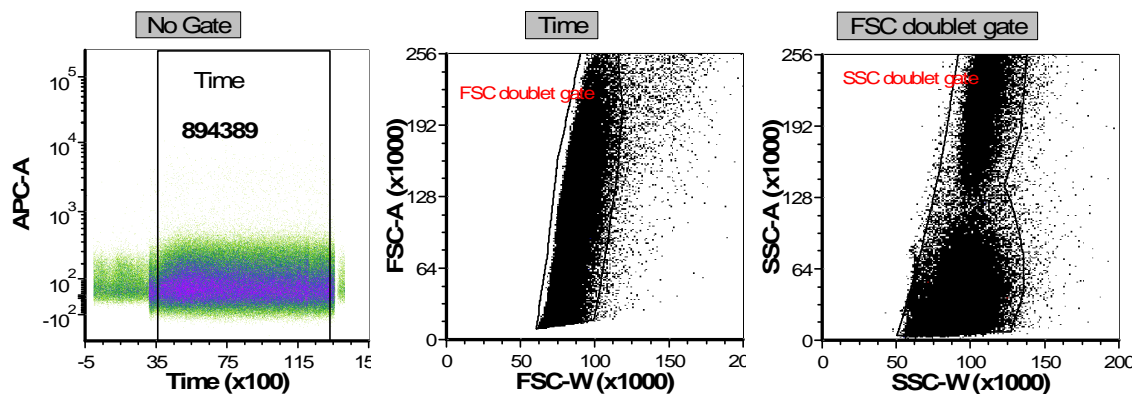


Abb. 3.8: Gating-Strategie im Zeit- und Duplettenfenster

In den Plots werden nur die Zellen angezeigt, welche innerhalb des gesetzten Gates des vorherigen Plots liegen (grau-unterlegte Überschrift). (Patientenprobe 50)

Zur Differenzierung lebender und toter Zellen zeigten wir anschließend die getroffene Vorauswahl in einem Density-Plot (PI vs. SSC-A) an. Tote Zellen zeigten sich in der Darstellung mit hohen Werten für den Fluoreszenz-Farbstoff. Sie befanden sich rechts der Population lebender Zellen, die nur wenig angefärbt waren. Mit einem Gate um die lebenden Zellen wählten wir diese für die Darstellung im nächsten Density-Plot (FSC-A vs. SSC-A) zur Auswahl der lymphozytären Zellen aus. Die lymphozytären Zellen befanden sich, abhängig von der Einstellung des Zytometers, typischerweise relativ ursprungsnah mit niedrigen Werten im SSC-A-Kanal. Meist waren sie durch eine gute Separation von den anderen Zellen (Granulozyten und Erythrozyten) abgrenzbar.

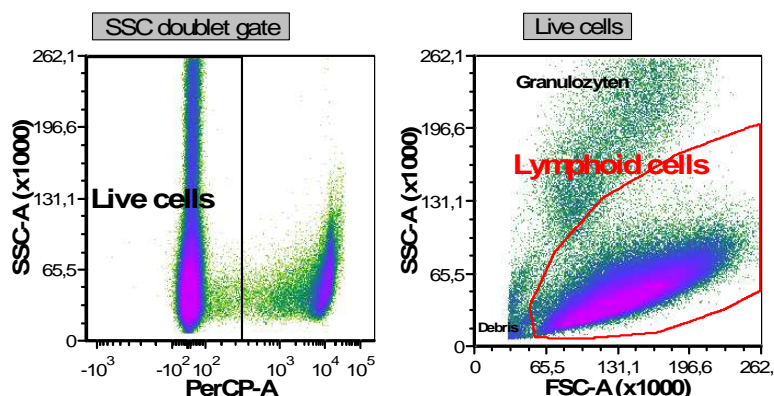


Abb. 3.9: Gating-Strategie zur Auswahl lebender und lymphoider Zellen

In den Plots werden nur die Zellen angezeigt, welche innerhalb des gesetzten Gates des vorherigen Plots liegen (grau-unterlegte Überschrift). Im linken Plot befinden sich die ungefärbten lebenden Zellen links, die toten Zellen rechts. Im rechten Plot sind die lymphoiden Zellen mit dem roten Gate markiert. Zellschrott und Erythrozyten befinden sich ursprungsnah (Debris), Granulozyten sind durch höhere Werte im SideScatter charakterisiert. (Patientenprobe 26)

Ein Gate um die lymphozytären Zellen diene letztlich als Bezugsgate für die ermittelten Werte der Aldefluor®-Färbung, sowie für die mit Antikörpern markierten Zellen. Auf Grundlage der zuvor angelegten Hierarchie der Auswertung wurden in den folgenden Gates nur diejenigen Zellen angezeigt und in der Statistik berücksichtigt, welche nach Vorauswahl in das Kriterium für lymphozytäre Zellen fielen.

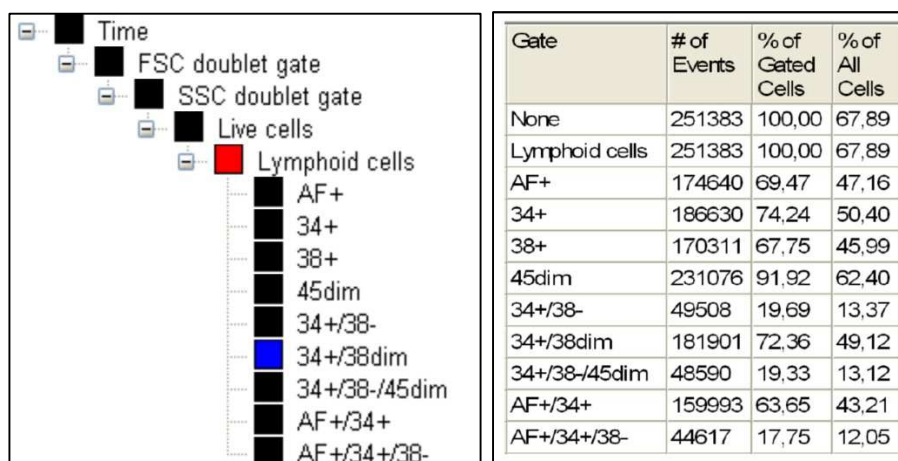


Abb. 3.10: Gating-Hierarchie und statistische Ergebnisdarstellung

Im linken Bild ist die Hierarchie der einzelnen Gates dargestellt. Das rechte Bild zeigt ein Beispiel für die statistische Darstellung der Auswertung in Tabellenform (# = Anzahl, % of Gated Cells bezieht sich auf lymphoide Zellen, % of All Cells bezieht sich auf alle gemessenen Zellen).

In den nächsten Schritten wurden Aldefluor[®]- und Antikörperfärbungen jeweils gegen den SSC-A-Kanal aufgetragen und die positiven Zellen unter Zuhilfenahme der Kontrollfärbungen festgelegt.

Schwierigkeiten bestanden bei der Aldefluor[®]-Färbung darin, dass meist ein kontinuierlicher Übergang der Hauptpopulation zu den besonders stark gefärbten Aldefluor[®]-Zellen (Aldefluor[®]^{bright}) existierte. Zudem verschob sich die gesamte Population in der Kontrollfärbung mit dem ALDH-Hemmstoff DEAB nach links. Daher wurden in unserer Auswertung zunächst drei unterschiedliche Strategien zur Festlegung der Aldefluor[®]^{bright}-Population angewandt:

1. Orientierung des Gates anhand des Kontrollansatzes mit dem Ziel 0,1% Aldefluor[®]^{bright}-Zellen im Gate der Kontrolle zu erreichen:

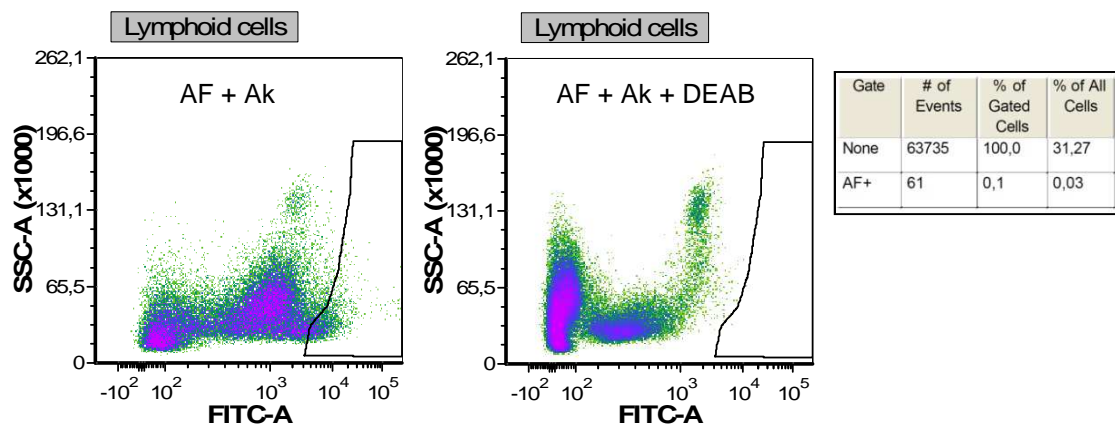


Abb. 3.11: Erste Strategie zur Auswahl der Aldefluor[®]^{bright}-Population

Angezeigt werden Zellen, welche nach Vorauswahl zu den lymphoiden Zellen gehören (grau-unterlegte Überschrift). Der Testansatz (AF+Ak) links, die Aldefluor[®]-Kontrolle (AF+Ak+DEAB) rechts. Die Tabelle zeigt die Anzahl Aldefluor[®]^{bright}-Zellen im Gate des Kontrollansatzes. Das Gate wurde so gelegt, dass dabei im Kontrollansatz annähernd 0,1% (0,09% - 0,11%) Aldefluor[®]^{bright}-Zellen vorlagen. (Patientenprobe 50)

2. Orientierung des Gates anhand besonders hell gefärbter Aldefluor[®]-Zellen im Testansatz (möglichst keine positiven Zellen in der Kontrolle):

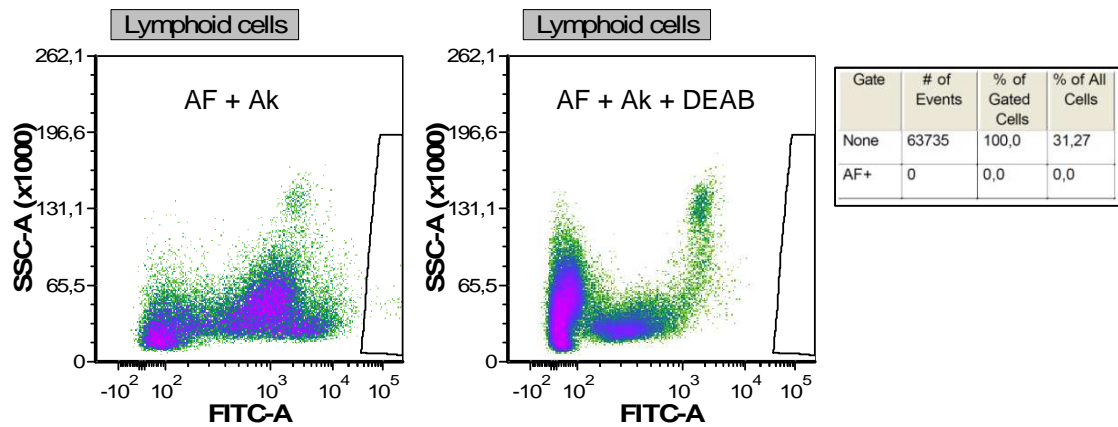


Abb. 3.12: Zweite Strategie zur Auswahl der Aldefluor[®]^{bright}-Population

Angezeigt werden Zellen, welche nach Vorauswahl zu den lymphoiden Zellen gehören (grau-unterlegte Überschrift). Der Testansatz (AF+Ak) links, die Aldefluor[®]-Kontrolle (AF+Ak+DEAB) rechts. Die Tabelle zeigt die Anzahl Aldefluor[®]^{bright}-Zellen im Gate des Kontrollansatzes. Das Gate wurde so gelegt, dass nur besonders stark fluoreszierende Zellen im Testansatz vom Gate erfasst werden. (Patientenprobe 50)

3. Freie Orientierung des Gates nach erkennbarer Aldefluor[®]^{bright}-Population im Testansatz

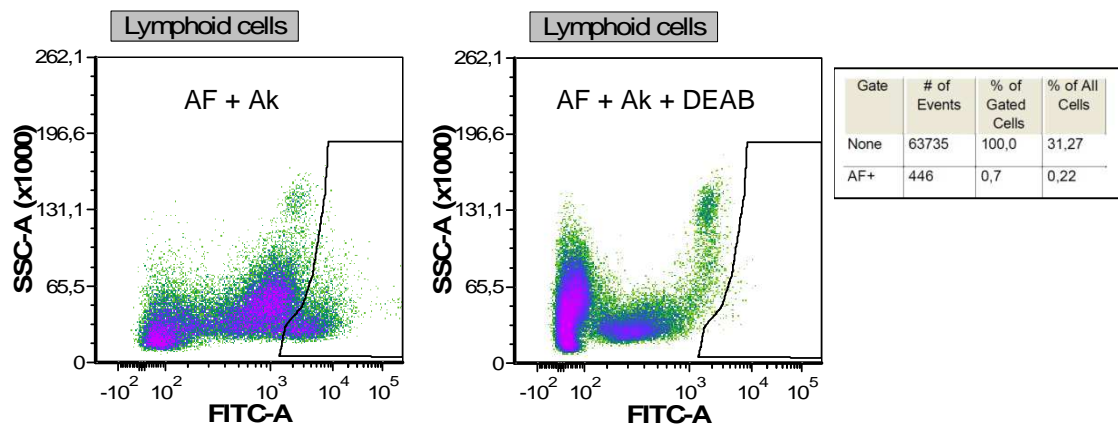


Abb. 3.13: Dritte Strategie zur Auswahl der Aldefluor[®]^{bright}-Population

Angezeigt werden Zellen, welche nach Vorauswahl zu den lymphoiden Zellen gehören (grau-unterlegte Überschrift). Der Testansatz (AF+Ak) links, die Aldefluor[®]-Kontrolle (AF+Ak+DEAB) rechts. Die Tabelle zeigt die Anzahl Aldefluor[®]^{bright}-Zellen im Gate des Kontrollansatzes. Das Gate wurde frei nach erkennbarer Aldefluor[®]^{bright}-Population gelegt. (Patientenprobe 50)

Wir entschieden uns anschließend für die dritte Methode, da sie die eindeutigsten Ergebnisse liefern konnte.

Als Kontrollfärbung für den Aldefluor[®]-Testansatz (AF + Ak) diene hierbei die Aldefluor[®]-Kontrollfärbung mit Antikörpern (AF + Ak + DEAB), um nach dem Schema Fully minus one (FMO) die Effekte der gebundenen Antikörper zu berücksichtigen [76].

Mit dem Ansatz der Aldefluor[®]-Färbung ohne Antikörper (AF) kontrollierten wir die Antikörperfärbungen. Die eingesetzten Fluoreszenz-Farbstoffe APC, PE und PB wurden alle von unterschiedlichen Laserquellen angeregt. Ihre Emissions-Spektren zeigten prinzipiell keine Überlappung. Somit war diese Strategie dem Prinzip nach recht ähnlich zu dem Schema FMO.

Deutliche abgrenzbare Populationen zeigten sich meist bei CD34-APC, welche bei fließendem Übergang durch die Kontroll-Färbung überprüft werden konnten.

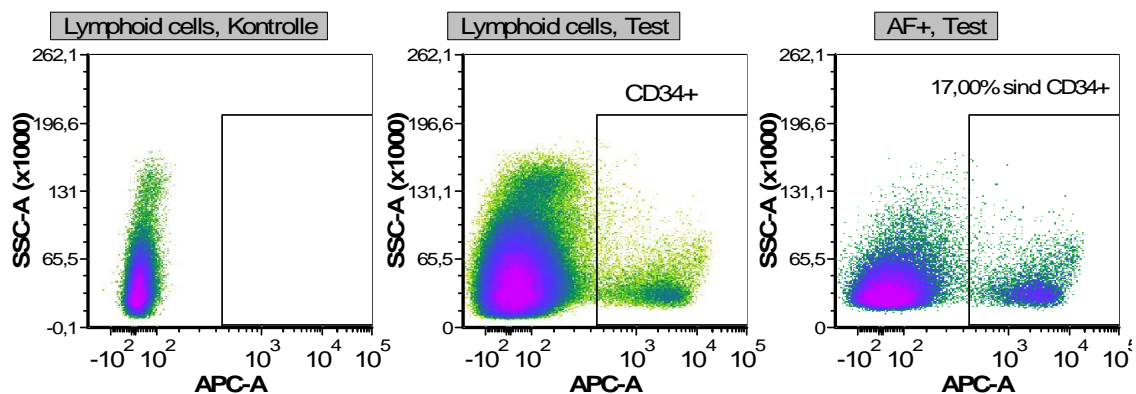


Abb. 3.14: Auswertestrategie für CD34-APC

Links: Kontrollfärbung (AF). Mitte: Testfärbung (AF+Ak). Rechts: Testfärbung (AF+Ak). Im rechten Density-Plot werden nur Aldefluor^{®bright}-Zellen angezeigt. Die Prozentwerte im Plot beziehen sich dabei auf die Gesamtzahl der Aldefluor^{®bright}-Zellen. Im Testansatz ist eine deutliche Population sichtbar. Das Gate wurde um die positiv gefärbte Population gelegt. (Patientenprobe 50)

Um CD38-PE positive Zellen von den negativen zu selektionieren, bedienten wir uns der Kontrollfärbung und setzten die Grenze bei ungefähr 1 % positive Zellen in der Kontrollfärbung. Dadurch pendelte sich der Cut-off-Wert für die Fluoreszenz-Intensität positiver Zellen bei ca. 400 ein. Diesen Wert nutzten wir in schwer auszuwertenden Proben als Erfahrungswert. Probleme im PE-Kanal machte die große Überlappung der Emissionsspektren von PI und Aldefluor[®], weshalb die Zellen in der Kontrollfärbung oft eine weite Streuung aufwiesen.

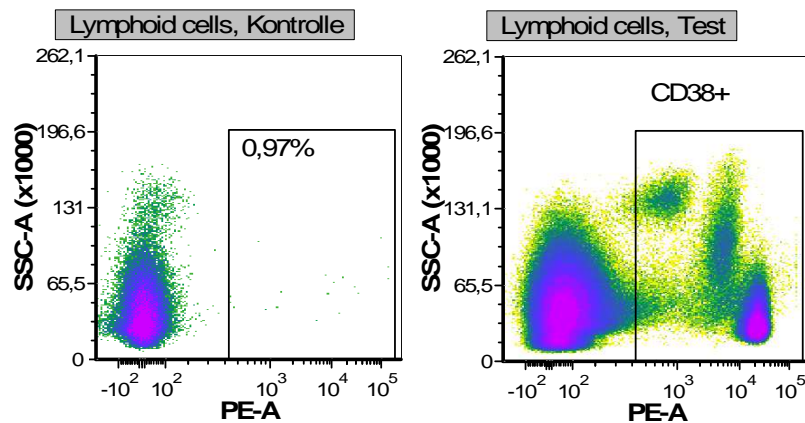


Abb. 3.15: Auswertestrategie für CD38-PE

Links: Kontrollfärbung (AF). Rechts: Testfärbung (AF+Ak). Die Prozentwerte im Plot beziehen sich auf lymphoide Zellen in der Kontrollfärbung. Das Gating schloss schwach und stark gefärbte Populationen mit ein und wurde wie über dem Bild beschrieben durchgeführt. Mit $CD38^-$ bezeichneten wir alle Zellen, die nicht in das Gate $CD38^+$ fielen. (Patientenprobe 50)

Bei CD45-PB sollten die stark angefärbten von den negativen und schwach gefärbten Zellen ($CD45^{dim/neg}$) abgegrenzt werden. Wir setzten das Gate unter Ausschluss der deutlich abgrenzbaren positiven Zellen.

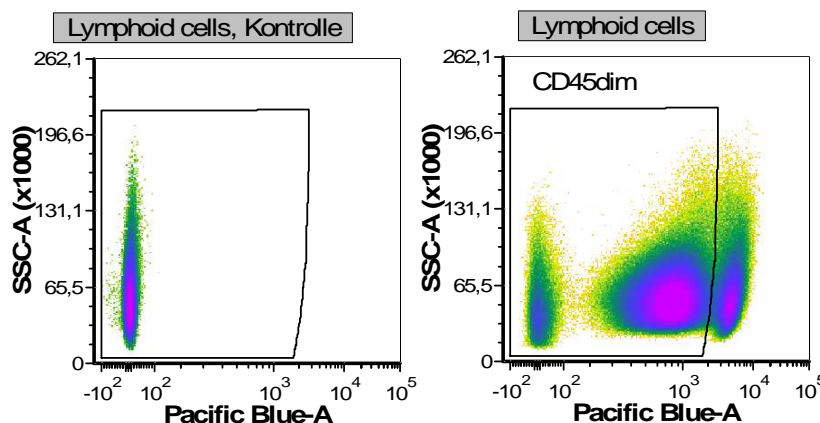


Abb. 3.16: Auswertestrategie für CD45-PB

Links: Kontrollfärbung (AF). Rechts: Testfärbung (AF+Ak). Im Testansatz sind deutliche Populationen sichtbar. Das Gate wurde unter Ausschluss der stark gefärbten Population gelegt. (Patientenprobe 4)

Zur besseren Veranschaulichung potentieller Stammzellen stellten wir in einem weiteren Density-Plot CD34-APC gegen CD38-PE dar und legten ein Quadranten-Gate analog zu den vorherigen Cut-off-Werten. Um eventuelle leukämische Stammzellen in die Auswertung mit einzubeziehen, setzten wir ein

zusätzliches Gate auf die $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ -Zellen. In der gleichen Darstellung ließen wir uns in einem weiteren Plot die Aldefluor[®]^{bright}-Zellen anzeigen.

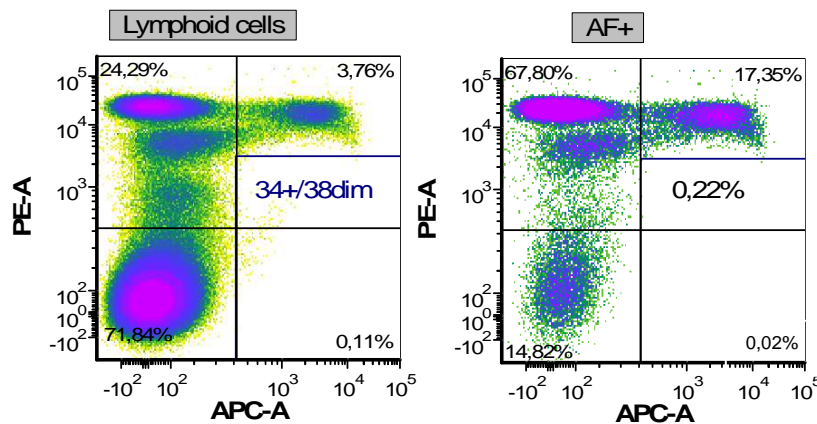


Abb. 3.17: Auswertestrategie für CD34-APC/CD38-PE

Links: Lymphoide Zellen, Testfärbung (AF+Ak). Rechts: Aldefluor[®]^{bright}-Zellen, Testfärbung (AF+Ak). Die Plots sind in 4 Quadranten aufgeteilt, deren Prozentwerte der zugehörigen Zellen in den Ecken angezeigt werden. Die Begrenzung der Quadranten wurde von den Gates für $CD34^+$ (Abb. 3.14) und $CD38^+$ (Abb. 3.15) übertragen. Das zusätzliche Gate $34^+/38^{dim}$ umfasst neben den ungefärbten Zellen für CD38 auch die schwach gefärbten Zellen. Es wurde unter Ausschluss der CD38 stark positiven Zellen angelegt. Im rechten Plot bezieht sich der Prozentwert im Gate auf Aldefluor[®]^{bright}-Zellen. (Patientenprobe 50)

Auf dem Auswertungsblatt stellten wir zusätzlich CD34-APC und CD45-PB gegen Aldefluor[®] dar. Diese Density-Plots fanden jedoch in der Statistik keine Bedeutung. In den tabellarischen Auswertungen der einzelnen Gates ließen wir neben absoluten Zellzahlen auch prozentuale Werte bezogen auf lymphoide Zellen und die Gesamtzahl der gemessenen Zellen anzeigen (siehe Abb. 3.10). Besonderes Interesse lag neben den Werten in den einzelnen Gates auf den folgenden Kombinationen:

- $CD34^+/CD38^-$,
- $CD34^+/CD38^{dim/neg}$,
- $CD34^+/Aldefluor^{®}{}^{bright}$,
- $CD34^+/CD38^-/CD45^{dim}$,
- $CD34^+/CD38^-/Aldefluor^{®}{}^{bright}$,
- $CD34^+/CD38^{dim/neg}/Aldefluor^{®}{}^{bright}$.

Ein Muster für das Auswertebrett befindet sich im Anhang (siehe 8.2).

3.8 Statistik

Die gewonnenen Messwerte wurden zunächst mit den Daten von Ahlers verglichen. Nach Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung, Streuung und Median war eine Gegenüberstellung möglich. Zur Veranschaulichung diente der Box-and-Whisker-Plot. Dieses Schaubild ermöglicht einen guten Überblick über die Verteilung der Werte. Die Kenngrößen Median, Quartile, Streuung und Ausreißer können direkt abgelesen werden.

Der Pearson-Korrelationskoeffizient „r“ wurde berechnet um die Stärke und Richtung des Zusammenhangs zweier metrischer Merkmale zu vergleichen. Er wurde sowohl zur Korrelation der Populationen untereinander eingesetzt, als auch zur Korrelation bestimmter Populationen mit dem klinischen Verlauf. Der Koeffizient liegt definitionsgemäß zwischen -1 und +1. Ist $r = 0$, so liegt kein Zusammenhang vor, ist $r = |1|$, liegt ein perfekter linearer Zusammenhang vor. Positive Werte sprechen für einen gleichgerichteten Zusammenhang, negative Werte für einen gegensinnigen.

Mittelwerte zwischen zwei Gruppen wurden mit dem t-Test verglichen. Mit dem Fishers-Exact-Test wurden kategoriale Daten geprüft.

Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet, als hochsignifikant galt ein p-Wert $< 0,01$, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% entspricht.

3.9 Korrelation mit klinischem Verlauf

Da bei ALL-Erkrankungen erfreulicherweise relativ wenig klinische Ereignisse wie Tod und Rezidiv auftreten und deshalb eine lange Nachbeobachtungszeit nötig wäre, wählten wir für die Korrelation der Populationen den gleichen Surrogatparameter wie Ahlers. Mit dem MRD-Level am Tag 33 nach Therapiebeginn lassen sich die zuverlässigsten Aussagen über das spezifische Risiko der Patienten treffen. Je geringer das MRD-Level ist, desto besser ist die Prognose [89]. Bei den Verlaufsproben korrelierten wir allerdings mit dem Auftreten eines erneuten Rezidivs. Bei der ohnehin geringen Patienten-Zahl lagen nur bei wenigen Patienten MRD-Werte vor.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse unreifer Populationen bei Diagnosestellung

Im Zeitraum von Februar bis Dezember 2008 konnten insgesamt 17 Proben von Erstdiagnosen und akuten Rezidiven von ALL-Erkrankungen für unsere Untersuchung verwendet werden. Dabei handelte es sich jedoch um eine heterogene Diagnosegruppe. Es befanden sich 7 Erstdiagnosen einer c-ALL, 5 akute Rezidive von c-ALLs, 4 Erstdiagnosen einer T-ALL und eine Infant-ALL unter den Patientenproben (vgl. 2.1.4.1). Sie wurden alle gemäß der beschriebenen Vorgehensweise weiterverarbeitet (vgl. 3.2 - 3.5). Nach Abschluss der Messungen werteten wir die Proben anhand der beschriebenen Gating-Strategie mit dem Programm FCS Express aus (vgl. 3.7). Im Anhang befinden sich Wertetabellen der einzelnen Proben (vgl. 8.1). Soweit nicht anders vermerkt, beziehen sich die angegebenen Zahlen auf lymphoide Zellen.

Nach abgeschlossener Auswertung verglichen wir die gemessenen Proben mit den bereits vorliegenden Daten von Ahlers [40]. Während Ahlers fast ausschließlich kryokonservierte Erstdiagnosen für seine Experimente nutzte, verwendeten wir bei unseren Versuchen hauptsächlich frisch gewonnenes Knochenmark. Durch die zusätzlichen Stichproben konnten wir die Gesamtdatenmenge erweitern. Nebenbei war es über den Vergleich möglich, die Reliabilität und Plausibilität der Datenerhebung bei Durchführung der Versuche durch einen weiteren Experimentator zu stützen. Im Gegensatz zu der Auswertung von Ahlers zogen wir die Aldefluor[®]-Werte der Kontrollfärbung nicht von den Werten im Testansatz ab. Dieses Vorgehen erschien uns in Bezug auf klar erkennbar positive Populationen als sinnvoller. Ein weiteres Argument dafür lag bei den kombinierten Populationen (z.B.: ALDH^{br}/CD34⁺), bei welchen ohnehin nur die Gesamtzahl der ALDH^{br}-Zellen im Gate des Testansatzes berücksichtigt werden konnte. Entsprechende Werte sind deshalb für die Daten von Ahlers geändert worden. Es handelt sich um Werte in der Größenordnung von 0,38% aller lymphoiden Zellen, die im Mittel ca. 2,76% der ALDH^{br}-Population ausmachen.

4.1.1 Messergebnisse

4.1.1.1 Aldefluor[®]bright (ALDH^{br})

Der mittlere Wert für die ALDH^{br}-Population betrug in den eigenen Proben 17,41%. Die einzelnen Werte lagen zwischen 0,18% bis 97,12%. Die Standardabweichung (SA) betrug 29,31%. Die Werte lagen im Vergleich zu Ahlers Daten etwas höher. Folgende Tabelle vergleicht die statistischen Werte für ALDH^{br}. Die Abbildung veranschaulicht die Werte der verschiedenen Stichproben.

ALDH ^{br}	Eigene Proben (n=17)	Ahlers (n=42)	Gesamt (n=59)
Mittelwert	17,41%	13,75%	14,80%
Streuung (Range)	0,18% - 97,12%	0,05% - 87,84%	0,05% - 97,12%
Standardabweichung	29,31%	24,06%	25,74%
Median	3,10%	1,96%	2,05%

Tab. 4.1: Werte für ALDH^{br} im Vergleich

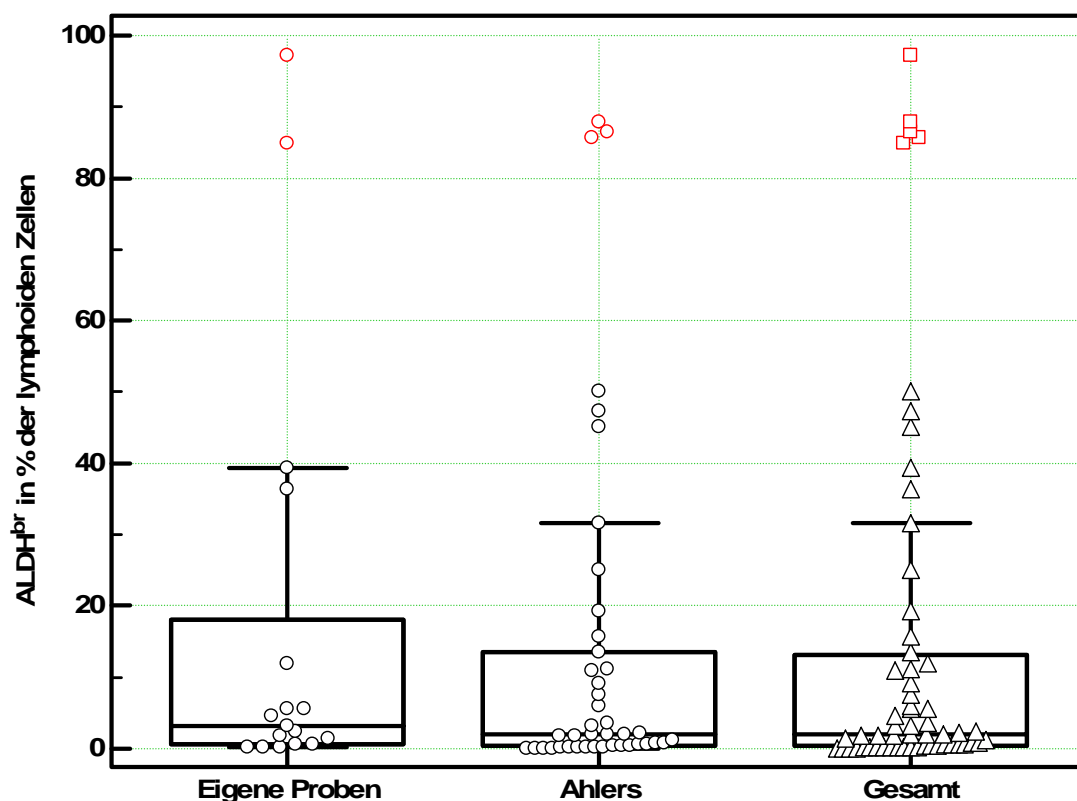


Abb. 4.1: Werte für ALDH^{br} im Vergleich

Vergleichende Darstellung der gemessenen Werte für ALDH^{br} im Box-and-Whisker-Plot. Die Werte der einzelnen Proben sind als kleine Kreise bzw. als Dreiecke dargestellt. Extreme Ausreißer sind rot gekennzeichnet. Die Box umspannt den Bereich in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Der Median ist als durchgehender Strich innerhalb der Box eingezeichnet. Die Antennen erstrecken sich bis zu einem 1,5-fachen Interquartilsabstand.

4.1.1.2 CD34⁺

Auch die Werte für den Oberflächen-Antikörper CD34 waren vergleichbar mit den Daten von Ahlers. Die Werte wiesen erneut eine sehr große Streubreite mit ähnlichem Durchschnittswert auf. Die folgende Tabelle stellt die statistischen Kennzahlen vergleichend dar und wird durch einen Box-and-Whisker-Plot zur besseren Veranschaulichung ergänzt.

CD34 ⁺	Eigene Proben (n=17)	Ahlers (n=42)	Gesamt (n=59)
Mittelwert	46,23%	45,91%	46,00%
Streuung (Range)	0,46% - 97,29%	0,13% - 96,45%	0,13% - 97,29%
Standartabweichung	35,03%	38,80%	37,75%
Median	48,44%	41,31%	43,93%

Tab. 4.2: Werte für CD34⁺ im Vergleich

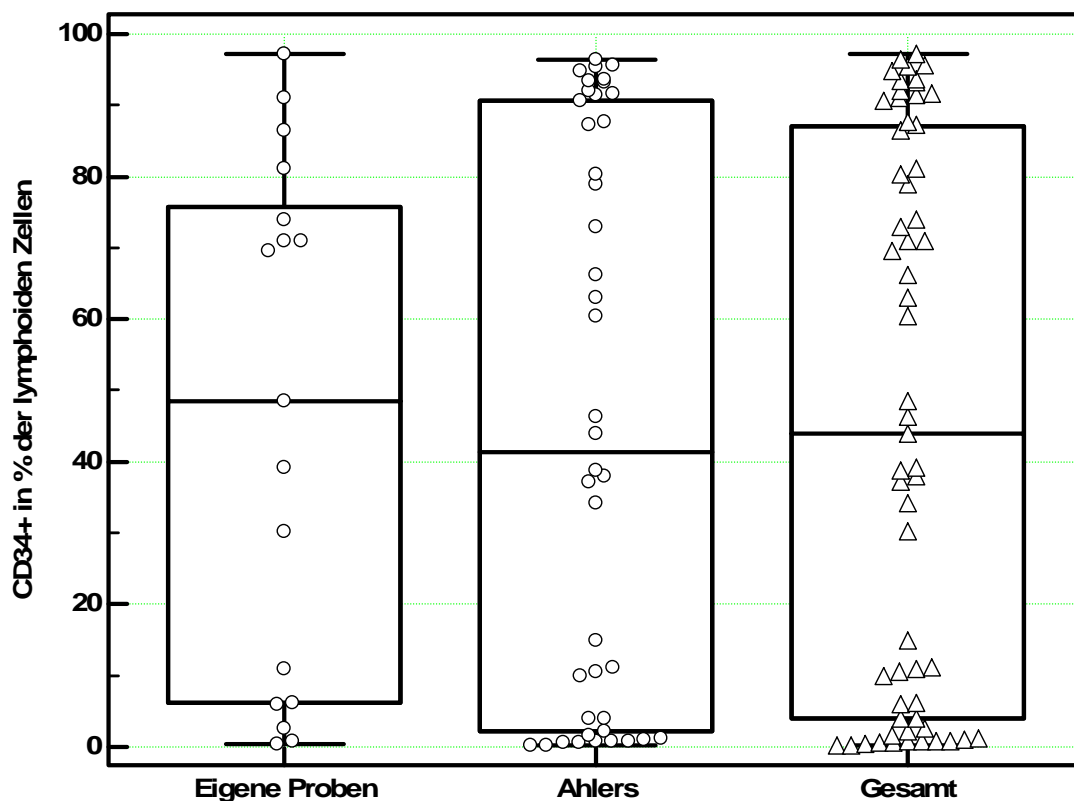


Abb. 4.2: Werte für CD34⁺ im Vergleich

Vergleichende Darstellung der gemessenen Werte für CD34⁺ im Box-and-Whisker-Plot. Die Werte der einzelnen Proben sind als kleine Kreise bzw. als Dreiecke dargestellt. Die Box umspannt den Bereich in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Der Median ist als durchgehender Strich innerhalb der Box eingezeichnet. Die Antennen erstrecken sich maximal bis zu einem 1,5-fachen Interquartilsabstand.

4.1.1.3 CD34⁺ (ALDH^{br})

Die Auswertung des Anteils CD34 positiver Zellen an der Gesamtzahl der ALDH^{br}-Population bot ebenfalls recht ähnliche Werte zu Ahlers Daten. Der direkte Vergleich der Daten ist in der nachstehenden Tabelle und der darauf folgenden Abbildung veranschaulicht:

CD34 ⁺ (ALDH ^{br})	Eigene Proben (n=17)	Ahlers (n=42)	Gesamt (n=59)
Mittelwert	49,90%	42,33%	44,51%
Streuung (Range)	7,35% - 99,92%	0,08% - 99,28%	0,08% - 99,92%
Standartabweichung	28,02%	30,49%	30,00%
Median	52,85%	42,10%	44,71%

Tab. 4.3: Werte für CD34⁺ (ALDH^{br}) im Vergleich

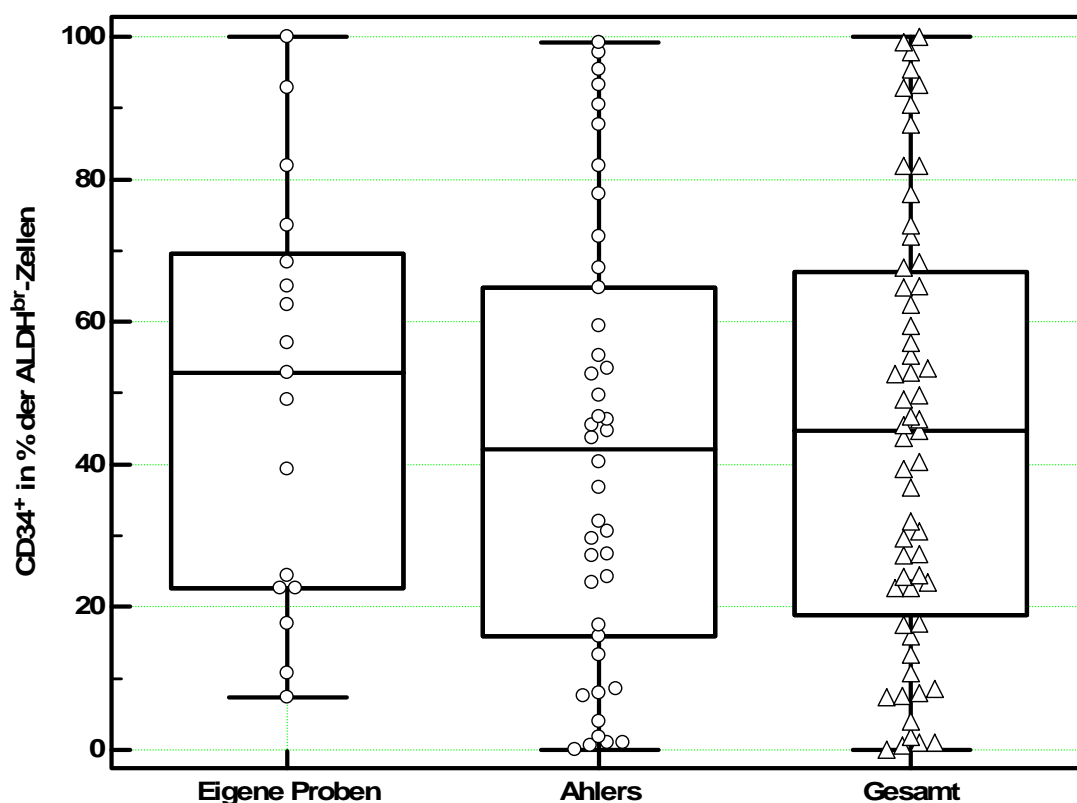


Abb. 4.3: Werte für CD34⁺ (ALDH^{br}) im Vergleich

Vergleichende Darstellung der gemessenen Werte für CD34⁺ (ALDH^{br}) im Box-and-Whisker-Plot. Die Werte der einzelnen Proben sind als kleine Kreise bzw. als Dreiecke dargestellt. Die Box umspannt den Bereich in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Der Median ist als durchgehender Strich innerhalb der Box eingezeichnet. Die Antennen erstrecken sich maximal bis zu einem 1,5-fachen Interquartilsabstand.

4.1.1.4 CD34⁺/CD38⁻, CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} und CD34⁺/CD38⁻/ALDH^{br}

Die Anzahl der Zellen in der Population CD34⁺/CD38⁻ lag bei den eigenen Proben durchschnittlich bei 3,70% (Range: 0,01% - 44,30%). Die Standardabweichung betrug 10,36%. Die zusätzliche Einbeziehung von CD45 zeigte, dass diese Zellpopulation den Marker CD45 größtenteils nur schwach oder gar nicht exprimiert. Somit lagen die Werte für die Kombination CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} nur wenig unter den Werten für CD34⁺/CD38⁻ allein. Der Mittelwert lag bei 3,67% (Range: 0,01% - 44,29%), die Standardabweichung betrug 10,36%. Dieses Phänomen wurde bereits von Ahlers [40] beschrieben.

Bei der Kombination von CD34⁺/CD38⁻ mit Aldefluor[®] (CD34⁺/CD38⁻/ALDH^{br}) betrug die Anzahl der Zellen im Mittel 3,04% (Range: 0,00% - 44,16%). Die Standardabweichung lag bei 10,38%. Bei einem durchschnittlichen Wert für ALDH^{br} von 17,41% bedeutet dies, dass innerhalb der ALDH^{br}-Population im Mittel 17,46% der Zellen CD34⁺/CD38⁻ exprimierten ($3,04 \div 17,41 \times 100\%$). Umgekehrt befanden sich innerhalb der Population CD34⁺/CD38⁻ im Mittel 82,16% ALDH^{br}-Zellen ($3,04 \div 3,70 \times 100\%$).

In der nachfolgenden Tabelle sind die eigenen Werte den Daten Ahlers gegenübergestellt, anschließend wurden die Ergebnisse der Gesamtdaten berechnet.

Population	Eigene Proben (n=17)	Ahlers (n=42)	Gesamt (n=59)
CD34⁺/CD38⁻	3,70% ± 10,36%	3,61% ± 13,18%	3,63% ± 12,43%
Streuung (Range)	0,01% - 44,30%	0,00% - 82,14%	0,00% - 82,14%
CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg}	3,67% ± 10,36%	3,59% ± 13,14%	3,61% ± 12,41%
Streuung (Range)	0,01% - 44,29%	0,00% - 81,94%	0,00% - 81,94%
CD34⁺/CD38⁻/ALDH^{br}	3,04% ± 10,38%	0,78% ± 3,65%	1,43% ± 6,45%
Streuung (Range)	0,00% - 44,16%	0,00% - 22,96%	0,00% - 22,96%
CD34⁺/CD38⁻ (ALDH^{br})	17,46%	5,67%	9,66%
ALDH^{br} (CD34⁺/CD38⁻)	82,16%	21,61%	39,39%

Tab. 4.4: Werte in den kombinierten Populationen zum Vergleich
Mittelwert ± SA. Die Werte der zwei unteren Zeilen sind aus den Mittelwerten berechnet.

4.1.1.5 Korrelation von $ALDH^{br}$ mit $CD34^+/CD38^-$:

Ferner wurden die Proben anhand aufsteigender ALDH-Aktivität ausgewertet. Es zeigte sich ähnlich den Ergebnissen von Ahlers eine hoch signifikante Korrelation der $ALDH^{br}$ -Population mit der Population $CD34^+/CD38^-$ (Pearsonkoeffizient $r = 0,69$; $p < 0,005$). Die Berücksichtigung von CD45 hatte keinen entscheidenden Einfluss auf die Korrelation ($r=0,69$; $p < 0,005$). Allerdings konnten wir bei der Unterscheidung zwischen niedrigen ($ALDH^{br} < 1\%$) und hohen ($ALDH^{br} > 1\%$) Werten für die ALDH-Aktivität gegensätzlich zu Ahlers Daten keine bessere Korrelation nachweisen (vgl. Tabelle 4.5).

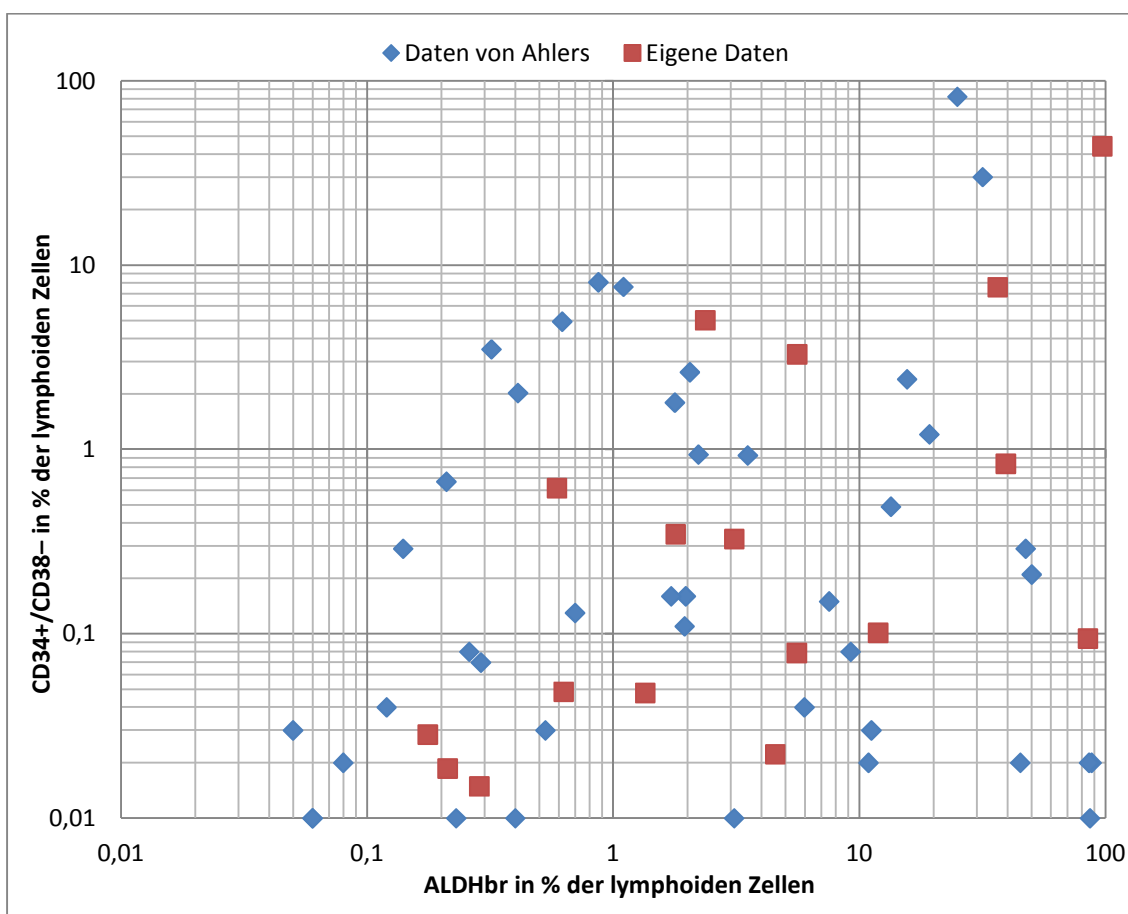


Abb. 4.4: Korrelation der ALDH-Aktivität mit $CD34^+/CD38^-$

Die einzelnen Punkte entsprechen den Datenwerten einer Patientenprobe. Die blauen Rauten entsprechen den Patienten von Ahlers, die roten Vierecke sind selbst gemessene Proben. Um die Werte logarithmisch darstellen zu können wurden drei Patientenproben von Ahlers vom Wert '0' auf den Wert '0,01' abgeändert. Es lässt sich für die blauen Rauten innerhalb der $ALDH^{br}$ -Werte von 0,01% bis 1% ein Zusammenhang ansteigender Werte sowohl auf der x-Achse, als auch auf der y-Achse erkennen. Bei den roten Vierecken ist dieser Zusammenhang im Sinne einer Korrelation über die gesamte Spannweite zu beobachten (vgl. Tab.4.5).

Korrelation	Eigene Proben	Ahlers	Gesamt
ALDH ^{br} vs. 34 ⁺ /38 ⁻	r=0,69; p<0,005 n=17	r=0,08; p=0,31 n=42	r=0,25; p=0,03 n=59
ALDH ^{br} vs. 34 ⁺ /38 ⁻ /45 ^{dim/neg}	r=0,69; p<0,005 n=17	r=0,08; p=0,31 n=42	r=0,25; p=0,03 n=59
ALDH ^{br} <1% vs. 34 ⁺ /38 ⁻	r=0,58; p=0,15 (n=5)	r=0,68; p=0,001 (n=17)	r=0,59; p=0,002 (n=22)
ALDH ^{br} >1% vs. 34 ⁺ /38 ⁻	r=0,67; p<0,01 (n=12)	r=0,01; p=0,48 (n=25)	r=0,19; p=0,12 (n=37)

Tab. 4.5: Pearson-Korrelation der ALDH-Aktivität mit CD34⁺/CD38⁻
 Pearson-Korrelationskoeffizient (r), Zufallswahrscheinlichkeit (p), Anzahl der Proben (n)

4.1.1.6 Korrelation von ALDH^{br} mit CD34⁺/ALDH^{br}

Eine besonders hoch signifikante Korrelation konnten wir zwischen der Population ALDH^{br} und der Kombination von ALDH^{br} mit CD34⁺ (ALDH^{br}/CD34⁺) jeweils bezogen auf lymphoide Zellen feststellen. Der Pearson-Koeffizient lag für die eigenen Proben bei r=0,95 (p<0,005, n=17).

Dieser starke Zusammenhang konnte für die Daten von Ahlers nicht bestätigt werden. Bei den von Ahlers gemessenen Proben lag der Pearson-Koeffizient bei r=0,21 (p=0,08, n=42) und war somit nicht signifikant.

Für die Gesamtzahl der gemessenen Proben lag der Pearson-Koeffizient bei r=0,59 (p<0,005, n=59) und bestätigte den Zusammenhang der leukämischen Subpopulationen (vgl. Abb. 4.5).

Der Rückschluss, dass auch CD34⁺ mit dem kombinierten Gate aus ALDH^{br} und CD34⁺ korreliert, war allerdings nicht zu eruieren. Der Pearson-Koeffizient betrug r=0,29 für die eigenen Proben, die Korrelation war nicht signifikant. Auch bei Ahlers Daten mit r=0,19 und für die Gesamtdaten mit r=0,18 konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden.

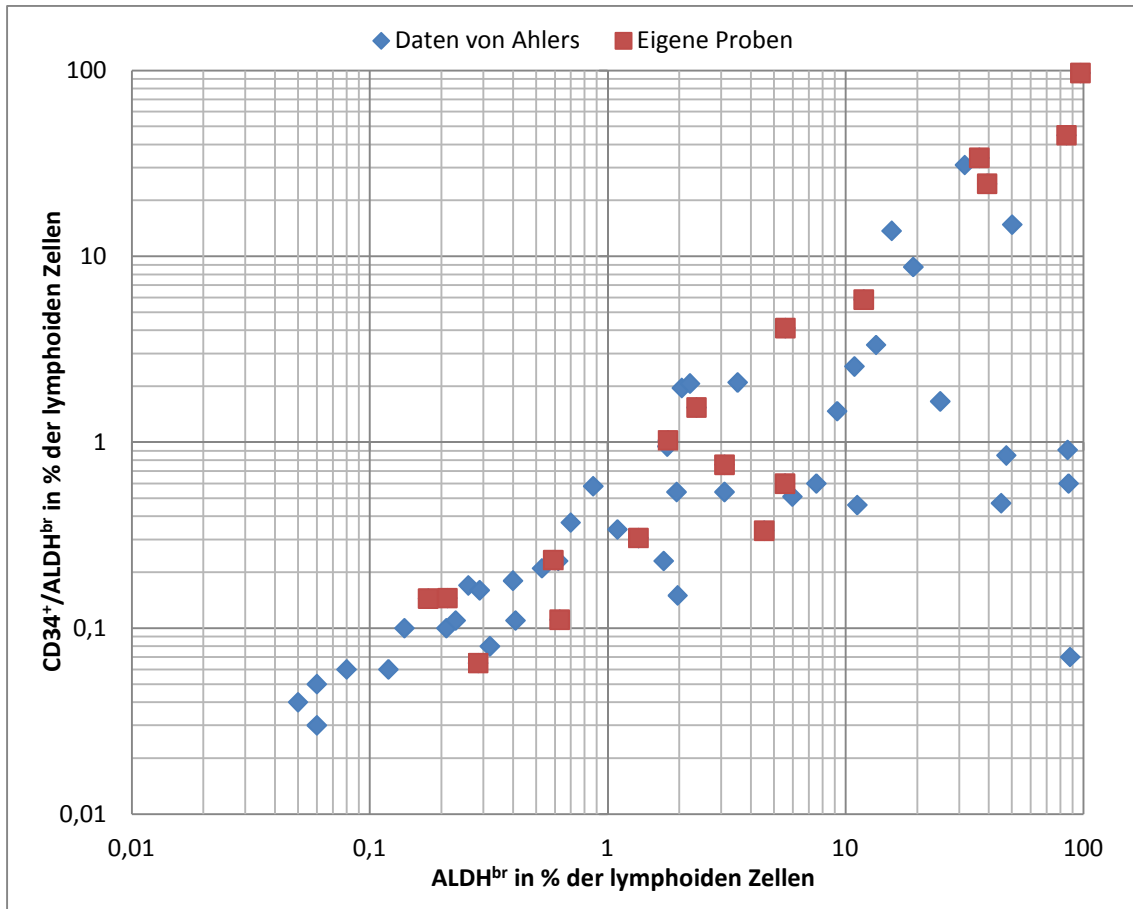


Abb. 4.5: Korrelation von ALDH^{br} mit CD34⁺/ALDH^{br}

Die einzelnen Punkte entsprechen den Datenwerten einer Patientenprobe. Die blauen Rauten entsprechen den Patienten von Ahlers, die roten Vierecke sind selbst gemessene Proben. Die Werte sind im logarithmischen Koordinatensystem dargestellt. Es wird deutlich, dass bei steigenden Werten für die Population ALDH^{br}, gleichermaßen die Werte in der Population CD34⁺/ALDH^{br} ansteigen. Dieser Zusammenhang wird für die roten Vierecke mit einem Pearson-Koeffizienten von $r=0,95$ und für die Gesamtzahl der Proben mit $r=0,59$ beschrieben (siehe Text).

4.1.2 Korrelation mit dem MRD-Level

Für die Korrelation mit MRD-Werten konnten nur Proben verwendet werden, von denen MRD-Daten zu Verfügung standen. Neben den akuten Rezidiven mussten auch einige Proben bei Erstdiagnose wegen fehlenden MRD-Werten ausgeschlossen werden. Letztlich wurden für die Korrelation mit MRD-Werten 6 Proben von Erstdiagnosen einer c-ALL und 3 Proben von Erstdiagnosen einer T-ALL verwendet. Um die gemessenen Werte mit dem MRD-Level an Tag 33 zu korrelieren, wandelten wir die MRD-Werte entsprechend Tab. 4.6 in eine lineare Skala von 0 bis 5 um. Zur Bestimmung der Korrelation diene die Berechnung des Pearson-Koeffizienten und dessen Signifikanz mittels p-Wert.

Lineare Skala	MRD-Level	Prognose
0	$<10^{-5}$	besser
1	10^{-5}	
2	10^{-4}	
3	10^{-3}	
4	10^{-2}	
5	10^{-1}	
		schlechter

Tab. 4.6: Übertragung des MRD-Levels in eine lineare Skala

4.1.2.1 Aldefluor®

Die Korrelation der MRD-Level mit den ALDH^{br}-Werten der selbst gemessenen Proben ergab einen Pearson-Korrelationskoeffizienten von $r=0,34$ ($p=0,18$, $n=9$). Zur übersichtlichen Darstellung der Daten wurden die ALDH^{br}-Mittelwerte des jeweiligen MRD-Levels in Tabelle 4.7 dargestellt.

MRD (linear)	Fallzahl	ALDH ^{br} in % der lymphoiden Zellen
0	5	$1,19 \pm 1,12$
1	0	-
2	0	-
3	3	$13,16 \pm 16,51$
4	1	1,35
5	0	-

Tab. 4.7: Eigene Proben: Werte für ALDH^{br} nach MRD-Level
Eigene Patientenproben, Mittelwert \pm Standardabweichung

In der Kombination mit den Daten von Ahlers ergab sich ein Pearson-Korrelationskoeffizient von $r=-0,16$ ($p=0,13$, $n=51$). Somit konnte keine signifikante Korrelation der ALDH^{br}-Population mit dem MRD-Level festgestellt werden. Die ALDH^{br}-Mittelwerte des jeweiligen MRD-Levels sind in Tabelle 4.8 dargestellt.

MRD (linear)	Fallzahl	ALDH ^{br} in % der lymphoiden Zellen
0	18	17,38 ± 31,29
1	1	31,7
2	13	9,17 ± 16,63
3	12	8,02 ± 15,35
4	4	4,75 ± 6,30
5	3	15,05 ± 10,30

Tab. 4.8: Gesamtdaten: Werte für ALDH^{br} nach MRD-Level
 Kombination eigener Patientenproben mit den Daten von Ahlers, Mittelwert ± SA.

Bei der von Ahlers getroffenen Unterscheidung von Proben mit niedriger (<1%) und hoher (>1%) ALDH-Aktivität stellte sich bei der kombinierten Auswertung weiterhin eine hoch signifikante positive Korrelation für ansteigende niedrige ALDH^{br}-Werte mit dem MRD-Level heraus. Allerdings war der Pearson-Koeffizient mit $r=0,52$ ($p<0,01$, $n=21$) schwächer als bei Ahlers.

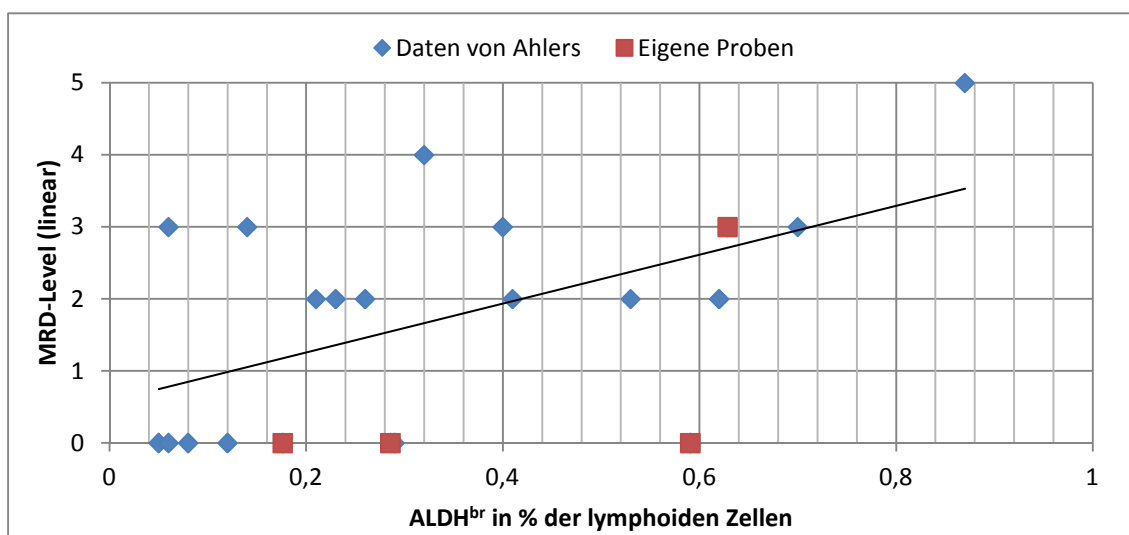


Abb. 4.6: Korrelation der ALDH^{br}-Aktivität (<1%) mit dem MRD-Level
 Lineares Koordinatensystem: ALDH^{br} vs. MRD-Level. Die Punkte entsprechen den Datenwerten einer Patientenprobe. Ahlers Daten (blaue Rauten), eigene Proben (rote Vierecke). Für ALDH^{br}-Werte <1% besteht eine signifikante Korrelation zum MRD-Level, der Pearson-Koeffizient beträgt $r=0,52$. Die Linie verdeutlicht diesen Zusammenhang.

4.1.2.2 Oberflächen-Antikörper

Nach dem gleichen Schema wurden die Werte für die Oberflächen-Antikörper berechnet. CD34 wies alleine erneut keine signifikante Korrelation zum MRD-Level auf. Der Pearson-Korrelationskoeffizient betrug $r=-0,54$ ($p=0,06$; $n=9$) für die eigenen Proben und $r=0,11$ ($p=0,22$; $n=51$) für die Kombination.

Für die Population $CD34^+/CD38^-$ lag der Pearson-Korrelationskoeffizient bei den eigenen Proben bei $r=0,46$ ($p=0,10$, $n=9$) und war somit nicht signifikant, allerdings lag der Korrelationskoeffizient in der kombinierten Auswertung bei $r=0,31$ ($p=0,01$; $n=51$). Es bestand somit weiterhin ein hoch signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl Zellen der Population $CD34^+/CD38^-$ und dem MRD-Level am Tag 33.

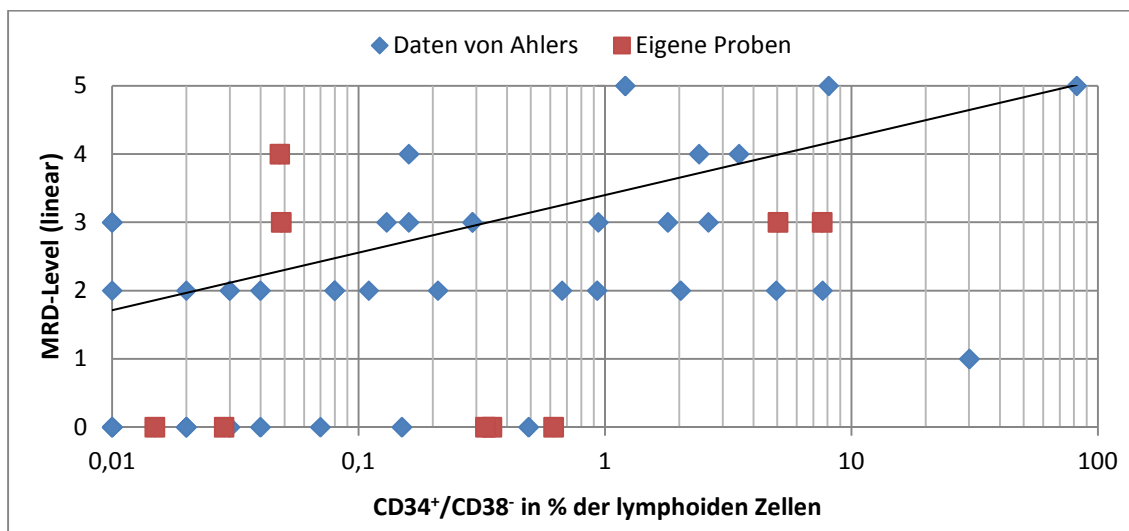


Abb. 4.7: Korrelation der Population $CD34^+/CD38^-$ mit dem MRD-Level

Koordinatensystem: $CD34^+/CD38^-$ (logarithmisch) vs. MRD-Level (linear). Die Punkte entsprechen den Datenwerten einer Patientenprobe. Ahlers Daten (blaue Rauten), eigene Proben (rote Vierecke). Für die Population $CD34^+/CD38^-$ besteht eine signifikante Korrelation zum MRD-Level, der Pearson-Koeffizient beträgt $r=0,31$. Die eingezeichnete Linie soll diesen Zusammenhang verdeutlichen.

Nur einen minimalen Unterschied machte die Kombination mit $CD45^{dim/neg}$ aus. Die Population $CD34^+/CD38^-/CD45^{dim/neg}$ korrelierte ebenfalls hoch signifikant mit dem MRD-Level in der kombinierten Auswertung, wohingegen die Fallzahlen der eigenen Proben zum Nachweis einer signifikanten Korrelation zu gering waren. Die Koeffizienten und p-Werte lagen dabei annähernd auf dem gleichem Niveau ($r=0,31$; $p=0,01$).

Für die Population CD34⁺/CD38⁻/ALDH^{br} konnte ebenfalls eine signifikante Korrelation festgestellt werden. Mit einem Korrelationskoeffizienten von r=0,27 (p=0,03, n=51) war das Signifikanz-Niveau aber schwächer als für die Population CD34⁺/CD38⁻ ohne ALDH^{br}.

Zur übersichtlichen Darstellung der eigenen Daten wurden in Tabelle 4.9 die Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Populationen in Abhängigkeit des MRD-Levels dargestellt.

MRD (linear)	Fallzahl	CD34 ⁺	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CD45 ^{dim/neg}	CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /ALDH ^{br}
0	5	65,81 ± 33,27	0,27 ± 0,23	0,25 ± 0,22	0,08 ± 0,12
1	0	-	-	-	-
2	0	-	-	-	-
3	3	37,54 ± 27,97	4,23 ± 3,14	4,16 ± 3,07	2,12 ± 2,95
4	1	5,88	0,05	0,04	0,01
5	0	-	-	-	-

Tab. 4.9: Eigene Proben: Werte versch. Populationen nach dem MRD-Level geordnet
Eigene Patientenproben, Werte in %, Mittelwert ± SA

Tabelle 4.10 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Populationen für die Gesamtdaten.

MRD (linear)	Fallzahl	CD34 ⁺	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CD45 ^{dim/neg}	CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /ALDH ^{br}
0	18	43,67 ± 41,62	0,12 ± 0,18	0,12 ± 0,18	0,06 ± 0,12
1	1	93,52	30,11	30,03	7,56
2	13	38,05 ± 35,27	1,29 ± 2,27	1,27 ± 2,24	0,05 ± 0,04
3	12	48,98 ± 36,24	1,58 ± 2,32	1,55 ± 2,28	0,57 ± 1,72
4	4	47,22 ± 37,04	1,53 ± 1,48	1,50 ± 1,46	0,06 ± 0,09
5	3	74,98 ± 12,73	30,48 ± 36,64	30,35 ± 36,59	7,72 ± 10,78

Tab. 4.10: Gesamtdaten: Werte versch. Populationen nach dem MRD-Level geordnet
Kombination eigener Patientenproben mit den Daten von Ahlers, Werte in %, Mittelwert ± SA.

4.2 Analyse unreifer Populationen im Verlauf unter Therapie

Ein großer Vorteil der frischen Probenverarbeitung lag darin, dass auch bei zellarmen Knochenmark-Proben die Zellzahl oftmals für unsere Versuche ausreichend war. Somit gelang es, für eine begrenzte Anzahl Patienten sowohl Erstdiagnosen als auch Verlaufspalten unter der zytoreduktiven Induktionstherapie bis zum Tag 40 nach Erstdiagnose zu untersuchen. Dabei war eine grundlegende Fragestellung, wie sich die Stamm- und Progenitorzellen unter Chemotherapie verhalten und ob sich daraus Rückschlüsse auf die Prognose der Erkrankung ziehen lassen.

Ein großes Problem in der Datenerhebung bestand darin, dass viele Patienten nicht kontinuierlich untersucht werden konnten. Manchmal war nach den priorisierten Routineuntersuchungen aufgrund von Zytopenie während der ablativen Behandlung nicht genug Knochenmark für die Experimente der vorliegenden Arbeit übrig. Um die erhobenen Daten miteinander vergleichen zu können, setzten wir uns vor der Auswertung sinnvoll erscheinende Einschlusskriterien.

Die Folgeproben wurden nur in die Auswertung einbezogen, wenn die Punktion bis zum 40. Tag nach Diagnosestellung erfolgte. Wir gingen in diesem Zeitraum davon aus, dass die normale Hämatopoese unterdrückt blieb und somit unsere Werte nicht durch die Regeneration verfälscht wurden. Als Erstdiagnosen werteten wir neben den wahren ALL-Ersterkrankungen nur erneut aufgetretene akute Rezidive nach morphologischer Remission. Wenn zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine Probe untersucht werden konnte, wurden in wenigen Fällen auch frühe Folgeproben als Referenz an Stelle der Erstdiagnose verwendet. Voraussetzung hierfür war allerdings, dass die Anzahl der Blasten im Ausstrich mehr als 80% betrug. Freundlicherweise durften wir von Dr. med. Christina Haug aus unserer Arbeitsgruppe Proben von zwei weiteren Patienten einschließen. Sie erfüllten unsere Einschlusskriterien und wurden im Rahmen ihrer Studie über die „Side-Population“ (vgl. 1.3.2) ebenfalls mit den Oberflächenmarkern CD34 und CD38 untersucht.

Ergebnisse

In der Datenauswertung galt unser besonderes Augenmerk auf den fakultativen Stammzellen. Die relative Zellzahl der Population CD34⁺/CD38^{dim/neg} wurde in den Verlaufspuben auf die relative Zellzahl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. der ersten Probe nach Erstdiagnose (hohe Blastenlast vorausgesetzt) bezogen. Bei einigen Patienten fiel die relative Zellzahl dieser Population im Verlauf stark ab, bei anderen nur wenig oder sie stieg sogar an. Als einen signifikanten Abfall der Population CD34⁺/CD38^{dim/neg} bezeichneten wir einen relativen Abfall von > 50% zum Ausgangswert.

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Daten und Ergebnisse der Verlaufspuben aufgelistet (vgl. Tab. 8.9 – 8.12):

Patient	Interne Fallnummer #	Geschlecht	Diagnose	MRD-Tag	34 ⁺ /38 ^{dim/neg}	Relative Abnahme (34 ⁺ /38 ^{dim/neg})	Erneutes Rezidiv	% Blasten im Ausstrich
1	4	m	c-ALL	4	31,08%	100,00%	nein	98
1	17	m	c-ALL	17	5,90%	18,99%	nein	3
1	36	m	c-ALL	36	0,06%	0,18%	nein	0
2	9	m	c-ALL	0	2,02%	100,00%	nein	92
2	18	m	c-ALL	16	0,15%	7,21%	nein	0
3	70	m	c-ALL	0	0,14%	100,00%	nein	36
3	10	m	c-ALL	39	0,04%	29,10%	nein	0
4	68	w	c-ALL	0	0,59%	100,00%	nein	98
4	1	w	c-ALL	14	0,17%	27,98%	nein	8
5	26	m	c-ALL Rezidiv	0	72,36%	100,00%	ja	70
5	37	m	c-ALL Rezidiv	16	53,62%	74,10%	ja	79
6	27	m	c-ALL Rezidiv	0	5,70%	100,00%	ja	40
6	31	m	c-ALL Rezidiv	7	7,28%	127,75%	ja	42
6	48	m	c-ALL Rezidiv	35	3,74%	65,60%	ja	63
7	67	m	c-ALL Rezidiv	10	97,26%	100,00%	nein	98
7	15	m	c-ALL Rezidiv	35	0,18%	0,19%	nein	0
8	72	w	T-ALL	15	0,40%	100,00%	ja	85
8	6	w	T-ALL	28	0,40%	100,25%	ja	40
9	4	m	T-ALL	0	0,25%	100,00%	ja	97
9	11	m	T-ALL	15	0,14%	55,75%	ja	7
9	23	m	T-ALL	34	0,14%	54,91%	ja	1
10	A1	m	c-ALL	0	81,52%	100,00%	nein	97
10	A2	m	c-ALL	15	62,37%	76,51%	nein	(*) 0,21
10	A3	m	c-ALL	33	0,00%	0,00%	nein	(*) 0,001
11	B1	m	c-ALL Rezidiv	0	21,78%	100,00%	nein	89
11	B2	m	c-ALL Rezidiv	15	5,49%	25,21%	nein	(*) 20,4
11	B3	m	c-ALL Rezidiv	32	0,80%	3,69%	nein	(*) 0,009

Tab. 4.11: Daten und Ergebnisse der Verlaufspuben

Übersicht der wichtigsten Daten und Ergebnisse (vgl. Tab. 8.9 – 8.12). (*)=MRD-Daten

Die Patienten wurden in 2 Gruppen eingeteilt, je nachdem ob sie im Nachbeobachtungszeitraum unserer Untersuchung ein erneutes Rezidiv erlitten hatten oder nicht. Die Nachbeobachtungszeit der Patienten betrug im Durchschnitt 3 11/12 Jahre (3 9/12 Jahre – 4 1/12 Jahre). Eine Patientin, die an einer Sepsis innerhalb eines Monats nach Therapiebeginn verstarb, wurde zu der Gruppe ohne Rezidiv eingeteilt (Patient 4, Tab. 4.11).

Die Population $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ wurde aus folgenden Gründen ausgewählt: Einerseits wurden in der Auswertung der Patientenproben von Dr. med. Christina Haug nur die Werte dieser Population bestimmt, andererseits wirken sich die etwas höheren Zellzahlen im Vergleich zu $CD34^+/CD38^-$ positiv auf die Genauigkeit der erhobenen Werte aus.

Die Fragestellung, ob der Abfall der Population $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ um $> 50\%$ mit dem Rezidiv-Risiko korreliert, überprüften wir mit dem Fishers-Exact-Test. Nach Auswertung der Daten erhielten wir folgende Vierfeldertafel:

Kategorie	Abfall der Population $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ um $> 50\%$ bis Tag 40	Abfall der Population $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ um $< 50\%$ bis Tag 40	Summe
Kein Rezidiv	7	0	7
Erneutes Rezidiv	0	4	4
Summe	7	4	11

Tab. 4.12: Vierfeldertafel der Verlaufspuben
Vierfeldertafel der Verlaufspuben zur Durchführung eines Fishers-Exact-Tests.

Mit einer Zufallswahrscheinlichkeit von $p = 0,003$ (two-sided) korreliert das Rezidivrisiko mit dem Abfall der Population $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ um $< 50\%$, während bei einem Abfall um $> 50\%$ kein erneutes Rezidiv zu erwarten ist.

Studien mit höherer Stichprobenzahl werden diesen starken Zusammenhang in Zukunft prüfen müssen. Die Ergebnisse belegen, dass nicht nur die Höhe der Population $CD34^+/CD38^-$ bei Diagnosestellung prognostisch relevant ist, sondern auch der Verlauf der Population $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ unter Therapie.

4.3 Vergleichende Messungen

4.3.1 Tumorzellsuspension eines Lymphknotens

In diesem Kapitel soll gezeigt werden, wie gesundes Knochenmark im Gegensatz zu Blasten aussieht.

Bei einem Patienten konnten wir parallel zur Färbung des Knochenmarks die Färbung einer tumorösen Lymphknoten-Zellsuspension durchführen. Der Patient hatte in der Vorgeschichte eine T-ALL und kam nun mit Lymphknotenschwellung bei Verdacht auf ein akutes Rezidiv in die Klinik. Es wurde die Diagnose eines T-Zell-NHL ohne Knochenmarkinfiltration gestellt. Der gefundene maligne Zellklon unterschied sich deutlich vom Zellklon der stattgehabten T-ALL. Somit blieb als offene Frage, ob es sich um ein Abkömmling der gleichen malignen Stammzelle mit unterschiedlichem Phänotyp oder um ein unabhängiges Zweitmalignom handelte. Wir folgten der gleichen Methode wie für die leukämischen Proben (vgl. 3.2 - 3.7). Allerdings wurde die in Pufferlösung befindliche Lymphknoten-Zellsuspension ohne Ficoll-Dichte-zentrifugation direkt weiterverarbeitet. Die Ergebnisse der vergleichenden Messung sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

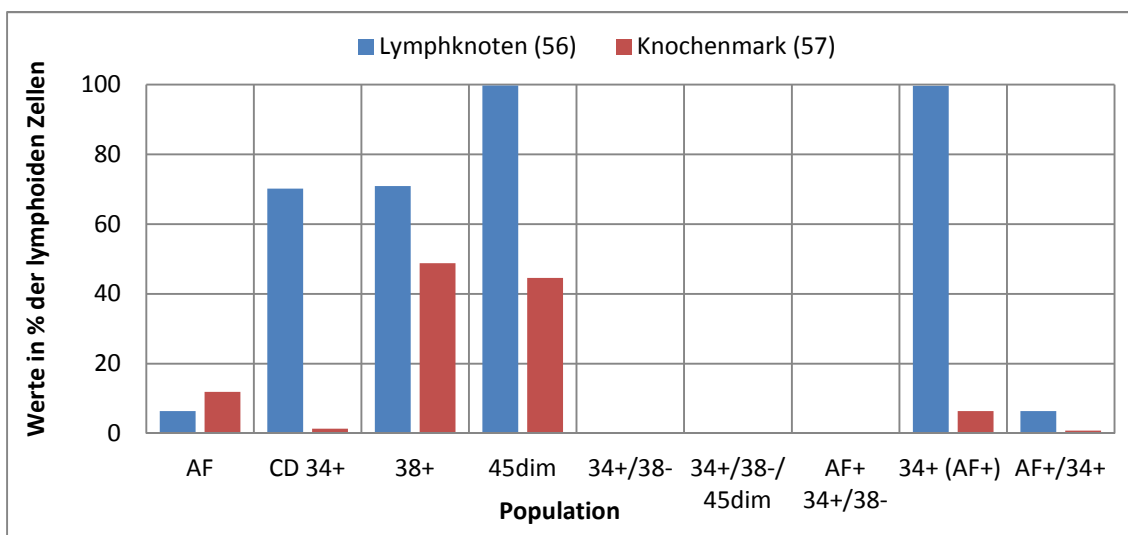


Abb. 4.8: Knochenmark vs. Lymphknoten-Zellsuspension

Die Abbildung zeigt die Werte in den einzelnen Gates bezogen auf lymphoide Zellen. Ausnahme: "34+(AF⁺)" bezieht sich auf den Anteil der ALDH^{br}-Zellen. Lymphknoten-Zellsuspension (blaue Balken), Knochenmark (rote Balken). Die eingeklammerte Zahl in der Legende gibt die interne Probennummer wieder. Die Abbildung soll verdeutlichen, wie Blasten im Lymphknoten im Gegensatz zu nicht befallenem Knochenmark aussehen. Besonders ausgeprägt ist der Unterschied in der Population CD34⁺ und CD34⁺(AF⁺). Mit AF⁺ und AF ist jeweils die Population ALDH^{br} bezeichnet.

Im Ausstrich des Lymphknotens (Tumortupfpräparat) wurde der Anteil der L1-Lymphoblasten nicht ausgezählt. Aufgrund unserer Analyse in der die Expression von CD34 in über 70% der Zellen nachgewiesen wurde, gehen wir von einem Blastenanteil von mindestens 70% aus. Das Knochenmark war mikroskopisch ohne Hinweis für Befall bei T-NHL.

In dieser einmalig durchgeführten Untersuchung zeigten sich klare Unterschiede in der Expression von CD34⁺ (70,11% vs. 1,37%), CD45^{dim/neg} (99,68% vs. 44,55%) und CD34⁺ bezogen auf ALDH^{br} (99,60% vs. 6,39%). Leider liegen uns aber keine Referenzwerte für normale Lymphknoten vor.

In Tabelle 4.12 sind die Werte der einzelnen Populationen des Knochenmarks und in der Lymphknoten-Zellsuspension dargestellt:

Population	Knochenmark	Lymphknoten-Zellsuspension
<i>ALDH^{br}</i>	11,89%	6,40%
<i>CD34⁺</i>	1,37%	70,11%
<i>CD38⁺</i>	48,74%	70,88%
<i>CD45^{dim/neg}</i>	44,55%	99,68%
<i>CD34⁺/CD38⁻</i>	0,06%	0,15%
<i>CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg}</i>	0,04%	0,15%
<i>CD34⁺/CD38⁻/ALDH^{br}</i>	0,00%	0,00%
<i>ALDH^{br}/CD34⁺</i>	0,76%	6,37%
<i>CD34⁺(ALDH^{br})</i>	6,39%	99,60%

Tab. 4.13: Knochenmark vs. Lymphknoten-Zellsuspension
 Vergleich der Werte von Knochenmark (Probennummer 57) und der Zellsuspension eines tumorösen Lymphknotens (Probennummer 56) des gleichen Patienten.

Während die Werte für die jeweiligen Populationen in der Knochenmark-Probe ähnlich den Werten bei den Kontrollpatienten waren, lagen die Werte in der Lymphknoten-Zellsuspension eher in der Größenordnung von leukämischen Proben (vgl. Tabelle 4.12 und 4.13).

4.3.2 Peripheres Blut bei Erstdiagnose einer c-ALL

Die Blutgerinnung ist bei Leukämie-Patienten aufgrund der Verdrängung der normalen Hämatopoese oft beeinträchtigt. Die Punktion von Knochenmark kann dadurch risikohaft sein. Deshalb wird in einigen Fällen auf die Knochenmarkpunktion verzichtet. Alternativ werden die Blasten des peripheren Blutes zu Zwecken der Diagnosesicherung verwendet. Bei einer Patientin mit Erstdiagnose einer c-ALL führten wir deshalb eine vergleichende Messung zwischen peripherem Blut und Knochenmark durch. Die Verarbeitung der Proben erfolgte dabei nach der gleichen Methode wie bei den übrigen leukämischen Patienten (vgl. 3.2 - 3.7). Die Ergebnisse der vergleichenden Messung sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Der Blasten-Anteil beträgt im nativen Ausstrich des Knochenmarks 90% und im peripheren Blut 60%.

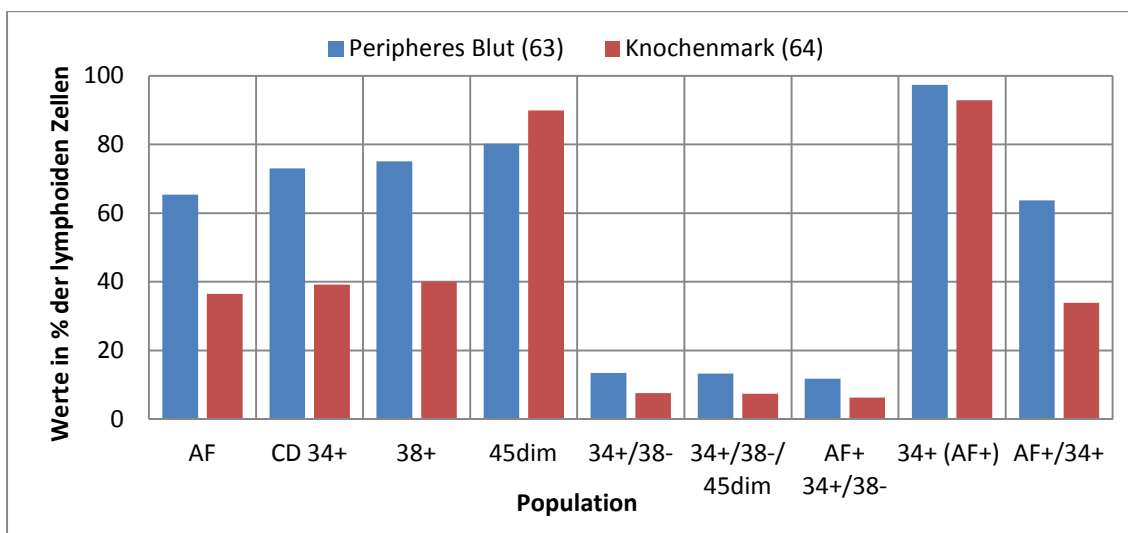


Abb. 4.9: Peripheres Blut vs. Knochenmark

Die Abbildung zeigt die Werte in den einzelnen Gates bezogen auf lymphoide Zellen. Ausnahme: "34⁺(AF⁺)" bezieht sich auf den Anteil der ALDH^{br}-Zellen. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer c-ALL wurde peripheres Blut (blaue Balken) und Knochenmark (rote Balken) einer Patienten miteinander verglichen. Die eingeklammerte Zahl in der Legende gibt die interne Probennummer wieder. Die Abbildung soll verdeutlichen, dass es sich bei den unreifen LSC-artigen Zellen nicht um HSC des KM handelt, sondern in der Tat um eine leukämische Subpopulation, die auch peripher nachweisbar ist. AF und AF⁺ meint ALDH^{br}.

Die Werte für die einzelnen Populationen lagen im peripheren Blut jeweils etwas über den Werten im Knochenmark. Die einzige Ausnahme stellte die Population CD45^{dim/neg} dar. Der Vergleich soll zeigen, dass es sich bei den unreifen LSC-artigen Zellen nicht um HSC des KM handelt, sondern in der Tat um eine leukämische Subpopulation, die auch peripher nachweisbar ist.

4.4 Kontrollproben

Da die Punktion von Knochenmark bei Gesunden ethisch nicht vertretbar gewesen wäre, nutzten wir wie bereits beschrieben KM zweier rheumatisch erkrankter Patienten zu Kontrollfärbungen (vgl. 2.1.3). Sie wurden zum Ausschluss einer malignen Erkrankung punktiert. Die Analysen wurden nach der gleichen Weise wie für die Leukämie-Proben durchgeführt (vgl. 3.2 - 3.7). Dies sollte zur internen Kontrolle unserer Messungen und zur Feststellung von Unterschieden dienen. Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse der selbst verarbeiteten Kontrollproben.

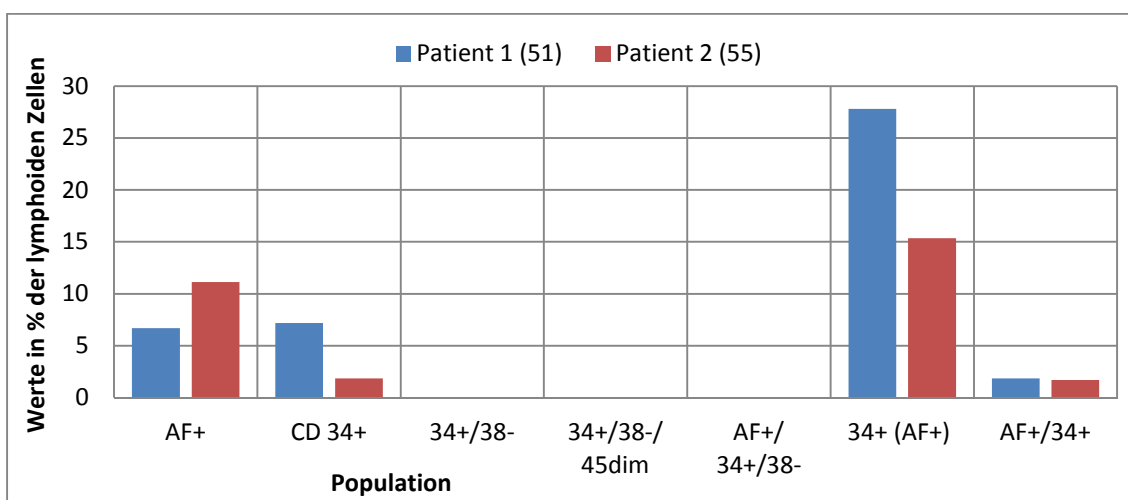


Abb. 4.10: Ergebnisse der Kontrollpatienten

Die Abbildung zeigt die Werte in den einzelnen Gates bezogen auf lymphoide Zellen. Ausnahme: "34⁺(AF⁺)" bezieht sich auf den Anteil der ALDH^{br}-Zellen. Zum Ausschluss einer malignen Erkrankung wurde das KM zweier Patienten mit rheumatischer Erkrankung punktiert. Patient 1 (blaue Balken) und Patient 2 (rote Balken). Die eingeklammerte Zahl in der Legende gibt die interne Probennummer wieder. AF und AF⁺ meint ALDH^{br}.

Zusammen mit den 5 Kontrollproben die schon zuvor von Ahlers ausgewertet wurden, konnten wir die Gesamtzahl der Kontrollpatienten auf insgesamt 7 Proben erweitern und somit die Aussagekraft dieser Werte erhöhen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Populationen blieben für die Gesamtzahl der Kontrollpatienten nahezu konstant zu den Daten, die bereits von Ahlers erhoben wurden. ALDH-Aktivität (8,19% ± 2,48%), CD34⁺ (6,96% ± 4,08%), CD34⁺/CD38⁻ (0,05% ± 0,05%), CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} (0,05% ± 0,05%), CD34⁺/CD38⁻/ALDH^{br} (0,03% ± 0,05%) und ALDH^{br}/CD34⁺ (2,75% ± 1,43%). Die Streubreite bei den Werten für CD34 positive Zellen

innerhalb der ALDH^{br}-Population (CD34⁺(ALDH^{br})) war allerdings etwas größer (35,05% ± 14,74%).

In Tabelle 4.13 werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Zellpopulationen gesunder Kontrollpatienten, den Werten von leukämisch erkrankten Patienten gegenüber gestellt.

Population	Kontroll-Patienten (n=7)	Leukämie-Patienten (n=59)
ALDH ^{br}	8,19% ± 2,48%	14,08% ± 25,74%
CD34 ⁺	6,96% ± 4,08%	46,00% ± 37,75%
CD34 ⁺ /CD38 ⁻	0,05% ± 0,05%	3,63% ± 12,43%
CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CD45 ^{dim/neg}	0,05% ± 0,05%	3,61% ± 12,41%
CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /ALDH ^{br}	0,03% ± 0,05%	1,43% ± 6,45%
ALDH ^{br} / CD34 ⁺	2,75% ± 1,43%	5,24% ± 14,90%
CD34 ⁺ (ALDH ^{br})	35,05% ± 14,74%	44,51% ± 30,00%

Tab. 4.14: Kontroll-Patienten vs. Leukämie-Patienten

Vergleich der Werte in den jeweiligen Populationen (Mittelwert ± SA) von 7 nicht leukämisch erkrankten KM-Proben vs. 59 ALL-Erstdiagnosen und akute Rezidive.

Der t-Test zum Vergleich der Mittelwerte zwischen Kontroll- und Leukämiepatienten ergab nur für die Population CD34⁺ einen signifikanten Unterschied. Der t-Wert betrug 2,72 mit einer Zufallswahrscheinlichkeit p<0,01. Bei allen weiteren Populationen war kein signifikanter Unterschied zwischen den ALL-Patienten und den gesunden Kontrollproben erkennbar.

Die folgende Abbildung verdeutlicht die Unterschiede zwischen Kontrollproben und Leukämien. Stellvertretend werden die Werte für ALDH^{br} und CD34⁺ dargestellt. Es ist zu beachten, dass für die ALDH^{br}-Werte zwischen den Kontrollpatienten und den ALL-Proben kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte, ein hoch signifikanter Unterschied besteht jedoch für die Population CD34⁺.

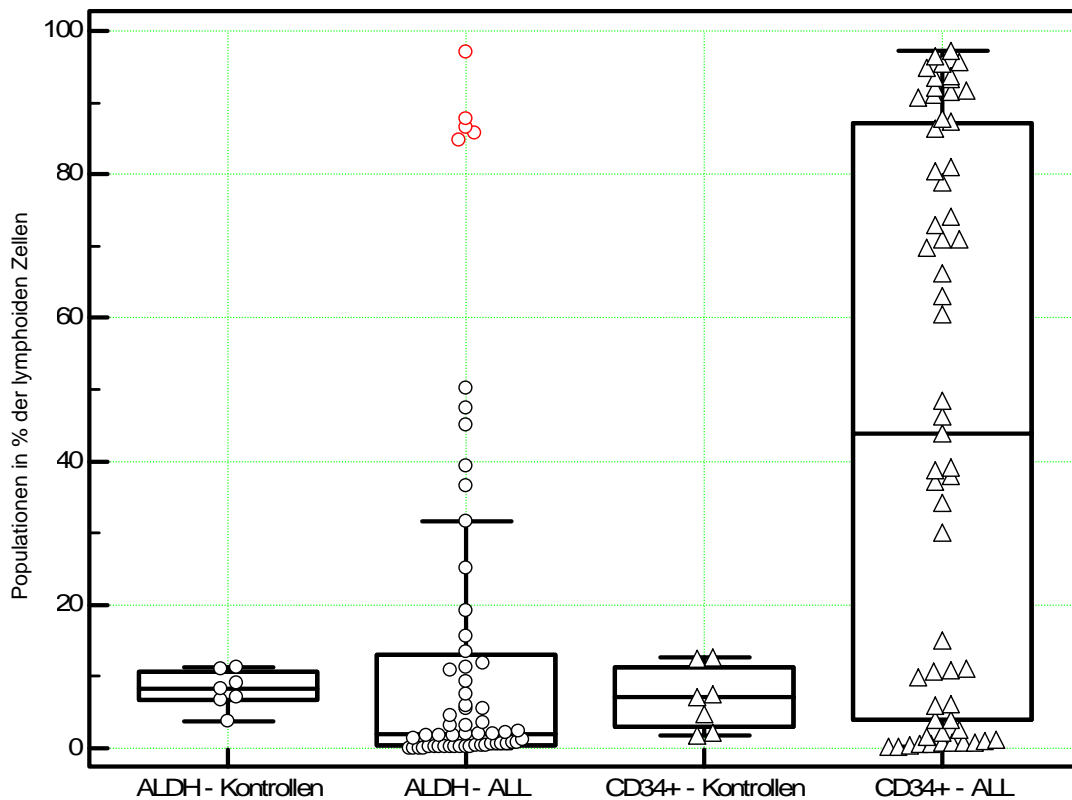


Abb. 4.11: Kontroll-Patienten vs. Leukämie-Patienten

Vergleichende Darstellung der Populationen $ALDH^{br}$ und $CD34^+$ im Box-and-Whisker-Plot. Die Werte der einzelnen Proben sind als kleine Kreise ($ALDH^{br}$) bzw. als Dreiecke ($CD34^+$) dargestellt und geben den Anteil der jeweiligen Population in % der lymphoiden Zellen wieder. Die Kontrollpatienten sind links der ALL-Proben angezeigt und beschriftet. Boxen umspannen den Bereich in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Der Median ist als durchgehender Strich innerhalb der Box eingezeichnet. Die Antennen erstrecken sich maximal bis zu einem 1,5-fachen Interquartilsabstand. Es ist zu beachten, dass für die $ALDH^{br}$ -Werte zwischen den Kontrollpatienten und den ALL-Proben kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte, jedoch für die Population $CD34^+$.

5 Diskussion

Die Rolle leukämischer Stamm- und Progenitorzellen in der Krankheits- und Rezidiventstehung der ALL im Kindesalter ist Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion. Bei vielen Leukämieformen und anderen Malignomen wird gegenwärtig eine Subpopulation mit Stammzeleigenschaften vermutet, welche das Tumorwachstum aufrecht erhält [90]. Die meisten Therapiemodalitäten zum heutigen Zeitpunkt richten sich gegen die Tumormasse und lassen diese spezielle Subpopulation unberücksichtigt. Doch genau dies könnte der Schlüssel zur Erklärung von schlechtem Therapieansprechen und dem Auftreten von Rezidiven sein [27]. Guzman et al. zeigten in einer Studie, dass sich 96% der putativen LSCs, welche über den Phänotyp $CD34^+/CD38^-/CD123^+$ definiert waren, in der G0-Phase des Zellzyklus befanden. Dieser Zustand schützt die putativen LSCs vor den Wirkungen der üblichen Zellzyklus-spezifischen Chemotherapeutika [91]. Für die AML sind leukämische Stammzellen recht gut beschrieben, deren Existenz und Relevanz bei der ALL ist allerdings nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert [92]. Mehrere Publikationen beschreiben stammzellartige ALL-Subpopulationen mit unreifem Phänotyp, während andere Arbeiten davon ausgehen, dass die meisten leukämischen Zellen zur Bildung neuer Blasten fähig sind. Zudem ist unklar, ob Krebs-Stammzellen Abkömmlinge einer Gewebe-spezifischen Stammzelle nach maligner Transformation sind, von veränderten Progenitorzellen abstammen oder von differenzierten Zellen mit zurückerworbener Stammzeleigenschaft ausgehen [93]. Leukämische Stammzellen sind durch ihre Fähigkeit charakterisiert, nach Xenotransplantation in immundefiziente Mäuse erneut Leukämien erzeugen zu können [92]. Cobaleda et al. gelang es beispielsweise mit primitiven Blasten des Immunphänotyps $CD34^+/CD38^-$, eine Philadelphia-Chromosom positive ALL in NOD/SCID-Mäuse zu transplantieren [94]. Daraus wurde zunächst der Schluss gezogen, dass sich LSCs genauso wie normale HSCs innerhalb dieser Population befinden. In weiteren Studien wurde die These vertreten, dass normale HSCs sich mit LSCs einige Oberflächen-Marker teilen, andere Oberflächen-Marker aber verschieden seien. Sowohl HSCs als auch LSCs

exprimieren CD34, wohingegen CD90 und CD117 nur auf HSCs und CD123 nur auf LSCs exprimiert werden [27]. Le Viseur et al. gelang nachfolgend unter anderem auch die Transplantation einer ALL in NOD/SCID-Mäuse mit der Population CD34⁻/CD19⁺ [72]. Diese Population war bemerkenswerterweise ebenfalls dazu fähig, den gesamten Immunphänotyp der ursprünglichen Leukämie zu erzeugen. Die Beobachtung führte zu der Annahme, dass ALL-Blasten möglicherweise Stammzeleigenschaften zurückgewinnen können bzw. doch einem stochastischen Modell folgen [92]. Eine genaue Identifikation leukämischer Stammzellen bei der ALL durch die Kombination von Oberflächenmarkern scheint jedoch nicht möglich zu sein. Die bestehenden Unterschiede zwischen den Arbeitsgruppen, in der Möglichkeit Leukämien zu transplantieren, mögen jedoch neben der Heterogenität leukämischer Stammzellen unter den verschiedenen ALL-Formen auch durch Unterschiede im NOD/SCID-Modell bedingt sein [73, 92].

Im Rahmen unserer Studie untersuchten wir Knochenmark-Proben gleichzeitig sowohl mit Oberflächen-Antikörpern, als auch mit funktionellen Nachweismethoden für Stamm- und Progenitorzellen. Als Oberflächen-Antigene dienten CD34, CD38 und CD45. Für den funktionellen Nachweis wurde Aldefluor[®] eingesetzt, ein Reagens zum Nachweis erhöhter ALDH-Aktivität. Dieses Enzym wird in hämatopoetischen Stammzellen wesentlich stärker exprimiert, als in den ausgereiften Zellen des peripheren Blutes. Funktionelle Stammzell-Marker, wie beispielsweise Aldefluor[®], sind zum Nachweis leukämischer Stammzellen wegen der inkonstanten Expression der Oberflächenmoleküle bei leukämischen Blasten möglicherweise vorteilhaft [62].

5.1 Diskussion der Messergebnisse

Beim Vergleich der gemessenen Werte mit der Arbeit von Ahlers [40] zeigten sich nahezu konstante Ergebnisse der einzelnen Populationen. Dies war sowohl innerhalb der leukämischen Proben, als auch für die Kontrollproben, die von nicht leukämisch erkrankten Patienten stammten, nachzuweisen. Diese Resultate bestätigten somit die Reproduzierbarkeit unserer Versuche, in denen wir klar verschiedene leukämische Subpopulationen nachweisen konnten.

Die Verteilung der verschiedenen Populationen in den Leukämien ist nicht gleichförmig. Zwar lagen die Werte für die Population ALDH^{br} größtenteils in einem Bereich von 0%-15% (Mittelwert 14,80%, Median 2,05%), dennoch gab es Ausreißer, die weit über den üblichen Zahlen lagen. Ähnliche Ergebnisse beobachtete Cheung et al. in KM-Proben von AML-Patienten. Bei etwa einem Drittel der Proben bestanden große ALDH^{br}-Populationen mit einem Median von 14,89% (Bereich: 5,65-48,01%), die in der Mehrzahl ebenfalls eine Koexpression von CD34 aufwiesen. In den übrigen Fällen war die ALDH-Aktivität deutlich niedriger oder nicht nachweisbar. In den wenigen untersuchten Fällen bei ALL-Patienten konnte jedoch keine vermehrte ALDH-Aktivität nachgewiesen werden [95].

Aufgrund der großen Variabilität in der Expression der ALDH-Aktivität nehmen wir an, dass erhöhte ALDH-Aktivität nicht ein Stammzell-spezifisches Merkmal sein muss, sondern auch eine intrinsische Aktivität leukämischer Blasten mancher Leukämien sein könnte. Eine weitere Erklärung bestünde darin, dass es sich bei den Leukämien mit stark erhöhter ALDH-Aktivität um ein bestimmtes Entwicklungsstadium der unreifen Blasten handelt, dessen Auswirkung auf die Prognose nicht eindeutig geklärt ist. Demgegenüber steht die Beobachtung von Cheung et al., die in den AML-Fällen mit hoher ALDH-Aktivität signifikant mehr zytogenetische Aberrationen und besseres Anwachsen nach Transplantation in NOD/SCID-Mäusen feststellten. Es wurde postuliert, dass es sich dabei um LSCs handelt, deren Existenz und Nachweis mit einer schlechteren Prognose verbunden ist [95].

Dass die Werte für die ALDH-Aktivität in den selbst gemessenen Proben etwas höher liegen als bei Ahlers [40], erklärt sich möglicherweise aus der großzügigeren Lage des Gates bei der Auswertung bzw. dem eventuellen Unterschied der Färbung frischer Patientenproben ohne längere Lagerung in kryokonserviertem Zustand. Zudem waren die Gates in der Auswertung nicht immer zweifelsfrei eindeutig zu setzen aufgrund nahe beieinander liegender Populationen und Schwierigkeiten bei der Kompensation des enzymatischen Markers (vgl. 3.7). Dass die Unterschiede dennoch recht klein sind, veranschaulicht Abbildung 4.1.

Das wichtigste Ergebnis der Kontrollproben waren die weiterhin konstanten Werte mit nur sehr geringer Streubreite. Im t-Test konnte kein signifikanter Unterschied der ALDH^{br}-Werte der Kontrollen zu den ALDH^{br}-Werten der leukämischen Proben festgestellt werden (vgl. Abb. 4.11). Gentry et al. gibt ALDH^{br}-Werte in Knochenmark-Proben gesunder Erwachsener mit durchschnittlich 1,2% an, während die Werte unserer Arbeitsgruppe von 8,19% höher liegen [96]. Unter Berücksichtigung der Unterschiede im Versuchsprotokoll liegen sie aber in ähnlicher Größenordnung. Gentry et al. führten ihre Versuche nach Lyse der Erythrozyten ohne Ficoll-Dichtezentrifugation durch und berechneten die Werte nach Ausschluss toter Zellen bezogen auf alle kernhaltige Zellen. Unser Durchschnittswert in den Kontrollproben mit 8,19% bezog sich nach Ficoll-Dichtezentrifugation auf den Anteil der lebenden lymphoiden Zellen, weshalb die von uns angegebenen Werte plausibel erklärbar höher sind. Weiterhin ist der physiologische Anteil an ALDH^{br}-Zellen im Knochenmark gesunder Kinder nicht ausreichend untersucht und möglicherweise deutlich höher als bei Erwachsenen. Referenzwerte im Vergleich zu Erwachsenen sind jedenfalls nicht verfügbar.

Die Population CD34⁺ wies bei den leukämischen Proben eine enorme Streubreite auf. Ein deutlicher Unterschied zu den leukämischen Proben war in den Kontrollfärbungen zu beobachten. Der Mittelwert der Kontrollproben lag bei 6,96%, die Standardabweichung betrug 4,08%. Für die leukämischen Proben ergaben sich mit 46,00% ± 37,75% deutlich höhere Werte für CD34⁺-Zellen. Im t-Test erwies sich diese Differenz mit einer Zufallswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ als hoch signifikant (vgl. 4.4). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass einige Leukämien CD34 konstitutionell exprimieren, andere Leukämien exprimieren CD34 nicht oder nur auf einem Teil der Blasten. Somit kann allein mit dem Oberflächenmarker CD34 generell keine konkrete Aussage zur Höhe einer putativen Stammzell-Population oder der Blasten getroffen werden. Erhöhte Werte sind aber sicher pathologisch. Eine prognostische Relevanz für Leukämien deren Blasten CD34 exprimieren kann nach einer Untersuchung von Vanhaeke et al. allerdings nicht nachgewiesen werden [97].

Bei den analysierten ALL-Proben betrug der durchschnittliche Anteil der CD34⁺-Zellen an der ALDH^{br}-Population (CD34⁺ (ALDH^{br})) 49,90%. Auch dieser Wert lag in ähnlicher Größenordnung wie die in der Vorstudie erhobenen Daten [40]. Durch die enorme Streuung der Werte ließ sich jedoch kein Rückschluss auf ein konstantes Verhältnis zwischen den beiden Populationen ziehen. Es scheint sich vielmehr bei der Koexpression von CD34 innerhalb der ALDH^{br}-Population um eine Leukämie-spezifische Eigenschaft der Blasten zu handeln, welche von Leukämie zu Leukämie unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Storms et al. fanden unter Nabelschnurblut-Zellen, welche eine Koexpression von ALDH^{br} und CD34⁺ aufwiesen, besonders viele koloniebildende Zellen [98].

In den Populationen CD34⁺/CD38⁻ und CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} fanden sich jeweils nahezu konstante Werte beim Vergleich der eigenen Proben mit den Proben von Ahlers [40]. Dies gilt sowohl für die Leukämien, als auch für die Kontrollproben. In einer bisher unveröffentlichten Studie einer chinesischen Arbeitsgruppe an 112 ALL-Patienten lag der Anteil der Population CD34⁺/CD38⁻ bei 4,57% der mononukleären Zellen. Unsere Werte liegen in einer ähnlichen Größenordnung mit 3,61% der MNCs. In Nabelschnurblut betrug der Mittelwert für CD34⁺/CD38⁻-Zellen 0,6% ± 0,2 (n=14) [99], was in etwa den Werten unserer Kontrollpatienten entspricht (0,05% ± 0,05, n=7). Weshalb die Werte in den leukämischen Proben höher liegen, ist möglicherweise der Tatsache geschuldet, dass bei der ALL viele Blasten CD38 unterexprimieren und es deshalb zu artefiziellen Überschneidungen der putativen LSCs und normalen Blasten kommt [100].

Um Hinweise für die Korrelation der beiden konkurrierenden Stammzell-Marker ALDH^{br} und CD34⁺/CD38⁻ zu erhalten, wurde eine Pearson-Korrelation durchgeführt. Wenngleich es sich nicht um die identische Population handelt, da die Überschneidung der Zellen nur teilweise gegeben ist, wurden durch beide Marker bereits Zellen mit Stammzeleigenschaften nachgewiesen [39]. Eine lineare Beziehung wäre daher durchaus plausibel. Ein hochsignifikanter linearer Zusammenhang zwischen den beiden Populationen (r=0,69, p<0,005) konnte jedoch nur innerhalb der selbst gemessenen Proben festgestellt werden, für die Proben-Gesamtheit liegt die Korrelation deutlich niedriger (r=0,25,

$p < 0,03$) (vgl. Tab. 4.5). Ahlers hingegen konnte in seiner Arbeit zuvor nur für Proben mit geringer ALDH^{br}-Aktivität (ALDH^{br} < 1%) einen signifikanten Zusammenhang mit der Population CD34⁺/CD38⁻ ($r = 0,68$, $p < 0,001$) feststellen [40], das Korrelationsmaß in der Proben-Gesamtheit lag erneut niedriger ($r = 0,59$, $p < 0,002$) (vgl. Tab. 4.5). Eine Erklärung hierfür würde wieder die Annahme bringen, dass durch den Nachweis einer erhöhten ALDH-Aktivität nicht zwangsläufig eine stammzellspezifische Eigenschaft abgeleitet werden kann und somit nicht zwingend eine Überschneidung der Expression von CD34⁺/CD38⁻ vorliegen muss. Die Korrelation von ALDH^{br} mit CD34⁺/CD38⁻/CD45^{dim/neg} zeigte keine Verbesserung des Zusammenhangs. Christ et al. führten Analysen mit menschlichen Nabelschnurzellen durch und konnten zeigen, dass nach Linage-Depletion >80% der ALDH^{br}-Population auch CD34 exprimierten und etwa ein Drittel der Zellen zur Population CD34⁺/CD38⁻ gehörten [99]. Die ALDH-Aktivität in der Population CD34⁺/CD38⁻ war durchschnittlich höher im Vergleich zur Population CD34⁺/CD38⁺. Umgekehrt gehörten 71% der CD34⁺ und ein Drittel der CD34⁺/CD38⁻ nicht zur Population ALDH^{br}. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die ALDH-Aktivität primitive Zellen markiert, aber nicht perfekt mit einem der bekannten Immunphänotypen für primitive Zellen korreliert [99].

Um zu zeigen wie ein gesundes Knochenmark im Gegensatz zu Blasten aussieht, wurde eine vergleichende Messung durchgeführt. Bei einem Patienten mit T-Zell-NHL wurde die Suspension eines betroffenen Lymphknotens nach der gleichen Methode wie die KM-Proben verarbeitet. Zytomorphologisch fanden sich viele Lymphoblasten im Lymphknoten, mindestens 70% (vgl. 4.3.1). Im Knochenmark dieses Patienten wurden morphologisch keine Blasten festgestellt. Den deutlichsten Unterschied der Blastenpopulation im Vergleich zu den gesunden Zellen im Knochenmark bot der Oberflächen-Marker CD34 (70,11% vs. 1,37%). Dieses Phänomen ist durch die aberrante Expression der Oberflächenmoleküle bei Blasten zu erklären. Die Werte für putative Stammzellen ließen allerdings keine so deutlichen Unterschiede erkennen. Im befallenen Lymphknoten lag die Aktivität der ALDH niedriger als im Knochenmark (6,40% vs. 11,89%), die Population CD34⁺/CD38⁻ war in beiden

Proben sehr gering ausgeprägt (0,15% vs. 0,06%). Somit lässt sich alleine durch die Frequenz der Zellen mit zugeschriebener Stammzelleigenschaft nicht prinzipiell zwischen Blasten und gesunden Proben differenzieren.

In einem weiteren Vergleich wurde peripheres Blut und Knochenmark einer Patientin mit neu diagnostizierter ALL untersucht. Durch die Ergebnisse dieser Messung konnte gezeigt werden, dass es sich bei den unreifen LSC-artigen Zellen nicht um hämatopoetische Zellen des Knochenmarks handelt, sondern in der Tat um eine leukämische Subpopulation, die auch peripher nachweisbar ist. Die Werte jeglicher dargestellten Population (vgl. Abb. 4.9) lagen im peripheren Blut bis auf die Ausnahme bei CD45 über den Werten im Knochenmark. Zytomorphologisch lag die Anzahl der Blasten im peripheren Blut bei 60% und im KM bei 89%. Die Analysen fanden jedoch nach Ficoll-Dichtezentrifugation statt, so dass die quantitativen Unterschiede zwischen den beiden Proben am ehesten dadurch bedingt und zu erklären sind.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im Rahmen der vorliegenden Studie klar und reproduzierbar verschiedene leukämische Subpopulationen gemessen werden konnten. Ob unter den verwendeten Marker-Kombinationen prognostisch relevante Populationen oder LSC-artige Zellen vorliegen, wurde durch Korrelation mit dem klinischen Verlauf bzw. dem MRD-Level untersucht.

5.2 Korrelation mit dem MRD-Level

Die klinischen Endpunkte Rezidiv, Tod und Therapieversagen sind bei kindlichen ALL-Erkrankungen erfreulicherweise insgesamt recht selten. Da sie als Korrelationsparameter für Therapieverlauf und Prognose daher eine große Stichprobe beziehungsweise lange Nachbeobachtungszeiten erfordern würden, korrelierten wir die jeweiligen Subpopulationen mit dem MRD-Level, welches nachweislich eng mit der Prognose korreliert [101].

Zunächst wurden die Patienten mit Erstdiagnose ausgewählt, für die MRD-Bestimmungen gemäß dem in Tübingen etablierten ALL-BFM-Protokoll vorlagen. Nicht bei allen Patienten gelingt die MRD-Methode mittels PCR, was unterschiedliche Gründe haben kann, beispielsweise zu wenig Probenmaterial

oder das Fehlen eines geeigneten Targets [102]. Um die Aussagekraft der Daten zu erhöhen, wurden die eigenen Daten erneut mit den Daten von Ahlers kombiniert. Dabei wurde die Gesamtzahl der Erstdiagnose-Proben auf 51 erhöht. Die Korrelation der ALDH^{br}-Population bei Erstdiagnose mit dem MRD-Level am Tag 33 führte zu keinem signifikanten Ergebnis. Dennoch konnte erneut für die Proben mit niedriger ALDH-Aktivität (ALDH^{br}<1%) ein signifikanter Zusammenhang zum MRD-Level an Tag 33 festgestellt werden ($r=0,52$, $p<0,01$). Der Grenzwert mit 1% wurde analog zu Daten von Pearce et al. gewählt [61]. Bei erwachsenen Leukämiepatienten stellten sie bei Leukämien mit geringem ALDH^{br}-Anteil (<1%) fest, dass der Anteil CD34⁺-Zellen innerhalb der ALDH^{br}-Population signifikant größer war, als bei Leukämien mit hoher ALDH-Aktivität. Anhand dessen könnte davon ausgegangen werden, dass es sich dabei vermehrt um eine Population mit Stammzeleigenschaften handelt. Allerdings wiesen sie bei nachfolgender Transplantation in Mäuse nach, dass es sich dabei ebenso um physiologische HSCs handelt. So konnte dadurch keine leukämiespezifische unreife Population nachgewiesen werden. Eine Erklärung für unsere Ergebnisse könnte darin liegen, dass es sich bei niedrigen Aldefluor®-Werten vermehrt um eine Stammzeleigenschaft handelt, deren Frequenz prognostische Relevanz hat. Bei hohen Werten hingegen ist eher von einer intrinsischen Aktivität der Leukämieform auszugehen.

Die Korrelation der Höhe des Oberflächenmarkers CD34⁺ mit den MRD-Werten von Tag 33 wies keinen signifikanten Zusammenhang auf. Dies war ebenfalls, wie bereits erwähnt, von Vanhaeke et al. gezeigt worden [97]. Allerdings wies die Korrelation der Population mit der Kombination CD34⁺/CD38⁻ einen Pearson-Koeffizienten von $r=0,31$ ($p=0,01$) auf. Auch wenn es sich bei dieser Marker-Kombination nicht spezifisch um leukämische Stammzellen handelt, so könnte diese Subpopulation möglicherweise doch therapieresistenter als andere Populationen sein. Wie oben schon beschrieben wird davon ausgegangen, dass leukämische Stammzellen durchaus eine große Zahl an Oberflächen-Markern mit normalen HSCs teilen [103, 104]. Deshalb erscheint es auch plausibel, dass unter der Population CD34⁺/CD38⁻ ebenfalls leukämische Zellen mit Stammzeleigenschaft vorhanden sind.

Der weitere Versuch zur genaueren Identifizierung der leukämischen Subpopulation erbrachte keine bessere Korrelation zum MRD-Level, dem gewählten Parameter zur Abschätzung der Prognose. Es zeigten sich für die Subpopulation $CD34^+/CD38^-/CD45^{dim/neg}$ annähernd gleiche Korrelationswerte. Etwas schwächer, aber dennoch signifikant waren die Korrelationswerte für die Subpopulation $CD34^+/CD38^-/ALDH^{br}$ mit dem MRD-Level ($r=0,27$, $p=0,03$). Dies könnte auf den höheren Anteil gesunder HSCs in der Kombination dieser Marker zurückzuführen sein. Unserer Erwartung nach wäre ein hoher Anteil leukämischer Progenitorzellen mit einer schlechteren Prognose verbunden, während gesunde HSCs eher positiv für die Erholung des hämatopoetischen Systems nach der zytoreduktiven Therapie zu werten sind. Gerber et al. beschrieben kürzlich eine zusätzliche Population $CD34^+/CD38^-/ALDH^{int}$, die sie bei bestimmten Formen der AML im Erwachsenen-Alter feststellen konnten [74]. Demnach lagen diese Zellen bei selektiver Darstellung der Population $CD34^+/CD38^-$ „intermediär“, also zwischen den Populationen mit hoher und niedriger ALDH-Aktivität und waren bei Gesunden nicht nachweisbar. Weitere Untersuchungen belegten die zytogenetische Anomalität dieser Population und zeigten einen Zusammenhang zwischen der Persistenz dieser Zellen nach Therapie und dem Auftreten von Rezidiven [74]. In den Folgeproben der Patienten, die im Verlauf ein Rezidiv entwickelten, reicherte sich die Population $CD34^+/CD38^-/ALDH^{int}$ relativ zu den übrigen Tumorzellen an. Bei Patienten mit anhaltender klinischer Remission verschwand diese Population [74]. Diese Beobachtung stützte deren These, dass es sich bei diesem Phänotyp um LSCs handeln könnte. In unseren Analysen an kindlichen ALL-Patienten stellten wir ebenfalls fest, dass sich die Gesamtpopulation nur selten in distinkte Gruppen mit hoher und niedriger ALDH-Aktivität einteilen ließ. Allerdings konnte aufgrund einer Verschmelzung der intermediären Population keine eindeutige Abgrenzung dieser erzielt werden. Dies könnte dem Unterschied im Versuchsprotokoll geschuldet sein, da Gerber et al. die weiteren Analyseschritte erst nach Anreicherung von $CD34^+$ - Zellen durchführten.

5.3 Verlaufspuben

Um die prognostische Relevanz der Population $CD34^+/CD38^-$ weiter zu untersuchen, führten wir die Messungen an Proben von Patienten nach Therapiebeginn durch. Sollten sich prognostisch relevante Zellen in dieser Population befinden, so wäre ihr Verhalten insbesondere in der frühen Induktionsphase der Therapie interessant. Während sich diese Zellen bei Patienten, die zu einem späteren Zeitpunkt ein Rezidiv erleiden, als relativ Therapieresistent erweisen würden, müsste diese Population bei dauerhaft geheilten Patienten erfolgreich zurückgedrängt worden sein. Die gleiche Theorie wurde in schon genannter Arbeit von Gerber et al. [74] gezeigt, bei welcher die Persistenz der Population $ALDH^{int}$ mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert war, und ist nicht zuletzt bei der Bestimmung der MRD gängig [105]. Unter dieser Annahme untersuchten wir 27 Proben von 11 Patienten, bei denen geeignete Folgeproben gesammelt werden konnten (vgl. 4.2). Die Kohorte bestand sowohl aus Patienten mit Erstdiagnose einer ALL als auch aus Patienten mit akuten Rezidiven. Es ließ sich beobachten, dass die Population $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ bei einem Teil der Patienten im Verlauf deutlich abnahm. Bei anderen Patienten blieb der relative Anteil dieser Population entweder konstant, nahm zu oder wurde nur geringfügig kleiner. Unter der willkürlichen Festlegung, dass eine deutliche Reduktion der Population ab 50% im Vergleich zur Erstdiagnose vorliegt, testeten wir als klinischen Endpunkt das Auftreten eines erneuten Rezidivs mit dem Fishers-Exact-Test (vgl. Tab. 4.11). Mit einer Zufallswahrscheinlichkeit von $p < 0,005$ korreliert das Rezidivrisiko mit dem Abfall der Population $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ um weniger als 50%, während bei einem Abfall der Population um mehr als 50% das Risiko für ein erneutes Rezidiv niedriger ist. Dieses Ergebnis untermauert unsere These, dass diese Population prognostisch relevant ist. Demgegenüber stehen die Schlussfolgerungen einer Studie von Wilson et al. [100]. Sie untersuchten Knochenmarkproben einer Studienkohorte von 48 Patienten mit kindlicher B-ALL auf das Vorliegen einer putativen LSC-Population mit dem Phänotyp $CD34^+/CD38^-/CD19^+$ bei Diagnosestellung und nach Abschluss der Induktionstherapie. Eine signifikante Zellpopulation dieses Phänotyps konnte allerdings nur in 60% der

diagnostischen Proben beobachtet werden und war zudem eng mit der Unterexpression von CD38 verknüpft, eine häufige phänotypische Eigenschaft leukämischer Blasten. Bei einigen Patienten mit positivem MRD-Level nach Induktionstherapie konnte in der Studie eine Anreicherung dieser Population beobachtet werden. Das fehlende Vorhandensein dieser Population in anderen MRD-positiven Proben und in 40% der Erstdiagnosen ließ die Autoren aber darauf schließen, dass durch den Nachweis dieses Phänotyps kein allgemeingültiger Marker zum Monitoring von LSCs in der MRD-Phase gegeben ist [100]. Ob es sich nun bei der gefundenen Zellpopulation um LSC handelt oder nicht, können wir nicht beantworten. Unsere Ergebnisse weisen jedoch klar auf eine prognostisch relevante Subpopulation hin, welche sich bei Patienten mit Rezidiv angereichert und folglich resistenter gegenüber der erfolgten Chemotherapie gezeigt hat. Wir nehmen an, dass zumindest bei einem Teil der Leukämien, neue Blasten aus dieser resistenteren Population hervorgehen. Neue und gezieltere Studien an einer größeren Kohorte müssen diesen Zusammenhang festigen.

5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Studie finden wir Hinweise für eine prognostisch relevante unreife Population leukämischer Zellen in kindlichen ALL-Erkrankungen. Analysen weiterer Proben im Therapieverlauf können Klarheit über die Stärke des Zusammenhangs zwischen Persistenz dieser putativen Stammzellpopulation und der Krankheitsprognose bringen. Die beiden Oberflächenmarker CD34 und CD38 werden erfreulicherweise im Rahmen der routinierten MRD-Bestimmungen meist ohnehin klinisch eingesetzt. Somit könnte eine prospektive Studie die dargestellten Ergebnisse mit hohen Fallzahlen stützen. Gegebenenfalls könnte sogar die erneute Analyse von bereits erhobenen MRD-Daten retrospektiv zur Festigung der These herangezogen werden. Sollte sich der Zusammenhang zwischen der Population $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ und der Prognose verfestigen, wäre damit eine neue wertvolle Option zum Monitoring der Therapie kindlicher ALL gefunden. Dieses Vorgehen wäre kostengünstiger und weniger aufwendig als die bisherige PCR-Variante MRD-Messmethode. Darüber hinaus könnten neue Verfahren entwickelt werden, welche die Bestimmung der Toxizität verschiedener Zytostatika für die individuelle Leukämieform ermöglichen, beispielsweise mittels Zellkulturen der Population $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ unter Zumischung verschiedener Zytostatika im Medium. Die genauere Analyse der Population $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ könnte zudem neue Aufschlüsse zur Unterscheidung zwischen putativen LSCs und den gesunden HSCs des Knochenmarks bringen. Obwohl in dieser Studie vermutlich eine Population mit hohem prognostischem Wert identifiziert werden konnte, kann die offene Frage der Tumormodelle letztlich nicht beantwortet werden. Unsere Ergebnisse weisen dennoch auf eine Subpopulation hin, deren Existenz als Argument für das CSC-Modell in der kindlichen ALL zu werten ist.

6 Zusammenfassung

Die Entstehung und Aufrechterhaltung von Krebserkrankungen scheint bei vielen Malignomen sogenannten Krebs-Stammzellen (CSCs) zugeschrieben werden zu können. Ob sich bei der ALL im Kindesalter eine bestimmte Subpopulation finden lässt oder ob der Großteil der leukämischen Blasten zur Teilung fähig ist, wird in der aktuellen wissenschaftlichen Forschung diskutiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 18 Erstdiagnose-KM-Proben von kindlichen ALL-Patienten durchflusszytometrisch auf Stammzell-Merkmale untersucht. Hierfür wurden verschiedene Kombinationen der Oberflächenmarker CD34, CD38 und CD45, sowie zum funktionellen Nachweis einer erhöhten ALDH-Aktivität bei Stammzellen das Reagens Aldefluor[®] eingesetzt. Neben konkordanten Ergebnissen beim Vergleich mit der Vorarbeit von Ahlers, welche die Reliabilität unserer Methode bestätigen, konnten 9 Proben zur Erweiterung seiner Korrelation mit dem klinischen Verlauf kindlicher ALL-Erkrankungen verwendet werden. Unter Zusammenschau der Ergebnisse korrelierte die Höhe der leukämischen Population CD34⁺/CD38⁻ bei Diagnosestellung hoch signifikant ($p=0,01$) mit dem MRD-Level der Verlaufsproben und folglich mit der Prognose ($n=51$). Zudem konnten wir nachweisen, dass bei Leukämien mit insgesamt niedriger ALDH-Aktivität ($<1\%$), die Frequenz der ALDH^{br}-Population hoch signifikant mit dem MRD-Level korreliert ($p<0,01$). Wir finden somit zwei leukämische Subpopulationen, die bei Diagnosestellung eng mit der Prognose korrelieren.

Um die Rolle der leukämischen Progenitorpopulation CD34⁺/CD38⁻ bezüglich des Therapieansprechens weiter zu charakterisieren, untersuchten wir die fakultativen Stammzellen in Verlaufsproben. Analysiert und in die Studie eingeschlossen wurden Proben von 11 verschiedenen Patienten, bei denen sowohl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als auch im Therapieverlauf bis zu Tag 40 der Therapie Folgeproben vorlagen. Mit einer Zufallswahrscheinlichkeit von $p<0,005$ korrelierte das Rezidivrisiko mit dem Verlauf der Population CD34⁺/CD38^{dim/neg}. Während bei einem relativen Abfall der Population im

Vergleich zur Erstdiagnose um weniger als 50% mit einem erneuten Rezidiv zu rechnen war, trat bei Abfall der Population um mehr als 50% kein erneutes Rezidiv auf. Unsere Daten belegen, dass die leukämische Progenitorpopulation $CD34^+/CD38^-$ bzw. $CD34^+/CD38^{dim/neg}$ nicht nur bei Diagnosestellung mit der Prognose korreliert, sondern dass es bei ungünstigem Therapieansprechen und Rezidiven unter der Therapie zu einer Anreicherung dieser Population kommt.

Der beschriebene Zusammenhang sollte prospektiv an einer größeren Stichprobe untersucht werden. Wenn sich die Ergebnisse dadurch bestätigen, könnten durch die Isolierung und funktionelle Charakterisierung dieser Population neue Therapieansätze entwickelt werden.

7 Literaturverzeichnis

Quellen

1. Sitzmann, F.C. and P. Bartmann, *Pädiatrie*. 3. Auflage ed. Duale Reihe. Vol. Duale Reihe. 2007, Stuttgart: Thieme.
2. Kaatsch, P. *Deutsches Kinderkrebsregister, Jahresbericht 2010*. 2010; Available from: <http://www.kinderkrebsregister.de/>.
3. Kaatsch, P. *Deutsches Kinderkrebsregister, Jahresbericht 2008*. 2008; Available from: <http://www.kinderkrebsregister.de/>.
4. Belson, M., B. Kingsley, and A. Holmes, *Risk factors for acute leukemia in children: a review*. *Environ Health Perspect*, 2007. **115**(1): p. 138-45.
5. Greaves, M., *Childhood leukaemia*. *BMJ*, 2002. **324**(7332): p. 283-7.
6. Richardson, R.B., *Promotional etiology for common childhood acute lymphoblastic leukemia: the infective lymphoid recovery hypothesis*. *Leuk Res*, 2011. **35**(11): p. 1425-31.
7. Poplack, D.G., MD, *Preface*. *The Pediatric Clinics of North America*, 1988. **35**(4): p. xi.
8. Wayne, A.S., K. Baird, and R.M. Egeler, *Hematopoietic stem cell transplantation for leukemia*. *Pediatr Clin North Am*, 2010. **57**(1): p. 1-25.
9. Borkhardt, A., et al., *Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group*. *Blood*, 1997. **90**(2): p. 571-7.
10. Herold, G., *Innere Medizin 2007*, Köln: Gerd Herold und Mitarbeiter.
11. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. *Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie*. 05/2008; Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-014.pdf.
12. Yiallourous, M., Dipl.-Biol. , R. Herold, Dr. med., and U. Creutzig, Prof. Dr. med. *Akute myeloische Leukämie (AML) - Kurzinformation*. 2006 03.08.2011; Available from: www.kinderkrebsinfo.de/AML_kurzinformation.

13. Campana, D. and E. Coustan-Smith, *Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry*. Cytometry, 1999. **38**(4): p. 139-52.
14. Campana, D., *Determination of minimal residual disease in leukaemia patients*. Br J Haematol, 2003. **121**(6): p. 823-38.
15. Szczepanski, T., et al., *Minimal residual disease in leukaemia patients*. Lancet Oncol, 2001. **2**(7): p. 409-17.
16. Campana, D. and C.H. Pui, *Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance*. Blood, 1995. **85**(6): p. 1416-34.
17. Bader, P., et al., *Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL*. Leukemia, 2002. **16**(9): p. 1668-72.
18. Borowitz, M.J., et al., *Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5477-85.
19. Coustan-Smith, E., et al., *Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet, 1998. **351**(9102): p. 550-4.
20. Coustan-Smith, E., et al., *Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2002. **100**(1): p. 52-8.
21. Coustan-Smith, E., et al., *Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2691-6.
22. Dworzak, M.N., et al., *Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2002. **99**(6): p. 1952-8.
23. Langebrake, C., et al., *Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group*. J Clin Oncol, 2006. **24**(22): p. 3686-92.
24. Sugg, T., *Durchflusszytometrische Bestimmung der Minimal Residual Disease bei pädiatrischen Patienten mit akuten Leukämien*, in *Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen 2011*, Eberhard Karls Universität zu Tübingen: Tübingen. p. 181.
25. Campana, D., *Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies*. Br J Haematol, 2008. **143**(4): p. 481-9.

26. Wognum, A.W., A.C. Eaves, and T.E. Thomas, *Identification and isolation of hematopoietic stem cells*. Arch Med Res, 2003. **34**(6): p. 461-75.
27. Ravandi, F. and Z. Estrov, *Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(2): p. 340-4.
28. Yin, T. and L. Li, *The stem cell niches in bone*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1195-201.
29. Chiba, S., *Hematopoietic stem cell*. Nihon Rinsho, 2008. **66**(3): p. 439-43.
30. Moore, K.A. and I.R. Lemischka, *Stem cells and their niches*. Science, 2006. **311**(5769): p. 1880-5.
31. Bruce, W.R. and B.E. Meeker, *Comparison of the sensitivity of hematopoietic colony-forming cells in different proliferative states to 5-fluorouracil*. J Natl Cancer Inst, 1967. **38**(3): p. 401-5.
32. Arai, F., A. Hirao, and T. Suda, *Regulation of hematopoietic stem cells by the niche*. Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(2): p. 75-9.
33. Morrison, S.J., N. Uchida, and I.L. Weissman, *The biology of hematopoietic stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 35-71.
34. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.
35. Christensen, J.L. and I.L. Weissman, *Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14541-6.
36. Rieger, M. and T. Schröder, *Hämatopoetische Stammzellen*. BIoSpektrum, 2007. **3**: p. 254-257.
37. Wilson, A., et al., *Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1106**: p. 64-75.
38. Ahmed, F., *Role of the ABC transporter ABCG2 in human haematopoiesis*, in *Dissertation2007*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
39. Will, B. and U. Steidl, *Multi-parameter fluorescence-activated cell sorting and analysis of stem and progenitor cells in myeloid malignancies*. Best Pract Res Clin Haematol, 2010. **23**(3): p. 391-401.
40. Ahlers, J., *Identifikation einer Zellpopulation mit Stammzellmarkern mit Korrelation zum klinischen Verlauf bei Diagnosestellung akuter kindlicher Leukämien*, in *Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen2009*, Eberhard-Karls-Universität: Tübingen. p. 119.
41. Conneally, E., et al., *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.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9836-41.
42. Goodell, M.A., et al., *Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species.* Nat Med, 1997. **3**(12): p. 1337-45.
43. Srour, E.F., et al., *Human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis.* Blood Cells, 1991. **17**(2): p. 287-95.
44. Terstappen, L.W., et al., *Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells.* Blood, 1991. **77**(6): p. 1218-27.
45. Berardi, A.C., et al., *Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells.* Science, 1995. **267**(5194): p. 104-8.
46. Craig, W., et al., *Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells.* J Exp Med, 1993. **177**(5): p. 1331-42.
47. Galy, A., et al., *Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset.* Immunity, 1995. **3**(4): p. 459-73.
48. Huang, S. and L.W. Terstappen, *Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells.* Blood, 1994. **83**(6): p. 1515-26.
49. Manz, M.G., et al., *Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11872-7.
50. Miller, J.S., et al., *Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells.* Blood, 1999. **93**(1): p. 96-106.
51. Goodell, M.A., et al., *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo.* J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1797-806.
52. Kim, M., et al., *The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(1): p. 22-8.
53. Zhou, S., et al., *The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype.* Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1028-34.
54. Jonker, J.W., et al., *Contribution of the ABC transporters Bcrp1 and Mdr1a/1b to the side population phenotype in mammary gland and bone marrow of mice.* Stem Cells, 2005. **23**(8): p. 1059-65.

55. Pearce, D.J. and D. Bonnet, *The combined use of Hoechst efflux ability and aldehyde dehydrogenase activity to identify murine and human hematopoietic stem cells*. *Exp Hematol*, 2007. **35**(9): p. 1437-46.
56. Matsui, W., et al., *Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance*. *Cancer Res*, 2008. **68**(1): p. 190-7.
57. Moshaver, B., et al., *Identification of a small subpopulation of candidate leukemia-initiating cells in the side population of patients with acute myeloid leukemia*. *Stem Cells*, 2008. **26**(12): p. 3059-67.
58. Jones, R.J., et al., *Circulating clonotypic B cells in classic Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2009. **113**(23): p. 5920-6.
59. Kastan, M.B., et al., *Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells*. *Blood*, 1990. **75**(10): p. 1947-50.
60. Jones, R.J., et al., *Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells*. *Blood*, 1995. **85**(10): p. 2742-6.
61. Pearce, D.J., et al., *Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples*. *Stem Cells*, 2005. **23**(6): p. 752-60.
62. Hess, D.A., et al., *Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity*. *Blood*, 2004. **104**(6): p. 1648-55.
63. Pierre-Louis, O., et al., *Dual SP/ALDH functionalities refine the human hematopoietic Lin-CD34+CD38- stem/progenitor cell compartment*. *Stem Cells*, 2009. **27**(10): p. 2552-62.
64. Williams, J.L., *Cancer stem cells*. *Clin Lab Sci*, 2012. **25**(1): p. 50-7.
65. Griffin, J.D., et al., *Effects of recombinant human GM-CSF on proliferation of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia*. *Blood*, 1986. **67**(5): p. 1448-53.
66. Sutherland, H.J., A. Blair, and R.W. Zapf, *Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells*. *Blood*, 1996. **87**(11): p. 4754-61.
67. Alison, M.R., et al., *Cancer stem cells: In the line of fire*. *Cancer Treat Rev*, 2012.
68. Guzman, M.L. and C.T. Jordan, *Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia*. *Cancer Control*, 2004. **11**(2): p. 97-104.
69. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. *Nat Med*, 1997. **3**(7): p. 730-7.
70. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. *Nature*, 1994. **367**(6464): p. 645-8.

71. Adams, J.M. and A. Strasser, *Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones?* *Cancer Res*, 2008. **68**(11): p. 4018-21.
72. le Viseur, C., et al., *In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties.* *Cancer Cell*, 2008. **14**(1): p. 47-58.
73. Vormoor, H.J., *Malignant stem cells in childhood acute lymphoblastic leukemia: the stem cell concept revisited.* *Cell Cycle*, 2009. **8**(7): p. 996-9.
74. Gerber, J.M., et al., *A clinically relevant population of leukemic CD34+CD38- cells in acute myeloid leukemia.* *Blood*, 2012.
75. Boyum, A., *Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages.* *Scand J Immunol*, 1976. **Suppl 5**: p. 9-15.
76. Witte, K. *Mündliche Mitteilung.* 2010.
77. Stemcell Technologies. *Aldefluor™ - Aldehyde Dehydrogenase - Based Cell Detection Kit* August 2011 [cited 2012 07.03.2012]; Product information sheet]. Available from: http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/B/2/E/4/2/29888PIS_1_1_0.ashx.
78. BD Biosciences. *Fluorescence Spectrum Viewer for Multicolor Flow Cytometry.* [cited 2012 07.03.2012]; Available from: http://www.bdbiosciences.com/eu/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp.
79. Linkenheld, C. *Basiswissen rund um die Fluoreszenz.* 2002 [cited 2012 06.03.2012]; Available from: <http://www.mikroskopie.de/kurse/fluoreszenz/elektron.html>.
80. Lacombe, F., et al., *Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia.* *Leukemia*, 1997. **11**(11): p. 1878-86.
81. Pathology Outlines.com. *Pathology Outlines.* 2011 06.02.2011 [cited 2012 10.03.2012]; Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd34.html>.
82. Gangenahalli, G.U., et al., *Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing.* *Stem Cells Dev*, 2006. **15**(3): p. 305-13.
83. Chini, E.N., *CD38 as a regulator of cellular NAD: a novel potential pharmacological target for metabolic conditions.* *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(1): p. 57-63.
84. Malavasi, F., et al., *Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology.* *Physiol Rev*, 2008. **88**(3): p. 841-86.
85. Hermiston, M.L., J. Zikherman, and J.W. Zhu, *CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells.* *Immunol Rev*, 2009. **228**(1): p. 288-311.

86. BD Biosciences. *BD FACSAria User's Guide*. [Users Manual] 2003 March 2003 [cited 2012 09.03.2012]; Part No. 333608 Rev. A:[236]. Available from: http://ncxt.lbl.gov/files/lab/BD_Aria_manual.pdf.
87. Ibrahim, S.F. and G. van den Engh, *Flow cytometry and cell sorting*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007. **106**: p. 19-39.
88. Veal, D.A., et al., *Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells*. J Immunol Methods, 2000. **243**(1-2): p. 191-210.
89. van Dongen, J.J., et al., *Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood*. Lancet, 1998. **352**(9142): p. 1731-8.
90. Dick, J.E., *Stem cell concepts renew cancer research*. Blood, 2008. **112**(13): p. 4793-807.
91. Guzman, M.L., et al., *Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2301-7.
92. Testa, U., *Leukemia stem cells*. Ann Hematol, 2011. **90**(3): p. 245-71.
93. Bernt, K.M. and S.A. Armstrong, *Leukemia stem cells and human acute lymphoblastic leukemia*. Semin Hematol, 2009. **46**(1): p. 33-8.
94. Cobaleda, C., et al., *A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2000. **95**(3): p. 1007-13.
95. Cheung, A.M., et al., *Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential*. Leukemia, 2007. **21**(7): p. 1423-30.
96. Gentry, T., et al., *Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy*. Cytotherapy, 2007. **9**(3): p. 259-74.
97. Vanhaeke, D.R., et al., *Expression and long-term prognostic value of CD34 in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia*. Leuk Lymphoma, 1995. **20**(1-2): p. 137-42.
98. Storms, R.W., et al., *Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34*. Blood, 2005. **106**(1): p. 95-102.
99. Christ, O., et al., *Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity*. Haematologica, 2007. **92**(9): p. 1165-72.
100. Wilson, K., et al., *Flow minimal residual disease monitoring of candidate leukemic stem cells defined by the immunophenotype*,

- CD34+CD38lowCD19+ in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia.* Haematologica, 2010. **95**(4): p. 679-83.
101. Steenbergen, E.J., et al., *Prolonged persistence of PCR-detectable minimal residual disease after diagnosis or first relapse predicts poor outcome in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia.* Leukemia, 1995. **9**(10): p. 1726-34.
102. van der Velden, V.H., et al., *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects.* Leukemia, 2003. **17**(6): p. 1013-34.
103. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells.* Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
104. Ebinger, M., et al., *High frequency of immature cells at diagnosis predicts high minimal residual disease level in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Leuk Res, 2010. **34**(9): p. 1139-42.
105. Hoelzer, D., et al., *Acute lymphoblastic leukemia.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2002: p. 162-92.

8 Anhang

8.1 Datentabellen

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

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

8.1.1 Kontroll-Patienten

Interne Fallnummer #	Geschlecht	Alter bei Punktion	Diagnose
51	m	7J 5M	Verdacht auf rheumatisches Fieber bei AVSD, M.Down
55	w	30J 6M	Arthritis

Tab. 8.1: Kontroll-Patienten (Eigene Analysen)

#	ALDH ^{br}	CD 34 ⁺	CD38 ⁺	CD45 ^{dim}	34 ⁺ /38 ⁻	34 ⁺ /38 ⁻ / 45 ^{dim}	ALDH ^{br} / 34 ⁺ /38 ⁻	CD34 ⁺ (ALDH ^{br})	ALDH ^{br} /34 ⁺
51	6,69	7,19	74,30	49,33	0,02	0,01	0,00	27,79	1,86
55	11,14	1,86	29,91	73,05	0,02	0,02	0,00	15,34	1,71

Tab. 8.2: Messergebnisse der Kontrollpatienten (Eigene Analysen)

Werte in % der lymphoiden Zellen, Ausnahme: (ALDH^{br}) Anteil in % der ALDH^{br}-Population

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

Tab. 8.3: Kontroll-Patienten (Ahlers)

#	ALDH ^{br}	CD 34 ⁺	CD38 ⁺	CD45 ^{dim}	34 ⁺ /38 ⁻	34 ⁺ /38 ⁻ / 45 ^{dim}	ALDH ^{br} / 34 ⁺ /38 ⁻	CD34 ⁺ (ALDH ^{br})	ALDH ^{br} /34 ⁺
1	3,67	4,72	21,98	85,26	0,03	0,03	0,02	46,38	1,70
2	11,31	12,69	88,28	63,33	0,15	0,15	0,14	50,21	5,68
3	7,16	12,43	88,58	67,39	0,08	0,08	0,06	56,77	4,07
4	8,27	7,60	73,56	99,86	0,01	0,01	0,00	28,27	2,34
5	9,06	2,26	28,23	66,47	0,05	0,03	0,00	20,75	1,88

Tab. 8.4: Messergebnisse der Kontrollpatienten (Ahlers)

Werte in % der lymphoiden Zellen, Ausnahme: (ALDH^{br}) Anteil in % der ALDH^{br}-Population. Die Messergebnisse für ALDH^{br} wurden abgeändert (vgl. 4.1).

8.1.2 ALL-Patienten Erstdiagnosen

Interne Fallnummer #	Geschlecht	Diagnose	Alter bei ED	Rezidiv (Alter)	Tod (Zeit n. ED)	MRD Tag 33	sensitive Marker
4	m	T-ALL	3J 8M			0	2
9	m	c-ALL	16J 5M			0	3
17	w	Infant-ALL	9T				
22	m	c-ALL Rezidiv	unbekannt	6J 1M			
28	m	c-ALL	17J 6M			3	4
40	m	T-ALL	13J 4M			4	2
44	m	c-ALL Rezidiv	unbekannt	26J			
62	w	T-ALL	11J 4M			3	3
64	w	c-ALL	3J 7M			3	6
65	w	c-ALL	11J 11M			0	2
67	m	c-ALL Rezidiv	7J 7M	14J 6M			
68	w	c-ALL	11J 11M		1M		
69	m	c-ALL Rezidiv	10 J 4 M	11J 5M			
70	m	c-ALL	3J 10M			0	3
71	w	c-ALL	4J 11M			0	2
72	w	T-ALL	9J				
73	m	c-ALL Rezidiv	5J 1M	10J			

Tab. 8.5: ALL-Patienten (Eigene Analysen)

Probe 67-73 wurden 2012 zur Vervollständigung der Daten nachgemessen.

#	ALDH ^{br}	CD 34 ⁺	CD38 ⁺	CD45 ^{dim}	34 ⁺ /38 ⁻	34 ⁺ /38 ⁻ / 45 ^{dim}	ALDH ^{br} / 34 ⁺ /38 ⁻	CD34 ⁺ (ALDH ^{br})	ALDH ^{br} /34 ⁺
4	3,10	0,81	89,19	80,87	0,33	0,33	0,32	24,43	0,76
9	1,79	69,68	86,47	82,22	0,35	0,26	0,05	57,11	1,02
17	39,35	30,12	83,02	82,51	0,84	0,84	0,28	62,45	24,57
22	4,55	0,46	87,18	97,13	0,02	0,02	0,01	7,35	0,33
28	2,36	70,93	85,17	83,78	5,04	4,99	0,04	65,10	1,54
40	1,35	5,88	37,29	89,14	0,05	0,04	0,01	22,67	0,31
44	11,93	6,21	44,25	65,31	0,10	0,10	0,06	49,09	5,86
62	0,63	2,49	95,38	94,66	0,05	0,05	0,03	17,66	0,11
64	36,48	39,19	40,03	89,94	7,61	7,44	6,28	92,87	33,88
65	0,59	81,08	92,09	87,74	0,62	0,62	0,01	39,37	0,23
67	97,12	97,29	54,86	97,27	44,30	44,29	44,16	99,92	97,04
68	5,57	10,84	96,55	98,21	0,08	0,08	0,02	10,75	0,60
69	5,59	74,04	95,76	94,01	3,29	3,28	0,38	73,63	4,11
70	0,18	91,10	98,92	95,16	0,03	0,03	0,02	81,90	0,14
71	0,29	86,39	97,73	90,53	0,01	0,01	0,00	22,71	0,06
72	0,21	70,91	95,25	73,19	0,02	0,01	0,00	68,35	0,15
73	84,87	48,44	97,18	90,82	0,09	0,09	0,08	52,85	44,85

Tab. 8.6: Messergebnisse der ALL-Patienten (Eigene Analysen)

Werte in % der lymphoiden Zellen, Ausnahme: (ALDH^{br}) Anteil in % der ALDH^{br}-Population.

Einbezogene Patientenproben von Dr. med. J. Ahlers:

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

Tab. 8.7: ALL-Patienten (Ahlers)

#	ALDH ^{br}	CD 34 ⁺	CD38 ⁺	CD45 ^{dim}	34 ⁺ /38 ⁻	34 ⁺ /38 ⁻ /45 ^{dim}	ALDH ^{br} / 34 ⁺ /38 ⁻	CD34 ⁺ (ALDH ^{br})	ALDH ^{br} / 34 ⁺
2	31,70	93,52	65,89	97,28	30,11	30,03	7,56	97,83	31,01
3	0,21	38,69	62,60	97,69	0,67	0,66	0,05	49,63	0,10
4	0,05	96,45	99,33	97,69	0,03	0,03	0,00	90,43	0,04
5	0,41	91,71	91,44	97,66	2,03	2,02	0,01	27,18	0,11
6	0,62	37,12	72,59	59,06	4,95	4,92	0,04	36,84	0,23
7	15,63	80,37	95,24	97,71	2,41	2,33	0,22	87,74	13,72
8	50,16	34,18	98,11	94,41	0,21	0,21	0,16	29,57	14,83
9	0,06	10,58	99,39	98,58	0,01	0,01	0,01	77,95	0,05
10	19,26	60,52	97,52	92,57	1,21	1,15	0,14	45,50	8,77
11	3,52	62,97	88,94	90,98	0,93	0,86	0,05	59,48	2,10
12	11,20	9,95	98,21	94,4	0,03	0,02	0,01	4,07	0,46
13	1,97	2,19	87,75	95,12	0,16	0,16	0,01	7,62	0,15
15	0,40	37,89	99,33	92,11	0,01	0,01	0,01	44,71	0,18
19	5,98	0,83	95,71	8,11	0,04	0,04	0,03	8,61	0,51
20	25,01	91,49	11,89	93,70	82,14	81,94	22,96	99,28	1,66
21	13,44	3,98	62,38	0,54	0,49	0,49	0,47	31,97	3,34
22	0,53	94,90	98,55	96,62	0,03	0,03	0,03	40,45	0,21
24	0,29	46,33	98,74	98,49	0,07	0,07	0,06	55,28	0,16
25	87,84	0,14	98,70	94,2	0,02	0,01	0,01	0,08	0,07
26	0,32	87,68	92,83	93,23	3,5	3,48	0,01	24,27	0,08
27	2,05	78,87	92,13	80,34	2,63	2,60	0,06	95,48	1,96
28	2,22	92,00	95,99	95,7	0,94	0,89	0,10	93,26	2,07
29	0,70	95,50	96,93	98,27	0,13	0,13	0,04	52,77	0,37
30	0,14	90,67	97,92	97,14	0,29	0,29	0,01	72,06	0,10
31	0,06	95,63	98,98	98,31	0,00	0,00	0,00	43,75	0,03
33	45,08	0,53	36,55	83,82	0,02	0,01	0,01	1,05	0,47
34	47,39	1,18	91,27	66,4	0,29	0,28	0,25	1,79	0,85
35	1,72	14,94	75,27	99,07	0,16	0,16	0,02	13,36	0,23
36	0,23	0,13	98,74	98,44	0,00	0,00	0,00	46,26	0,11
37	0,26	87,35	96,21	95,86	0,08	0,07	0,06	64,80	0,17
38	3,10	93,63	98,33	95,13	0,00	0,00	0,00	17,51	0,54
39	0,87	72,93	89,06	88,45	8,09	7,96	0,06	67,55	0,58
40	0,12	11,16	98,15	93,81	0,04	0,04	0,01	46,80	0,06
42	0,08	93,22	98,810	92,01	0,02	0,02	0,01	81,97	0,06
43	10,90	3,99	88,30	54,56	0,02	0,01	0,01	23,51	2,56
45	85,77	1,04	97,30	99,14	0,02	0,02	0,00	1,06	0,91
46	86,54	0,71	99,33	97,19	0,01	0,01	0,00	0,69	0,60
47	7,54	0,74	84,26	99,99	0,15	0,14	0,13	7,99	0,60
48	1,78	66,29	93,38	84,83	1,80	1,79	0,05	53,39	0,95
49	1,10	43,93	61,21	80,21	7,64	7,53	0,07	30,69	0,34
55	9,22	1,65	82,32	51,47	0,08	0,08	0,07	15,98	1,47
56	1,95	0,62	96,07	90,65	0,11	0,11	0,11	27,50	0,54

Tab. 8.8: Messergebnisse der ALL-Patienten (Ahlers)

Werte in % der lymphoiden Zellen, Ausnahme: (ALDH^{br}) Anteil in % der ALDH^{br}-Population.
Die Messergebnisse für ALDH^{br} wurden abgeändert (vgl. 4.1).

8.1.3 Verlaufsproben

Interne Fallnummer #	Geschlecht	Diagnose	MRD-Tag	Alter bei ED	Rezidiv (Zeit n. ED)	Tod (Zeit n. ED)	Nachbeobachtungszeit
4	m	c-ALL	4	17J 6M			3J 9M
17	m	c-ALL	17	17J 6M			3J 9M
36	m	c-ALL	36	17J 6M			3J 9M
9	m	c-ALL	0	16J 5M			3J 11M
18	m	c-ALL	16	16J 5M			3J 11M
70	m	c-ALL	0	3J 10M			3J 11M
10	m	c-ALL	39	3J 10M			3J 11M
68	w	c-ALL	0	11J 11M		1M	
1	w	c-ALL	14	11J 11M		1M	
26	m	c-ALL Rezidiv	0	unbekannt	unbekannt	unbekannt	3J 10M
37	m	c-ALL Rezidiv	16	unbekannt	unbekannt	unbekannt	3J 10M
27	m	c-ALL Rezidiv	0	10J 4M	1J 1M	unbekannt	3J 9M
31	m	c-ALL Rezidiv	7	10J 4M	1J 1M	unbekannt	3J 9M
48	m	c-ALL Rezidiv	35	10J 4M	1J 1M	unbekannt	3J 9M
67	m	c-ALL Rezidiv	10	7J 7M	6J 11M		4J 1M
15	m	c-ALL Rezidiv	35	7J 7M	6J 11M		4J 1M
72	w	T-ALL	15	9J 0M			4J 0M
6	w	T-ALL	28	9J 0M			4J 0M
4	m	T-ALL	0	3J 8M	unbekannt		3J 11M
11	m	T-ALL	15	3J 8M	unbekannt		3J 11M
23	m	T-ALL	34	3J 8M	unbekannt		3J 11M

Tab. 8.9: Patienten der Verlaufsproben (Eigene Analysen)

#	Erneutes Rezidiv	% Blasten im Ausstrich	ALDH ^{br}	CD 34 ⁺	34 ⁺ /38 ⁻	ALDH ^{br} /34 ⁺ /38 ⁻	ALDH ^{br} /34 ⁺	34 ⁺ /38 ^{dim/neg}	Relative Abnahme (34 ⁺ /38 ^{dim/neg})
4	nein	98	2,36	70,93	5,04	0,04	1,54	31,08	100,00%
17	nein	3	4,39	8,32	1,66	0,00	0,62	5,90	18,99%
36	nein	0	1,42	0,29	0,01	0,00	0,25	0,06	0,18%
9	nein	92	1,79	69,68	0,35	0,05	1,02	2,02	100,00%
18	nein	0	7,51	0,50	0,03	0,00	0,34	0,15	7,21%
70	nein	36	0,18	91,10	0,03	0,02	0,14	0,14	100,00%
10	nein	0	8,52	0,78	0,02	0,00	0,72	0,04	29,10%
68	nein	98	5,57	10,84	0,08	0,02	0,60	0,59	100,00%
1	nein	8	9,41	0,41	0,06	0,04	0,31	0,17	27,98%
26	ja	70	69,47	74,24	19,69	17,75	63,65	72,36	100,00%
37	ja	79	50,01	55,25	12,66	11,14	48,96	53,62	74,10%
27	ja	40	33,12	22,10	2,02	1,15	11,36	5,70	100,00%
31	ja	42	59,88	36,74	2,62	2,17	27,30	7,28	127,75%
48	ja	63	28,08	33,05	1,88	1,48	19,15	3,74	65,60%
67	nein	98	97,12	97,29	44,30	44,16	97,04	97,26	100,00%
15	nein	0	10,29	3,25	0,04	0,03	0,45	0,18	0,19%

72	ja	85	0,21	70,91	0,02	0,00	0,15	0,40	100,00%
6	ja	40	0,70	41,45	0,17	0,00	0,22	0,40	100,25%
4	ja	97	3,10	0,81	0,33	0,32	0,76	0,25	100,00%
11	ja	7	7,77	1,84	0,02	0,00	1,69	0,14	55,75%
23	ja	1	22,81	2,16	0,05	0,01	2,06	0,14	54,91%

Tab. 8.10: Messergebnisse der Verlaufspuren (Eigene Analysen)

Werte in % der lymphoiden Zellen, Ausnahme: % Blasten im Ausstrich bezieht sich auf Leukozyten. Relative Abnahme bezieht sich auf den Wert der Population CD34⁺/CD38^{dim/neg} der ersten verfügbaren Probe, im allg. bei Diagnosestellung.

Einbezogene Verlaufspuren von Dr. med. C. Haug:

Interne Fallnummer #	Geschlecht	Diagnose	MRD-Tag	Alter bei ED	Rezidiv (Zeit n. ED)	Tod (Zeit n. ED)	Nachbeobachtungszeit
A1	m	c-ALL	0	3J 0M			3J
A2	m	c-ALL	15	3J 0M			3J
A3	m	c-ALL	33	3J 0M			3J
B1	m	c-ALL Rezidiv	0	1J 11M	3J 11M		2J 7M
B2	m	c-ALL Rezidiv	15	1J 11M	3J 11M		2J 7M
B3	m	c-ALL Rezidiv	32	1J 11M	3J 11M		2J 7M

Tab. 8.11: Patienten der Verlaufspuren (Dr. med. C. Haug)

#	Erneutes Rezidiv	% Blasten im Ausstrich	ALDH ^{br}	CD 34 ⁺	34 ⁺ /38 ⁻	ALDH ^{br} /34 ⁺ /38 ⁻	ALDH ^{br} /34 ⁺	34 ⁺ /38 ^{dim/neg}	Relative Abnahme (34 ⁺ /38 ^{dim/neg})
A1	nein	97	-	-	-	-	-	51,52	100,00%
A2	nein	(*) 0,21	-	-	-	-	-	62,37	76,51%
A3	nein	(*) 0,001	-	-	-	-	-	0,00	0,00%
B1	nein	89	-	-	-	-	-	21,78	100,00%
B2	nein	(*) 20,4	-	-	-	-	-	5,49	25,21%
B3	nein	(*) 0,009	-	-	-	-	-	0,80	3,69%

Tab. 8.12: Messergebnisse der Verlaufspuren (Dr. med. C. Haug)

Werte in % der lymphoiden Zellen, Ausnahme: % Blasten im Ausstrich bezieht sich auf Leukozyten. Relative Abnahme bezieht sich auf den Wert der Population CD34⁺/CD38^{dim/neg} der ersten verfügbaren Probe, im allg. bei Diagnosestellung. (*)=MRD-Daten

8.1.4 Vergleichsproben

8.1.4.1 Knochenmark vs. Lymphknoten-Zellsuspension:

Interne Fallnummer #	Geschlecht	Diagnose	Alter bei Punktion	Alter bei T-ALL Erkrankung	Probenmaterial
56	m	T – NHL ohne KM-Beteiligung,	15J 2M	5J 6M	Lymphknoten-Zellsuspension
57	m	Z.n. T-ALL	15J 2M	5J 6M	Knochenmark

Tab. 8.13: Vergleichspatient KM vs. LK

Probeentnahme bei V.a. T-ALL Rezidiv. Im Tumortupfpräparat des Lymphknotens lag der Blastenanteil > 70% (vgl. 4.3.1), im Knochenmark kein Hinweis für Befall bei T-NHL.

#	ALDH ^{br}	CD 34 ⁺	CD38 ⁺	CD45 ^{dim}	34 ⁺ /38 ⁻	34 ⁺ /38 ⁻ / 45 ^{dim}	ALDH ^{br} / 34 ⁺ /38 ⁻	CD34 ⁺ (ALDH ^{br})	ALDH ^{br} /34 ⁺
56	6,40	70,11	70,88	99,68	0,15	0,15	0,00	99,60	6,37
57	11,89	1,37	48,74	44,55	0,06	0,04	0,00	6,39	0,76

Tab. 8.14: Messergebnisse KM vs. LK

Werte in % der lymphoiden Zellen, Ausnahme: (ALDH^{br}) Anteil in % der ALDH^{br}-Population.

8.1.4.2 Knochenmark vs. Peripherblut:

Interne Fallnummer #	Geschlecht	Diagnose	Alter bei ED	MRD Tag 33	Sensitive Marker	Rezidiv (Zeit nach ED)	Tod (Zeit nach ED)	Probenmaterial
63	w	c-ALL	3J 7M	3	4	-	-	Peripheres Blut
64	w	c-ALL	3J 7M	3	4	-	-	Knochenmark

Tab. 8.15: Vergleichspatientin KM vs. PB

Probeentnahme zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Morphologisch fanden sich im nativen Ausstrich ~60% Blasten im peripheren Blut und ~ 90% Blasten im Knochenmark.

#	ALDH ^{br}	CD 34 ⁺	CD38 ⁺	CD45 ^{dim}	34 ⁺ /38 ⁻	34 ⁺ /38 ⁻ / 45 ^{dim}	ALDH ^{br} / 34 ⁺ /38 ⁻	CD34 ⁺ (ALDH ^{br})	ALDH ^{br} /34 ⁺
63	65,42	73,01	75,10	80,23	13,48	13,26	11,82	97,31	63,67
64	36,48	39,19	40,03	89,94	7,61	7,44	6,28	92,87	33,88

Tab. 8.16: Messergebnisse KM vs. PB

Werte in % der lymphoiden Zellen, Ausnahme: (ALDH^{br}) Anteil in % der ALDH^{br}-Population.

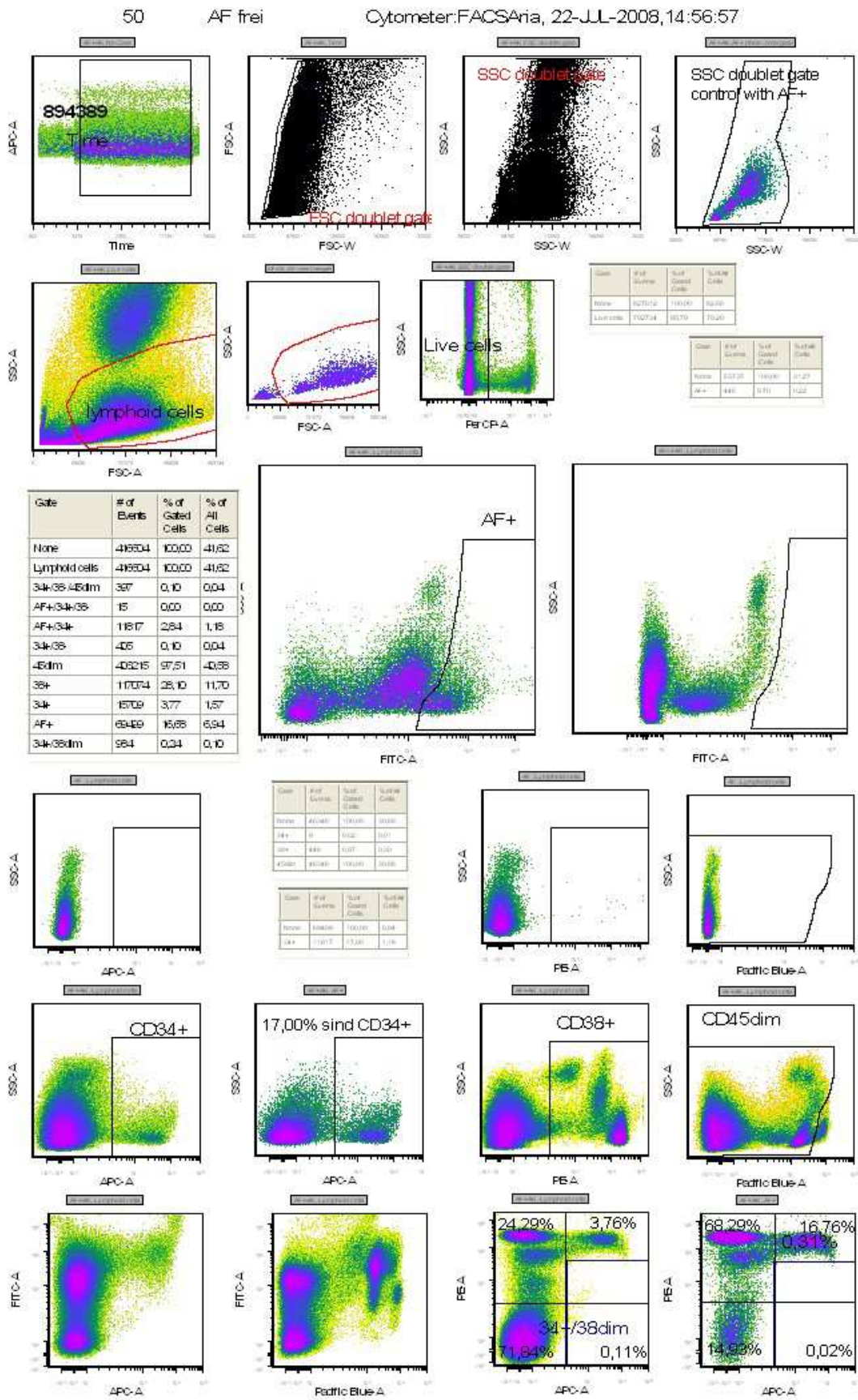
8.1.5 Zytometer-Einstellungen

Kanal:	FSC	SSC	FITC (ALDH ^{br})	PE (CD38)	APC (CD34)	PB (CD45)	PerCP (PI)
Voltage (V) 2008:	70	280	370	420	572	420	500
Voltage (V) 2012:	80	230	370	420	600	600	650

Tab. 8.17: Zytometer- Einstellungen

Einstellungen der Voltages (in Volt) am FACS Aria für die verschiedenen Kanäle. Die Voltages der Kanäle mussten 2012 zur Probenvervollständigung neu eingestellt werden.

8.2 Auswertebogen



02.05.2012

Abb. 8.1: Beispiel für einen Auswertebogen

Die Abbildung zeigt einen gewöhnlichen Auswertebogen der Patientenproben. Er wurde mit dem Programm FCS Express (De Novo Software) erstellt. Die gespeicherten Daten der Messung wurden im Dateiformat „.fcs“ in das Auswertungstemplate geladen. Zur Analyse der Daten wurden die Gates für die individuellen Proben angepasst. Die Abbildung zeigt die Patientenprobe 50 in der Version AF frei (vgl. 3.7), was in der Kopfzeile des Auswertungsblattes neben den Zytometer-, Datum- und Zeitangaben vermerkt ist. Die Datumsangabe rechts unten gibt das letzte Speicherdatum des angezeigten Auswertebogens wieder. Wie im Kapitel Datenauswertung (vgl. 3.7) werden die Zielzellen in den verschiedenen Plots nacheinander dargestellt. Die Tabellen geben die Werte der verschiedenen Populationen wieder (vgl. Abb. 3.10).

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Häufigkeitsverteilung maligner Erkrankungen im Kindesalter	2
Abb. 1.2: Knochenmarkausstrich bei ALL und AML	3
Abb. 1.3: Ontogenese hämatopoetischer Zellen aus Stammzellen	11
Abb. 1.4: Cancer Stem Cell vs. Clonal Evolution Modell	16
Abb. 2.1: Verteilung der Erstdiagnosen und akuten Rezidive.....	20
Abb. 2.2: Zeitpunkte der Folgeproben	22
Abb. 3.1: Spektrum von Aldefluor [®]	34
Abb. 3.2: Spektrum von APC.....	36
Abb. 3.3: Spektrum von PE	37
Abb. 3.4: Spektrum von PB	37
Abb. 3.5: Spektrum von PI.....	41
Abb. 3.6: Filterkonfiguration am FACS Aria.....	44
Abb. 3.7: Spektrum der am 488 nm-Laser gemessenen Fluorophore.....	45
Abb. 3.8: Gating-Strategie im Zeit- und Duplettenfenster.....	47
Abb. 3.9: Gating-Strategie zur Auswahl lebender und lymphoider Zellen	48
Abb. 3.10: Gating-Hierarchie und statistische Ergebnisdarstellung.....	48
Abb. 3.11: Erste Strategie zur Auswahl der Aldefluor ^{®bright} -Population.....	49
Abb. 3.12: Zweite Strategie zur Auswahl der Aldefluor ^{®bright} -Population.....	50
Abb. 3.13: Dritte Strategie zur Auswahl der Aldefluor ^{®bright} -Population.....	50
Abb. 3.14: Auswertestrategie für CD34-APC.....	51
Abb. 3.15: Auswertestrategie für CD38-PE	52
Abb. 3.16: Auswertestrategie für CD45-PB	52
Abb. 3.17: Auswertestrategie für CD34-APC/CD38-PE	53
Abb. 4.1: Werte für ALDH ^{br} im Vergleich	56
Abb. 4.2: Werte für CD34 ⁺ im Vergleich	57
Abb. 4.3: Werte für CD34 ⁺ (ALDH ^{br}) im Vergleich	58
Abb. 4.4: Korrelation der ALDH-Aktivität mit CD34 ⁺ /CD38 ⁻	60
Abb. 4.5: Korrelation von ALDH ^{br} mit CD34 ⁺ /ALDH ^{br}	62
Abb. 4.6: Korrelation der ALDH ^{br} -Aktivität (<1%) mit dem MRD-Level.....	64
Abb. 4.7: Korrelation der Population CD34 ⁺ /CD38 ⁻ mit dem MRD-Level	65
Abb. 4.8: Knochenmark vs. Lymphknoten-Zellsuspension.....	70

Abb. 4.9: Peripheres Blut vs. Knochenmark.....	72
Abb. 4.10: Ergebnisse der Kontrollpatienten	73
Abb. 4.11: Kontroll-Patienten vs. Leukämie-Patienten	75
Abb. 8.1: Beispiel für einen Auswertebogen.....	106

8.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Formen der akuten lymphatischen Leukämie.....	5
Tab. 1.2: FAB-Klassifikation der AML.....	7
Tab. 1.3: Stamm- und Progenitorzell-Marker.....	13
Tab. 2.1: Charakterisierung der Erstdiagnosen und akuten Rezidive.....	21
Tab. 2.2: Charakterisierung der Erstdiagnosen mit Folgeproben.....	22
Tab. 2.3: Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	24
Tab. 2.4: Verwendete Chemikalien.....	25
Tab. 2.5: Stammlösungen und Inhaltsstoffe.....	25
Tab. 2.6: Stammzellreagenzien.....	26
Tab. 2.7: Fluorochrom-konjugierte Antikörper.....	26
Tab. 2.8: Lebend/Tot-Marker.....	27
Tab. 2.9: Cytometer-Beads zur Gerätekalibrierung.....	27
Tab. 2.10: EDV-Software.....	27
Tab. 3.1: Verwendete Antikörper bei den Versuchen.....	38
Tab. 4.1: Werte für ALDH ^{br} im Vergleich.....	56
Tab. 4.2: Werte für CD34 ⁺ im Vergleich.....	57
Tab. 4.3: Werte für CD34 ⁺ (ALDH ^{br}) im Vergleich.....	58
Tab. 4.4: Werte in den kombinierten Populationen zum Vergleich.....	59
Tab. 4.5: Pearson-Korrelation der ALDH-Aktivität mit CD34 ⁺ /CD38 ⁻	61
Tab. 4.6: Übertragung des MRD-Levels in eine lineare Skala.....	63
Tab. 4.7: Eigene Proben: Werte für ALDH ^{br} nach MRD-Level.....	63
Tab. 4.8: Gesamtdaten: Werte für ALDH ^{br} nach MRD-Level.....	64
Tab. 4.9: Eigene Proben: Werte versch. Populationen nach dem MRD-Level geordnet.....	66
Tab. 4.10: Gesamtdaten: Werte versch. Populationen nach dem MRD-Level geordnet.....	66
Tab. 4.11: Daten und Ergebnisse der Verlaufspuben.....	68
Tab. 4.12: Vierfeldertafel der Verlaufspuben.....	69
Tab. 4.13: Knochenmark vs. Lymphknoten-Zellsuspension.....	71
Tab. 4.14: Kontroll-Patienten vs. Leukämie-Patienten.....	74
Tab. 8.1: Kontroll-Patienten (Eigene Analysen).....	98

Tab. 8.2: Messergebnisse der Kontrollpatienten (Eigene Analysen)	98
Tab. 8.3: Kontroll-Patienten (Ahlers)	98
Tab. 8.4: Messergebnisse der Kontrollpatienten (Ahlers).....	98
Tab. 8.5: ALL-Patienten (Eigene Analysen)	99
Tab. 8.6: Messergebnisse der ALL-Patienten (Eigene Analysen)	99
Tab. 8.7: ALL-Patienten (Ahlers)	100
Tab. 8.8: Messergebnisse der ALL-Patienten (Ahlers).....	101
Tab. 8.9: Patienten der Verlaufsproben (Eigene Analysen)	102
Tab. 8.10: Messergebnisse der Verlaufsproben (Eigene Analysen).....	103
Tab. 8.11: Patienten der Verlaufsproben (Dr. med. C. Haug).....	103
Tab. 8.12: Messergebnisse der Verlaufsproben (Dr. med. C. Haug).....	103
Tab. 8.13: Vergleichspatient KM vs. LK	104
Tab. 8.14: Messergebnisse KM vs. LK.....	104
Tab. 8.15: Vergleichspatientin KM vs. PB	104
Tab. 8.16: Messergebnisse KM vs. PB	104
Tab. 8.17: Zytometer- Einstellungen	104

9 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. P. Lang und Prof. Dr. R. Handgretinger möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die Annahme als Doktorand bedanken.

Meinen Betreuern Dr. Martin Ebinger und Dipl. biol. Kai Witte gebührt mein besonderer Dank für die sehr gute Betreuung, die vielen Hilfestellungen und die Klärung großer und kleiner Probleme bei der Umsetzung der Experimente und der Erstellung dieser Dissertation. Vielen herzlichen Dank für Eure Zeit und Euren motivierenden Zuspruch und dafür, dass ihr mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden seid und mit Eurem Wissen, Eurer Hilfe und Kritik maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen habt.

Zudem möchte ich mich bei Frau Dipl. biol. Iris Schäfer, Dr. Jörg Ahlers und Dr. Timo Sugg bedanken, mit denen ich unzählige Stunden im Labor verbracht habe, die mir labortechnische Methoden beigebracht haben und deren Arbeiten teilweise Bestandteil dieser Studie geworden sind.

Der gesamten Arbeitsgruppe AG Ebinger sowie allen Labormitarbeitern der Kinderklinik danke ich für das nette Arbeitsklima und die vielen Gespräche über mehr oder minder wissenschaftliche Themen.

Meinen Eltern Matthis und Margrit und meinen Geschwistern Bettina mit Lutz, Daniel und Mirjam danke ich neben allen anderen meiner lieben Familie, die stets für mich da sind und mir in allen Phasen meines Lebens zur Seite stehen. Ganz herzlichen Dank für Eure jahrelange, liebevolle Unterstützung und Begleitung, Eure Geduld und Eure Kraft.

Zuletzt möchte ich hier meine vielen Freunde erwähnen, besonders meine besten Freunde Bine, Schnaff und Dieter. Vielen Dank von ganzem Herzen für Eure Zeit, Eure Zuwendung und Euren motivierenden Zuspruch, der entscheidend zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen hat.

10 Lebenslauf