

**Manipulation der Zellpopulation mit differenziellen
Stammzellkriterien in definierten Zelllinien
akuter Leukämien**

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

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

vorgelegt von

Mattes, Michael

2016

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. M. Ebinger

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H.-G. Kopp

For my friend Michael Bailey. May God richly bless you.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	12
Abkürzungsverzeichnis	13
1 Einleitung	15
1.1 Leukämien	15
1.1.1 Krankheitsbegriff	15
1.1.2 Einteilung und Klassifikation	15
1.1.3 Epidemiologie	17
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese	17
1.1.5 Klinik	18
1.1.6 Diagnostik	19
1.1.7 Prognose und therapeutische Fortschritte	20
1.2 Hämatopoetische Stammzellen (HSC)	22
1.2.1 Bedeutung hämatopoetischer Stammzellen	22
1.2.2 Nachweis hämatopoetischer Stammzellen	24
1.3 Leukämie-initiiierende Zellen (LIC)	26
1.3.1 Die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Leukämie	26
1.3.2 Rezidive und Resistenzmechanismen leukämischer Stammzellen (LSC)	27
1.3.3 Aktuelle Erkenntnisse zu LIC	30
1.3.4 Nachweis von LIC	32
1.3.5 LIC-Fraktion und Prognose bei Erstdiagnose	33
1.3.6 In-vitro-Modelle	34
1.3.7 Therapeutische Konsequenzen	34
1.4 Arsentrioxid (ATO)	37
1.4.1 Historische Entwicklung von ATO	37
1.4.2 Aktuelle Indikationen von ATO	37
1.4.3 Wirkungsweise von ATO	38
1.5 TDZD-8	39
1.5.1 Herkunft von TDZD-8	39
1.5.2 Beschriebene Effekte von TDZD-8 auf leukämische Zellen	39
1.5.3 Wirkungsweise von TDZD-8	40
1.6 Fragestellung	41

2	Material und Methoden.....	42
2.1	Material.....	42
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	42
2.1.2	Allgemeine Chemikalien.....	45
2.1.3	Stammlösungen.....	46
2.1.4	Potenzielle Therapeutika.....	46
2.1.5	Stammzellreagenzien und Lebend-Tot-Marker.....	47
2.1.6	Antikörper und Fluorochrome.....	47
2.1.7	Beads.....	48
2.1.8	EDV-Software.....	48
2.2	Methoden.....	48
2.2.1	Zellkultur.....	49
2.2.2	Durchflusszytometrie.....	53
2.2.3	Herstellung der Therapieansätze.....	61
2.2.4	Hoechstfärbung.....	64
2.2.5	Lebend-Tot-Färbung.....	70
2.2.6	Färbungen zur Beurteilung von Apoptose und Stammzellmarkern.....	71
2.2.7	Behandlungsversuche mit ATO.....	73
2.2.8	Behandlungsversuche mit TDZD-8.....	73
2.2.9	Übersicht über sämtliche durchgeführte Färbungen.....	74
2.2.10	Statistische Auswertung.....	76
3	Ergebnisse.....	77
3.1	Charakterisierung leukämischer Zellen in Bezug auf differenzielle Stammzellkriterien mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	78
3.1.1	Aufreinigung der Zellen.....	78
3.1.2	Eingrenzung vitaler Zellen.....	80
3.1.3	Eingrenzung der Side population (SP).....	83
3.1.4	Differenzierung der SP.....	85
3.1.5	Gating-Hierarchie bei der Charakterisierung der SP.....	87
3.2	Verhältnisanalyse differenzieller Stammzellkriterien in definierten leukämischen Zelllinien mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	89
3.2.1	Charakterisierung des Anteils der Zellpopulation mit definierten Stammzellkriterien.....	89
3.2.2	Charakterisierung des Anteils der Zellpopulation mit definierten frühen Stammzellkriterien.....	91
3.3	Analyse des Effektes eines anerkannten Leukämie-Therapeutikums (ATO) auf die Zellpopulation mit Stammzellkriterien bei KG-1a-Zellen.....	93

3.3.1	Differenzielle zytotoxische Effekte von ATO auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration	94
3.3.2	Differenzielle zytotoxische Effekte von ATO auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer	95
3.3.3	Differenzielle Effekte von ATO auf den Anteil der diploiden Zellpopulation mit Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer.....	96
3.3.4	Differenzielle Effekte von ATO auf den Anteil der diploiden Zellpopulation mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer.....	98
3.3.5	Differenzielle Effekte von ATO auf den Anteil der tetraploiden Zellpopulation mit Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer.....	99
3.3.6	Differenzielle Effekte von ATO auf den Anteil der tetraploiden Zellpopulation mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer.....	100
3.3.7	Differenzierung zwischen absoluter und relativer Anreicherung der SP unter ATO-Therapie bei KG-1a-Zellen	102
3.3.8	Vergleichende Betrachtung von ATO-behandelten diploiden/tetraploiden Zellpopulationen mit Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer	103
3.4	Analyse des Effektes von TDZD-8 auf die Zellpopulation mit Stammzellkriterien bei KG-1a-Zellen	105
3.4.1	Differenzielle Effekte von TDZD-8 auf den Anteil der diploiden Zellpopulation mit Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer.....	105
3.4.2	Differenzielle Effekte von TDZD-8 auf den Anteil der tetraploiden Zellpopulation mit Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer.....	106
3.5	Charakterisierung unbehandelter KG-1a-Zellen bezüglich Apoptoseverhalten und Stammzellmarker	107
3.5.1	Methodischer Eingrenzungsversuch apoptotischer und toter Zellen .	108
3.5.2	Vergleichende Betrachtung der diploiden SP mit der Hauptpopulation in Bezug auf Stammzellmarker	110
3.6	Zusammenfassende Gesamtbetrachtung der Ergebnisse	113
4	Diskussion	115
4.1	Einführung	115
4.2	Kritische Beurteilung der durchflusszytometrischen Analyse differenzieller Stammzellkriterien	117
4.2.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der SP	117
4.2.2	SP-Eingrenzung und -Differenzierung	118
4.3	Differenzielle Stammzellkriterien in definierten Zelllinien	119

4.3.1	Vorteile und Begrenzungen der leukämischen Zellkultur.....	120
4.3.2	Die SP innerhalb definierter Zelllinien.....	121
4.4	Effekte von ATO auf die Zellpopulation mit Stammzellkriterien bei KG-1a-Zellen	123
4.4.1	Zytotoxizität von ATO	123
4.4.2	Effekte von ATO auf die diploide und tetraploide SP in Abhängigkeit von Behandlungsdauer und Konzentration.....	124
4.4.3	Klinischer Einsatz von ATO	128
4.5	Effekte von TDZD-8 auf die Zellpopulation mit Stammzellkriterien bei KG-1a-Zellen.....	129
4.6	Zellmarker als methodische Hilfe bei der Charakterisierung unbehandelter KG-1a-Zellen	130
4.6.1	Die Rolle von Annexin V als Apoptose-Marker bei der Charakterisierung unbehandelter KG-1a-Zellen	130
4.6.2	Die Rolle von Stammzellmarkern bei der Differenzierung zwischen SP und Hauptpopulation unbehandelter KG-1a-Zellen.....	130
4.7	Ausblick	131
5	Zusammenfassung.....	135
6	Literaturverzeichnis.....	137
7	Anhang	146
7.1	Einzelmessergebnisse.....	146
7.2	Veröffentlichungen und Preise.....	151
8	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	152
9	Danksagung	153

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Hämatopoese (Blutbildung)	23
Abbildung 1-2: Heterogenität der AML/CML.....	29
Abbildung 2-1: Hydrodynamische Fokussierung und Streuung.....	55
Abbildung 2-2: Konfiguration des blauen Lasers (488 nm).....	57
Abbildung 2-3: Konfiguration des violetten Lasers (405 nm) und roten Lasers (633 nm).....	58
Abbildung 2-4: Konfiguration des UV-Lasers (355 nm)	58
Abbildung 2-5: Hoechst-Färbung der diploiden Hauptpopulation	65
Abbildung 2-6: Verapamil-Kontrolle der diploiden Hauptpopulation	67
Abbildung 3-1: All events mit Time-window-Gate	79
Abbildung 3-2: Time window mit Singlets-Gate	79
Abbildung 3-3: Singlets mit Live-cells-Gate	80
Abbildung 3-4: Subpopulationen im Hoechst-blue-Hoechst-red-Fenster.....	81
Abbildung 3-5: Singlets mit Live-cells-Gate und Dead-cells-Gate	82
Abbildung 3-6: Live cells mit Vital-cells-Gate.....	83
Abbildung 3-7: Vital cells mit SP-Gate.....	84
Abbildung 3-8: Vital cells mit G2/M- sowie G0/G1-Gate.....	85
Abbildung 3-9: SP mit Early-, Intermediate- und Late-SP-Gate.....	87
Abbildung 3-10: Gating-Hierarchie der Behandlungsversuche.....	88
Abbildung 3-11: Anteil der SP an den vitalen Zellen bei Zelllinien.....	90

Abbildung 3-12: Anteil der Early SP und Intermediate SP an den vitalen Zellen bei Zelllinien	92
Abbildung 3-13: Anteil der toten Zellen an den Singlets in Abhängigkeit von der ATO-Konzentration	95
Abbildung 3-14: Anteil der toten Zellen an den Singlets in Abhängigkeit von der ATO-Behandlungsdauer	96
Abbildung 3-15: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer.....	97
Abbildung 3-16: Anteil der Early SP und Intermediate SP an der diploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer.....	98
Abbildung 3-17: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer.....	100
Abbildung 3-18: Anteil der Early SP und Intermediate SP an der tetraploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer.....	101
Abbildung 3-19: Verhältnis der tetraploiden SP zur diploiden SP in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer.....	104
Abbildung 3-20: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von TDZD-8-Konzentration und -Behandlungsdauer	106
Abbildung 3-21: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von TDZD-8-Konzentration und -Behandlungsdauer.....	107
Abbildung 3-22: Annexin- und PI-Färbung von KG-1a-Zellen	109

Abbildung 3-23: PI-negative, Annexin-negative Zellen im Hoechst-blue-Hoechst-red-Plot.....	109
Abbildung 3-24: Diploide SP im CD38-CD34-Fenster	111
Abbildung 3-25: Diploide Hauptpopulation im CD38-CD34-Fenster.....	111
Abbildung 3-26: Diploide SP im CD338-CD243-Fenster	112
Abbildung 3-27: Diploide Hauptpopulation im CD338-CD243-Fenster.....	112
Abbildung 4-1: Schwierigkeit der SP-Eingrenzung	118
Alternative Abbildung 3-11 (7-1): Anteil der SP an den vitalen Zellen bei Zelllinien.....	146
Alternative Abbildung 3-12 (7-2): Anteil der Early SP und Intermediate SP an den vitalen Zellen bei Zelllinien	146
Alternative Abbildung 3-13 (7-3): Anteil der toten Zellen an den Singlets in Abhängigkeit von der ATO-Konzentration.....	147
Alternative Abbildung 3-14 (7-4): Anteil der toten Zellen an den Singlets in Abhängigkeit von der ATO-Behandlungsdauer.....	147
Alternative Abbildung 3-15 (7-5): Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer.....	148
Alternative Abbildung 3-16 (7-6): Anteil der Early SP und Intermediate SP an der diploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer.....	148
Alternative Abbildung 3-17 (7-7): Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer.....	149

Alternative Abbildung 3-18 (7-8): Anteil der Early SP und Intermediate SP an der tetraploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer	149
Alternative Abbildung 3-19 (7-9): Verhältnis der tetraploiden SP zur diploiden SP in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer.....	150

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Zytomorphologische FAB-Einteilung der akuten myeloischen Leukämien	16
Tabelle 2-1: Allgemeine Geräte, Glas- und Kunststoffmaterial	42
Tabelle 2-2: Allgemeine Chemikalien	45
Tabelle 2-3: Potenzielle Therapeutika	46
Tabelle 2-4: Reagenzien zur Bestimmung der SP	47
Tabelle 2-5: Lebend-Tot-Marker	47
Tabelle 2-6: Antikörper	47
Tabelle 2-7: Weitere fluoreszierende Reagenzien	48
Tabelle 2-8: Beads	48
Tabelle 2-9: EDV-Software	48
Tabelle 2-10: Verwendete Zelllinien	51
Tabelle 2-11: Zelllinien und deren Zellzahl nach Passage	52
Tabelle 2-12: ATO-Ansätze	62
Tabelle 2-13: TDZD-8-Ansätze	64
Tabelle 2-14: Übersicht über sämtliche durchgeführte Färbungen	74
Tabelle 3-1: Volumenquotient und SP-Quotient unter ATO-Behandlung	103

Abkürzungsverzeichnis

Hinter der ausgeschriebenen Bezeichnung ist das (Unter-)Kapitel der erstmaligen Erwähnung in dieser Arbeit angegeben.

ABC	Adenosine triphosphate-binding cassette 1.3.2
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase 1.2.2
ALL	Akute lymphatische Leukämie 1.1.2
AML	Akute myeloische Leukämie 1.1.2
APL	Akute Promyelozyten-Leukämie 1.1.4 und Tabelle in 1.1.2
ATO	Arsentrioxid 1.3.7
BCRP	Breast cancer related protein 1.3.2
CD	Cluster of differentiation 1.2.2
CFU	Colony-forming unit 1.2.2
CLL	Chronische lymphatische Leukämie 1.1.2
CML	Chronische myeloische Leukämie 1.1.2
CLP	Common lymphoid progenitor 1.2.1
CMP	Common myeloid progenitor 1.2.1
DFS	Disease-free survival 1.4.2
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium 2.1.2
DMSO	Dimethylsulfoxid 2.1.2
EFS	Event-free survival 1.4.2
FACS	Fluorescence-activated cell sorting 2.2.2.1
FCS	Fetal calf serum 2.1.2
FSC	Forward scatter 2.2.2.2
GMP	Granulocyte–macrophage progenitors 1.3.3
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β 1.5.1
HSC	Hematopoietic stem cell 1.2.1
HEPES	4-(3-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure 2.1.2
LIC	Leukemia-initiating cell 1.1.4
LSC	Leukemic stem cell 1.3
MDR	Multidrug resistance 1.3.2
MRD	Minimal residual disease 1.1.7

mRNS	messenger-Ribonukleinsäure 1.3.2
NF-κB	Nuclear factor κ B 1.3.7
PBS	Phosphate buffer saline 2.1.2
PCR	Polymerase chain reaction 1.1.6
PI	Propidiumiodid 2.2.4.4
PI3	Phosphatidyl-Inositid 3 1.3.7
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 2.2.1.1
RNS	Ribonukleinsäure 1.3.3
RT	Raumtemperatur 2.2.3.1
SCID	Severe combined immune-deficient 1.3.1
SD	Standard deviation 2.2.10
SL-IC	SCID leukemia-initiating cell 1.3.1
SSC	Side scatter 2.2.2.2
SP	Side population 1.2.2
TDZD-8	4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione 1.3.7
ZNS	Zentrales Nervensystem 1.1.6

1 Einleitung

1.1 Leukämien

1.1.1 Krankheitsbegriff

Leukämie bedeutet wörtlich übersetzt „weißes Blut“ (von griechisch λευκός - weiß und αἷμας - das Blut) und ist eine Erkrankung des blutbildenden bzw. lymphatischen Systems. Unbehandelt endet die Krankheit in der Regel tödlich. Der Begriff wurde 1845 von Virchow geprägt, der eine weiß-gelbliche Ausfüllung innerhalb der Blutgefäße sowie eine Vergrößerung der Milz beobachtete. Beide Phänomene sind auf einen Überschuss an weißen Blutzellen zurückzuführen.

Leukämien sind durch eine ungehemmte klonale Proliferation von entarteten Vorläuferzellen der Hämatopoese, also der Blutbildung, charakterisiert. Dabei werden die gesunden blutbildenden Zellen zunehmend verdrängt.

1.1.2 Einteilung und Klassifikation

Stammt die entartete Ursprungszelle aus der Lymphozytopoese, spricht man von einer lymphatischen, andernfalls von einer myeloischen Leukämie.

Abhängig vom natürlichen Verlauf differenziert man zwischen akuten, das heißt sehr rasant verlaufenden, und chronischen Leukämien. Bei letzteren können die Patienten oft viele Jahre auch unbehandelt überleben.

Bei der Berücksichtigung von Ursprungszelle und natürlichem Verlauf ergeben sich folgende Krankheitsgruppen:

- Akute myeloische Leukämie (AML)
- Akute lymphatische Leukämie (ALL)
- Chronische myeloische Leukämie (CML)
- Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Die AML wird anhand zytologischer Kriterien im FAB-Schema weiter unterteilt – siehe Tabelle 1-1. FAB steht für French American British und rührt von den Begründern der Einteilung her.

Tabelle 1-1: Zytomorphologische FAB-Einteilung der akuten myeloischen Leukämien

FAB-Subtyp	Bezeichnung
M0	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung
M1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung
M2	Akute myeloische Leukämie
M2baso	Akute Basophilen-Leukämie
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie (APL)
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M4Eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie
M5a	Akute Monoblasten-Leukämie
M5b	Akute Monozyten-Leukämie
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie

Neben der FAB-Klassifikation (FAB-L1: kleine Zellen, FAB-L2: heterogene Zellverteilung, FAB-L3: große Zellen, leukämische Form des Burkitt-Lymphoms) unterteilt man die ALL nach dem Differenzierungsgrad der entarteten Zelle (Dempke 2006, S. 536):

- B-Vorläufer-ALL:
 - Pro-B-ALL
 - Common-ALL (cALL)
 - Prä-B-ALL
- Reife B-ALL

- Unreife T-ALL:
 - Pro-T-ALL
 - Prä-T-ALL
- (Reife) kortikale T-ALL
- Reife T-ALL

Die aktuelle WHO-Klassifikation berücksichtigt darüber hinaus genetische und immunologische Aspekte, die im klinischen Alltag therapeutische Konsequenzen haben.

1.1.3 Epidemiologie

In Deutschland erkranken pro Jahr rund 11.000 Menschen an einer Leukämie, darunter etwa 600 Kinder. Bei letzteren sind Leukämien mit ungefähr einem Drittel die häufigsten bösartigen Neoplasien.

Die vier oben genannten Leukämietypen haben abhängig vom Erkrankungsalter sehr unterschiedliche Inzidenzen. So kommen im Kindesalter fast ausschließlich akute Leukämien (80 % ALL, 20 % AML) vor (Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) 2012). Die Inzidenz der kindlichen Leukämien in den vergangenen Jahren lag in Deutschland bei etwa 5-6/100.000 (Kaatsch and Spix 2012). Das Risiko, an einer Leukämie zu erkranken, sinkt bei Kindern mit zunehmendem Alter, ab etwa 20 Jahren steigt es kontinuierlich an. Im Erwachsenenalter überwiegen die chronischen Leukämien (Robert-Koch-Institut und die G. d. e. K. i. D. e.V. 2012).

1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Für die Entstehung einer Leukämie sind einige Risikofaktoren bekannt, unter anderem ionisierende Strahlung, Zytostatika und vermutlich verschiedene Chemikalien (Buffler, Kwan et al. 2005). Häufig lassen diese sich aber nicht in der Vorgeschichte der Patienten nachweisen. Die eigentlichen Ursachen für Leukämie sind weitgehend unbekannt.

Kinder mit Down-Syndrom weisen ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko auf (Ross, Spector et al. 2005).

Auf molekularer Ebene finden sich bei Leukämien häufig reziproke Translokationen, unter anderem die Translokation t(9;22) bei der CML oder die Translokation t(15;17) bei der akuten Promyelozyten-Leukämie (APL).

Man geht davon aus, dass eine Leukämie durch eine Leukämie-initiiierende Zelle (Leukemia-initiating cell, LIC) entsteht, die aus einer physiologischen Vorläuferzelle der Hämatopoese hervorgegangen ist. Hierbei spielen Mutationen und epigenetische Veränderungen der ursprünglich physiologischen Stammzelle eine wesentliche Rolle (Bonnet 2005). Durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihre unkontrollierte Proliferation entsteht aus ihr die Vielzahl an leukämischen Zellen, die meist im peripheren Blut nachweisbar sind und Blasten genannt werden. Die LIC erhält die Erkrankung also aufrecht (siehe 1.3.1 Die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Leukämie, S. 26).

1.1.5 Klinik

Klinisch imponieren Leukämien durch die Folgen der Blutbildungsverdrängung aufgrund der ungehemmten Proliferation entarteter Zellen. Abhängig vom Leukämie-Typ dominieren jeweils andere Symptome:

- Milz- und Lebervergrößerung, Lymphknotenschwellung
- Fieber, Nachtschweiß
- Anämie mit Blässe, Abgeschlagenheit und Leistungsknick, Thrombozytopenie mit Blutungen, Leukozytopenie mit Infektneigung
- Knochenschmerzen
- Appetit- und Gewichtsverlust

Da es sich hierbei zum Großteil um unspezifische Symptome handelt, die bei einer Vielzahl anderer Krankheiten auftauchen können, sind zur Diagnostizierung einer Leukämie weitere apparative bzw. invasive Untersuchungen notwendig.

1.1.6 Diagnostik

Folgende diagnostische Bereiche sind essenziell bei der Feststellung einer Leukämie:

- Körperliche Untersuchung (siehe 1.1.5 Klinik auf S. 18)
- Blutuntersuchung
- Knochenmarksuntersuchung

Bei der Blutuntersuchung wird Blut aus einer Vene entnommen und der Anteil roter und weißer Blutzellen sowie der Blutplättchen bestimmt. Innerhalb der weißen Blutzellen wird der absolute sowie prozentuale Anteil von Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten überprüft. Auch die zytomorphologische Untersuchung unter dem Mikroskop ist trotz technischer Fortschritte nach wie vor ein diagnostischer Standard.

In der Regel gewinnt man aus dem Beckenkamm durch Aspiration das Knochenmark. Die Leukämie wird durch folgende Bestimmungen näher klassifiziert:

- Mikroskopische Beurteilung von Morphologie, Zytochemie und Zytogenetik
- Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung: Mit Hilfe monoklonaler Antikörper weist man bestimmte Oberflächenantigene nach (siehe auch 1.3.4 Nachweis von LIC, S. 32)
- Molekulargenetische Untersuchungen mit Hilfe der PCR (Polymerase chain reaction) und Southern Blot.

Zusätzlich wird eine Untersuchung des Liquor cerebrospinalis vorgenommen, um gegebenenfalls eine Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) zu entdecken.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen gehen mit prognostischen sowie therapeutischen Konsequenzen einher.

1.1.7 Prognose und therapeutische Fortschritte

Die Therapie richtet sich in erster Linie nach dem Leukämie-Typ, daher ist eine sorgfältige Diagnostik (siehe 1.1.6, S. 19) unerlässlich. Heute gibt es verschiedene komplexe Behandlungskonzepte, die aufgrund von Studienergebnissen stetig modifiziert werden. Bei der AML-Therapie lassen sich folgende wesentliche Bestandteile unterscheiden:

- Induktionsphase
- Konsolidierungsphase
- Erhaltungsphase

Ziel der Induktionsphase ist es, möglichst rasch eine komplette Remission zu erreichen, also eine Zurückdrängung der Erkrankung bis unter die lichtmikroskopische Nachweisgrenze von einem fünfprozentigen Anteil an Blasten im Knochenmark. Klassischerweise besteht die Induktionstherapie aus einer kombinierten Chemotherapie mit Cytosin-Arabinosid und einem Anthrazyklin, zum Beispiel Daunorubicin (Dempke 2006, S. 528).

Die Konsolidierungstherapie gestaltet sich je nach Karyotyp und Ansprechen auf die Induktionstherapie unterschiedlich. Entweder folgt eine intensive Chemotherapiekombination mit Cytosin-Arabinosid oder eine Hochdosis-Chemotherapie mit Stammzelltransplantation (Dempke 2006, S. 529). Ziel dieser Phase ist es, die Remission zu erhalten und prognostisch ungünstige Rezidive zu vermeiden.

Nach der ersten Vollremission gibt es unterschiedliche Optionen, um die Remission dauerhaft zu erhalten:

- Allogene Knochenmark-Transplantation
- Intensivierte Erhaltungschemotherapie

Aufgrund der hochdosierten Gabe von Cytosin-Arabinosid nähern sich die genannten Optionen hinsichtlich des Gesamtüberlebens einander an (Dempke 2006, S. 532).

Seit einigen Jahren steht neben der oben beschriebenen klassischen Chemotherapie auch eine Antikörper-Therapie im Falle eines AML-Rezidivs zur

Verfügung: Der Wirkstoff Gemtuzumab (Handelsname: Mylotarg®) ist gegen spezifische myeloische Oberflächenantigene (CD33) auf den leukämischen Zellen gerichtet und wurde bereits bei einer Vielzahl an Patienten genutzt (Cowan, Laszlo et al. 2013).

Die Therapie der ALL wird ebenfalls in die Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungsphase unterteilt. Eine wichtige Rolle spielt darüber hinaus die ZNS-Prophylaxe in Form einer intrathekalen Therapie und ZNS-Bestrahlung (Dempke 2006, S. 538).

Trotz Vollremission verbleiben kleine Anteile an entarteten Zellen im Knochenmark, was als minimale Resterkrankung (Minimal residual disease, MRD) bezeichnet wird. Die MRD wird meist mit Hilfe der PCR oder Durchflusszytometrie ermittelt. Diese Quantifizierung verbliebener leukämischer Zellen dient als Therapieerfolgskontrolle sowie zur Risikostratifikation, da abhängig von der MRD die Therapie gegebenenfalls angepasst wird. Mit Hilfe der MRD-Bestimmung ist somit eine Patienten-adaptierte Therapie möglich, durch die das Rezidivrisiko gesenkt wird, ohne ungerechtfertigt hohe Chemotherapiedosen mit entsprechenden Nebenwirkungen zu verwenden (Hourigan and Karp 2013).

Innerhalb der einzelnen Leukämiegruppen gibt es unterschiedliche Prognosefaktoren, die im Falle neuer Therapien auch an Bedeutung verlieren bzw. sich ändern können (Gutjahr 1999).

Für die kindliche ALL fassten Inaba et al. folgende Risikofaktoren in ihrem Review-Artikel zusammen (Inaba, Greaves et al. 2013):

- Alter (Kleinkind bzw. über neun Jahre)
- Hohe Leukozytenzahl im peripheren Blut ($\geq 50 \times 10^6 / \mu\text{l}$)
- Herkunft (hispanische oder afrikanische Abstammung)
- Männliches Geschlecht
- T-Zell-Immunphänotyp
- Schwaches Ansprechen auf die Therapie (MRD-Last)

Die MRD-Last gilt als stärkster Prognosefaktor (Borowitz, Devidas et al. 2008).

1.2 Hämatopoetische Stammzellen (HSC)

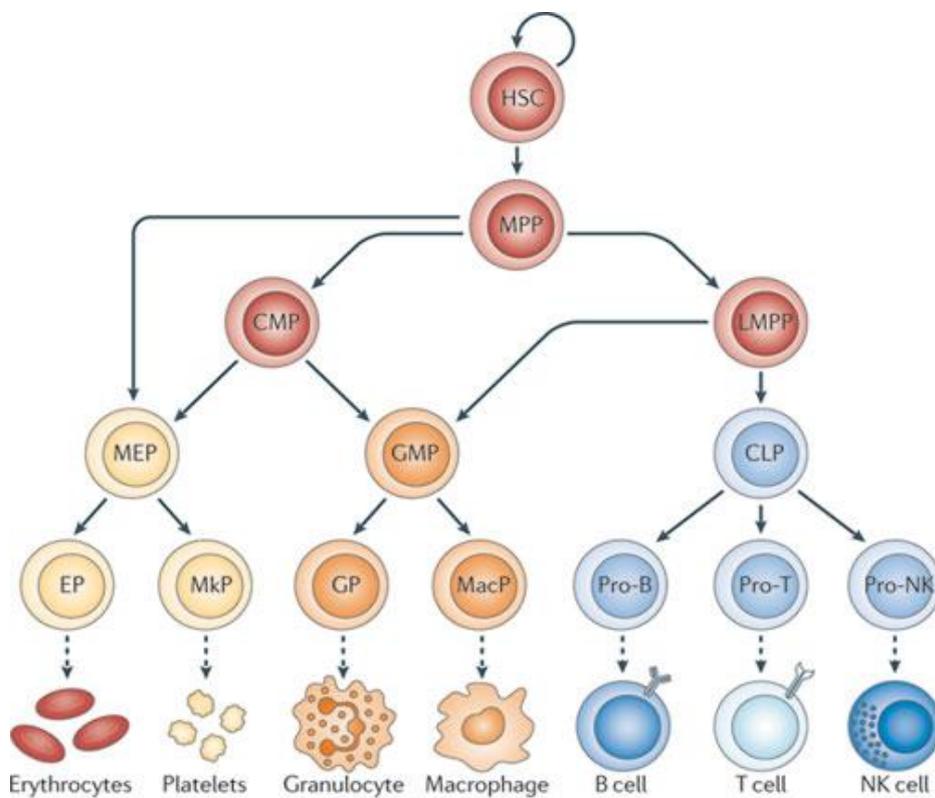
Reife Blutzellen haben eine beschränkte Lebensdauer und müssen daher stetig nachgebildet werden. Pro Sekunde werden beispielsweise rund zwei Millionen Erythrozyten nachgebildet. Dieses System kann nur durch eine fein abgestimmte Hämatopoese aufrechterhalten werden.

Till und McCulloch gelang 1961 erstmalig der Nachweis blutbildender Stammzellen in der Maus. Dazu injizierten sie letal bestrahlten Mäusen Knochenmarkszellen. Daraufhin bauten die Tiere erneut ein hämatopoetisches System auf und überlebten die Bestrahlung (Till and McCulloch 1961).

1.2.1 Bedeutung hämatopoetischer Stammzellen

Physiologischerweise ist bei Kindern vorrangig und bei Erwachsenen einzig das Knochenmark der Ort der Blutbildung. Hier befinden sich hämatopoetische Stammzellen (Hematopoietic stem cell, HSC), die unter anderem die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen (Weissman, Anderson et al. 2001). Dadurch kann die Anzahl an Stammzellen konstant gehalten werden. Sie sind komplexen Regulationsmechanismen unterworfen und unter entsprechender Stimulation dazu fähig zu proliferieren und in reifere Zellen auszudifferenzieren. Dazu ist die asymmetrische Teilung notwendig, bei der eine pluripotente Tochterzelle erhalten bleibt, während sich die andere Zelle differenziert. Dem gegenüber steht die symmetrische Zellteilung, bei der beide Tochterzellen die Stammzeleigenschaften beibehalten (Reya, Morrison et al. 2001). Im Laufe der Ausdifferenzierung durchläuft eine Zelle verschiedene Vorläuferstadien, wobei sie nach und nach ihre Stammzeleigenschaften zugunsten spezifischer, für die jeweilige Zellart typischer Charakteristika aufgibt. Neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung sind HSC pluripotent, das heißt sie können sich in jede hämatologische Zelle differenzieren (siehe Abbildung 1-1: Hämatopoese (Blutbildung)). Meistens befinden sie sich in einem Ruhezustand, der Quieszenz genannt wird. Die HSC werden in Langzeit- und Kurzzeit-HSC eingeteilt: Langzeit-HSC sind dazu fähig, das Blutsystem beliebig lange zu rekonstituieren. Kurzzeit-HSC hingegen können sich nicht mehr lebenslang

selbsterneuern. Noch differenziertere Zellen werden multipotente Progenitoren genannt – sie können sich ebenfalls in sämtliche Zellen differenzieren, haben aber die Fähigkeit zur Selbsterneuerung vollständig verloren. Die nächste Differenzierungsstufe sind die lymphatischen oder myeloischen Vorläuferzellen (Common lymphoid progenitors, CLP; common myeloid progenitors, CMP), die bereits auf eine Zelllinie festgelegt sind (Chotinantakul and Leraanansaksiri 2012). Aus den CLP entwickeln sich über Zwischenstufen dendritische Zellen, B- und T-Zellen sowie natürliche Killerzellen. Die CMP differenzieren sich zu Thrombozyten, Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen.



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 1-1: Hämatopoese (Blutbildung)

Aus den sich selbst erneuernden (siehe Rundpfeil), pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entstehen multipotente Progenitoren, die sich zunehmend differenzieren und damit das Potenzial verlieren, sich in andere Linien zu differenzieren. Gestrichelte Pfeile symbolisieren nicht-abgeblendete Zwischenschritte der Differenzierung.

Abkürzungen: CLP/CMP: Common lymphoid/myeloid progenitor, EP: Erythrocyte progenitor, GMP: Granulocyte–macrophage progenitor, GP: Granulocyte progenitor, LMPP: Lymphoid primed multipotent progenitor, MacP: Macrophage progenitor, MEP: Megakaryocyte–erythrocyte progenitor, MkP: Megakaryocyte progenitor, MPP: Multipotent progenitor, NK: Natural killer (Cedar and Bergman 2011).

Bedeutend sind die HSC auch bei der Stammzelltransplantation im Rahmen einer Chemotherapie: Diese greift nicht nur leukämische Blasten, sondern auch gesunde Zellen inklusive der HSC an. Deshalb werden den Patienten teilweise nach einer Chemotherapie Stammzellen transplantiert. Diese können aus körpereigenem Knochenmark stammen, das den Patienten vor der Chemotherapie entnommen wurde (autologe Transplantation). Eine weitere Möglichkeit ist die allogene Transplantation, bei der Spender und Empfänger nicht identisch sind.

HSC machen trotz ihrer essenziellen Bedeutung nur einen verschwindend geringen Anteil im Knochenmark aus. Aufgrund unterschiedlicher Definitionen variieren die Angaben hierzu. Morrison et al. geben einen Anteil der HSC von bis zu 0,05 % aller Zellen in humanem und murinem Knochenmark an (Morrison, Uchida et al. 1995). Der Nachweis dieser Stammzellen erfordert daher eine sehr sensitive Methodik.

1.2.2 Nachweis hämatopoetischer Stammzellen

Über mittlerweile mehrere Jahrzehnte wurden HSC immer detaillierter charakterisiert. Mit diesem Wissen wurde versucht, HSC möglichst gezielt und hochkonzentriert anzureichern.

So konnten spezifische Oberflächenmarker für verschiedene Entwicklungsstufen der hämatopoetischen Vorläuferzellen identifiziert werden (Ogawa 2002). Immunphänotypische Zelloberflächenmerkmale werden dabei in der „Cluster-of-differentiation (CD)“- Nomenklatur gelistet. Der Nachweis solcher CD-Moleküle erfolgt durchflusszytometrisch mit Antikörpern.

Vielfach wurden HSC als CD34 positiv und CD38 negativ (CD34+/CD38-) beschrieben (Ogawa 2002). Bei der Stammzelltransplantation werden bis heute CD34+ Zellen selektiert, da sie die Fähigkeit besitzen, nach Chemotherapie die Hämatopoese neu aufzubauen (Hauge, Haastrup et al. 2013).

Weitere Moleküle wie CD90, CD117 und CD133 erwiesen sich als hilfreich in der Differenzierung von Vorläuferzellen in einheitlichere Populationen (Bonnet 2005; Freund, Oswald et al. 2006).

Zellen, die bereits für eine Zelllinie determiniert sind, besitzen zusätzlich Lineage-Marker auf ihrer Oberfläche. Entsprechend sind HSC Lineage negativ (lin⁻) (Weissman, Anderson et al. 2001).

Zur Isolierung von HSC werden außerdem enzymatische Eigenschaften genutzt: Von besonderer Bedeutung ist hierbei der Farbstoff Hoechst 33342, ein Bisbenzimid, das ursprünglich für Zellzyklusanalysen verwendet wurde (Goodell, Brose et al. 1996). Diese fluoreszierende Verbindung bindet an DNA-Stränge. Abhängig vom Hoechst-Gehalt fluoreszieren mit Hoechst inkubierte Zellen unterschiedlich stark. Eine kleine Subpopulation von Knochenmarkzellen fluoresziert nach einer bestimmten Inkubationsdauer messbar schwächer, was auf Transportproteine in der Zellmembran zurückzuführen ist, die den Hoechst-Farbstoff aus der Zelle herauspumpen (Goodell, Rosenzweig et al. 1997; Kim, Turnquist et al. 2002). Diese kleine Subpopulation wird Side population (SP) genannt. Man geht davon aus, dass innerhalb der SP besonders frühe Vorläuferzellen stark angereichert sind. Interessanterweise erwies sich die Mehrzahl der SP-Zellen als CD34⁻ (Goodell, Rosenzweig et al. 1997). Eben diese Zellen waren in den Versuchen von Goodell et al. in der Lage, in tödlich bestrahlten Mäusen ein hämatopoetisches System zu regenerieren, so dass die Mäuse überlebten (Goodell, Brose et al. 1996). Darüber hinaus waren die SP-Zellen in der Lage in vitro Langzeit-Zellkolonien zu bilden. Zellen mit diesem Potenzial nennt man Colony-forming units (CFU). Reifere Zellen können aufgrund ihrer Unfähigkeit, sich zu teilen und weiter zu differenzieren, keine Kolonien bilden.

Eine weitere funktionelle Methode, HSC zu identifizieren, nutzt das zytosolische Enzym Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), das physiologischerweise intrazelluläre Aldehyde oxidiert. Sowohl in murinen als auch humanen Vorläuferzellen wurden höhere ALDH-Spiegel gemessen als in reiferen Blutzellen (Hess, Meyerrose et al. 2004). Durch Inkubation mit dem Aldefluor®-Farbstoff, der von der ALDH in einen Stoff umgewandelt wird, der intrazellulär akkumuliert, kann der ALDH-Gehalt von Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden (Storms, Trujillo et al. 1999).

Bei sämtlichen hier genannten Methoden handelt es sich um Versuche, HSC möglichst stark anzureichern. Reine HSC-Populationen können derzeit weder durch Selektion von Zellen mit bestimmten Oberflächenmarkern (CD34+/CD38-) noch durch die beiden beschriebenen funktionellen Assays (Hoechst- und Aldefluor-Assay) gewonnen werden.

1.3 Leukämie-initiierende Zellen (LIC)

Entgegen der ursprünglichen Annahme, AML-Zellen seien eine relativ homogene Zellpopulation, fand man heraus, dass nur ein kleiner Anteil der Zellen die Fähigkeit zur Koloniebildung in vitro besaß (Griffin and Lowenberg 1986). Diese Subpopulation mit proliferativen Eigenschaften, so wurde geschlussfolgert, entspricht den HSC innerhalb der physiologischen Hämatopoese (Minden, Till et al. 1978). Daher wurden diese AML-Zellen als leukämische Stammzellen (Leukemic stem cells, LSC) bezeichnet (Sutherland, Blair et al. 1996).

1.3.1 Die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Leukämie

Es konnte gezeigt werden, dass CD34+/CD38- Zellen aus dem peripheren Blut von AML-Patienten eine AML in immundefizienten (Severe combined immunodeficient, SCID) Mäusen initiieren können (Lapidot, Sirard et al. 1994). Dieser Nachweis gelang weder bei CD34+/CD38+ noch bei CD34- Zellen.

Bonnet et al. zeigten 1997, dass ebendiese Zelle – SL-IC steht für SCID leukemia-initiating cell – das Potenzial zur Differenzierung, Proliferation und zur Selbsterneuerung aufweist (Bonnet and Dick 1997). Diese Eigenschaften, verbunden mit den an HSC erinnernde Oberflächenmolekülen, nährte den Verdacht, dass bei der leukämischen Transformation HSC der Angriffspunkt und damit der Schlüssel zur Entstehung einer Leukämie seien.

Die SL-ICs waren in der Lage, sich im Tiermodell in leukämische Blasten zu differenzieren. Daher schlussfolgerte man, dass auch Leukämien – ähnlich wie die physiologische Hämatopoese – hierarchisch organisiert sind (Bonnet and Dick 1997). Die oben erwähnten Fähigkeiten von LSC erinnern tatsächlich stark

an HSC und gewährleisten die Aufrechterhaltung einer Leukämie. Dennoch gibt es folgenreiche Unterschiede: So führt eine ineffektive Differenzierung der LSC zu Blasten, die nicht mehr in der Lage sind, die Aufgaben reifer Blutzellen zu übernehmen (Guzman and Jordan 2004).

Als Ursache werden genetische und epigenetische Ereignisse vermutet, die im Laufe des Lebens akkumulieren und durch das zelleigene Reparatur-System nicht behoben werden können (Bonnet 2005).

1.3.2 Rezidive und Resistenzmechanismen leukämischer Stammzellen (LSC)

Die Therapie der neu diagnostizierten AML führt in 50-80 % der Fälle zur Remission. Dennoch erleidet die Mehrzahl der erwachsenen Patienten ein Rezidiv (Weltermann, Fonatsch et al. 2004). Auch bei Kindern stellen Rezidive mit etwa 40 % nach Remission eine große Herausforderung dar (Aladjidi, Auvrignon et al. 2003).

Physiologische HSC haben verschiedene Eigenschaften inne, die sie für potenzielle Angriffe wie Chemotherapie weniger sensibel macht.

Bei LSC finden sich ähnliche Eigenschaften (Ravandi and Estrov 2006). Man macht die LSC für die häufigen Rezidive verantwortlich, da man davon ausgeht, dass trotz Chemotherapie einige LSC im Körper verbleiben. Nach einiger Zeit proliferieren und differenzieren sie, was sich klinisch als Rezidiv manifestiert. Im Folgenden werden die Resistenzmechanismen der LSC genauer betrachtet.

Wie HSC befinden sich auch LSC in einem Ruhezustand (Guan, Gerhard et al. 2003). Guzman et al. zeigten 2001, dass sich die Mehrzahl der frühen leukämischen Vorläuferzellen in der G₀-Phase des Zellzyklus befindet (Guzman, Neering et al. 2001). Dadurch sind sie resistenter gegenüber den Zellzyklus-spezifischen Chemotherapeutika (Ravandi and Estrov 2006).

Unter anderem folgende zwei Zellmembrantransporter spielen ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Chemotherapie-Resistenz. MDR steht im Folgenden für Multidrug resistance:

- P-Glykoprotein: Dieses Protein, auch CD243 genannt, ist auf dem MDR1-Gen kodiert. Es gehört zur Gruppe der ABC-Transporter. ABC steht für Adenosine triphosphate-binding cassette. Diese Proteine transportieren Moleküle über intra- und extrazelluläre Membranen. Auf diese Weise verhindern sie eine intrazelluläre Anreicherung von Medikamenten (Dean, Fojo et al. 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression von MDR1-mRNS (messenger-Ribonukleinsäure) als Marker für das Chemotherapie-Ansprechen von AML-Patienten benutzt werden könnte (Doxani, Voulgarelis et al. 2013).
- BCRP (Breast cancer related protein): Dieses Membran-assoziierte Protein, auch CD338 genannt, ist ein ABC-Transporter, das auf dem ABCG2-Gen kodiert ist. Mehrere Studien zeigten eine positive Korrelation zwischen hoher BCRP-Expression bzw. -Funktion und niedriger Überlebenswahrscheinlichkeit bei AML-Patienten (Steinbach and Legrand 2007). Bei der kindlichen AML ist die BCRP-Genexpression mit einem schlechteren Ansprechen auf die Induktionstherapie assoziiert (Steinbach, Sell et al. 2002).

In quieszenten AML-Zellen fand man außerdem eine Überexpression der anti-apoptischen Proteine Bcl-X_L und Bcl-2 (Konopleva, Zhao et al. 2002).

Vermutlich spielen sekundäre Mutationen ebenfalls eine Rolle, die den LSC einen noch resistenteren Phänotyp verleihen. Denkbar sind auch Mutationen, die durch den Selektionsdruck der Chemotherapie auftreten und zum Krankheitsfortschritt oder zur Resistenz beitragen (Ravandi and Estrov 2006).

Dieser Resistenzmechanismus wurde beispielsweise bei kleinen Populationen entarteter Vorläuferzellen im Rahmen der CML gezeigt (Chu, Xu et al. 2005).

Horton et al. beschrieben 2012 die Heterogenität myeloischer Leukämien in ihrem Review-Artikel im Hinblick auf Therapie-Resistenzen und Rezidive. Dabei fassen sie phänotypische, genetische und epigenetische Veränderungen zusammen (siehe Abbildung 1-2 auf S. 29), die in den LIC im Laufe der Krankheit und deren Therapie auftreten können (Horton and Huntly 2012).

Da LSC als Ursache sowohl für die Entstehung von Leukämien als auch für Rezidive angesehen werden, sind sie ein vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt.

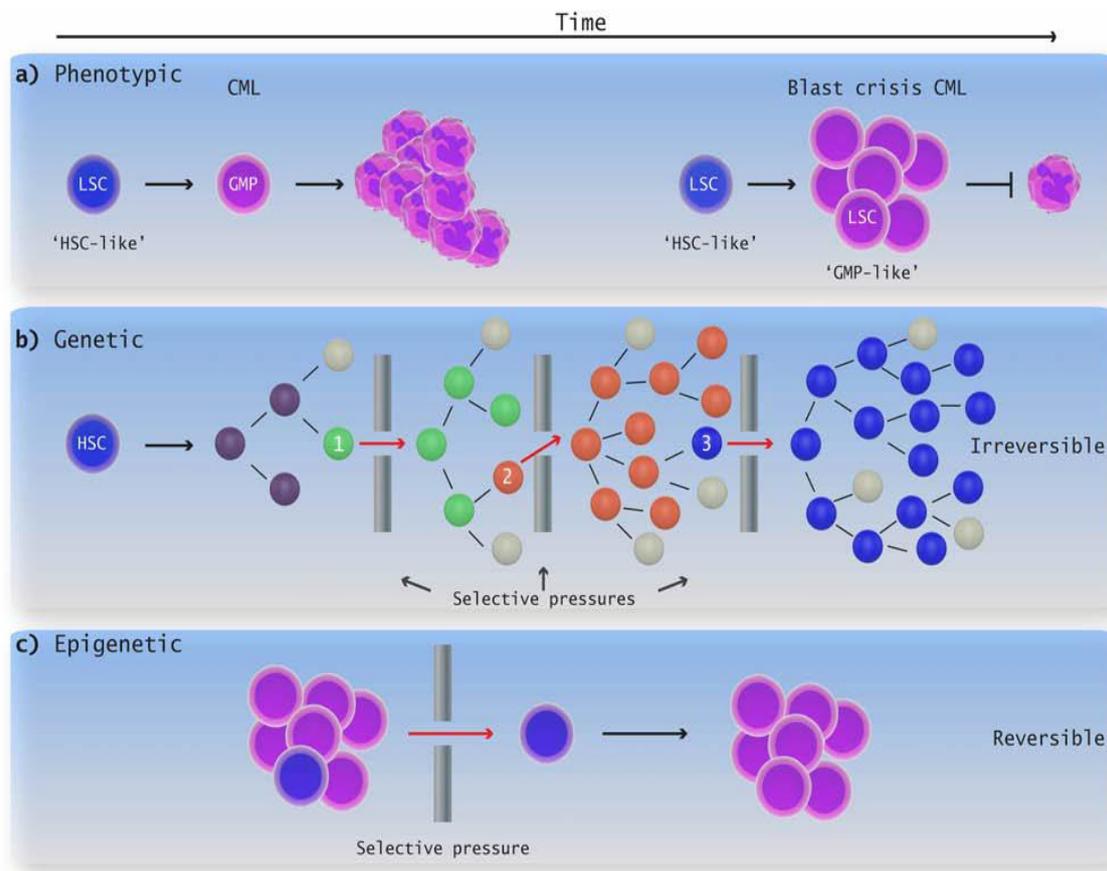


Abbildung 1-2: Heterogenität der AML/CML

a) Während der chronischen Phase einer CML besitzen die LSC phänotypische Eigenschaften, die sehr an HSC erinnern. Mit Fortschritt der Krankheit kann es zur Blastenkrise kommen. Hier entsprechen LSC phänotypisch oft den GMP.

b) Selektionsdruck (Chemotherapie, Nährstoffentzug, Sauerstoffmangel, etc.) kann zur Selektion von mutierten und dadurch resistenten Zellen führen. Ein Farbwechsel zeigt hier den Erwerb einer weiteren Mutation der leukämischen Zelle an. Graue Zellen sind apoptotisch. Die Zahl in einer Zelle steht für die Anzahl erworbener Mutationen.

c) Auch epigenetische Veränderungen können eine Zelle resistent gegenüber Selektionsdruck machen. Im Unterschied zu genetischen Mutationen sind diese Veränderungen jedoch reversibel, so dass die Zelle nach Überwindung des Selektionsdrucks womöglich ihren ursprünglichen Zustand einnehmen kann.

Abkürzungen: CML: Chronische myeloische Leukämie, GMP: Granulocyte-macrophage progenitor, HSC/LSC: Hematopoietic/leukemic stem cell. (Horton and Huntly 2012).

1.3.3 Aktuelle Erkenntnisse zu LIC

Den LIC werden Initiation, Aufrechterhaltung und Rezidive der Leukämie zugeschrieben. Ziel langjähriger Forschung war und ist es daher herauszufinden, auf welcher Differenzierungsstufe die maligne Entartung geschieht. Mit diesem Wissen sollen die LIC therapeutisch spezifischer und damit für die Patienten schonender angegriffen werden.

Da sowohl HSC als auch LSC die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, liegt der Schluss nahe, dass LSC durch eine unbekannte Anzahl an Mutationen aus HSC entstehen (Bonnet 2005). Da HSC eine deutlich längere Lebensdauer als reife Zellen haben, ist die Wahrscheinlichkeit dieser akkumulierten Mutationen in HSC entsprechend erhöht (Passegue, Jamieson et al. 2003).

Es gibt aber auch Grund zur Annahme, dass die LSC nicht aus HSC, sondern aus bereits differenzierteren Progenitoren der Hämatopoese hervorgehen: So konnten im Mausmodell übertragende Onkogene, also Gene, die die Entartung einer Zelle fördern, reifere Vorläuferzellen in LSC umzuwandeln. Beispiele für diese Onkogene sind MLL-ENL, MOZ-TIF2 und MLL-AF9 (Horton and Huntly 2012). Die ursprünglichen Vorläuferzellen waren also keine HSC, dennoch wiesen sie nach der Übertragung der Onkogene Charakteristika von LSC auf.

Progenitoren von Granulozyten bzw. Makrophagen (Granulocyte-macrophage progenitors, GMPs (siehe Abbildung 1-1)) konnten durch retrovirale Transduktion von MLL-AF9 in LSC umgewandelt werden (Chen, Kumar et al. 2008). Die retrovirale Transduktion ist die Genübertragung in Zellen mit Hilfe von Retroviren, einer Gruppe behüllter Viren mit Einzelstrang-Ribonukleinsäure (RNS). Die Retroviren sind aufgrund ihrer Eigenschaften sehr beliebt als Vektoren, also als Überträger von Genen (Bushman 2007). Die oben genannte Umwandlung erforderte allerdings sehr viele übertragene Genkopien (Chen, Kumar et al. 2008). Dennoch zeigten die Versuche eindrucksvoll, dass HSC nicht zwingend Angriffspunkt der malignen Entartung sein müssen.

2008 wiesen Taussig et al. nach, dass die Methodik, mit der AML-Vorläuferzellen in SCID-Mäuse transplantiert werden, womöglich falsche Rückschlüsse auf die LIC mit sich bringt: Da die LIC einen verschwindend

geringen Anteil an allen leukämischen Zellen ausmachen, müssen sie erst isoliert werden. Dies geschieht mit Antikörpern, die an unterschiedliche Oberflächenmoleküle wie CD34 oder CD38 binden und durch ihre Fluoreszenz im Falle einer Bindung zwischen Molekül und Antikörper identifiziert und die entsprechenden Zellen getrennt werden können. Mit Hilfe dieser Methode wurde vielfach gezeigt, dass CD34+/CD38- leukämische Zellen im Gegensatz zu anderen Populationen eine Leukämie in SCID-Mäusen bewirken. Taussig et al. zeigten allerdings, dass Anti-CD38-Antikörper einen massiven inhibitorischen Effekt auf das Anwachsen von Leukämie-Zellen haben, so dass CD34+/CD38+ Zellen, die zuvor entsprechend mit einem Anti-CD38-Antikörper versehen worden waren, nicht aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle, sondern aufgrund des Antikörpers keine Leukämie in den Mäusen induzierten. Weiter zeigte die Arbeitsgruppe, dass dieser Effekt durch immunsuppressive Antikörper reduziert werden kann (Taussig, Miraki-Moud et al. 2008). Mit Hilfe dieser modifizierten Methode kam man zu überraschenden Ergebnissen in Bezug auf das Anwachsen der Leukämien: So entwickelten 19 von 21 Mäusen, die die vermutlich schon etwas differenziertere CD34+/CD38+ Subpopulation einer AML transplantiert bekommen hatten, eine Leukämie (Taussig, Miraki-Moud et al. 2008).

Im Zusammenhang mit der ALL zweifelt auch Vormoor die Theorie stark an, LIC entstünden ausschließlich aus HSC, und gibt zu bedenken, dass kleinere Veränderungen in der Methodik des SCID-Mausmodells zu bedeutenden Unterschieden im Anwachsen von Leukämiezellen führe (Vormoor 2009). Weiterhin wurde gezeigt, dass bei der ALL viele leukämische Zellen und eben nicht nur mutierte HSC in der Lage waren, eine Leukämie in Mäusen zu bewirken. Dies schwächt die HSC-Hypothese zumindest bei der ALL erheblich (Vormoor 2009; Hörrmann 2013). Daher wird auch in dieser Arbeit bei der Ursprungszelle einer Leukämie nun von LIC statt von LSC die Rede sein. Bei Zitaten wird der von den Autoren verwendete Begriff in der Regel beibehalten.

Im Falle von reiferen Vorläuferzellen als Ursprungszellen einer Leukämie könnte die Fähigkeit zur Selbsterneuerung auf einen synergistischen Effekt zurückzuführen sein: Zum einen bewirken Mutationen die maligne Entartung

der schon reiferen Vorläuferzelle, zum anderen bewirken darauf aufbauende Mutationen die Fähigkeit der Selbsterneuerung, die physiologisch ja schon aufgegeben war (Bonnet 2005).

Obige Experimente legen den Schluss nahe, dass akute Leukämien vermutlich sowohl aus HSC als auch aus differenzierteren Progenitoren entstehen können. Grundvoraussetzung dabei ist die Fähigkeit der Selbsterneuerung (Horton and Huntly 2012).

1.3.4 Nachweis von LIC

Wie in 1.3.2 beschrieben, teilen HSC und LIC mehrere funktionelle und teilweise auch phänotypische Eigenschaften. Daher wurden die Verfahren zur Identifizierung von HSC auch zur Suche von LIC akuter Leukämien, insbesondere der AML eingesetzt (siehe auch 1.2.2 Nachweis hämatopoetischer Stammzellen auf S. 24). Von besonderer Bedeutung sind dabei folgende Methoden:

- Immunphänotypische Bestimmung von CD34+/CD38- Zellen
- Funktionelle Assays wie die Hoechst-Färbung (Wulf, Wang et al. 2001) und die Aldeflour-Färbung (Cheung, Wan et al. 2007)

Während in Zellkulturen meist ausschließlich leukämische Zellen gezüchtet werden, kommen im Krankheitsfall innerhalb des Knochenmarks sowohl HSC als auch LIC vor, so dass weitere Marker notwendig sind, um diese beiden Gruppen voneinander zu trennen. Bisher wurden unter anderem das C-type lectin-like molecule-1 (CLL-1) sowie verschiedene Lineage-Marker beschrieben, die mit einer Leukämie assoziiert werden (van Rhenen, van Dongen et al. 2007). Moshaver et al. wiesen nach, dass AML-SP-Zellen mit Hilfe von CLL-1 und Lineage-Markern von physiologischen SP-Zellen unterschieden werden können (Moshaver, van Rhenen et al. 2008).

Außerdem wurden folgende Konstellationen von CD-Oberflächenmolekülen in Verbindung mit leukämischen Vorläuferzellen gebracht:

- Für die ALL: CD133+/CD19- sowie CD133+/CD38- (Cox, Diamanti et al. 2009)
- Für die AML: CD96+ (Hosen, Park et al. 2007)

Die Selektion von leukämischen Vorläuferzellen anhand der Expression bestimmter CD-Moleküle ist allerdings auch mit Problemen behaftet. Einen allgemeinen „LSC-Phänotyp“ gibt es höchstwahrscheinlich nicht (Ahlers 2010). Selbst die Expression von CD34 sowie CD38 variiert in verschiedenen Leukämien stark. Darüber hinaus kommen auch ausdifferenzierte CD34+ Blasten vor (Sutherland, Blair et al. 1996).

Schließlich spielt zusätzlich das Knochenmark als unmittelbare Mikro-Umgebung der entarteten Zellen eine Rolle bei der Pathogenese. So wurden bereits eine Abnahme von Fibroblasten und Makrophagen sowie eine de-regulierte Zytokinproduktion beobachtet (Mayani, Flores-Figueroa et al. 2009).

Zusammenfassend handelt es sich bei akuten Leukämien um sehr heterogene Krankheitsbilder. Phänotypische sowie funktionelle Eingrenzungsversuche der LIC bleiben aufgrund ebendieser Heterogenität, aber auch der Dynamik im individuellen Krankheitsverlauf limitiert. Dennoch sind sie im klinischen Kontext sehr hilfreich, sowohl im Hinblick auf prognostische als auch auf therapeutische Konsequenzen.

1.3.5 LIC-Fraktion und Prognose bei Erstdiagnose

Die Rolle von CD34-positiven Zellen im Zusammenhang mit der Prognose wird seit einigen Jahren kontrovers diskutiert. Dalal et al. stellten 1997 fest, dass AML-Patienten, die bei Diagnosestellung einen hohen Anteil CD34-positiver Zellen aufweisen, insgesamt signifikant schlechtere Chancen auf eine komplette Remission haben als Patienten, bei denen die CD-34-Expression weniger ausgeprägt ist (Dalal, Wu et al. 1997).

Ebinger et al. gelang 2010 der Nachweis, dass der Anteil an CD34-positiven, CD38-negativen Zellen bei Erstdiagnose einer kindlichen ALL positiv mit der Höhe der MRD-Last korreliert (Ebinger, Witte et al. 2010). Im darauffolgenden Jahr konnten sie auch bei der kindlichen AML diesen Zusammenhang zeigen:

Ein hoher Anteil an Zellen mit den Eigenschaften CD34+/CD38-/CD45-(/low) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ist mit einer ungünstigen Prognose verbunden (Witte, Ahlers et al. 2011). Damit bietet sich eben diese Fraktion unreifer Zellen als prognostischer Marker an.

1.3.6 In-vitro-Modelle

Organische Vorgänge, die außerhalb eines Organismus ablaufen, werden als in vitro (lateinisch für „im Glas“) bezeichnet. Häufig versucht man hierbei, physiologische Bedingungen zu schaffen, so dass In-vitro-Beobachtungen möglichst Rückschlüsse auf Reaktionen in vivo, also im Lebendigen, zulassen. Häufig geschieht auch die Testung von Medikamenten in vitro, nämlich in Zellkulturen (siehe 2.2.1 Zellkultur, S. 49).

1.3.7 Therapeutische Konsequenzen

Aufgrund der beschriebenen Erkenntnisse über die zentrale Rolle unreifer leukämischer Zellen liegt der Versuch nahe, diese Populationen therapeutisch anzugreifen.

Die LIC-Eigenschaften können abhängig von der Entwicklungsstufe der mutierten Zelle variieren. Entsprechend können leukämische Erkrankungen nicht als eine maligne Entität angesehen werden, sondern müssen differenziert betrachtet werden, also auch bei der Therapie (Gilliland, Jordan et al. 2004).

Konopleva und Jordan beschreiben in ihrem Review-Paper extrinsische und intrinsische Faktoren, die das Überleben leukämischer Stammzellen stark beeinflussen und damit potenzielle Angriffspunkte einer gezielten Therapie sind (Konopleva and Jordan 2011): Zu den intrinsischen Faktoren zählen:

- Regulatoren des Zellzyklus
- für das Überleben förderliche Signalwege (Nuclear Factor κ B, NF- κ B, Akt)
- Regulatoren bei oxidativem Stress
- spezifische molekulare Komponenten, die für die Selbsterneuerung wichtig sind

Die für das Überleben der Stammzellen entscheidenden extrinsischen Faktoren werden bei Erkrankten vom Knochenmark gestellt:

- Chemokinrezeptoren (CXCR4)
- Adhäsionsmoleküle (VLA-4, CD44)
- Proteine, die bei Hypoxie eine Rolle spielen

Eine der größten Herausforderungen bei der Bekämpfung der LIC ist die Schonung physiologischer Vorläuferzellen, die den entarteten Zellen sehr ähneln können (Ravandi and Estrov 2006).

Verschiedene Inhibitoren der ABC-Transporter (siehe 1.3.2 Rezidive und Resistenzmechanismen leukämischer Stammzellen (LSC), S. 27) konnten klinisch teils wenig überzeugen. Da HSC diese Transporter ebenfalls stark exprimieren, werden hierbei auch gesunde Zellen angegriffen (Dean, Fojo et al. 2005).

Dieses Problem könnte umgangen werden, indem Signalwege identifiziert und inhibiert werden, die spezifisch das Überleben der LIC regulieren.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird beispielsweise in physiologischen CD34+ Vorläuferzellen kaum oder nicht exprimiert, während CD34+ AML-Zellen vermehrte NF- κ B-Aktivität erkennen lassen (Guzman, Neering et al. 2001). Passend dazu wirkt der NF- κ B-Inhibitor Parthenolid, ein aus Mutterkraut gewonnenes Lakton, apoptotisch auf AML-Vorläuferzellen, während er physiologische Vorläuferzellen deutlich weniger angreift als Cytosin-Arabinosid, ein Standard-Chemotherapeutikum (Guzman, Rossi et al. 2005).

Zumindest bei AML-Blasten ist nachgewiesen, dass sie auch vom Phosphatidylinositid (PI)3-Kinase-Signalweg abhängig sind (Xu, Simpson et al. 2003). Die PI3-Kinase hat Akt als Substrat – eine weitere Proteinkinase, die eine wesentliche Rolle bei der Regulierung von Proliferation, Zellwachstum und -überleben spielt (Vivanco and Sawyers 2002).

Bislang wurden weder beim PI3-Kinase-Signalweg noch beim NF- κ B-Signalweg spezifische Mutationen beschrieben (Gilliland, Jordan et al. 2004). Man geht

davon aus, dass verschiedene genetische Ereignisse zusammenspielen, um bestimmte Signalwege zu aktivieren.

Neben den NF- κ B-Inhibitoren und PI3-Kinase-Inhibitoren gibt es bereits eine Vielzahl neuartiger Medikamente, die spezifische und pathologisch veränderte Zellmechanismen und Signalwege beeinflussen (Gilliland, Jordan et al. 2004):

- Kinaseinhibitoren
- Histondeacetylase-Inhibitoren
- Cyclin-D-Kinase-Inhibitoren
- Hitzeschockprotein-Inhibitoren
- Methylierungsinhibitoren
- Farnesyltransferase-Inhibitoren
- Proteasom-Inhibitoren

Wie auch physiologische Stammzellen befinden sich leukämische Stammzellen meist in einem Ruhezustand (Guan, Gerhard et al. 2003). Dies macht sie weniger angreifbar gegenüber klassischer Chemotherapie. Cytosinarabinosid wirkt beispielsweise fast ausschließlich in der Synthesephase des Zellzyklus zytotoxisch. Daher ist die Stimulation von quieszenten LIC ein vielversprechendes therapeutisches Ziel, da sie deutlich leichter angreifbar wären, sobald sie DNA synthetisieren und sich teilen.

Es konnte in vitro bereits gezeigt werden, dass die Mehrzahl an quieszenten LIC durch Entzug von Wachstumsfaktoren (Stammzellfaktor, FLT3-Ligand sowie Interleukin 3) in den aktiven Zellzyklus eintritt. Dies geschah innerhalb von 72 Stunden. Ruhende physiologische Zellen blieben interessanterweise auch beim Entzug der Faktoren quieszent (Guan, Gerhard et al. 2003).

Vor diesem Hintergrund ist man aktuell auf der Suche nach Medikamenten, die oben beschriebene Eigenschaften der LIC ausnutzen, um sie möglichst spezifisch angreifen zu können. Zwei dieser Medikamente wurden im Rahmen dieser Arbeit an leukämischen Zellen in vitro getestet. Sie werden in den folgenden beiden Unterkapiteln vorgestellt: Arsentrioxid (ATO) und 4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione (TDZD-8).

1.4 Arsentrioxid (ATO)

1.4.1 Historische Entwicklung von ATO

Die natürliche Substanz Arsen wird seit über 2400 Jahren in der Medizin verwendet (Waxman and Anderson 2001). Die sogenannte Fowlersche Lösung, eine 1%ige Kaliumarsenit-Lösung, diente vom 18. bis ins 20. Jahrhundert als allgemeines Stärkungsmittel. 1931 wurde sie in den USA zur Therapie der CML eingesetzt (Jolliffe 1993). Im Laufe des 20. Jahrhunderts nahm die Bedeutung von Arsen allerdings wieder ab. Hauptgrund war die Angst vor unerwünschten Arzneimittelwirkungen, insbesondere der Karzinogenität von Arsen, zum Beispiel in Bezug auf Hautkrebs (Cuzick, Evans et al. 1982). In den 1970ern wurde „ailing-1“, eine Lösung, die neben Kräuterextrakten auch ATO enthielt, zur Therapie der APL verwendet (Waxman and Anderson 2001). ATO ist bis heute ein anerkanntes Therapeutikum bei der Behandlung der APL.

1.4.2 Aktuelle Indikationen von ATO

Heute ist ATO sowohl in Europa als auch in den USA für die Therapie der APL zugelassen.

Ursprünglich wurde ATO einzig zur Therapie bei Rezidiven eingesetzt. Jüngere Studien legten allerdings nahe, dass ATO auch bei der Behandlung der de-novo-APL großen Nutzen haben könnte.

So zeigte eine Phase-III-Studie in den USA mit 481 Patienten, dass die Induktions- und Konsolidierungstherapie (Tretinoin, Cytarabin, Daunorubicin) mit einem signifikant besseren Event-free survival (EFS) und Disease-free survival (DFS) einhergeht, wenn sie von einer zwei-zeitigen ATO-Konsolidierung zu je 25 Tagen flankiert wird (Powell, Moser et al. 2010). Auch das Überleben nach drei Jahren war in der ATO-Therapie-Gruppe höher (86 % gegenüber 81 %, $p=0,059$).

Weitere Studien machen deutlich, dass durch die Einbeziehung von ATO in die First-line-Therapie der APL bei gleichem klinischen Outcome deutlich niedrigere Dosen klassisch-zytotoxischer Chemotherapeutika (z.B. Anthrazyklin)

verwendet werden könnten (Gore, Gojo et al. 2010). Damit würden insbesondere auch entsprechende Nebenwirkungen reduziert.

1.4.3 Wirkungsweise von ATO

Zhou fasst in einem Übersichtsartikel von 2012 folgende Wirkungen von ATO zusammen (Zhou 2012):

- Förderung der Zelldifferenzierung:
Im Rahmen einer APL ist das Fusionsprotein PML-RARA, das aufgrund der Translokation t(15;17) entsteht, diagnostisch beweisend. Es verhindert unter anderem die normale Zelldifferenzierung (de The and Chen 2010). ATO fördert den Abbau von PML-RARA (Zhang, Yan et al. 2010). In myeloischen Zelllinien kann ATO die Genexpression modulieren. Dadurch kommt es zur nicht-terminalen Differenzierung der Zellen, unter anderem durch eine Hyperacetylierung von Histonen (List, Beran et al. 2003).
- Apoptose-Induktion:
Rojewski et al. untersuchten die Potenz von ATO, bei verschiedenen leukämischen Zelllinien Apoptose zu induzieren. So konnte bei der Zelllinie KG-1a gezeigt werden, dass ATO-Konzentrationen von bereits 1 $\mu\text{mol/l}$ ausreichen, um nach mehreren Wochen sämtliche Zellen apoptotisch werden zu lassen (Rojewski, Baldus et al. 2002).
- Akkumulation von zellulären, reaktiven Sauerstoffspezies:
Unter anderem durch die Inhibition der Glutathion-Peroxidase, die reaktive Sauerstoffspezies abbaut, kann ATO die intrazelluläre Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies steigern (Park, Lee et al. 2005).
- Inhibierung des Hedgehog-Signalweges:
In Folge der Hedgehog-Signalkaskade wird bei der APL die Genexpression über das Protein Cubitus interruptus reguliert (Briscoe and Therond 2013). ATO inhibiert den abnorm aktivierten Signalweg (Yang, Cao et al. 2013).

- **Eliminierung von LSC:**

Bei der APL wird die Eliminierung der LSC in erster Linie durch den Abbau des oben beschriebenen PML-RARA-Fusionsproteins bewerkstelligt (Nasr, Guillemin et al. 2008). Aber auch bei Leukämien abseits der APL ist eine Wirkung auf LSC bekannt. Bedeutsame inhibierte Signalwege bei Stammzellen sind beispielsweise der Notch-, der NF- κ B- und der oben erwähnte Hedgehog-Signalweg (Chen, Zhou et al. 2011).

Aufgrund der beschriebenen Wirkung auf LSC ist ATO ein potenzielles Therapeutikum nicht nur in Modellen, sondern auch in der Klinik. Daher soll insbesondere die Wirkung von ATO auf die SP in KG-1a-Zellen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

1.5 TDZD-8

Mit TDZD-8 ist die Verbindung 4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione gemeint.

1.5.1 Herkunft von TDZD-8

TDZD-8 wurde ursprünglich als kompetitiver Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) entwickelt. Die GSK3 β ist bei neurologischen Erkrankungen wie Alzheimer besonders aktiv, weshalb man sich von TDZD-8 einen therapeutischen Benefit verspricht (Jordan 2007).

Präklinische Studien untersuchten die Verbindung bereits in Bezug auf Zytoprotektion in verschiedenen (Nager-) Modellen. Analysiert wurde TDZD-8 unter anderem im Zusammenhang mit Typ-2-Diabetes, Alzheimer und Verletzungen des Rückenmarks (Guzman, Li et al. 2007).

1.5.2 Beschriebene Effekte von TDZD-8 auf leukämische Zellen

Guzman et al. konnten nachweisen, dass TDZD-8 innerhalb von Stunden apoptotisch auf leukämische Zellen, insbesondere frühe Vorläuferzellen (CD34+/CD38-), wirkt. Die Zellen wurden aus Patientenproben gewonnen, die

unter anderem an AML, CML oder ALL erkrankt waren. Physiologische HSC in einer Zellkultur hingegen überlebten die Hinzugabe von TDZD-8 (Guzman, Li et al. 2007).

Außerdem inhibierte TDZD-8 das Engraftment von AML-LSC in NOD/SCID-Mäusen, nicht aber das Engraftment normaler HSC (Jordan 2007).

TDZD-8-Analoga zeigen ähnliche Effekte und können laut einer Untersuchung von Nasim et al. innerhalb von 30 min zum Zelltod bei Zellen der Zelllinien MV4-11 führen (Nasim, Guzman et al. 2011).

1.5.3 Wirkungsweise von TDZD-8

Die Wirkungsweise von TDZD-8 ist noch nicht im Detail geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass es die NF- κ B-Aktivität in den betroffenen Zellen inhibiert (Jordan 2007). Weitere Faktoren sind der Verlust der Membranintegrität und die Induktion von oxidativem Stress (Guzman, Li et al. 2007).

Andere bekannte GSK3 β -Inhibitoren konnten laut Guzman et al. keinen Leukämie-spezifischen Zelltod induzieren. Vermutlich beruht die antileukämische Wirkung von TDZD-8 also nicht oder zumindest nicht nur auf der GSK3 β -Inhibition (Guzman, Li et al. 2007).

1.6 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit gingen wir folgenden Fragestellungen nach:

Ziel des ersten Teils der Arbeit war es, zehn definierte leukämische Zelllinien durchflusszytometrisch auf Stammzellkriterien (SP-Anteil) zu charakterisieren und diese differenziellen Stammzellkriterien zu analysieren. Differenziell bedeutet hierbei, dass verschiedene SP anhand ihres Anteils an der Hauptpopulation quantitativ gegenübergestellt werden können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden differenzielle Effekte potenzieller Leukämie-Therapeutika (ATO sowie TDZD-8) auf den Stammzellanteil einer definierten Zelllinie (KG-1a) analysiert. Hierbei wurde zwischen Effekten auf diploide (einfacher Chromosomensatz) und tetraploide (doppelter Chromosomensatz) Zellen unterschieden. Ebenso wurde der Effekt auf das Verhältnis der beiden Populationen zueinander untersucht.

Exemplarisch verglichen wir im dritten Teil der Arbeit die SP der diploiden Zellen mit der diploiden Hauptpopulation von KG-1a-Zellen in Bezug auf folgende Eigenschaften:

- 1) Expression von CD34 und CD38
- 2) Expression von CD243 und CD338.

2 Material und Methoden

Neben sämtlichen Materialien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, erläutert dieses Kapitel die Methoden, mit Hilfe derer zehn Zelllinien (siehe 2.2.1.2, S. 50) auf reproduzierbar hohe SP untersucht wurden. Die Zelllinie KG-1a wurde anschließend mit unterschiedlichen potenziellen Therapeutika behandelt (siehe 2.2.3 Herstellung der Therapieansätze, S.61). Neben der Hoechstfärbung in Verbindung mit einem Lebend-Tot-Farbstoff, die den Großteil dieser Versuche ausmachen, wurden Apoptose-Verhalten und Stammzellmarker-Expression untersucht (siehe 2.2.6).

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-1: Allgemeine Geräte, Glas- und Kunststoffmaterial

Material	Hersteller
Beheizbares Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Dtl.
Blutanalysegerät ABX Micros CRP	Axonlab AG, Reichenbach an der Fils, Dtl.
Durchflusszytometer BD LSR II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
FACS-Röhrchen 5 ml, Rundboden inkl. Röhrchenabdeckungen	Becton Dickinson GmbH
Falcon-Röhrchen Cellstar Tubes 15/50 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Filter-tip Pipettenspitzen FT 10, FT 20, FT 100, FT1000	Greiner bio-one GmbH

Feinwaage Typ AC 210 S-001	Sartorius AG, Göttingen, Dtl.
Gefrierschrank (-23 °C)	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Dtl.
Gefrierschrank (-80 °C) -86 °C Freezer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Dtl.
Inkubator HERA cell	Heraeus GmbH, Hanau, Dtl.
Kanülen BD Microlance 3 18Gx 1,5"	Becton Dickinson GmbH
Kryoröhrchen CRYO S 2,0 ml	Greiner bio-one GmbH
Mikroskop CX 40	Olympus AG, Shinjuku, Tokio, Japan
Milli-Q-Biocel	Millipore GmbH, Schwalbach, Dtl.
Wasseraufbereitungssystem	
Neubauerkammer Improved	Karl Hecht GmbH + Co. KG "Assistent", Sondheim, Dtl.
Pipetten verstellbar, <i>Pipetman</i> 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson International, Limburg, Dtl.
Pipettenspitzen 10 µl, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Dtl.
Pipettenspitzen 200 µl, gelb	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht, Dtl.
Pipettenspitzen 1000 µl Ultratip, blau	Greiner bio-one GmbH
Pipettiergerät Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Dtl.
Pipettiergerät Pipetboy Plus	Integra Biosciences GmbH

Safe-Lock-Tubes 0,5/1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
Spritzen, steril 2, 5, 10 ml	Braun GmbH, Kronberg/Taunus, Dtl.
Sterile Plastikpipetten 1, 2, 5, 10, 25, 50 ml	Corning Costar GmbH, Bodenheim, Dtl.
Sterile Werkbank Hera safe	Heraeus GmbH
Umluftgewerbekühlschrank (4 °C)	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Dtl.
Vortexer MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Dtl.
Zellkulturflaschen CellStar 50/250/550 ml, roter Filterverschluss	Greiner bio-one GmbH
Zentrifuge Rotixa RP	Andreas Hettich GmbH + Co. KG, Tuttlingen, Dtl.
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Andreas Hettich GmbH + Co. KG
6-well Tissue Culture Plate	Becton Dickinson GmbH

2.1.2 Allgemeine Chemikalien

Tabelle 2-2: Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Dtl.
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
FACSFlow	Becton Dickinson GmbH
FACSClean	Becton Dickinson GmbH
FACSRinse	Becton Dickinson GmbH
Fötales Kälberserum (Fetal calf serum, FCS), hitzeinaktiviert (30 min bei 56 °C)	Biochrom AG, Berlin, Dtl.
HEPES (4-(3-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure)	Biochrom AG
L-Glutamin 200mM	Biochrom AG
Paraformaldehyd, Pulver	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
Penicillin/Streptomycin 10.000 U / ml	Biochrom AG
Phosphatpuffersalzlösung (Phosphate buffer saline, PBS)	Lonza Group AG
RPMI 1640	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH

2.1.3 Stammlösungen

- Zellkulturmedium RPMI+:
500 ml RPMI 1640
+ 10 % FCS bzw. 20 % FCS (abhängig von Herstellerempfehlung für die entsprechende Zelllinie, inaktiviert bei 56 °C für 30 min)
+ 2 % HEPES
+ 1 % Penicillin/Streptomycin
+ 1 % L-Glutamin
- DMEM+:
500 ml DMEM
+ 10 % FCS
+ 5 % HEPES
(teilweise zusätzlich 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 1 % L-Glutamin)
- Einfriermedium:
90 % FCS
10 % DMSO

2.1.4 Potenzielle Therapeutika

Tabelle 2-3: Potenzielle Therapeutika

Potenzielles Therapeutikum	Hersteller
Trisenox (Arsentrioxid, mit sterilem Wasser auf 5,05 mM [1 mg/ml] verdünnt)	TEVA GmbH, Ulm, Dtl.
TDZD-8 (mit sterilem Wasser auf 2 mM bzw. 20 mM verdünnt)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH

2.1.5 Stammzellreagenzien und Lebend-Tot-Marker

Tabelle 2-4: Reagenzien zur Bestimmung der SP

Reagenz	Hersteller
Hoechst 33342 (mit sterilem Wasser auf 1 mg/ml verdünnt)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
Verapamil (mit Alkohol auf 10 mM verdünnt)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH

Tabelle 2-5: Lebend-Tot-Marker

Reagenz	Hersteller
Propidium Iodid (PI, mit PBS (1x) auf 200 µg/ml verdünnt)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH

2.1.6 Antikörper und Fluorochrome

Tabelle 2-6: Antikörper

(Fluoreszenzmarkierte) Antikörper	Klon	Hersteller
CD34-APC-Cy7	581	BioLegend Company, San Diego, California, USA
CD38-PE-Cy7	HIT2	BioLegend Company
CD243-APC	UIC2	BioLegend Company
CD338-PE	5D3	BioLegend Company
Normal Rabbit Serum	-	Life Technologies GmbH (Invitrogen), Darmstadt, Dtl.

Tabelle 2-7: Weitere fluoreszierende Reagenzien

Fluoreszierendes Reagenz	Hersteller
AnnexinV-PerCP-e710	eBioscience GmbH, Frankfurt, Dtl.

2.1.7 Beads

Tabelle 2-8: Beads

Beads	Hersteller
Compensation Beads (Plus)	Becton Dickinson GmbH

2.1.8 EDV-Software

Tabelle 2-9: EDV-Software

Software	Hersteller
FACS Diva Software Version 6.1.3	Becton Dickinson GmbH
JMP Version 10 und 11	SAS Corporation, Cary, North Carolina, USA

2.2 Methoden

Nach einer Einführung in die Zellkultur und die Durchflusszytometrie (siehe 2.2.1-2.2.2) werden die Herstellung der Therapieansätze sowie alle angewandten Färbetechniken erläutert (siehe 2.2.3-2.2.6). Anschließend werden die Behandlungsversuche der untersuchten Medikamente erläutert (siehe 2.2.7-2.2.8). Da wir bei unseren Versuchen grundsätzlich Kombinationen der Färbungen verwendeten, werden diese als Übersicht unter 2.2.9 vorgestellt. Die Darstellung der statistischen Auswertung schließt das Kapitel ab.

2.2.1 Zellkultur

Unter Zellkultur versteht man die Kultivierung von Zellen in einem Nährmedium. Zellkulturen lassen sich in finite, also zeitlich begrenzt kultivierbare, und permanente Kulturen einteilen (Schmitz 2011, S.72). Letztere haben die Eigenschaft der „Unsterblichkeit“. Großer Vorteil von permanenten Zellkulturen ist folglich die stete Verfügbarkeit, so dass Versuchsreihen zeitlich ausgedehnt sein können und jederzeit wiederholbar sind (Schmitz 2011, S. 76). Die von uns benutzten leukämischen Zelllinien sind allesamt permanente Zellkulturen, deren Zellen ursprünglich aus dem Knochenmark von an einer Leukämie erkrankten Menschen isoliert wurden. Sie sind beispielsweise bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) erhältlich.

Da leukämische Zellen ihren Ursprung im hämatopoetischen System haben, verwendeten wir ausschließlich Suspensionskulturen. Die Zellen bewegen sich also frei im Medium und wachsen nicht adhärent.

2.2.1.1 Prinzip der Zellkultur

Jede Zellkultur benötigt neben den Zellen auch ein Medium, das sie mit lebenswichtigen Nährstoffen versorgt. Als Medium wurde RPMI+ (Roswell park memorial institute) verwendet (siehe 2.1.3 Stammlösungen, S. 46). RPMI 1640 ist eine Lösung von Glukose, Bikarbonat, Aminosäuren, Salzen und Vitaminen, die für das Überleben der leukämischen Zellen essentiell sind (Schmitz 2011, S. 105). Zur pH-Stabilisierung ist zudem ein Hydrogencarbonat-Puffersystem enthalten sowie Phenolrot, das pH-Veränderungen anzeigt.

Zusätzlich wurde dem RPMI 1640 noch FCS zugesetzt, das derzeit wohl bekannteste Serum bei der Zellkultur. Es enthält neben Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen ebenfalls noch Aminosäuren und Vitamine (Schmitz 2011, S. 116). Damit ist es essentieller Bestandteil der Zellkultivierung. Das FCS wurde für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Dieser routinemäßig durchgeführte Vorgang soll eventuell vorhandene Komplementfaktoren des Serums inaktivieren. Allerdings ist die Notwendigkeit der Hitzeinaktivierung von Seren umstritten (Schmitz 2011, S. 118).

Neben dem FCS enthält RPMI+ noch HEPES, ein organischer Puffer zur pH-Stabilisierung (Schmitz 2011, S. 122). Meist liegt der pH-Wert in der Zellkultur bei 7,2 – 7,4, also sehr nahe am physiologischen pH-Wert im menschlichen Blut (7,35 – 7,45).

Penicillin/Streptomycin ist ein weiterer Zusatz, der durch prophylaktische Zugabe zum Medium das Auftreten von Kontaminationen durch Bakterien unwahrscheinlicher macht. Das Penicillin G, ein klassisches Beta-Laktam-Antibiotikum, hemmt die bakterielle Zellwandsynthese und richtet sich primär gegen gram-positive Erreger. Streptomycin gehört zur Gruppe der Aminoglykoside und hemmt die bakterielle Proteinbiosynthese (Schmitz 2011, S. 124). Es weist ein breites Wirkspektrum auf und greift vor allem gram-negative Erreger an.

Ein weiterer Zusatz ist L-Glutamin. Je höher die Zellteilungsrate in einer Kultur, desto höher ist der Energiebedarf. Physiologischerweise wird der größte Teil an Glutamin in vivo über die Nahrung zugeführt. In vitro muss daher besonders bei hohem Energiebedarf L-Glutamin supplementiert werden (Schmitz 2011, S. 119).

Entsprechend der Herstellerangaben wurden die Zellen in 50ml- und 250ml-Zellkulturflaschen bei 37,0 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert.

2.2.1.2 Maligne Zelllinien

In Tabelle 2-10 werden sämtliche verwendete Zelllinien bezüglich der ursprünglichen Patienten (Alter, Geschlecht) und der zugrunde liegenden Erkrankung charakterisiert. Zur Einteilung der Leukämien siehe auch 1.1.2 Einteilung und Klassifikation auf S. 15.

Tabelle 2-10: Verwendete Zelllinien

Neben der Zelllinie sind Erkrankung und Patienteninformationen aufgelistet, aus denen die malignen Zellen gewonnen wurden. Angaben zur Erkrankung soweit bekannt.

Maligne Zelllinie	Erkrankung	Ursprung
EOL-1	AML	33-jähriger Mann
Jurkat	T-ALL	14-jähriger Junge
Kasumi-1	AML FAB M2	7-jähriger Junge
KG-1a	AML FAB M0	59-jähriger Mann
K562	CML	53-jähriger Mann
MHH-CALL4	Prä-B-ALL	11-jähriges Mädchen
MV4-11	AML FAB M5	10-jähriger Junge
NALM-16	B-Vorläufer- ALL	12-jähriges Mädchen
REH	B-Vorläufer- ALL	15-jähriges Mädchen
SEM	B-Vorläufer- ALL	5-jähriges Mädchen

2.2.1.3 Subkultur und Zellzählung

Eine Zellkultur braucht aus folgenden Gründen in regelmäßigen Abständen neues Medium (Schmitz 2011, S. 98):

- Zugeführte Inhaltsstoffe werden von den Zellen metabolisiert und daher mit der Zeit knapper.
- Manche Inhaltsstoffe, vor allem Antibiotika und Wachstumsfaktoren, sind nur zeitlich begrenzt stabil (Penicillin ist z.B. nur drei Tage stabil.).
- Durch die Metabolisierung entstehen Abfallstoffe, die zu einem pH-Wert-Abfall, also einer Ansäuerung des Mediums führen.

Hierbei muss nicht jedes Mal das komplette alte Medium erneuert werden. Es reicht aus, ein gewisses Volumen der alten Zellkultur nach einer Zellzählung zu behalten und es anschließend mit neuem Medium (RPMI+) zu verdünnen. Diese Subkultivierung wird auch Passagieren genannt. Das so genannte Splitting-Verhältnis gibt an, wie groß die Relation zwischen altem und neuem Suspensionsvolumen ist. Über das Splitting-Verhältnis kann man die Kultur auf diejenige Zelldichte reduzieren, die für das Wachstum der Zellen am geeignetsten ist (siehe Tabelle 2-11). Wir passagierten regelmäßig montags, mittwochs und freitags. Die Zelllinie MHH wurde montags und freitags passagiert. Manche Zelllinien brauchen mehr FCS als andere. Der FCS-Anteil am Medium ist ebenfalls in Tabelle 2-11 dargestellt.

Tabelle 2-11: Zelllinien und deren Zellzahl nach Passage

Bei den Zelllinien EOL-1 und Jurkat wurde RPMI+ mit einem FCS-Gehalt von zuerst 10 %, später 20 % benutzt.

Maligne Zelllinie	FCS-Gehalt des Mediums	Zelldichte nach Passage
EOL-1	10 %/20 %	0,5 x 10 ⁶ /ml
Jurkat	10 %/20 %	0,5 x 10 ⁶ /ml
Kasumi-1	20 %	0,5 x 10 ⁶ /ml
KG-1a	20 %	0,5 x 10 ⁶ /ml
K562	10 %	0,2 x 10 ⁶ /ml
MHH	20 %	0,5 x 10 ⁶ /ml
MV4-11	10 %	0,4 x 10 ⁶ /ml
NALM-16	10 %	0,7 x 10 ⁶ /ml
REH	10 %	0,3 x 10 ⁶ /ml
SEM	10 %	0,5 x 10 ⁶ /ml

Um exakte Zelldichten zu erreichen, bestimmten wir vor jeder Passage die Zellzahl der jeweiligen Zellkultur mit einem elektronischen Blutanalysegerät.

Bei den Therapieansätzen bestimmten wir darüber hinaus auch Zelldichten mit der Neubauer-Zählkammer (siehe 2.2.4.5 Färbung der Zellen aus den Therapieansätzen (Protokoll) auf S. 69).

2.2.2 Durchflusszytometrie

2.2.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie gelingt die Charakterisierung einzelner Partikel, in der Regel Zellen, in Bezug auf Größe, Granularität, Oberflächeneigenschaften und weiterer funktioneller und morphologischer Merkmale. Ein großer Vorteil besteht in der synchronen Bestimmung unterschiedlicher Eigenschaften (Kentrou, Tsagarakis et al. 2011). Auf diese Weise können pro Sekunde mehrere tausend Zellen analysiert werden (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 31).

Fälschlicherweise wird oft synonym für Durchflusszytometrie das Akronym FACS (Fluorescence-activated cell sorting) benutzt. Hierbei handelt es sich jedoch um die eigenschaftsbezogene Sortierung von Zellen. Der Begriff ist eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson GmbH (Herzenberg, Parks et al. 2002).

2.2.2.2 Physikalische Grundlagen

Die durchflusszytometrische Analyse basiert auf zwei wesentlichen Elementen: der Messung von Lichtstreuung und der Messung von Fluoreszenz. Beides wird durch einen Laserstrahl erreicht, der die Zellen senkrecht zum Probenfluss anregt (Herzenberg, Parks et al. 2002).

Abhängig von ihren Eigenschaften emittiert die Zelle Licht spezifischer Richtungen (Streulicht) bzw. Wellenlängen (Fluoreszenz), das photoelektrisch mit Hilfe von Detektoren erfasst wird (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 33).

Streulicht

Licht, das auf eine Zelle trifft, wird – abhängig von den Zelleigenschaften – gestreut. Der Anteil an Streulicht, der in engem Winkel zum Laserlicht steht, wird hierbei als Vorwärtsstreulicht (Forward scatter, FSC) bezeichnet und wird mit zunehmender Größe der Zelle stärker. Streulicht, das im Winkel von etwa 90 Grad zum Laser steht, wird als Seitwärtsstreulicht (Side scatter, SSC) detektiert. Dieses wird ebenfalls mit zunehmender Größe, aber darüber hinaus auch mit zunehmender Granularität und Membranfaltung einer Zelle stärker (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 32).

Fluoreszenz

Fluoreszierende Verbindungen, auch Fluorochrome genannt, können mit Hilfe von Lasern einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und wenige Nanosekunden später Licht emittieren. Jedes Fluorochrom hat ein spezifisches Anregungsspektrum an Wellenlängen, innerhalb dessen es Licht absorbiert (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 34). Mit Hilfe dieser Energie werden Elektronen kurzfristig auf ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Rücksprung in den Grundzustand werden Photonen, also Lichtteilchen, freigesetzt. Dieses Emissionslicht wird Fluoreszenz genannt. Es weist ein für das Fluorochrom charakteristisches Wellenlängenspektrum auf und kann mit Hilfe von Detektoren erfasst und am PC ausgewertet werden (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 34). Die Fluoreszenz ist stets energieärmer und damit langwelliger als das aufgenommene Licht. Dieses Phänomen wird Stoke's shift genannt (Petit, Denis-Gay et al. 1993).

Die Fluorochrome können mit Antikörpern für bestimmte Oberflächenmoleküle einer Zelle konjugiert werden (Maecker, Frey et al. 2004).

Anhand der von den Detektoren erfassten Fluoreszenzstärke einer Zelle lassen sich quantitative Rückschlüsse auf die zuvor an diese Zelle gebundenen Antikörper schließen, da das emittierte Fluoreszenzlicht proportional zur Anzahl der gebundenen Fluorochrome ist (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 34). Durch

Kombination von Fluorochrom-assoziierten Antikörpern lassen sich Zellen in Bezug auf verschiedene Eigenschaften gleichzeitig charakterisieren.

Neben der Antikörperkopplung können Fluorochrome auch intrazellulär angereichtert werden, zum Beispiel durch Bindung an die intrazelluläre DNA bei der Hoechst-Färbung (siehe 2.2.4.1 Prinzip der Hoechstfärbung, S. 64).

2.2.2.3 Aufbau des Gerätes und Messtechnik

Die in flüssigem Medium konzentrierten Zellen werden vom Durchflusszytometer aspiriert und anschließend mit einer Trägersubstanz versehen. Diese erlaubt es zusammen mit einer Querschnittsverringering innerhalb der Messküvette, jede Zelle in einem laminaren Hüllstrom an der gebündelten Laserquelle vorbeizuführen und so zu analysieren (hydrodynamische Fokussierung, siehe Abbildung 2-1: Hydrodynamische Fokussierung und Streuung).

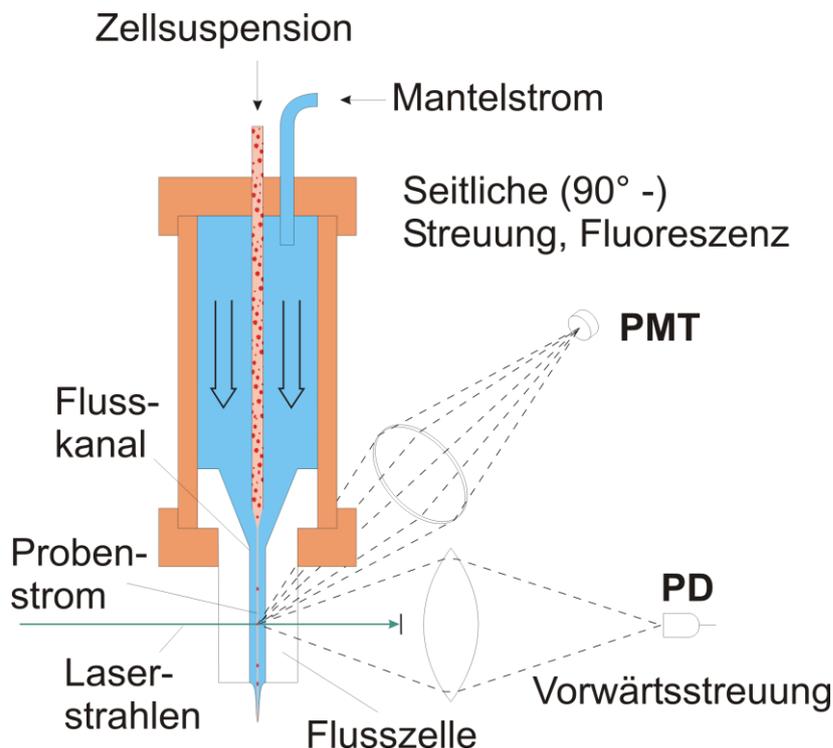


Abbildung 2-1: Hydrodynamische Fokussierung und Streuung

Durch den laminaren Mantelstrom gelingt es, dass jede Zelle des Probenstroms einzeln vom Laser angeregt wird und dadurch vorwärts und seitlich Licht streut. Dieses Licht wird dann von Detektoren (PMT, PD) erfasst.

Abkürzungen: PMT: Photomultiplier tube, PD: Photo diode. Modifiziert nach Kammel et al. (Kammel, Kummrow et al. 2012).

Abhängig von der Auswahl der verwendeten Fluorochrome und deren unterschiedlichen Anregungsspektren sind hierfür mehrere Laser notwendig. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer LSR II ist serienmäßig mit drei Lasern ausgestattet, wurde aber um einen vierten (UV-) Laser ergänzt. Auf diese Weise ist eine gleichzeitige Erfassung von Hoechst red und Hoechst blue möglich (siehe 2.2.4.1):

1. 355 nm Laser (UV)
2. 405 nm Laser (violet)
3. 488 nm Laser (blue)
4. 633 nm Laser (red)

Durch die oben beschriebenen Mechanismen wird für jede Zelle Streulicht und Fluoreszenz detektiert. Letztere wird mit Hilfe eines Systems aus Spiegeln und Filtern nach ihrer Wellenlänge aufgetrennt. Filter lassen sich in Kanten- und Bandpassfilter einteilen. Kantenfilter sind durchlässig für Licht ab einer bestimmten Wellenlänge und lassen sich weiter in Kurzpass- und Langpassfilter unterteilen. Kurzpassfilter lassen einzig kurzwellige Strahlung passieren, langwelliges Licht wird geblockt. Bei Langpassfiltern verhält es sich umgekehrt. Den Kantenfiltern stehen Bandfilter gegenüber, die nur Licht eines spezifischen Wellenlängenbereichs transmittieren. Nach Passage durch das Filtersystem erfassen Detektoren die Intensitäten für verschiedene Emissionswellenlängen (siehe Abbildung 2-2 - Abbildung 2-4). Kritisch hierbei ist die richtige Filterkombination: Das Emissionsmaximum des Fluorochroms darf durch die Filter nicht zu restriktiv eingegrenzt werden, da sonst das Signal zu schwach wird. Ist der Messbereich hingegen zu breit, verfälscht die Streustrahlung anderer Fluorochrome das Signal (Ahlers 2010). Das detektierte Licht wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und kann unmittelbar am PC ausgewertet werden.

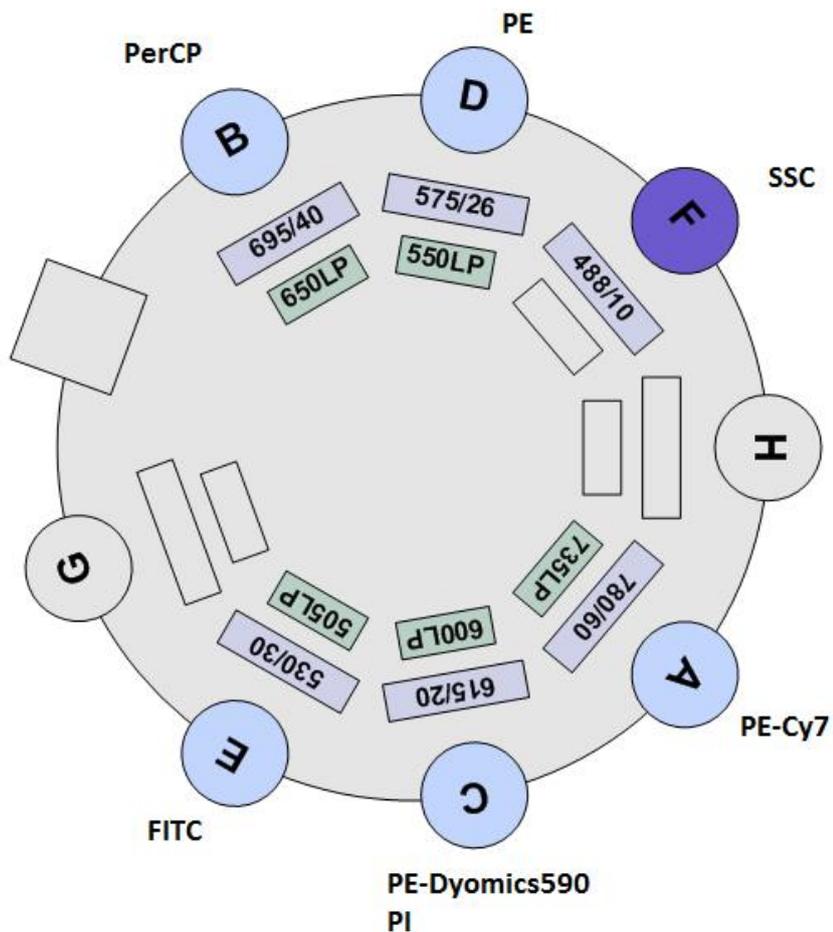


Abbildung 2-2: Konfiguration des blauen Lasers (488 nm)

Nach Passage des gestreuten Lichts durch das Filtersystem (innere Rechtecke) erfassen Detektoren (in der Reihenfolge A-H) die Intensitäten für verschiedene Emissionswellenlängen (äußere Rechtecke).

Abkürzungen: LP: Langpassfilter. Quelle: FACS Diva Software.

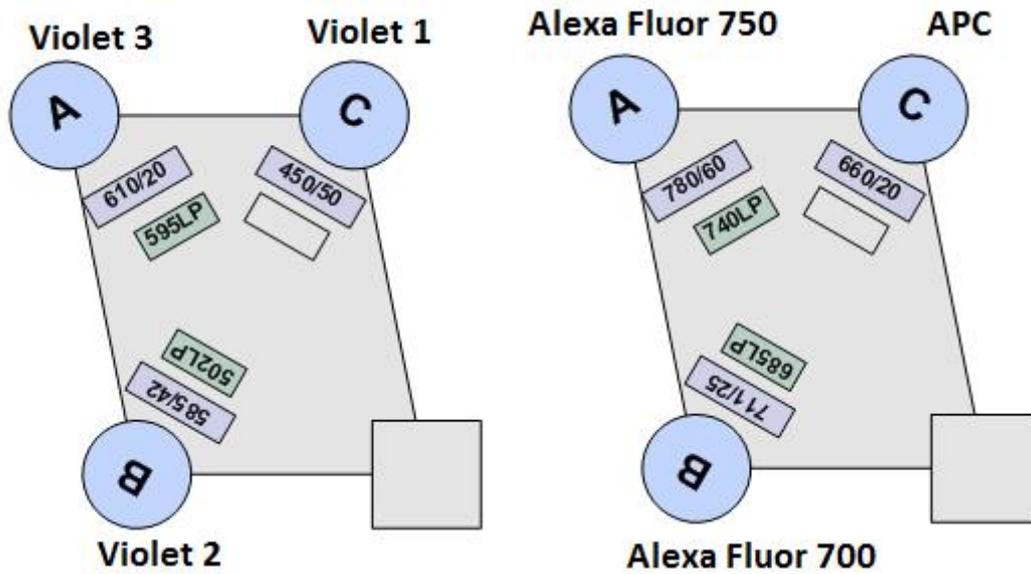


Abbildung 2-3: Konfiguration des violetten Lasers (405 nm) und roten Lasers (633 nm)

Nach Passage des gestreuten Lichts durch das Filtersystem (innere Rechtecke) erfassen Detektoren (in der Reihenfolge A-C) die Intensitäten für verschiedene Emissionswellenlängen (äußere Rechtecke).

Abkürzungen: LP: Langpassfilter. Quelle: FACS Diva Software.

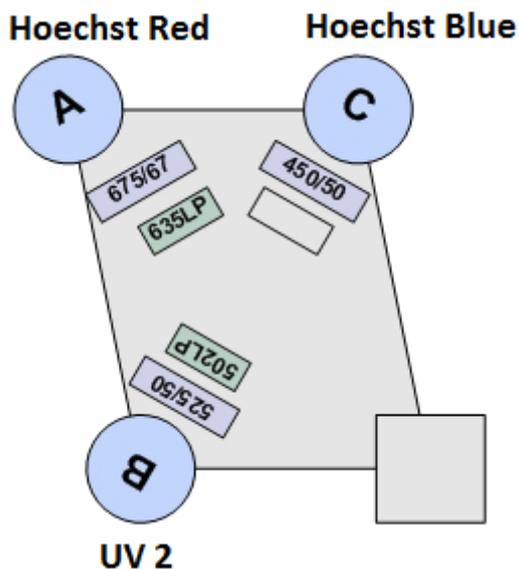


Abbildung 2-4: Konfiguration des UV-Lasers (355 nm)

Nach Passage des gestreuten Lichts durch das Filtersystem (innere Rechtecke) erfassen Detektoren (in der Reihenfolge A-C) die Intensitäten für verschiedene Emissionswellenlängen (äußere Rechtecke).

Abkürzungen: LP: Langpassfilter. Quelle: FACS Diva Software.

2.2.2.4 Kompensation und Kalibrierung am LSR II Durchflusszytometer

Ziel einer regelmäßig durchgeführten Kalibrierung des Durchflusszytometers ist es, vergleichbare Messwerte zu erhalten. Hierfür verwendeten wir die Compensation Beads bzw. Compensation Beads Plus von Becton Dickinson GmbH. Beads sind Mikropartikel mit definierter Größe und Oberflächenmorphologie. Aufgrund ihrer sehr konstanten Eigenschaften (Intensität der Fluoreszenz, zeitliche Stabilität, Gleichmäßigkeit der Anhaftung möglicher Antikörper) eignen sie sich gut für die Kalibrierung. Diese führten wir mit Hilfe der FACS Diva Software durch („CST Setup“).

Die Fluorochrome emittieren – wie oben beschrieben – nicht nur Licht einer Wellenlänge, sondern senden neben ihrem Emissionsmaximum auch Licht anderer Wellenlängen aus. Auf diese Weise überlappen die Spektren verschiedener Farbstoffe. Daher wird emittiertes Licht eines Fluorochroms teilweise von Detektoren erfasst, die Signale eines anderen Fluorochroms detektieren sollen. Es kann somit zu falsch positiven Ergebnissen kommen (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 35). Diesem Problem kann unter anderem mit einer geschickten Auswahl an Fluorochromen begegnet werden: So sollten beispielsweise keine Fluorochrome verwendet werden, die ein sehr ähnliches Emissionsspektrum haben. Auf diese Weise können die Überlappungsphänomene bereits stark reduziert werden. Allerdings bleiben auch bei sorgfältiger Fluorochrom-Auswahl Verfälschungen bei der Messung bestehen.

Ziel der rechnerischen Kompensation ist es, diese Verfälschungen zu minimieren. Dazu wird die Intensität eines Farbstoffes in allen vorhandenen Detektoren gemessen: Zum einen in dem Detektor, der die Intensität erfassen soll, zum anderen in allen so genannten Fremd-Dektoren, die die Fluoreszenz eigentlich nicht erfassen sollen. Anschließend wird das Verhältnis der Intensität je eines Fremd-Detektors zum eigentlichen Detektor bestimmt. So lässt sich beispielsweise berechnen, dass Detektor B (ein Fremd-Detektor) 10 % der Intensität von Detektor A (dem „gewollten“ Detektor) erfasst. Bei Messungen mit

diesem Farbstoff werden dann grundsätzlich 10 % der Intensität von Detektor A vom Wert, den Detektor B angibt, abgezogen (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 36).

Technisch gibt es zwei Möglichkeiten der Kompensationsberechnung:

1. Einzelfärbungen („single stain“): Eine definierte Probe (Zellen oder Beads) wird jeweils mit nur einem Fluorochrom angefärbt und gemessen.
2. FMO („Fluorescence minus one“): Eine definierte Probe (Zellen oder Beads) wird jeweils mit allen Fluorochromen außer einem angefärbt und gemessen.

Die FACS Diva Software kann anschließend die Kompensation berechnen und auf künftige oder vergangene Messungen anwenden (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 36).

2.2.2.5 Datenanalyse

Die erfassten Daten wurden mit dem Softwareprogramm FACS Diva Software 6.1.3 dargestellt und analysiert. Ziel der Analyse ist es, die am Durchflusszytometer erfassten Ereignisse („Events“), die für die gemessenen Zellen stehen, in Gruppen mit bestimmten Eigenschaften (Populationen) einzuteilen. Auf diese Weise können Aussagen über relative Häufigkeiten gemacht werden. Beispielsweise kann das Verhältnis einer Tochterpopulation, die ein bestimmtes Oberflächenmolekül (stark) exprimiert, zu ihrer Elternpopulation untersucht werden. Hierbei kann die Elternpopulation sowohl die Gesamtheit aller gemessenen Zellen sein, als auch bereits eine Auswahl mit definierten Eigenschaften.

Konkret werden die von den Detektoren erfassten Parameter ein- oder zweidimensional am Bildschirm abgebildet. Das eindimensionale Histogramm gibt hierbei Aufschluss über die Häufigkeit von Zellen mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität innerhalb eines bestimmten Wellenlängenbereichs (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 46). Durch die zweidimensionale Darstellung können zwei Parameter einer Zelle durch einen Punkt im Koordinatensystem gleichzeitig dargestellt werden (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 49). Stellt man nun viele oder alle Zellen einer Probe gleichzeitig im 2D-Diagramm dar, lassen sich

Zellpopulationen mit ähnlichen Eigenschaften bezüglich der beiden angezeigten Parameter eingrenzen und markieren. Dieser Vorgang wird „Gating“ genannt (Sack, Tárnok et al. 2007, S. 51).

2D-Diagramme werden in dieser Arbeit entweder als Dot plots oder als Konturplots dargestellt: Bei Dot plots wird jedes Event als einzelner Punkt dargestellt. Sind zwei oder mehr Zellen aufgrund ähnlicher Eigenschaften am selben Punkt im Diagramm positioniert, kann farblich die relative Zelldichte zum Umfeld auf dem Dot plot angezeigt werden. Bei Konturplots wird diese Dichte durch Konturlinien verdeutlicht: An zwei Punkten der gleichen Konturlinie besteht die gleiche Zelldichte. Diese Darstellung ist vergleichbar mit Höhenlinien einer Landkarte: Punkte der gleichen Linie entsprechen hier der gleichen Höhe.

2.2.3 Herstellung der Therapieansätze

2.2.3.1 Herstellung des Behandlungsansatzes mit ATO

Wir behandelten KG-1a-Zellen für unterschiedlich lange Zeiten (24 h, 48 h sowie 72 h) mit unterschiedlichen ATO-Konzentrationen (0,0 μM , 0,5 μM , 1,0 μM , 2,0 μM , 5,0 μM).

Im Einzelnen hielten wir uns dabei an folgendes Protokoll:

1. Zelldichte derjenigen Zellkultur maschinell bestimmen, aus der die später behandelten Zellen gewonnen werden.
2. Dasjenige Volumen der Zellkultur, das 9×10^6 Zellen entspricht, fünf Mal in je ein Falcon-Röhrchen (50 ml) überführen.
3. Für acht Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugieren (450 G), den Überstand abkippen und die Falcon-Röhrchen für wenige Sekunden umgedreht stehen lassen.
4. Die Zellen in 18 ml auf RT vorgewärmtem RPMI+ (20 % FCS-Anteil) resuspendieren. Dadurch entsteht eine neue Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml.

5. ATO und H₂O (steril) in die einzelnen Falcon-Röhrchen hinzugeben, so dass die gewünschten ATO-Konzentrationen entstehen (siehe Tabelle 2-12).
6. Drei 6-well-plates entsprechend der Inkubationsdauer mit „24 h“, „48 h“ sowie „72 h“ beschriften. Aus jedem Falcon-Röhrchen drei Mal 5ml entnehmen und in je ein Well der drei 6-well-plates geben. Auf diese Weise enthält am Ende jede der drei 6-well-plates sämtliche ATO-Konzentrationen.
7. Alle drei 6-well-plates in den Inkubator (37,0 °C und 5 % CO₂) stellen.

Tabelle 2-12: ATO-Ansätze

Aufgezählt sind die Konzentrationen und entsprechende ATO-Stock- und H₂O - Volumina bei einem Suspensionsvolumen von 18ml.

Abkürzungen: ATO: Arsentrioxid.

ATO-Konzentration	Vol. ATO-Stock (5,05 mM)	Vol. H ₂ O (steril)
0,0 µM (H ₂ O-Kontrolle)	-	17,8 µl
0,5 µM	1,78 µl	16,02 µl
1,0 µM	3,56 µl	14,24 µl
2,0 µM	7,12 µl	10,68 µl
5,0 µM	17,8 µl	-

Anmerkung: Beim ersten Versuch überführten wir im zweiten Schritt nur jeweils ein Volumen, das $6,5 \times 10^6$ Zellen entspricht, in die Falcon-Röhrchen. Das Volumen war bei gleicher Zelldichte kleiner. Dadurch verändern sich auch die Volumina von ATO und H₂O (steril) im fünften Schritt entsprechend. Im sechsten Schritt gaben wir dann nur 4×10^6 Zellen in ein Well. Diese Menge reichte ebenfalls für die spätere Akquirierung der Zellen aus.

2.2.3.2 Herstellung des Behandlungsansatzes mit TDZD-8

Unser Ziel war es, KG-1a-Zellen für unterschiedlich lange Zeiten (18 h, 42 h sowie 63 h) bei unterschiedlichen TDZD-8-Konzentrationen (0,0 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1,0 μM , 5,0 μM , 10,0 μM) zu behandeln.

Im Einzelnen hielten wir uns dabei an folgendes Protokoll:

1. Zelldichte derjenigen Zellkultur maschinell bestimmen, aus der die später behandelten Zellen gewonnen werden.
2. Dasjenige Volumen der Zellkultur, das 10×10^6 Zellen entspricht, sechs Mal in je ein Falcon-Röhrchen (50 ml) überführen.
3. Für acht Minuten zentrifugieren, den Überstand abkippen und die Falcon-Röhrchen für wenige Sekunden umgedreht stehen lassen.
4. Die Zellen in 20 ml auf Raumtemperatur vorgewärmtem RPMI+ (20 % FCS-Anteil) resuspendieren. Dadurch entsteht eine neue Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml.
5. TDZD-8 und DMSO (steril) in die einzelnen Falcon-Röhrchen hinzugeben, so dass die gewünschten TDZD-8-Konzentrationen entstehen (siehe Tabelle 2-13).
6. Drei 6-well-plates entsprechend der Inkubationsdauer mit „18 h“, „42 h“ sowie „63 h“ beschriften. Aus jedem Falcon-Röhrchen drei Mal 5ml entnehmen und in je ein Well der drei 6-well-plates geben. Auf diese Weise enthält am Ende jede der drei 6-well-plates sämtliche TDZD-8-Konzentrationen.
7. Alle drei 6-well-plates in den Inkubator (37,0 °C und 5 % CO₂) stellen.

Tabelle 2-13: TDZD-8-Ansätze

Aufgezählt sind die Konzentrationen und entsprechende TDZD-8- und DMSO-Volumina bei einem Suspensionsvolumen von 20 ml.

Abkürzungen: DMSO: Dimethylsulfoxid, TDZD-8: 4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione.

TDZD-8-Konzentration	Vol. TDZD-8-Stock (2 mM bzw. 20 mM)	Vol. DMSO (steril)
0,0 μ M (DMSO-Kontrolle)	-	10,0 μ l
0,1 μ M	1,0 μ l (2 mM)	9,0 μ l
0,5 μ M	5,0 μ l (2 mM)	5,0 μ l
1,0 μ M	1,0 μ l (20 mM)	9,0 μ l
5,0 μ M	5,0 μ l (20 mM)	5,0 μ l
10,0 μ M	10,0 μ l (20 mM)	-

2.2.4 Hoechstfärbung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der SP (siehe 1.3.4) innerhalb leukämischer Zellpopulationen. Mit Hilfe der Hoechstfärbung ist die SP darstellbar und quantifizierbar innerhalb der durchflusszytometrisch akquirierten Zellen. Differenzielle Effekte von potenziellen Therapeutika auf die SP können verglichen werden.

2.2.4.1 Prinzip der Hoechstfärbung

Grundlage der Färbung ist die Bindung des Farbstoffs Bisbenzimid Hoechst 33342 an die DNA im Zellkern. Wie in der Einleitung beschrieben können einige Vorläuferzellen diesen Farbstoff aktiv aus sich herauspumpen. Folglich haben diese Vorläufer- bzw. Stammzellen nach einer definierten Inkubationszeit mit dem Hoechst-Farbstoff einen niedrigeren Farbstoffgehalt als die Hauptpopulation. Dies lässt sich durchflusszytometrisch nachweisen: Hoechst

33342 wird vom Laser angeregt und emittiert Licht im blauen Wellenlängenbereich bei 450 nm (Hoechst Blue) und im roten Wellenlängenbereich bei 675 nm (Hoechst Red) (Hörrmann 2013). Diese Eigenschaft wird genutzt, indem man die beiden Parameter mit Hilfe eines 450 nm / 20 nm Bandpassfilters und eines 675 nm Langpassfilters misst (Ahlers 2010). Am PC trägt man nach einigen Zwischenschritten die Population in einem zweidimensionalen Diagramm auf (siehe Abbildung 2-5). Die SP geht dabei aus dem linken Abschnitt der Hauptpopulation hervor und reicht bis nahe zum Achsenursprung. Die Zellen mit dem größten Efflux emittieren am schwächsten und befinden sich somit am nächsten am Achsenursprung.

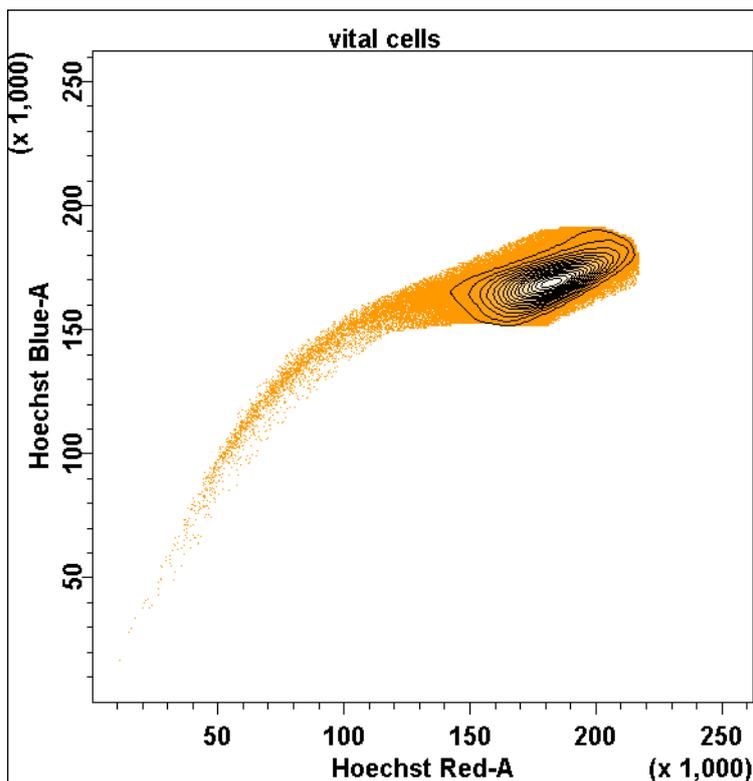


Abbildung 2-5: Hoechst-Färbung der diploiden Hauptpopulation

Die Hauptpopulation macht den Großteil aller gefärbten Zellen aus und fluoresziert relativ stark. Die SP geht aus dem linken Abschnitt der Hauptpopulation hervor und reicht bis nahe zum Achsenursprung, da die SP-Zellen aufgrund ihrer Efflux-Kapazität zum Zeitpunkt der Messung weniger Hoechst-Farbstoff an ihre DNA gebunden haben.

Abkürzungen: SP: Side population.

2.2.4.2 Verapamilfärbung

Verapamil ist ein potenter Inhibitor der MDR-Transporter (Goodell, Brose et al. 1996). Nach ausreichender Verapamilzugabe sollten die leukämischen Vorläuferzellen folglich nicht mehr in der Lage sein, Hoechst herauszupumpen. In der 2D-Graphik der Verapamilprobe ist entsprechend keine SP zu sehen (siehe Abbildung 2-6).

Durch Vergleich der Hoechstprobe mit der Verapamilkontrolle lässt sich die SP ungefähr eingrenzen. Eine exakte Eingrenzung ist nicht möglich, da die Emissionsintensität von Hoechst durch Verapamilzugabe leicht manipuliert wird. Folglich erscheint die Hauptpopulation bei der Verapamilkontrolle etwas verschoben. Da es sich nicht um eine translatorische Verschiebung handelt, kann auch nicht exakt bestimmt werden, wo die Hauptpopulation ohne Verapamil läge.

Soweit nicht anders erwähnt, fügten wir sämtlichen Hoechstfärbungsröhrchen eine Verapamilkontrolle hinzu.

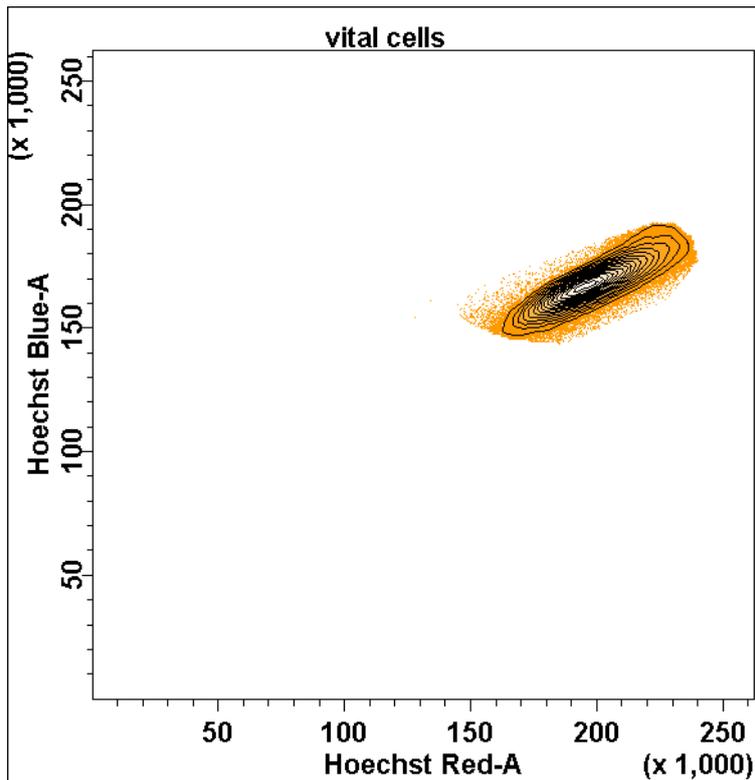


Abbildung 2-6: Verapamil-Kontrolle der diploiden Hauptpopulation

Die Hauptpopulation ist aufgrund der Hoechstfärbung nach wie vor im rechten oberen Quadranten zu sehen. Die SP ist nun nicht mehr erkennbar, da Verapamil die Efflux-Funktion der SP-Zellen inhibiert.

Abkürzungen: SP: Side population.

2.2.4.3 Herstellung des Hoechst- und Verapamilansatzes

Wir lösten 42,5 mg Hoechst 33342 in 42,5 ml gereinigtem Wasser, so dass wir eine Stock-Konzentration von 1 mg/ml erreichten. Nachdem wir den Ansatz in 500 μ L- und 50 μ L-Aliquots aufgeteilt hatten, froren wir sie bei -20 °C ein. Um bei unseren Proben eine finale Konzentration von 5 μ g/ml gemäß Protokoll nach Goodell et al. zu erreichen, verdünnten wir bei der Färbung im Verhältnis 1:200 (Goodell, Brose et al. 1996).

Beim Verapamilansatz lösten wir 4,9 mg Verapamil in einem Milliliter absolutem Alkohol und froren 100 μ L-Aliquots bei -20 °C ein. Um bei den Proben eine finale Konzentration von 50 μ M gemäß Protokoll zu erreichen, verdünnten wir im Verhältnis 1:200 (Goodell, Brose et al. 1996).

2.2.4.4 Färbung der Zellen aus definierten leukämischen Zelllinien (Protokoll)

Das folgende Färbeprotokoll wandten wir bei allen unter 2.2.1.2 („Maligne Zelllinien“, S.50) genannten Zelllinien mehrfach (mindestens drei Wiederholungen) an, um den Stammzellanteil unter Hoechst-Färbung zu bestimmen. Ziel war es, eine Zelllinie mit konstant hoher SP zu identifizieren. Diese Zelllinie (KG-1a) wurde dann im zweiten Teil der Arbeit für Behandlungsversuche genutzt, um den Effekt der potenziellen Therapeutika auf die Zellen zu bestimmen.

In Anlehnung an das von Goodell et. al. veröffentlichte Protokoll färbten wir die Zellen wie folgt. In der Regel färbten wir 2×10^6 Zellen in einem Proberöhrchen. Abweichungen werden im Folgenden erwähnt.

1. Zellzahl in der Kulturflasche mit den leukämischen Zellen bestimmen.
2. Dasjenige Volumen aus der Kulturflasche entnehmen, das 2×10^6 Zellen entspricht. Bei einer Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml wären das z.B. 4 ml. Die Zellen bei 450 G (1390 Umdrehungen/min) und Raumtemperatur für 3 min abzentrifugieren, den Überstand dekantieren und mit vorgewärmtem DMEM+ (37 °C) auf 2 ml auffüllen, so dass eine Zelldichte von 1×10^6 /ml entsteht.
3. Den aufgetauten Hoechstansatz 1:200 verdünnen auf eine finale Konzentration von 5 µg/ml und gut mischen. Bei 2 ml geben wir also 10 µl Hoechstansatz hinzu.
4. 500µl der Probe in ein zweites Röhrchen pipettieren und Verapamil in einer Verdünnung von 1:200, also 2,5 µl hinzugeben und mischen.
5. Beide Röhrchen für 120 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren, alle 15 min Röhrchen invertieren. Da der Effluxmechanismus eine physiologische Reaktion darstellt, wird er bei 37 °C am besten sichtbar.
6. Unmittelbar nach den 120 min die Röhrchen auf Eis stellen. Werden die Zellen auf 4 °C heruntergekühlt, so lässt sich die Reaktion nahezu stoppen.
7. 2 ml gekühltes DMEM+ (4 °C) zu den Proben hinzugeben.

8. Bei 4 °C abzentrifugieren (450 G, 1390 Umdrehungen/min). Überstand dekantieren.
9. Wiederholung der Schritte 7 und 8.
10. Je 1 µl Propidiumiodid (PI, 200 µg/ml) zu den Zellpellets hinzugeben (siehe 2.2.5 Lebend-Tot-Färbung, S. 70).
11. Akquise am LSR II Durchflusszytometer.

Anmerkung: Dies ist das Protokoll für die Färbung der zehn malignen Zelllinien, bei denen wir den SP-Anteil ermittelten. Bei den späteren Therapieansätzen wurden zusätzliche Schritte durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.4.5).

2.2.4.5 Färbung der Zellen aus den Therapieansätzen (Protokoll)

Die Hoechstfärbung der Zellen aus den Therapieansätzen nach 24 h, 48h sowie 72 h erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie im letzten Unterkapitel beschrieben. Die obigen Schritte „3“ bis „11“ sind identisch. Lediglich folgende Schritte wurden bei den Therapieansätzen vorangestellt:

1. 6-well-plate aus dem Inkubator holen und die jeweiligen Volumina (ca. 5 ml) vollständig aus dem Well in ein Falcon-Röhrchen (15 ml) überführen.
2. Zelldichtebestimmung in der Neubauer-Zählkammer:
Hierfür 10 µl der Zellsuspension entnehmen und mit 10 µl Trypanblau mischen. Nach Anfeuchtung der Zählkammerstege ein Deckglas andrücken, bis regenbogenfarbige Schnürringe erkennbar sind. Danach die Zählkammer mit 10 µl Trypanblau-Zellsuspension füllen und die Zellen in vier Quadranten mikroskopisch zählen. Mit folgender Formel kann die Zelldichte in [1/ml] berechnet werden:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\text{Anzahl Zellen in 4 Quadranten} \times \text{Verdünnung} \times 10^4}{4}$$

Der Vorteil dieser nicht-maschinellen Zelldichte-Bestimmung ist, dass man die Anzahl lebender sowie toter Zellen bestimmen kann: Einzig die

toten Zellen nehmen das Trypanblau ins Zytoplasma auf, die lebenden Zellen erscheinen weiß. Während die Durchflusszytometrie in erster Linie Verhältnisse zwischen Zellpopulationen angibt, kann die Zelldichtebestimmung in der Neubauer-Zählkammer auch absolute Werte liefern, also z. B. wie viele tote Zellen in den 5 ml Zellsuspension enthalten sind (siehe auch 3.3.1 Differenzielle zytotoxische Effekte von ATO auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration, S. 94 und 3.3.2 Differenzielle zytotoxische Effekte von ATO auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer, S. 95).

3. Die Zellen in den Falcon-Röhrchen für 8 min abzentrifugieren (450 G, RT).
4. Die Falcon-Röhrchen abgießen und auf 37 °C vorgewärmtes DMEM+ hinzugeben, so dass eine berechnete Zelldichte von $1,2 \times 10^6$ /ml Zellen erreicht wird. Auf diese Weise wird verhindert, dass die tatsächliche Zelldichte nicht unter der letztlich gewünschten Anzahl von $1,0 \times 10^6$ /ml Zellen liegt und man nachverdünnen kann, statt noch einmal zu zentrifugieren.
5. Maschinelle Zelldichtebestimmung: Hierzu 150 µl der Zellsuspension aus dem Falcon-Röhrchen entnehmen.
6. Dasjenige Volumen, das 2×10^6 Zellen entspricht, aus dem Falcon-Röhrchen in ein FACS-Röhrchen überführen und mit auf 37 °C vorgewärmtem DMEM+ auf 2 ml auffüllen, so dass eine Zelldichte von $1,0 \times 10^6$ /ml Zellen vorliegt.

Nun folgen die Schritte „3“ bis „11“ aus 2.2.4.4 Färbung der Zellen aus definierten leukämischen Zelllinien (Protokoll) auf S. 68.

Wichtig bei der Färbung ist eine exakte Einhaltung der vorgegebenen Konzentration und Inkubationsdauern, da diese unmittelbaren Einfluss auf das Ergebnis der Messungen haben.

2.2.5 Lebend-Tot-Färbung

Tote Zellen können Antikörper oder Fluorochrome binden und auf diese Weise zu falschen Ergebnissen führen. Zur Diskriminierung bereits toter Zellen

verwendeten wir daher Propidiumiodid (PI). Dieser Fluoreszenzfarbstoff durchdringt die perforierte Zellmembran von toten Zellen und interkaliert anschließend an die DNA. Intakte Zellmembranen kann er hingegen nicht durchdringen. An DNA gebundenes PI hat ein Absorptionsmaximum von 535 nm und ein Emissionsmaximum von 617 nm (Hoppe 2010). Im 2D-Diagramm mit Hoechst-Blue (450nm Filter) als Ordinate und Hoechst Red (675 nm Filter) als Abszisse erscheinen die PI-angefärbten, also toten Zellen am rechten Rand, da sie im 675 nm Filter deutlich intensiver fluoreszieren als Zellen ohne PI.

Nach dem Waschen der Hoechst-gefärbten Zellen gaben wir grundsätzlich 1 μ l des auf 200 μ g/ml verdünnten PI hinzu.

2.2.6 Färbungen zur Beurteilung von Apoptose und Stammzellmarkern

Wir benutzten das an ein Fluorochrom gekoppelte AnnexinV-PerCP-e710 zur Apoptose-Detektion im Rahmen einer weiterführenden Analyse von KG-1a-Zellen (siehe 3.5 Charakterisierung unbehandelter KG-1a-Zellen bezüglich Apoptoseverhalten und Stammzellmarker, S.107). Im Rahmen ebendieser Charakterisierung wurden auch monoklonale Oberflächenantikörper verwendet (siehe 2.2.6.2 Monoklonale Oberflächenantikörper, S. 72).

2.2.6.1 Annexinfärbung

Eine Zelle kann als Reaktion auf einen Reiz verschiedene Stadien des programmierten Zelltodes (Apoptose) durchlaufen. Ein Frühzeichen der Apoptose ist die Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran (Robles-Escajeda, Lerma et al. 2013). Phosphatidylserin ist ein anionisches Phospholipid, das bei einer gesunden Zelle ausschließlich auf der Innenseite der Membran vorkommt. Wird Phosphatidylserin also auf der äußeren Zelloberfläche detektiert, so ist von einem apoptotischen Prozess auszugehen. Dieser Nachweis gelingt mit Annexin, einem humanen Protein mit hoher Affinität zu membrangebundenem Phosphatidylserin (Blankenberg, Katsikis et al. 1999).

2.2.6.2 Monoklonale Oberflächenantikörper

Folgende Farbstoff-gekoppelten Oberflächenantikörper wurden im Rahmen einer weiterführenden, exemplarischen Analyse von KG-1a-Zellen (siehe 3.5.2, S. 110) verwendet:

- CD34-APC-Cy7
- CD38-PE-Cy7
- CD243-APC
- CD338-PE

Ziel war es, die SP der diploiden Zellen mit der diploiden Hauptpopulation in Bezug auf folgende Eigenschaften zu vergleichen:

- 1) Expression von CD34 und CD38
- 2) Expression von CD243 und CD338.

2.2.6.2.1 CD34-APC-Cy7 und CD38-PE-Cy7

Wie unter 1.3.5 (LIC-Fraktion und Prognose bei Erstdiagnose, S.33) beschrieben, scheinen CD34-positive, CD38-negative Vorläuferzellen wesentlichen Einfluss auf MRD-Last und Prognose von Leukämien zu haben. Andererseits wurde die SP in der Literatur als vorrangig CD34- beschrieben. Wir untersuchten, ob sich die SP in Bezug auf die CD34- und CD38-Expression von der Hauptpopulation bei KG-1a Zellen unterscheidet.

2.2.6.2.2 CD243-APC und CD338-PE

Diese beiden unter 1.3.2 (Rezidive und Resistenzmechanismen leukämischer Stammzellen (LSC), S.27) beschriebenen Zellmembrantransporter spielen eine wesentliche Rolle bei der Chemotherapieresistenz. Da es sich um Pumpen handelt, die vermutlich auch den Hoechst-Farbstoff aus der Zelle befördern, untersuchten wir die Expression ebendieser Pumpen sowohl innerhalb der SP als auch in der Hauptpopulation.

2.2.6.3 Färbung mit Annexin und Oberflächenantikörpern (Protokoll)

Unbehandelte KG-1a-Zellen wurden gemäß dem Protokoll (siehe 2.2.4.5, S. 69) mit dem Hoechst-Farbstoff gefärbt. Es wurden 250.000 Zellen verwendet. Nach der Inkubation mit dem Hoechst-Farbstoff und einem Waschlurchlauf mit 1 ml DMEM+ (450 G, 1390 Umdrehungen/min) bei 4 °C färbten wir mit einem zuvor hergestellten Antikörpermix, der wie folgt zusammengesetzt war:

1. 2,5 µl Rabbit Serum (IgG-Antikörper zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Zellen mit den konjugierten Antikörpern)
2. 1,25 µl AnnexinV-PerCP-e710
3. 2,5 µl CD338-PE-Antikörper
4. 1 µl CD38-PE-Cy7-Antikörper
5. 1 µl CD243-APC-Antikörper
6. 1,5 µl CD34-APC-Cy7-Antikörper

Die Proben wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zwei Mal mit je 2 ml DMEM+ gewaschen. Am Ende gaben wir zu jeder Probe noch 1 µl PI (200 µg/ml) hinzu.

2.2.7 Behandlungsversuche mit ATO

Bei unseren Versuchen, die 24- bis 72-stündige Inkubationszeiten vorsahen, wurden neben der Kontrolle folgende ATO-Konzentrationen gewählt: 0,5 µM, 1,0 µM, 2,0 µM, 5,0 µM.

Die Herstellung der Therapieansätze mit ATO wird unter 2.2.3.1 (S. 61) detailliert beschrieben.

2.2.8 Behandlungsversuche mit TDZD-8

Bei unseren Versuchen, die 18- bis 63-stündige Inkubationszeiten vorsahen, wurden neben der DMSO-Kontrolle folgende TDZD-8-Konzentrationen gewählt: 0,1 µM, 0,5 µM, 1,0 µM, 5,0 µM, 10,0 µM.

Die Herstellung der Therapieansätze mit TDZD-8 wird unter 2.2.3.2 auf S. 63 detailliert beschrieben.

2.2.9 Übersicht über sämtliche durchgeführte Färbungen

Tabelle 2-14 gibt eine Übersicht über sämtliche durchgeführte Färbungen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf folgenden beiden Untersuchungen:

1. Charakterisierung von zehn Zelllinien auf reproduzierbar hohe diploide SP mit Hilfe der Hoechst-Färbung.
2. Behandlung der Zelllinie KG-1a mit ATO und Analyse des Effektes auf die diploide sowie tetraploide SP mit Hilfe der Hoechst-Färbung und eines Lebend-Tot-Farbstoffs.

Neben der Hoechstoffärbung in Verbindung mit einem Lebend-Tot-Farbstoff, die den Großteil dieser Versuche ausmachen, wurden Apoptose-Verhalten, RNA-Synthese und Stammzellmarker-Expression untersucht (siehe 2.2.6).

Tabelle 2-14: Übersicht über sämtliche durchgeführte Färbungen

Kapitel 3.1 beschäftigt sich mit der optimalen Auswertungsstrategie zur Erfassung der SP. In 3.2 untersuchten wir zehn Zelllinien in Bezug auf reproduzierbar hohe diploide SP. Die daraus resultierende Zelllinie KG-1a behandelten wir in 3.3 mit ATO und in 3.4 mit TDZD-8 und analysierten jeweils Effekte auf die diploide und tetraploide SP. In 3.5 wurden ATO-behandelte KG-1a-Zellen auf Apoptose-Verhalten, RNA-Synthese und Stammzellmarker-Expression hin untersucht.

Abkürzungen: ATO: Arsentrioxid, SP: Side population, PI: Propidiumiodid.

Ergebnis- teil	Färbung	2n/4n- Messung	Anmerkungen
3.1	Hoechst + PI	2n	Gating-Darstellung bei der Hoechstauswertung
3.2	Hoechst + PI	2n	Mindestens Quadruplikate bei jeder Zelllinie (Ausnahme REH: Triplikate)
3.3	Hoechst + PI	4n	Triplikate
3.4	Hoechst + PI	4n	Gleiche Auswertung wie bei 3.3
3.5	Hoechst + PI, AnnexinV- PerCP-e710, Antikörper: siehe rechts	4n	- CD34-APC-Cy7 - CD38-PE-Cy7 - CD243-APC - CD338-PE

- 3.1 Charakterisierung definierter leukämischer Zelllinien auf differenzielle Stammzellkriterien mit Hilfe der Durchflusszytometrie:
Die konkreten Auswertungs- oder Gatingschritte unserer Experimente sind Ergebnis zahlreicher methodischer Versuche, die von uns gesuchten Zellpopulationen möglichst effektiv einzugrenzen und zu analysieren. Daher wird diese methodische Arbeit im Ergebnisteil aufgeführt.
- 3.2 Verhältnisanalyse differenzieller Stammzellkriterien in definierten leukämischen Zelllinien mit Hilfe der Durchflusszytometrie:
Zehn verschiedene Zelllinien wurden auf eine reproduzierbar hohe diploide SP hin untersucht. Dabei wurden mindestens vier Messungen jeder Zelllinie (Ausnahme: bei REH drei Messungen) an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.
- 3.3 Analyse des Effektes eines anerkannten Leukämie-Therapeutikums (ATO) auf die Zellpopulation mit Stammzellkriterien in KG-1a-Zellen:
Wir analysierten differenzielle Effekte von ATO auf das Apoptose-Verhalten der Zellen und auf den Anteil der diploiden sowie tetraploiden SP an der jeweiligen Hauptpopulation. Dieser Versuch wurde drei Mal wiederholt.
- 3.4 Analyse des Effektes von TDZD-8 auf die Zellpopulation mit Stammzellkriterien in KG-1a-Zellen:
Exemplarisch analysierten wir differenzielle Effekte von TDZD-8 auf den Anteil der diploiden sowie tetraploiden SP an der jeweiligen Hauptpopulation.
- 3.5 Analyse unbehandelter KG-1a-Zellen bezüglich Apoptoseverhalten und Stammzellmarker:
Ziel war zum einen, herauszufinden, ob eine Annexin-Färbung die Auswertung erleichtern würde. Zum anderen verglichen wir exemplarisch die SP der diploiden Zellen mit der diploiden Hauptpopulation in Bezug auf folgende Eigenschaften:
 - 1) Expression von CD34 und CD38
 - 2) Expression von CD243 und CD338.

Durch schrittweise Hinzugabe und Messung einzelner Marker im Rahmen vorangegangener Experimente konnten die Auswertungsgates relativ genau gelegt werden. Wir verwendeten FMO-Kontrollen, um festlegen zu können, ab welcher Intensität die gemessenen Events als sicher positiv anzusehen sind.

2.2.10 Statistische Auswertung

Wir werteten sämtliche Daten mit Hilfe der Software JMP (Version 10 und 11, SAS Corporation, Cary, North Carolina, USA) aus.

Bei der Darstellung der SP verwendeten wir das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung (SD: Standard deviation) als Streuungsmaß. Dies ist in der Literatur geläufiger Standard und hilfreich, um unsere Messwerte mit den Angaben anderer Veröffentlichungen im Diskussionsenteil vergleichen zu können. Das arithmetische Mittel nutzten wir als vernünftigen Repräsentanten der Einzelmesswerte. Letztere sind noch einmal separat im Anhang (siehe 7.1 Einzelmessergebnisse, S. 146) dargestellt.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in sechs Abschnitte:

Im ersten Abschnitt stellen wir die methodische Arbeit zur Charakterisierung leukämischer Zellen in Bezug auf Stammzellkriterien vor. Die Auswertungsschritte sind Ergebnis zahlreicher vorausgegangener Eingrenzungsversuche der gesuchten Zellpopulationen und in dieser Form neuartig. Daher sind sie als Ergebnis aufgelistet.

Der zweite Abschnitt widmet sich der Charakterisierung von zehn leukämischen Zelllinien mit der zuvor erläuterten Auswertungsweise. Hierbei wird der differenzielle SP-Anteil der Zellen ermittelt und analysiert. Differenziell bedeutet hierbei, dass verschiedene SP anhand ihres Anteils an der Hauptpopulation quantitativ gegenübergestellt werden können.

Der Schwerpunkt dieses Kapitels liegt auf dem dritten und vierten Abschnitt: Nach initialer Analyse der Zytotoxizität von ATO wurden differenzielle Effekte potenzieller Leukämie-Therapeutika (ATO sowie TDZD-8) auf den Stammzellanteil der zuvor für geeignet befundenen Zelllinie KG-1a analysiert. Es wurde zwischen Effekten auf diploide (einfacher Chromosomensatz) und tetraploide (doppelter Chromosomensatz) Zellen unterschieden. Bei der ATO-Behandlung wurde darüber hinaus der Effekt auf das Verhältnis der beiden Populationen zueinander untersucht.

Exemplarisch verglichen wir im fünften Abschnitt die SP der diploiden Zellen mit der diploiden Hauptpopulation von KG-1a-Zellen in Bezug auf folgende Eigenschaften:

- 1) Expression von CD34 und CD38
- 2) Expression von CD243 und CD338.

Zusätzlich wurde eine Annexin-Färbung durchgeführt und untersucht, ob diese die Auswertung der Messungen vereinfacht.

Der sechste Abschnitt rundet mit einer zusammenfassenden Gesamtbetrachtung das Kapitel ab.

3.1 Charakterisierung leukämischer Zellen in Bezug auf differenzielle Stammzellkriterien mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe mehrerer Gatingschritte, also der Eingrenzung von Zellpopulationen mit ähnlichen Eigenschaften, kann man Schritt für Schritt die gesuchte Subpopulation eingrenzen. In diesem Fall sind das unterschiedliche Entwicklungsstufen innerhalb der SP. Durch aufeinanderfolgendes Gating entsteht eine Gating-Hierarchie. Im Folgenden wird diese in vier Hauptschritte zusammengefasst, die jeweils in einem Unterkapitel erläutert werden (siehe 3.1.1 - 3.1.4). Es folgt ein Überblick über die Gating-Hierarchie (siehe 3.1.5).

3.1.1 Aufreinigung der Zellen

Ziel der ersten beiden Gatingschritte ist der Ausschluss zweier Störfaktoren: ungenau gemessene Zellen sowie Dupletten, also aneinander haftende Zellen, die das Messergebnis verfälschen.

Im ersten Plot sind sämtliche akquirierte Zellen gegen die Zeit (Abszisse) aufgetragen. Eine erste Eingrenzung geschieht durch die Gates „Time window“ und „Unstable acquisition“ (siehe Abbildung 3-1). Das Time window dient der Eliminierung ungenau gemessener Zellen zu Beginn und am Ende der Akquirierung. Die Unstable-acquisition-Gates schließen ungenaue Messungen aus, die beispielsweise durch kurzzeitiges Entfernen des Proberöhrchens entstanden sind. Diese Entfernung ist gelegentlich notwendig, um ein Absinken der relativ schweren Zellen auf den Röhrchengrund zu verhindern.

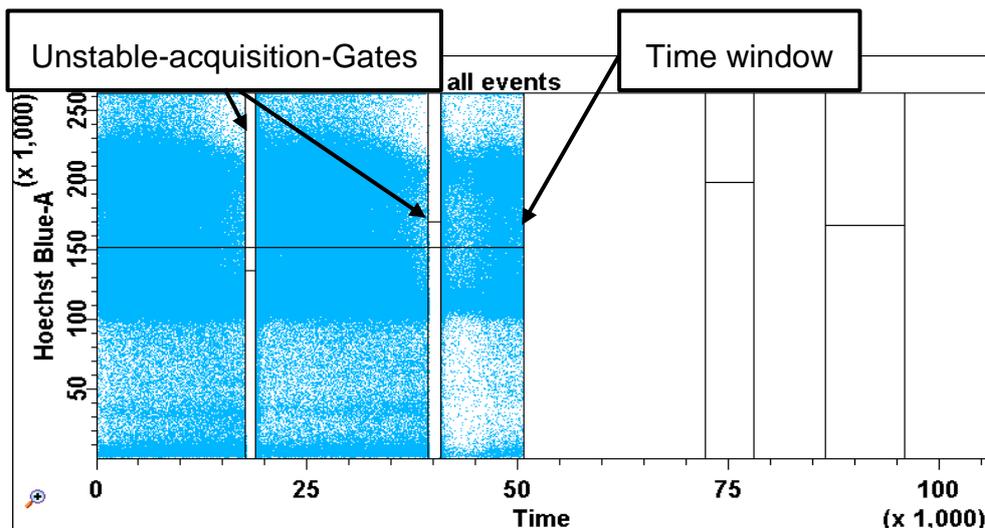


Abbildung 3-1: All events mit Time-window-Gate

Ziel der ersten Gating-Schritte ist die Eliminierung ungenau gemessener Zellen zu Beginn und am Ende der Akquirierung. „Unstable acquisition“-Gates schließen Events aus, die während der kurzzeitigen Entfernung des Proberöhrchens entstanden sind.

Im aus dem vorigen Schritt resultierenden Dot plot werden nun mit Hilfe einer doppelten SSC-Darstellung alle zuvor eingegrenzten Zellen angezeigt. Die Einzelzellen (Singlets) können nun durch ein weiteres Gate eingegrenzt werden (siehe Abbildung 3-2). Dupletten werden dabei herausgefiltert.

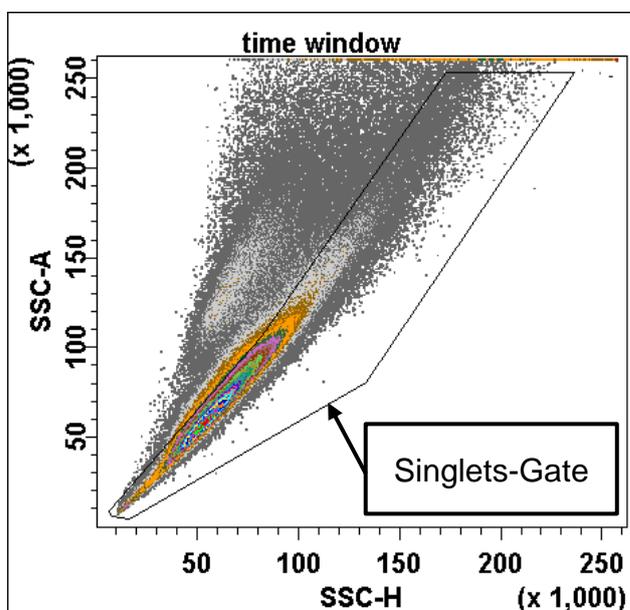


Abbildung 3-2: Time window mit Singlets-Gate

Dupletten weisen eine stärkere Fluoreszenz als Einzelzellen im SSC-A-Kanal auf – sie werden durch das Singlets-Gate von der Messung ausgeschlossen.

Abkürzungen: SSC-A: Side scatter area, SSC-H: Side scatter height.

3.1.2 Eingrenzung vitaler Zellen

In den darauffolgenden zwei Schritten sollen tote und apoptotische Zellen sowie Zelltrümmer heraus-gegatet und dadurch vitale Zellen eingegrenzt werden.

Im Singlets-Fenster können durch die Darstellung des Hoechst-red- sowie Hoechst-blue-Wertes die Live cells gegatet werden. Tote Zellen leuchten aufgrund der PI-Färbung in diesem Fenster sehr intensiv – man findet sie am rechten Fensterrand. Apoptotische Zellen befinden sich vorrangig im unteren Abschnitt dieses Konturplots.

Im Rahmen der Charakterisierung der zehn Zelllinien wählten wir eine Darstellung, bei der einzig die diploiden Zellen (einfacher Chromosomensatz) berücksichtigt wurden (siehe Abbildung 3-3).

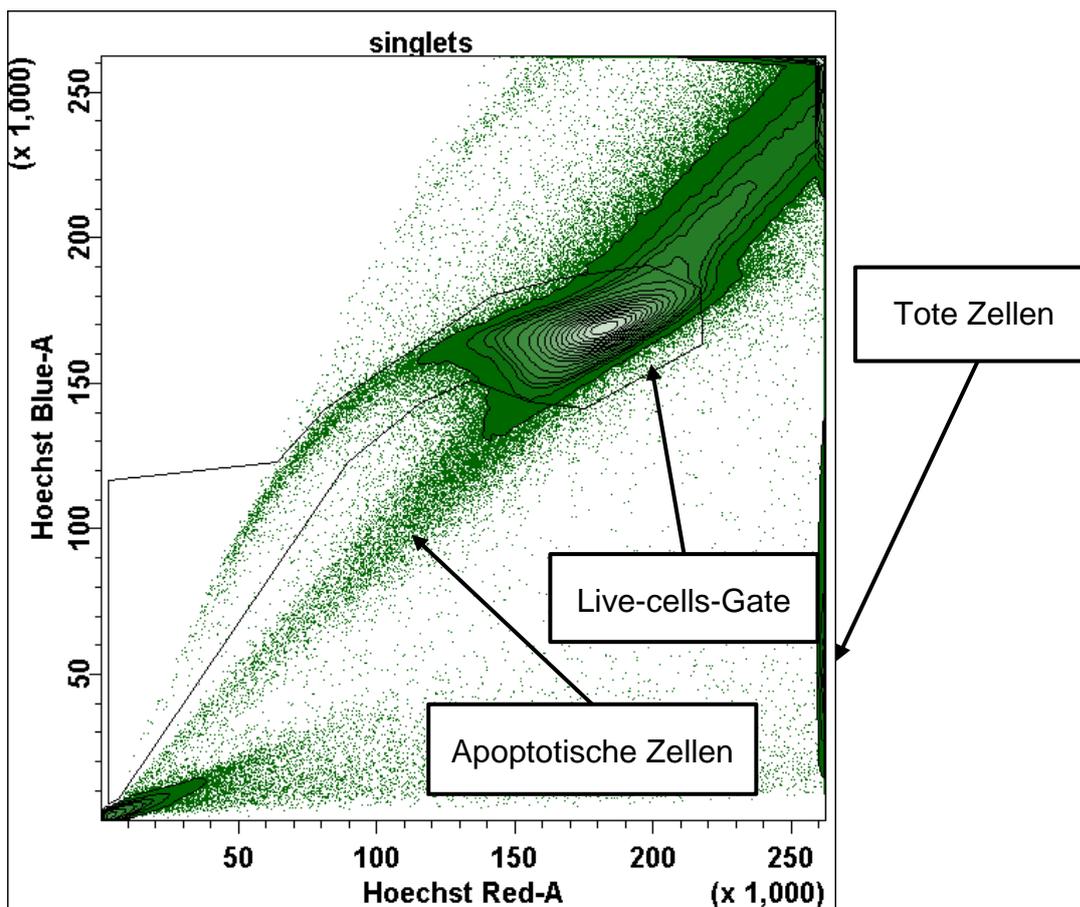


Abbildung 3-3: Singlets mit Live-cells-Gate

Tote Zellen befinden sich am rechten äußeren Rand des Fensters, apoptotische Zellen vorrangig im unteren Abschnitt.

Bei einem initialen ATO-Behandlungsversuch fiel uns eine Population auf, die der SP auffällig ähnelt. Sie entspringt der Population, die den doppelten DNA-Gehalt aufweist und unmittelbar vor der Mitose steht, so dass sie mehr Hoechst bindet und entsprechend stärker in den Hoechstkanälen fluoresziert (siehe Abbildung 3-4). Dieses Phänomen beschrieb Petriz bereits 2007 in seinem Artikel „Flow cytometry of the side population“ (Petriz 2007).

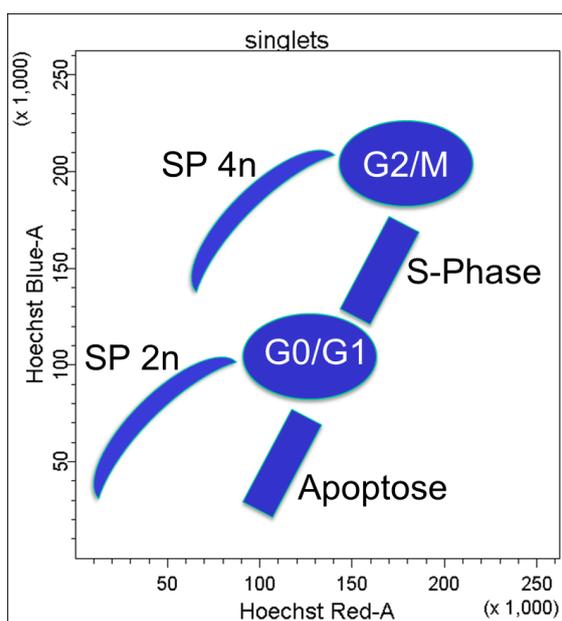


Abbildung 3-4: Subpopulationen im Hoechst-blue-Hoechst-red-Fenster

Die zwei stärksten Populationen sind die diploide G0/G1-Population sowie die tetraploide G2/M-Population. Letztere bindet aufgrund des doppelten DNA-Gehalts mehr Hoechst und fluoresziert in beiden Hoechstkanälen entsprechend stärker. Aus beiden Populationen geht jeweils eine SP hervor. Zellen, die gerade DNA synthetisieren (S-Phase), befinden sich zwischen den beiden großen Populationen. Apoptotische Zellen fluoreszieren schwächer.

Abkürzungen: G: Gap, M: Mitose, S-Phase: Synthese-Phase, SP: Side population, 2n: einfacher Chromosomensatz, 4n: doppelter Chromosomensatz. Modifiziert nach Petriz (Petriz 2007).

Durch Variation der Spannung können die von den Detektoren erfassten Signale unterschiedlich verstärkt werden. Daher benutzten wir für die drei folgenden und in dieser Arbeit beschriebenen Behandlungsversuche von KG-1a-Zellen mit ATO niedrigere Spannungen, so dass auch tetraploide Zellen dargestellt werden. Zusätzlich führten wir parallel zum Live-cells-Gate ein Dead-

cells-Gate entlang des rechten Randes des Hoechst-blue-Hoechst-red-Fensters ein, das den Großteil toter Zellen identifiziert (siehe Abbildung 3-5).

Dieses Gate gibt Aufschluss über den zytotoxischen Effekt des Medikaments. Bei der Durchflusszytometrie unbehandelter Zellen wäre ein solches Gate überflüssig gewesen, da es nur wenige tote Zellen gegeben hätte, die derart intensiv fluoreszieren.

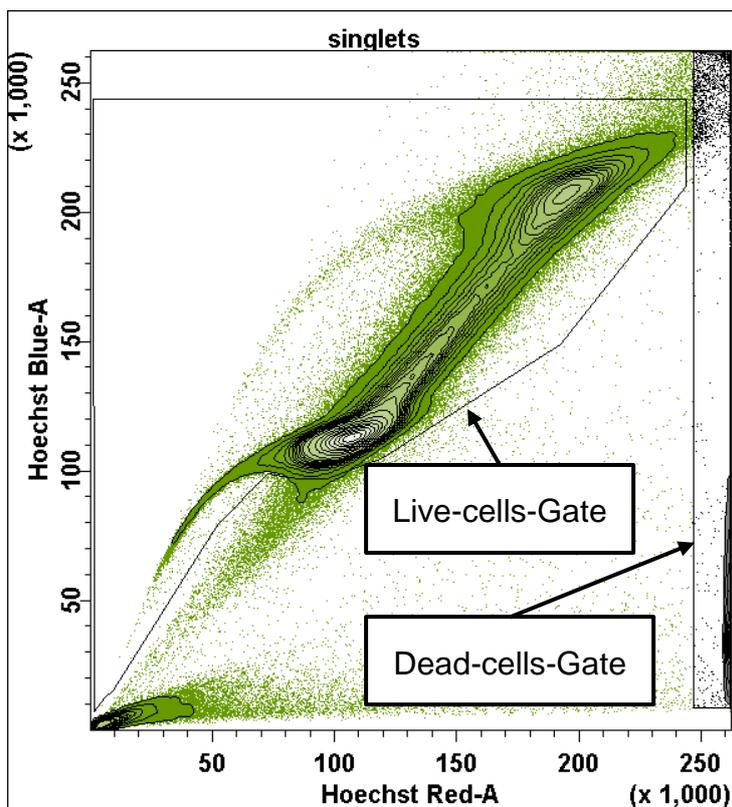


Abbildung 3-5: Singlets mit Live-cells-Gate und Dead-cells-Gate

Innerhalb des Live-cells-Gates ist neben der diploiden Zellpopulation eine weitere, tetraploide Population erkennbar. Die meisten toten Zellen können aufgrund ihrer intensiven Fluoreszenz im Hoechst-Red-A-Kanal erfasst werden.

Im darauffolgenden Dot plot werden die Live cells in Bezug auf die Parameter FSC und SSC angezeigt. Verbliebene tote Zellen sowie Zelltrümmer liegen hier ursprungsnah beziehungsweise haben sie eine starke SSC- und schwache FSC-Signalstärke. Das Vital-Cells-Gate filtert sie heraus (siehe Abbildung 3-6).

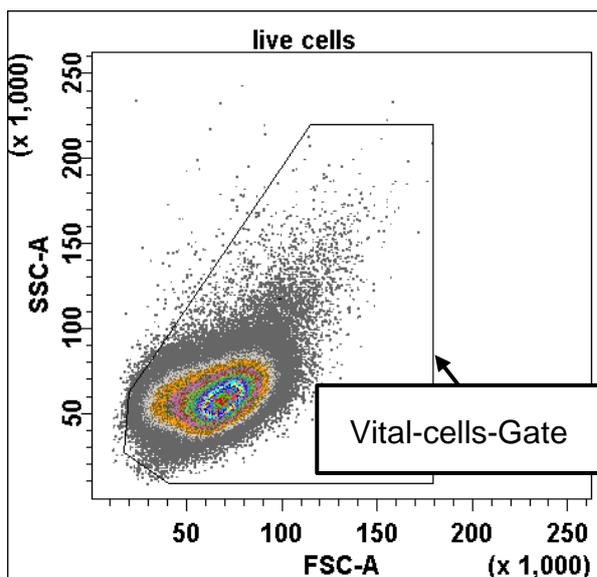


Abbildung 3-6: Live cells mit Vital-cells-Gate

Verbliebene tote Zellen bzw. Zelltrümmer liegen in dieser Darstellung ursprungsnah und werden durch das Vital-cells-Gate ausgeschlossen.

Abkürzungen: FSC-A: Forward scatter area, SSC-A: Side scatter area.

3.1.3 Eingrenzung der Side population (SP)

Die zuvor ermittelten Vital cells werden erneut im Hoechst-blue-Hoechst-red-Konturplot angezeigt (siehe Abbildung 3-7). Die Hauptpopulation der Vital cells macht den Großteil der verbliebenen leukämischen Zellen aus und fluoresziert relativ stark, ist also eher rechts und oben im Plot erkennbar. Der Anteil an Zellen mit Stammzellcharakteristika, also die SP, bildet eine Ausläuferpopulation, ausgehend vom linken Rand der Hauptpopulation. Sie läuft in einem Bogen in Richtung Achsenursprung. Dies ist auf das Herauspumpen des Hoechst-Farbstoffes durch membranständige Proteine zurückzuführen.

Das Side-population-Gate wird nun am Übergang der Haupt- zur Ausläuferpopulation gesetzt und reicht bis nahe an den Achsenursprung. Im Folgenden ist mit dem SP-Anteil (in %) immer der Anteil der SP an den Vital Cells gemeint.

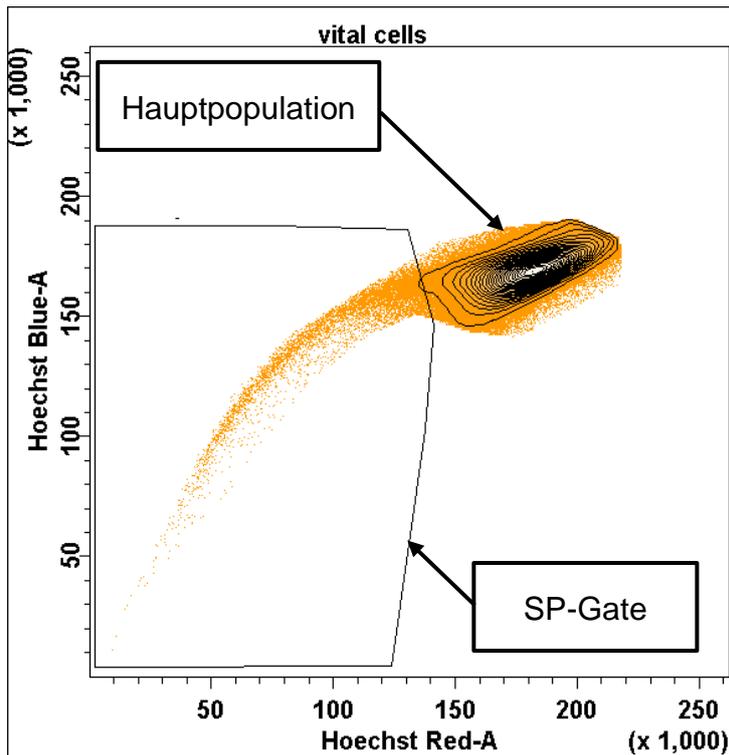


Abbildung 3-7: Vital cells mit SP-Gate

Die SP läuft vom linken Rand der Hauptpopulation in Richtung Achsenursprung, da ihre Zellen mit Hilfe membranständiger Pumpen den Hoechst-Farbstoff herausbefördern.

Abkürzungen: SP: Side population.

Bei der Darstellung der diploiden und tetraploiden Zellen im Rahmen der Behandlungsversuche fügten wir noch einen Zwischenschritt ein: die Eingrenzung einer diploiden G0/G1-Population sowie einer tetraploiden G2/M-Population. „G“ steht hierbei für Gap (englisch: Lücke), „M“ für Mitose. Beides sind gängige Begriffe für das Stadium des Zellzyklus, in dem sich eine Zelle gerade befindet (siehe Abbildung 3-8). Zwischen diesen beiden Populationen sind Zellen sichtbar, die sich gerade in der Synthesephase befinden. Da sie weder diploid noch tetraploid sind, erfassten wir sie in keinem der Gates und schlossen sie bewusst aus der Analyse aus.

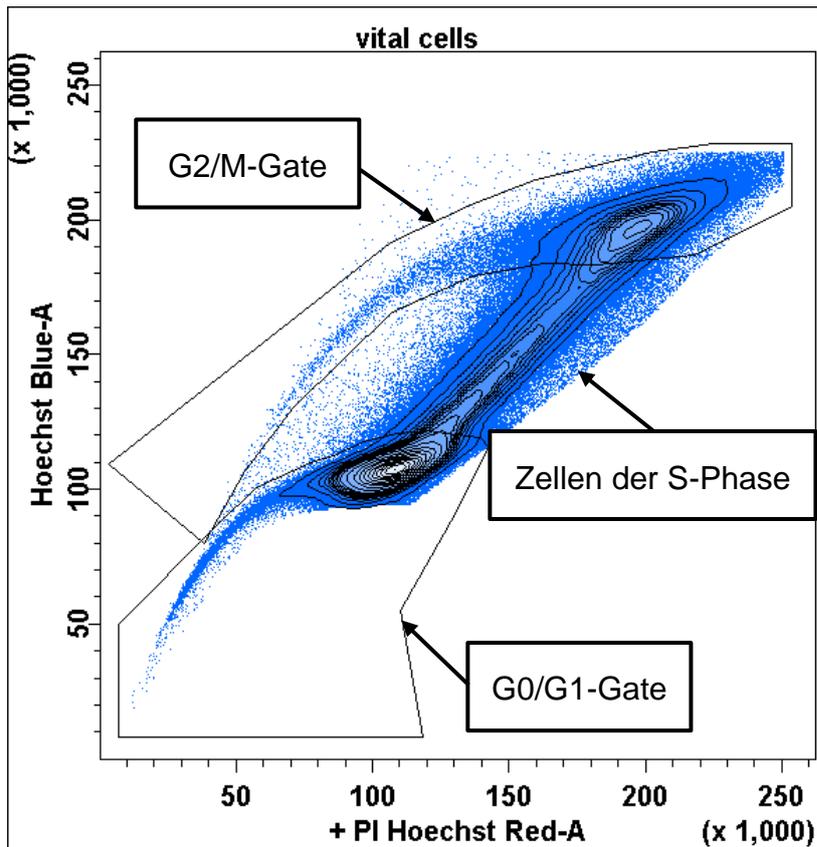


Abbildung 3-8: Vital cells mit G2/M- sowie G0/G1-Gate

Im Rahmen der Behandlungsversuche unterschieden wir eine diploide G0/G1-Population von einer tetraploiden G2/M-Population.

Abkürzungen: G: Gap, M: Mitose, PI: Propidiumiodid, S-Phase: Synthesephase.

Anschließend setzten wir bei dieser Darstellung entsprechend zwei SP-Gates: Zum einen ein SP-2n-Gate, das am linken Rand der G0/G1-Population ansetzt, zum anderen ein SP-4n-Gate, das am linken Rand der G2/M-Population ansetzt.

3.1.4 Differenzierung der SP

Wir untergliederten die SP weiter in die Subpopulationen Early SP, Intermediate SP sowie Late SP, wobei die Early SP nahe am Achsenursprung, die Late SP nahe an der Hauptpopulation liegt.

Zwei Gründe sprechen für diese Untergliederung: Zum einen geht man davon aus, dass es sich bei SP-Zellen, die besonders stark den Hoechst-Farbstoff

herauspumpen und entsprechend ursprungsnah liegen, um sehr frühe Vorläuferzellen handelt. Der Effekt von Medikamenten auf die besonders frühen Vorläuferzellen ist daher vermutlich entscheidender als der Effekt auf die gesamte SP (siehe auch 1.3.7 Therapeutische Konsequenzen, S. 34). Der zweite Grund ist die Schwierigkeit, das SP-Gate exakt am Übergang von der Hauptpopulation zur SP zu legen, da hier die Übergänge fließend sind (siehe auch 4.2.2 SP-Eingrenzung, S.118).

Es erscheint sinnvoll, die Early SP sowie die Intermediate SP zur „Zellpopulation mit frühen Stammzellkriterien“ zusammenzufassen (siehe 3.2.2, S. 91). Folglich sind bei ebendieser sicherlich keine Zellen der Hauptpopulation mehr enthalten. Ein weiteres Argument der Zusammenfassung beider Subpopulationen ist, dass es sich um sehr wenige Zellen handelt (jeweils deutlich unter 1 % der Hauptpopulation). Bei separater Betrachtung der Early SP und der Intermediate SP würden sich messbedingte Schwankungen besonders ungünstig auswirken.

Konkret erstellten wir ein Histogramm und bildeten die Fluoreszenz des Hoechst-blue-Kanals auf der Abszisse ab. Die dargestellten SP-Zellen teilten wir in drei Gruppen: Dazu nahmen wir den medianen Fluoreszenzwert der Hauptpopulation zu Hilfe und zogen eine definierte minimale Fluoreszenzintensität von 10,000 (bzw. 8,000 bei den Messungen mit tetraploiden Zellen) davon ab, die sämtliche SP-Zellen erfahrungsgemäß übertreffen. Ziel war es, möglichst konstante Werte in der Unterteilung der SP-Zellen zu verwenden. Der Fluoreszenz-Medianwert ist erfahrungsgemäß hinreichend konstant: So lag er bei den fünf Messungen des SP-Anteils bei KG-1a-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 169,479 und 175,462. Die definierte Minimalfluoreszenz der SP-Zellen ist ohnehin fix und blieb innerhalb sämtlicher Auswertungen unverändert.

Die Differenz dieser beiden Werte drittelten wir und erhielten dadurch die drei Subpopulationen Early SP, Intermediate SP und Late SP (siehe Abbildung 3-9).

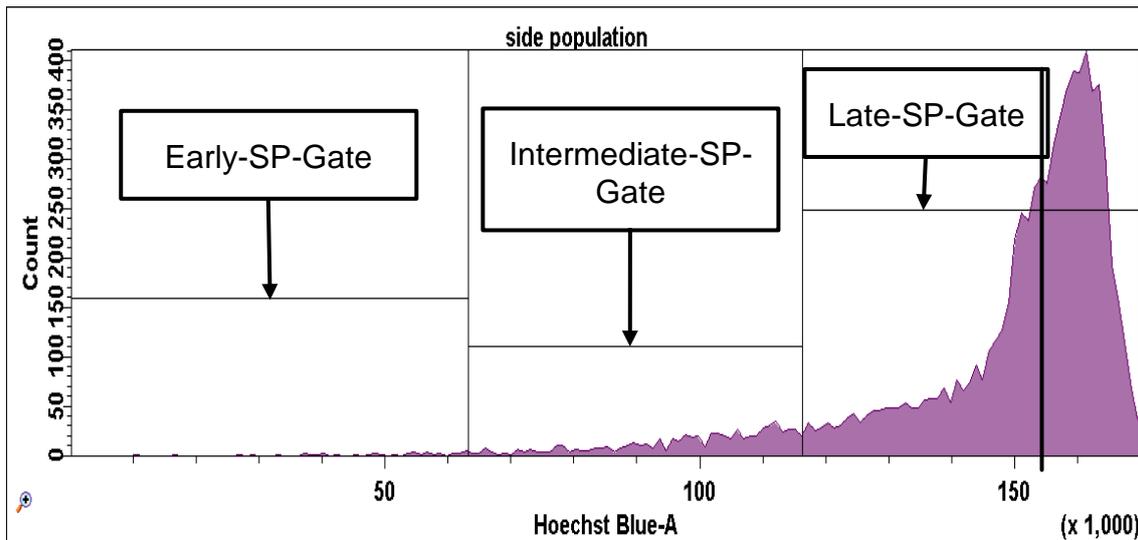


Abbildung 3-9: SP mit Early-, Intermediate- und Late-SP-Gate

Die Drittelung der Differenz aus dem Medianwert der Hauptpopulation einerseits (in der Abbildung etwa 154,000, verdeutlicht als senkrechte Linie) und einer definierten Minimalfluoreszenz andererseits (10,000 bzw. bei den Behandlungsversuchen 8,000) ergibt die drei dargestellten Gates. Die Annahme, dass besonders unreife SP-Zellen den Hoechst-Farbstoff stärker als reifere Zellen aus sich herauspumpen, ergibt die Nomenklatur Early SP, Intermediate SP und Late SP.

Abkürzungen: SP: Side population.

3.1.5 Gating-Hierarchie bei der Charakterisierung der SP

Sämtliche Gating-Schritte werden von der DIVA-Software zusammenfassend dargestellt. Eingerückte Populationen zeigen an, dass es sich um Eingrenzungen der darüber gestellten Population handelt (siehe Abbildung 3-10). Die Abbildung zeigt die Gating-Hierarchie bei den Behandlungsversuchen, die die Darstellung der tetraploiden Population inkludieren. Bei der Auswertung der zehn verschiedenen Zelllinien gliedert sich die Gating-Hierarchie entsprechend, allerdings ohne die Populationen G0/G1, G2/M sowie Dead cells.

Tube: Zellen Hoechstfaerbung Behandlungsversuch			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ all events	1,048,116	####	100.0
☒ unstable acquisition 1	1,560	0.1	0.1
■ NOT(unstable acquisition 1)	1,046,556	99.9	99.9
☒ unstable acquisition 2	0	0.0	0.0
■ NOT(unstable acquisition 2)	1,046,556	100.0	99.9
☒ unstable acquisition 3	0	0.0	0.0
■ NOT(unstable acquisition 3)	1,046,556	100.0	99.9
☒ unstable acquisition 4	0	0.0	0.0
■ NOT(unstable acquisition 4)	1,046,556	100.0	99.9
■ time window	1,045,595	99.9	99.8
■ singlets	999,976	95.6	95.4
■ live cells	871,285	87.1	83.1
■ vital cells	868,580	99.7	82.9
■ G0 / G1	493,297	56.8	47.1
■ side population 2n	6,899	1.4	0.7
■ early SP 2n	31	0.4	0.0
■ intermediate SP 2n	1,221	17.7	0.1
■ late SP 2n	5,647	81.9	0.5
■ NOT(G0 / G1)	375,283	43.2	35.8
■ G2 / M	163,371	43.5	15.6
■ side population 4n	7,614	4.7	0.7
■ early SP 4n	41	0.5	0.0
■ intermediate SP 4n	402	5.3	0.0
■ late SP 4n	7,171	94.2	0.7
■ dead cells	48,602	4.9	4.6

Abbildung 3-10: Gating-Hierarchie der Behandlungsversuche

Die linke Spalte listet sämtliche Populationen auf. Eingerückte Populationen sind aus den oberen Populationen durch Gating entstanden. Da die Unstable-Acquisition-Gates unbrauchbare Zellen enthalten, werden diese Populationen jeweils invertiert, so dass sämtliche Zellen außer denjenigen in den Gates weiterverwendet werden. Ebenso wird die G0/G1-Population invertiert. Dadurch ist ausgeschlossen, dass Zellen sowohl in der G0/G1- als auch in der G2/M-Population aufgezählt werden. Die anderen Spalten indizieren die absolute Anzahl an Events, die Relation zur übergeordneten Population sowie den jeweiligen Anteil an sämtlichen akquirierten Events.

Abkürzungen: G: Gap, M: Mitose, SP: Side population, 2n: einfacher Chromosomensatz, 4n: doppelter Chromosomensatz.

3.2 Verhältnisanalyse differenzieller Stammzellkriterien in definierten leukämischen Zelllinien mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Folgende leukämische Zelllinien wurden an unterschiedlichen Tagen jeweils mindestens vier Mal auf reproduzierbare SP hin untersucht (REH wurde drei Mal untersucht.): EOL-1, Jurkat, Kasumi-1, KG-1a, K562, MHH, MV4-11, NALM-16, REH, SEM.

Dabei ist mit „Zellpopulation mit definierten Stammzellkriterien“ die gesamte SP gemeint, während sich der Ausdruck „Zellpopulation mit definierten frühen Stammzellkriterien“ auf die Zusammenfassung der Early SP und Intermediate SP bezieht (siehe auch 3.1.4 Differenzierung der SP, S.85).

3.2.1 Charakterisierung des Anteils der Zellpopulation mit definierten Stammzellkriterien

Mit Hilfe der Auswertungsschritte aus 3.1 (S. 78) ermittelten wir durch mindestens vier (bei REH drei) Messungen an unterschiedlichen Tagen die durchschnittliche SP (siehe Abbildung 3-11). Bei der statistischen Darstellung verwendeten wir ausgehend vom Mittelwert die Standardabweichung (SD: Standard deviation) als Fehlerbalken.

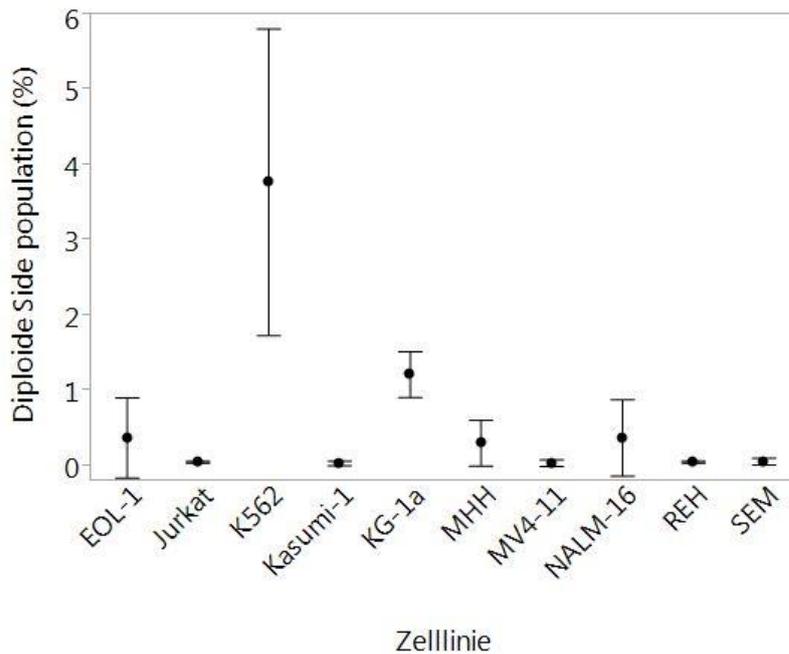


Abbildung 3-11: Anteil der SP an den vitalen Zellen bei Zelllinien

Abgebildet sind die Mittelwerte (Punkte) der SP aller zehn Zelllinien. Der Fehlerbalken reicht eine Standardabweichung weit, ausgehend vom Mittelwert. Acht Zelllinien weisen eine SP von unter 0,5 % auf, lediglich K562- und KG-1a-Zellen haben eine deutlich größere SP. KG-1a-Zellen zeigen in Bezug auf die Größe ihrer SP eine relativ geringe Streuung.

Abkürzungen: SP: Side population.

Abbildung 3-11 ist zu entnehmen, dass acht von zehn Zelllinien einen SP-Anteil von unter 0,5 % haben. Bei den Linien Jurkat, Kasumi-1, MV4-11, REH und SEM beträgt dieser sogar deutlich unter 0,1 %. Daher schieden ebendiese auch als potenzielle Linien für die späteren Behandlungsversuche aus. Die Linien EOL-1, MHH und NALM-16 weisen einen mittleren SP-Anteil von 0,3 % bis 0,4 % auf. Bezogen auf die geringe SP ist die Streuung bei allen dreien relativ groß (EOL-1: 0,5 %; MHH: 0,3 %; NALM-16: 0,5 %).

Einzig K562 und KG-1a haben einen SP-Anteil von deutlich über 1,0 %. Diese beiden Linien kamen in die engere Auswahl für die anschließenden Behandlungsversuche. Ein hoher SP-Anteil ist hierfür von Vorteil: Je größer die SP bei relativ geringer Streuung ist, desto sensitiver können Effekte von Medikamenten auf die SP erfasst werden. Beispielsweise lässt sich ein

Behandlungseffekt, der die SP von 1,0 % auf 0,5 % senkt, leichter nachweisen, als ein Behandlungseffekt, der die SP von 0,1 % auf 0,05 % senkt. Zum Nachweis des letzteren Effekts bräuchte man aufgrund der Streuung deutlich mehr Versuche, obwohl in beiden Fällen die SP halbiert worden wäre.

K562-Zellen haben die größte durchschnittliche SP (3,8 % im Mittel). Allerdings fällt die SD bei K562-Zellen relativ hoch aus (2,0 %). Die kleinste erfasste SP liegt bei 2,0 %, die größte bei 6,5 %. Eine derartige Streuung würde die Auswertung von Behandlungsversuchen stark erschweren. K562 war die einzige der zehn Zelllinien, die eine chronische statt eine akute Leukämie repräsentierte (siehe auch Tabelle 2-10: Verwendete Zelllinien, S. 51).

KG-1a-Zellen haben eine mittlere SP von 1,2 %, wobei wir Werte zwischen 0,9 % und 1,7 % gemessen haben. Die SD liegt bei 0,3 %.

Zusammenfassend liegen die SP von fünf Zelllinien bei unter 0,1 %, drei weitere Zelllinien wiesen SP zwischen 0,3 % und 0,4 % auf und zwei Zelllinien (K562 und KG-1a) hatten je eine SP von deutlich über 1,0 %. KG-1a-Zellen zeigten eine verhältnismäßig moderate Streuung bei den SP-Messergebnissen.

3.2.2 Charakterisierung des Anteils der Zellpopulation mit definierten frühen Stammzellkriterien

Mit Hilfe der Auswertungsschritte aus 3.1 (S. 78) ermittelten wir durch mindestens vier (bei REH drei) Messungen an unterschiedlichen Tagen die durchschnittliche Population mit frühen Stammzellkriterien (siehe Abbildung 3-12). Hierfür fassten wir den jeweiligen Anteil der Early SP und der Intermediate SP an den Vital cells zusammen (siehe 3.1.4 Differenzierung der SP, S.85). Bei der statistischen Darstellung verwendeten wir ausgehend vom Mittelwert die SD als Fehlerbalken.

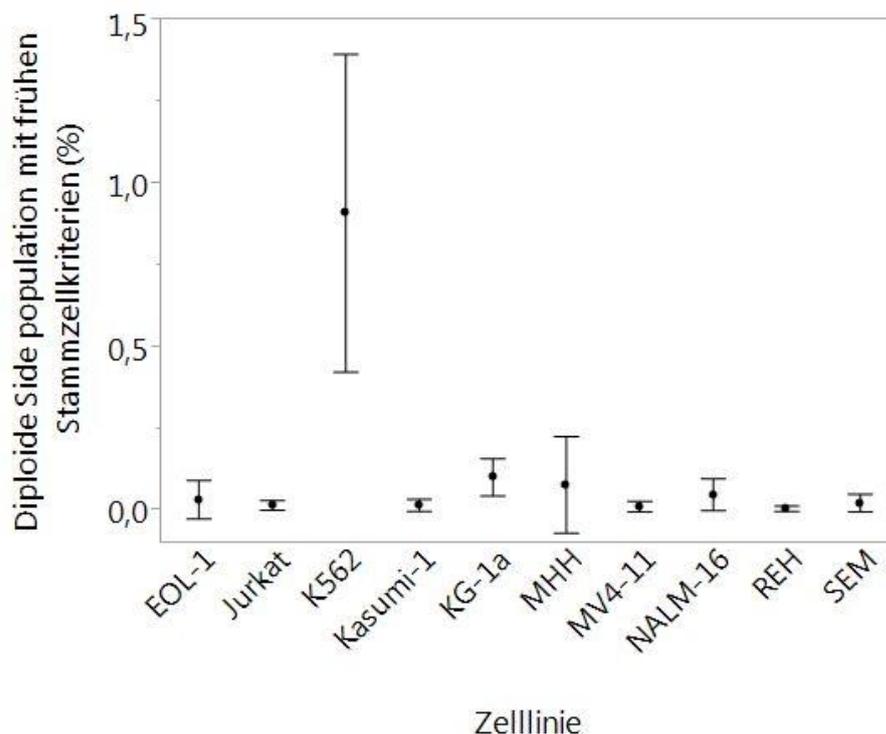


Abbildung 3-12: Anteil der Early SP und Intermediate SP an den vitalen Zellen bei Zelllinien

Abgebildet sind die Mittelwerte (Punkte) der Population mit frühen Stammzellkriterien bei allen zehn Zelllinien. Der Fehlerbalken reicht eine Standardabweichung weit, ausgehend vom Mittelwert. Sieben Zelllinien weisen eine „EarlyAndIntermediateSP“ von maximal 0,05 % auf. K562-Zellen stechen mit 0,91 % und einer verhältnismäßig großen Streuung hervor. KG-1a-Zellen haben einen „EarlyAndIntermediateSP“-Anteil von über 0,1 %, MHH-Zellen von 0,08 %. Relativ zu diesem Anteil ist die Streuung bei KG-1a-Zellen geringer.

Abkürzungen: SP: Side population.

Aus Abbildung 3-12 geht hervor, dass sieben von zehn Zelllinien einen „EarlyAndIntermediateSP“-Anteil von 0,05 % oder weniger haben. Bei den Linien Jurkat, Kasumi-1, MV4-11, REH und SEM macht dieser weniger als 0,03 % aus. Dies erinnert an den bereits kleinen Anteil der gesamten SP an den Vital cells bei ebendiesen Linien (siehe 3.2.1, S.89). EOL-1 und NALM-16 weisen einen mittleren „EarlyAndIntermediateSP“-Anteil von 0,03 % bzw. 0,05 % auf.

K562-Zellen haben auch die größte durchschnittliche „EarlyAndIntermediateSP“ (0,9 % im Mittel). Die SD beträgt hier 0,49 %. Die Messergebnisse bewegen sich zwischen 0,44 % und 1,61 %. Auch bei der „EarlyAndIntermediateSP“

würde eine solche Streuung die Auswertung von Behandlungsversuchen erschweren.

KG-1a-Zellen haben eine mittlere „EarlyAndIntermediateSP“ von 0,10 %, also etwa ein Zehntel der gesamten SP. Es wurden Anteile zwischen 0,05 % und 0,19 % gemessen. Die SD liegt bei unter 0,06 %.

Zusammenfassend lagen die „EarlyAndIntermediateSP“ von sieben Zelllinien bei maximal 0,05 %, eine weitere Zelllinie (MHH) wies eine SP von 0,08 % auf und zwei Zelllinien (K562 und KG-1a) hatten je eine SP von mindestens 0,1 %. Ein Anteil von 0,1 % an den vitalen Zellen scheint verschwindend gering. Dennoch handelt es sich hierbei aufgrund der initialen Akquirierung von rund 1.000.000 Events immer noch um mehrere hundert SP-Zellen.

KG-1a-Zellen zeigten bei den „EarlyAndIntermediateSP“-Messergebnissen eine verhältnismäßig moderate, jedoch nicht unerhebliche Streuung.

Aufgrund der relativ geringen Streuung bei den Messungen der gesamten SP, der Herkunft (akute Leukämie) und einem regelmäßig nachweisbaren Anteil besonders früher Vorläuferzellen verwendeten wir die Zelllinie KG-1a für unsere Behandlungsversuche.

3.3 Analyse des Effektes eines anerkannten Leukämie-Therapeutikums (ATO) auf die Zellpopulation mit Stammzellkriterien bei KG-1a-Zellen

Die Analyse des Effektes von ATO auf KG-1a-Zellen bildet den Schwerpunkt dieser Arbeit.

Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung des Behandlungsansatzes mit ATO findet sich im Kapitel 2.2.3.1 auf S. 61.

Insgesamt wurde der Versuch vier Mal wiederholt. Die letzten drei Experimente lassen aufgrund der Spannungseinstellungen Rückschlüsse nicht nur auf die diploide, sondern auch auf die tetraploide Zellpopulation im Rahmen der Behandlung zu (siehe auch Kapitel 3.1, S. 78). Daher wurden letztere auch für die hier durchgeführten Analysen verwendet. Lediglich eine Messung bei

5,0 μ M-ATO-behandelten Zellen nach 72 h wurde von der Wertung generell ausgeschlossen. Die Darstellung im Hoechst-blue-Hoechst-red-Plot deutete hierbei auf eine zu hohe Hoechst-Konzentration bei der Färbung hin.

Grundsätzlich zeigen die Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe, dass es sich bei der Hoechst-Färbung um einen sehr sensitiven Essay handelt, bei dem nebst der exakten Hoechst-Konzentration auch zwingend die vorgeschriebenen Inkubationszeiten eingehalten werden müssen, da es sonst zu einer raschen Zu- oder Abnahme von Populationen bei der Auswertung kommt (siehe auch 0 Hoechstoffärbung, S. 64 sowie 4.2.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der SP, S. 117).

3.3.1 Differenzielle zytotoxische Effekte von ATO auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration

ATO ist ein anerkanntes Therapeutikum bei der Behandlung der APL. Seine zytotoxische Wirkung ist unumstritten (Rojewski, Baldus et al. 2002). Unser Ziel war es, den zytotoxischen Effekt auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration (0,0 μ M – 5,0 μ M) zu ermitteln.

In Abbildung 3-13 ist der Anteil der Dead cells an den Singlets nach 72 Stunden in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer dargestellt. Mit steigender Konzentration erhöht sich auch der Anteil toter Zellen: Unbehandelte Zellen haben einen mittleren Anteil toter Zellen von lediglich 3,6 % (SD: 1,5 %), bei 0,5 μ M ATO sind es 6,9 % (SD: 3,4 %), bei 1,0 μ M ATO bereits 13,6 % (SD: 5,8 %). Mit 2,0 μ M ATO behandelte Zellen haben einen Anteil toter Zellen von 24,9 % (SD: 3,1 %), bei 5,0 μ M ATO sind es 30,2 % (SD: 5,5 %).

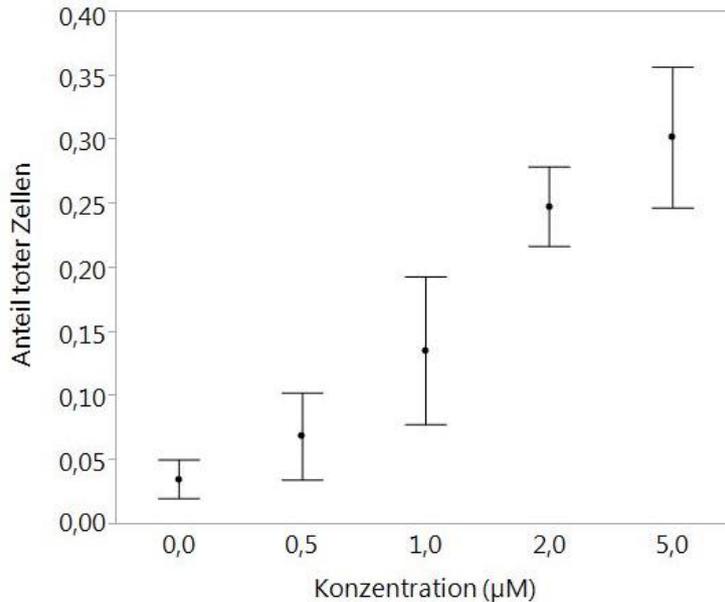


Abbildung 3-13: Anteil der toten Zellen an den Singlets in Abhängigkeit von der ATO-Konzentration

Die Punkte stehen für die Mittelwerte aller Messungen. Der Fehlerbalken reicht eine Standardabweichung weit, ausgehend vom Mittelwert. Abgebildet ist jeweils der Anteil toter Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen nach 72 h. Mit steigender Konzentration wird auch der Anteil toter Zellen höher: Unbehandelte Zellen haben einen mittleren Anteil toter Zellen von 3,6 %, mit 1 µM ATO behandelte Zellen weisen bereits einen Anteil von 13,6 % auf, mit 5 µM ATO behandelte Zellen haben einen Anteil toter Zellen von 30,2 %.

Abkürzungen: ATO: Arsentrioxid.

3.3.2 Differenzielle zytotoxische Effekte von ATO auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer

In Abbildung 3-14 ist der Anteil toter Zellen an den Singlets in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer dargestellt. Abgebildet sind mit 5,0 µM ATO behandelte Zellen sowie unbehandelte Zellen als Referenz. Letztere haben Anteile toter Zellen zwischen 3,3 % und 6,5 %. Bei mit ATO behandelten Zellen steigt dieser Anteil massiv an: Bereits nach 24 Stunden ist der Anteil toter Zellen auf 11,8 % gestiegen (SD: 2,4 %), nach 48 Stunden sind es 17,6 % (SD: 2,9 %) und nach 72 Stunden 30,2 % (SD: 5,5 %).

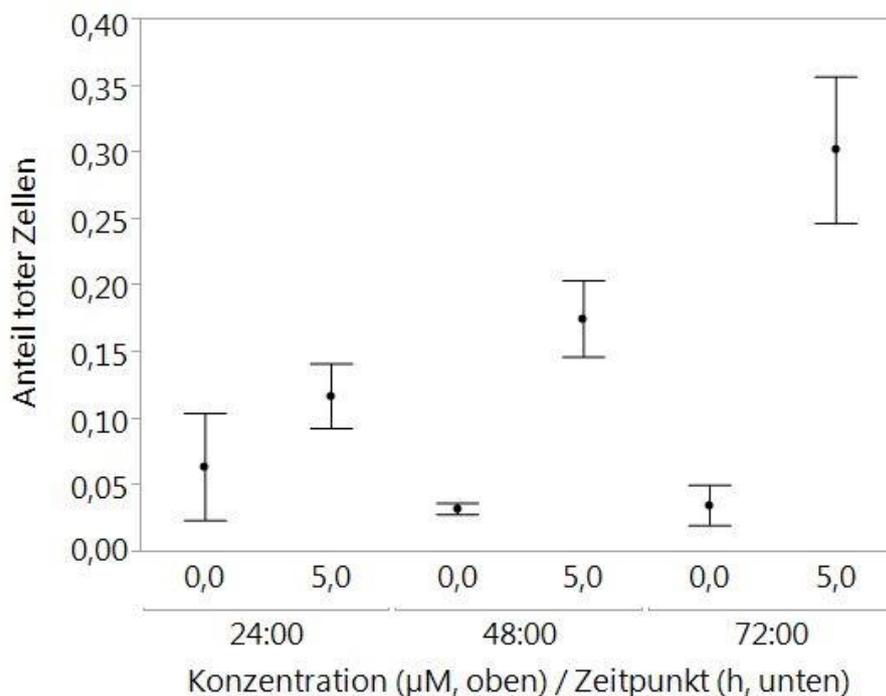


Abbildung 3-14: Anteil der toten Zellen an den Singlets in Abhängigkeit von der ATO-Behandlungsdauer

Die Punkte stehen für die Mittelwerte aller Messungen. Der Fehlerbalken reicht eine Standardabweichung weit, ausgehend vom Mittelwert. Neben den Zellen, die mit 5,0 µM ATO behandelt wurden, sind zum Vergleich die Messungen unbehandelte Zellen abgebildet. Letztere haben mittlere Anteile toter Zellen zwischen 3,3 % und 6,5 %. Der Anteil toter Zellen bei ATO-behandelten Zellen steigt stetig an: 11,8 % nach 24 h, 17,6 % nach 48 h und 30,2 % nach 72 h.

Abkürzungen: ATO: Arsenitoxid.

3.3.3 Differenzielle Effekte von ATO auf den Anteil der diploiden Zellpopulation mit Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer

Ziel dieser Analyse war es, herauszufinden, welchen Effekt ATO auf die SP hat. Da in der SP besonders frühe Vorläuferzellen vertreten sind, ist dieser Effekt besonders relevant. Die Messungen erfolgten nach 24 h, 48 h sowie 72 h Inkubation mit ATO. Dabei verwendeten wir ATO-Konzentrationen zwischen 0,0 µM und 5,0 µM.

Aus Abbildung 3-15 geht hervor, dass der SP-Anteil sowohl mit zunehmender Konzentration, als auch mit zunehmender Inkubationsdauer ansteigt.

Der mittlere SP-Anteil der unbehandelten Zellen liegt nach 24 h bei 1,4 %. Nach dieser Zeit ist der Anteil der mit 0,5 μM ATO behandelten Zellen bereits doppelt so hoch (2,8 %, SD: 0,24 %). Bei mit 5,0 μM ATO behandelten Zellen ist er auf 7,8 % angestiegen (SD: 2,8 %).

Nach 48 h sowie 72 h steigen ebenfalls sämtliche SP-Anteile, bei den mit 5,0 μM ATO inkubierten Zellen liegt dieser Anteil bei 25,1 % (SD: 5,0 %).

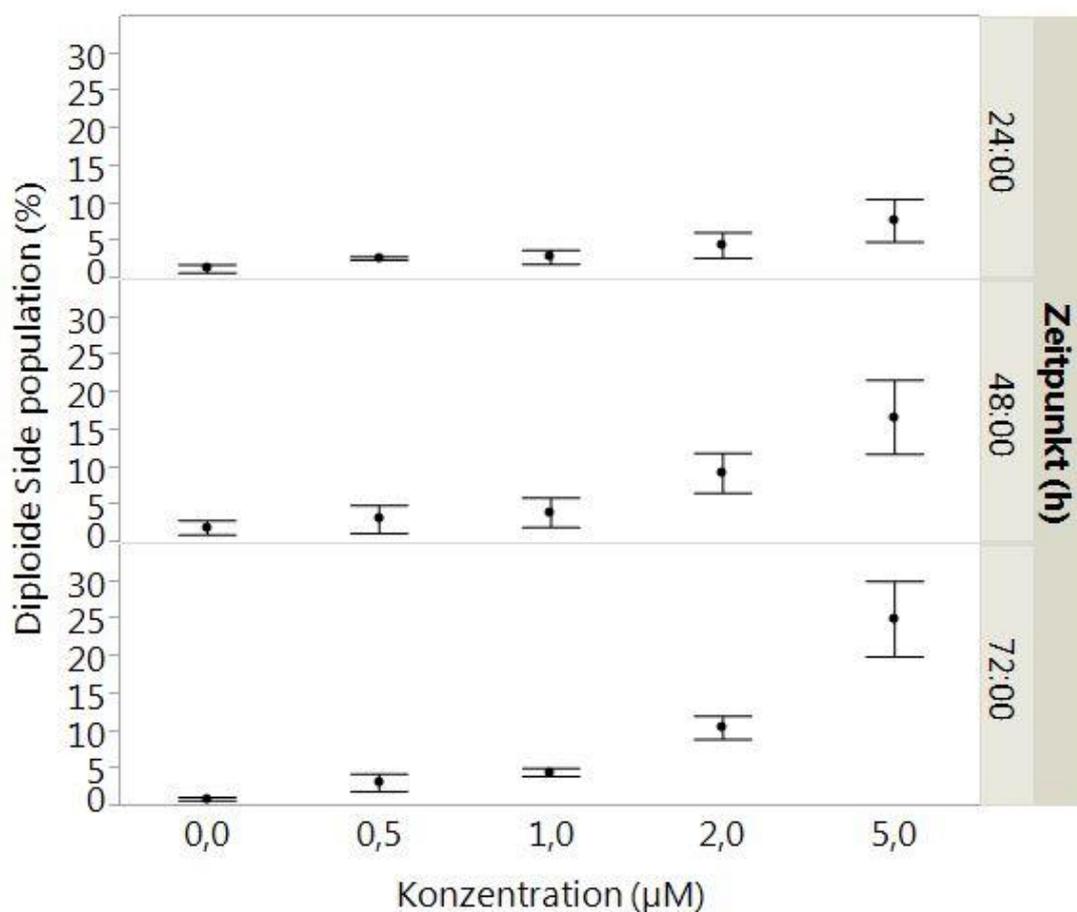


Abbildung 3-15: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer

Die Punkte stehen für die Mittelwerte aller Messungen. Der Fehlerbalken reicht eine Standardabweichung weit, ausgehend vom Mittelwert. Der SP-Anteil steigt sowohl mit zunehmender ATO-Konzentration, als auch mit zunehmender Inkubationsdauer deutlich an.

Abkürzungen: ATO: Arsentrioxid, SP: Side population.

3.3.4 Differenzielle Effekte von ATO auf den Anteil der diploiden Zellpopulation mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer

Innerhalb der SP analysierten wir die besonders frühen Vorläuferzellen unter ATO-Therapie. Abbildung 3-16 verdeutlicht, dass auch hier der SP-Anteil bei höheren ATO-Konzentrationen (2,0 μM und 5,0 μM) und zunehmender Inkubationszeit deutlich ansteigt. Bei niedrigeren ATO-Konzentrationen (0,5 μM und 1,0 μM) steigt der mittlere SP-Anteil leicht an. Aufgrund der Streuung liefert die Analyse jedoch keine zuverlässige Aussage über diesen kleinen relativen Zuwachs der SP.

Unbehandelte Zellen weisen nach 72 h einen mittleren Anteil der Early SP und Intermediate SP von 0,13 % auf (SD: 0,03 %). Mit 5,0 μM ATO behandelte Zellen haben hingegen einen Anteil von 4,14 % (SD: 0,59 %).

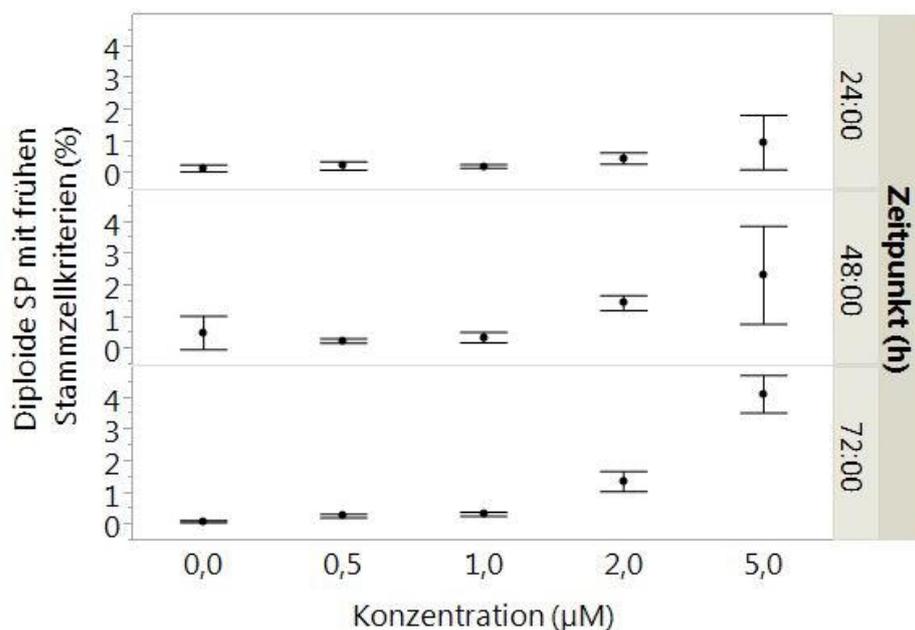


Abbildung 3-16: Anteil der Early SP und Intermediate SP an der diploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer

Die Punkte stehen für die Mittelwerte aller Messungen. Der Fehlerbalken reicht eine Standardabweichung weit, ausgehend vom Mittelwert. Niedrige ATO-Konzentrationen (0,5 μM und 1,0 μM) haben keine oder nur eine minimale Zunahme des SP-Anteils zur Folge. Höhere Konzentrationen (2,0 μM und 5,0 μM) steigern diesen Anteil deutlich auf bis zu 4,14 % (5,0 μM nach 72 h).

Abkürzungen: ATO: Arsentrioxid, SP: Side population.

3.3.5 Differenzielle Effekte von ATO auf den Anteil der tetraploiden Zellpopulation mit Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer

Bei einem initialen ATO-Behandlungsversuch fiel uns die tetraploide SP auf, die aus der Hauptpopulation mit doppeltem Chromosomensatz entspringt. Sie enthält die doppelte DNA-Menge und steht unmittelbar vor der Zellteilung, so dass sie mehr Hoechst bindet und entsprechend stärker in den Hoechstkanälen fluoresziert (siehe Abbildung 3-4, 81).

Der Anteil dieser SP an der tetraploiden Hauptpopulation steigt sowohl mit zunehmender ATO-Konzentration, als auch mit zunehmender Inkubationsdauer (siehe Abbildung 3-17).

Nach 24 h liegt der SP-Anteil bei den unbehandelten Zellen bei 4,2 % (SD: 1,1 %). Der Anteil der mit 0,5 μM ATO behandelten Zellen beträgt zu diesem Zeitpunkt bereits 10,1 % (SD: 2,0 %). Diese Zunahme setzt sich fort bis zu mit 5,0 μM ATO behandelten Zellen: Hier ist der Anteil bereits auf 47,2 % angestiegen (SD: 6,0 %).

Dieses Muster setzt sich nach 48 h und 72 h fort. Lediglich die mit 5,0 μM ATO behandelten Zellen weisen nach 48 h einen leichten Rückgang des SP-Anteils gegenüber des 24h-Wertes auf. Nach 72 h sind es aber bereits 58,6 % (SD: 9,5 %).

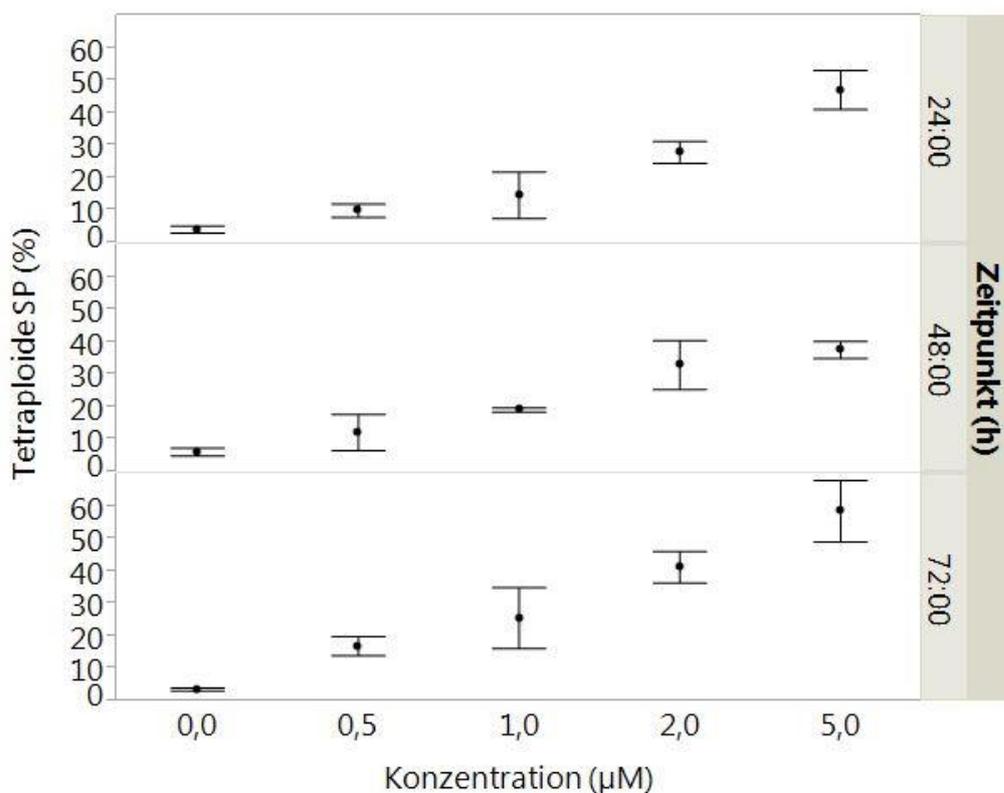


Abbildung 3-17: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer

Die Punkte stehen für die Mittelwerte aller Messungen. Der Fehlerbalken reicht eine Standardabweichung weit, ausgehend vom Mittelwert. Der SP-Anteil steigt sowohl mit zunehmender ATO-Konzentration, als auch mit zunehmender Inkubationsdauer deutlich an, so dass Zellen, die für 72 h mit 5,0 μM ATO inkubiert wurden, einen Anteil von 58,6 % aufweisen.

Abkürzungen: ATO: Arsentrioxid, SP: Side population.

3.3.6 Differenzielle Effekte von ATO auf den Anteil der tetraploiden Zellpopulation mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer

Insgesamt steigt der SP-Anteil mit besonders frühen Stammzellkriterien sowohl mit zunehmender Konzentration, als auch mit zunehmender Inkubationsdauer (siehe Abbildung 3-18).

Nach 24 h beträgt dieser Anteil bei unbehandelten Zellen 0,17 % (SD: 0,10 %), bei mit 2,0 μM ATO behandelten Zellen hingegen bereits 2,36 % (SD: 0,67 %). Für mit 5,0 μM ATO behandelten Zellen lässt sich aufgrund einer massiven

Streuung bzw. eines Messwert-Ausreißers (siehe auch Alternative Abbildung 3-18 (7-8a), S. 149) keine klare Aussage treffen.

Auch nach 48 h haben die SP-Anteile mit steigender Konzentrationen zugenommen. Bei der höchsten ATO-Konzentration (5,0 μM) liegt der mittlere Anteil bei 5,52 % (SD: 1,63 %), der sich in den weiteren Stunden jedoch durchschnittlich nicht vergrößert: Nach 72 h liegt der SP-Anteil der Zellen mit frühen Stammzellkriterien bei 5,28 % (SD: 0,87 %).

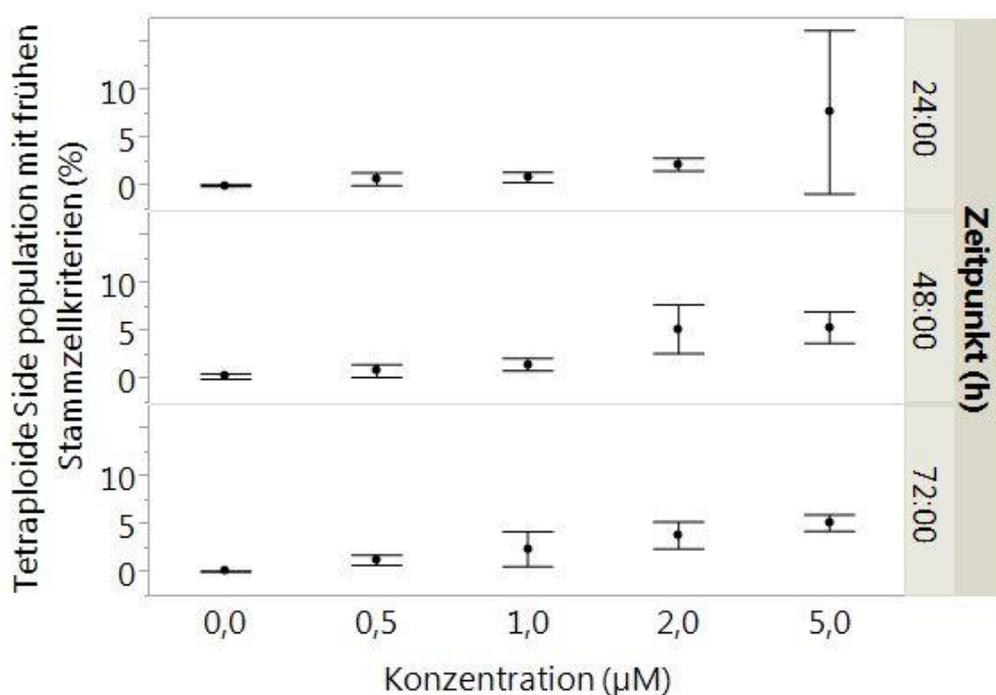


Abbildung 3-18: Anteil der Early SP und Intermediate SP an der tetraploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer

Die Punkte stehen für die Mittelwerte aller Messungen. Der Fehlerbalken reicht eine Standardabweichung weit, ausgehend vom Mittelwert. Niedrige ATO-Konzentrationen (0,5 μM und 1,0 μM) bewirken mit zunehmender Inkubation und Behandlungsdauer einen Anstieg des SP-Anteils mit frühen Stammzellkriterien. Auch bei höheren ATO-Konzentrationen (2,0 μM und 5,0 μM) steigt dieser Anteil insgesamt an. Aufgrund einer relativ großen Streuung bei 5,0 μM und 24 h sowie bei den Messungen nach 48 h fällt es schwer, hierfür klare Aussagen zu machen.

Abkürzungen: ATO: Arsentrioxid, SP: Side population.

3.3.7 Differenzierung zwischen absoluter und relativer Anreicherung der SP unter ATO-Therapie bei KG-1a-Zellen

Den Kapiteln 3.3.3 - 3.3.5 ist zu entnehmen, dass der Anteil diploider und tetraploider KG-1a-Zellen mit Stammzeleigenschaften in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer stark ansteigt. Dieses Unterkapitel geht nun der Frage nach, ob es sich hierbei nicht in erster Linie um eine Verringerung der Hauptpopulationen handelt. Folglich könnte die SP dann zwar relativ, aber nicht absolut gesehen angereichert sein. Eine detaillierte Erläuterung dieser Problematik findet sich unter 4.4.2 auf S. 124.

Für eine Färbung benötigten wir 2×10^6 Zellen (siehe 2.2.4.5 Färbung der Zellen aus den Therapieansätzen (Protokoll), S. 69). Daher sind in Tabelle 3-1 die für diese Zellzahl benötigten Volumina der mit $5,0 \mu\text{M}$ ATO behandelten sowie der unbehandelten Zellen nach 24 h, 48 h sowie 72 h dargestellt. Außerdem berechneten wir den Volumenquotient, also das benötigte Volumen der mit $5,0 \mu\text{M}$ ATO behandelten Zellen pro verwendetem Volumen der unbehandelten Zellen. Dem gegenüber steht der SP-Anteils-Quotient, also der SP-Anteil der mit $5,0 \mu\text{M}$ ATO behandelten Zellen geteilt durch den SP-Anteil unbehandelter Zellen. Der SP-Anteils-Quotient gibt somit an, um welchen Faktor sich die SP unter ATO-Behandlung verändert. Sämtliche Messwerte sind exemplarisch dem ersten der drei ausgewerteten ATO-Behandlungsversuche entnommen.

Tabelle 3-1: Volumenquotient und SP-Quotient unter ATO-Behandlung

Mit SP ist jeweils der Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation gemeint. „ATO-behandelt“ bedeutet in dieser Tabelle „mit 5,0 μM ATO inkubiert“. Die Volumina wurden mit Hilfe der Zellzahl berechnet, so dass 2×10^6 Zellen entsprechend dem Färbeprotokoll enthalten sind.

Abkürzungen: ATO: Arsentrioxid, SP: Side population, ZZB: Zellzahlbestimmung.

	24 h	48 h	72 h
ZZB H ₂ O-Kontrolle (in $10^6/\text{ml}$)	0,6	0,6	0,9
ZZB ATO-behandelte Zellen (in $10^6/\text{ml}$)	0,7	0,6	0,6
Volumen H ₂ O-Kontrolle (in ml)	3,3	3,3	2,2
Volumen ATO-behandelte Zellen (in ml)	2,9	3,3	3,3
SP H ₂ O-Kontrolle (in %)	0,9	2,5	1,1
SP ATO-behandelte Zellen (in %)	6,2	16,8	28,7
Volumenquotient	0,9	1,0	1,5
SP-Anteils-Quotient	6,9	6,7	26,1

Beim Volumenquotient ist mit zunehmender Inkubationsdauer eine leicht zunehmende Tendenz erkennbar, nämlich von 0,9 auf 1,5. Das bedeutet, dass mit fortschreitender Behandlungszeit bei den mit 5,0 μM ATO behandelten Zellen etwas mehr Volumen benötigt wird als bei den unbehandelten Zellen. Der SP-Anteils-Quotient hingegen ist bereits nach 24 h auf 6,9 angestiegen. In der gefärbten Suspensionsprobe der mit 5,0 μM ATO behandelten Zellen befanden sich also bereits nach 24 h 6,9 Mal so viele SP-Zellen wie in der Kontrolle. Dieser Quotient ist nach 72 h bereits auf 26,1 angestiegen.

3.3.8 Vergleichende Betrachtung von ATO-behandelten diploiden/tetraploiden Zellpopulationen mit Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer

Bei einem initialen Behandlungsversuch mit 5,0 μM ATO fiel auf, dass die tetraploide SP im Verhältnis zur diploiden SP deutlich zunimmt. In Abbildung 3-19 wird dieses Verhältnis innerhalb der darauf folgenden drei Versuche

dargestellt. Hierzu bildeten wir den Quotient aus der jeweiligen Anzahl der gemessenen Events innerhalb dieser beiden SP-Populationen.

Nach 24 h weisen unbehandelte Zellen ein Verhältnis von 1,0 auf (SD: 0,1). Es gibt hier also etwa gleich viele diploide wie tetraploide SP-Zellen. Dieses Verhältnis steigt zugunsten der tetraploiden SP-Zellen mit zunehmender Konzentration. Mit 5,0 μM ATO behandelte Zellen weisen nach 24 h ein Verhältnis von 2,9 auf (SD: 1,3). Dieses Verhältnis steigt weiter an, bis nach 72 h 5,7 Mal so viele tetraploide wie diploide SP-Zellen gemessen werden (SD: 1,5).

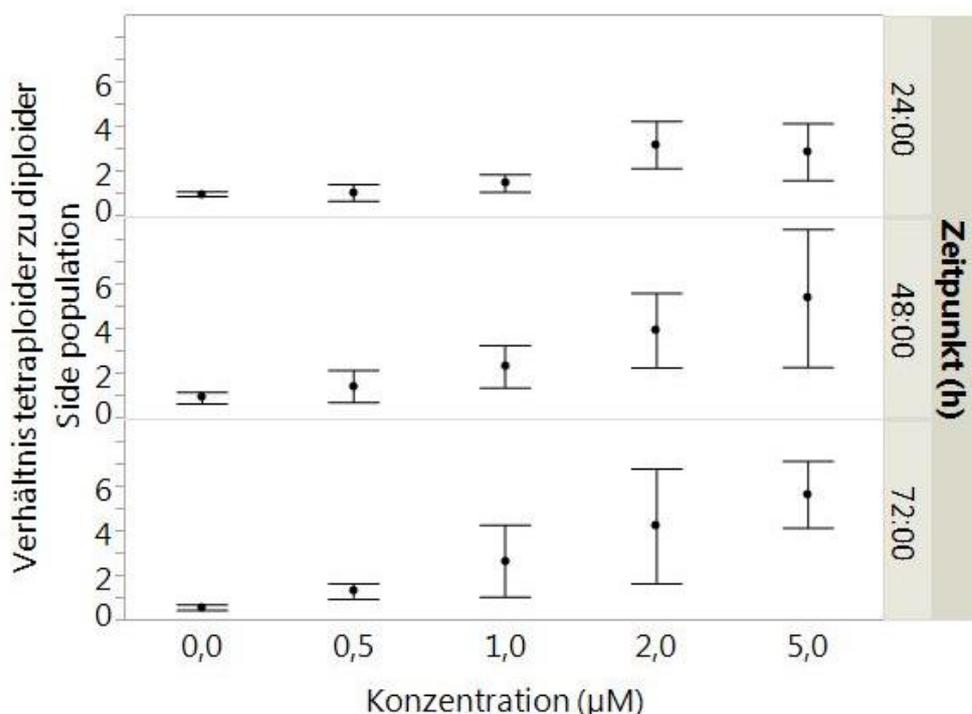


Abbildung 3-19: Verhältnis der tetraploiden SP zur diploiden SP in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer

Die Punkte stehen für die Mittelwerte aller Messungen. Der Fehlerbalken reicht eine Standardabweichung weit, ausgehend vom Mittelwert. Das Verhältnis tetraploider zu diploiden SP-Zellen ist in der unbehandelten Kultur ausgeglichen. Es steigt mit zunehmender Konzentration sowie Behandlungsdauer auf bis zu 5,7 an (5,0 μM ATO, 72 h Inkubation).

Abkürzungen: ATO: Arsentrioxid, SP: Side population.

3.4 Analyse des Effektes von TDZD-8 auf die Zellpopulation mit Stammzellkriterien bei KG-1a-Zellen

Entsprechend den Behandlungsversuchen mit ATO wurden KG-1a-Zellen auch mit TDZD-8 inkubiert. Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung des Behandlungsansatzes mit TDZD-8 findet sich im Kapitel 2.2.3.2 auf S.63. Die Spannungseinstellungen am Durchflusszytometer lassen Rückschlüsse sowohl auf die diploide als auch auf die tetraploide Zellpopulation im Rahmen der Behandlung zu (siehe auch Kapitel 3.1, S. 78).

Da es sich um exemplarische Einzelmessungen handelt, wird in diesem Kapitel auf die Angabe von Mittelwert und Standardabweichung verzichtet.

3.4.1 Differenzielle Effekte von TDZD-8 auf den Anteil der diploiden Zellpopulation mit Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer

Nach 18 h weisen unbehandelte KG-1a-Zellen einen SP-Anteil von 2,0 % auf (siehe Abbildung 3-20). Wesentliche Abweichungen von diesem Wert gibt es einzig bei mit 0,5 μM und 1,0 μM TDZD-8 behandelten Zellen. Hier liegt der Anteil bei 4,5 % bzw. 4,4 %.

Nach 42 h zeigt sich ein homogenes Bild bei sämtlichen Konzentrationen. Eine konzentrationsabhängige Zunahme oder Abnahme der SP ist nicht erkennbar. Die Werte reichen von 1,4 % (1,0 μM , 5,0 μM) bis 3,0 % (unbehandelte Zellen).

Auch nach 63 h ist kein konzentrationsabhängiger Effekt von TDZD-8 auf KG-1a-Zellen erkennbar. Bei mittleren Konzentrationen (0,5 μM , 1,0 μM) ist der SP-Anteil etwas höher als bei niedrigen und hohen Konzentrationen (2,5 % bei 0,5 μM , 3,6 % bei 1,0 μM).

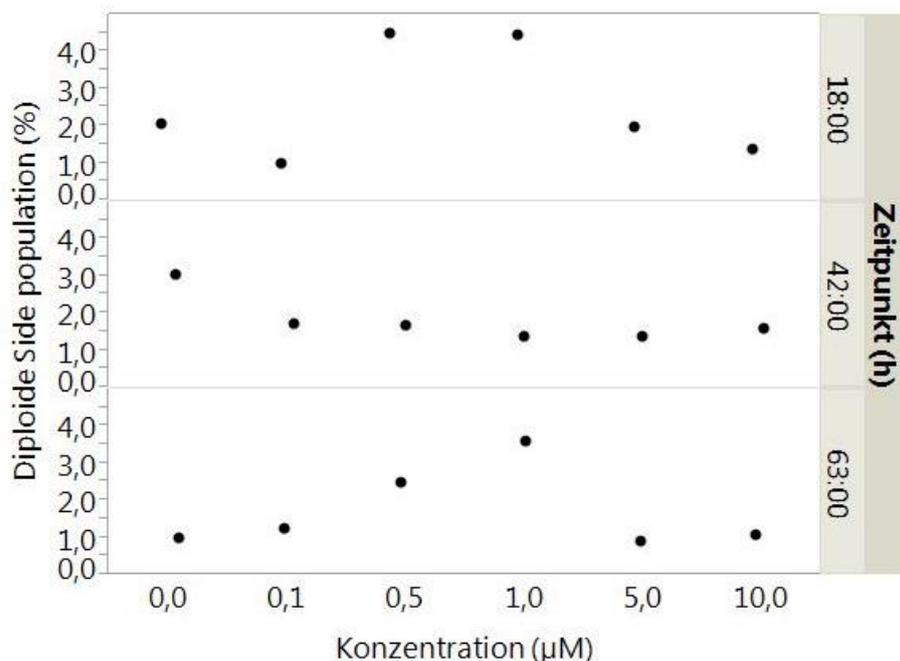


Abbildung 3-20: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von TDZD-8-Konzentration und -Behandlungsdauer

Der SP-Anteil bei niedrigen und hohen TDZD-8-Konzentrationen reicht von 0,9 % bis 3,0 % (0,0 µM, 0,1 µM, 5,0 µM, 10,0 µM). Lediglich bei mittleren Konzentrationen (0,5 µM, 1,0 µM) reicht der Anteil nach 18 h bis 4,5 %. Insgesamt ist keine konzentrationsabhängige Zu- oder Abnahme der SP erkennbar.

Abkürzungen: SP: Side population.

3.4.2 Differenzielle Effekte von TDZD-8 auf den Anteil der tetraploiden Zellpopulation mit Stammzellkriterien in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer

Nach 18 h liegt der Anteil unbehandelter tetraploider SP-Zellen an der tetraploiden Hauptpopulation bei 4,4 % (siehe Abbildung 3-21). Ähnlich verhält es sich bei mit 0,1 µM TDZD-8 behandelten Zellen: Hier liegt der Anteil bei 3,7 %. Höhere TDZD-8-Konzentrationen weisen etwas höhere SP-Anteile auf, beispielsweise 11,1 % bei mit 10,0 µM TDZD-8 behandelten Zellen. Nach 42 h liegen sämtliche SP-Anteile zwischen 5,1 % und 7,9 %. Eine konzentrationsabhängige Zu- oder Abnahme der tetraploiden SP ist auch nach 63 h nicht eindeutig erkennbar – hier liegen die SP-Anteile zwischen 4,7 % (5,0 µM TDZD-8) und 9,9 % (1,0 µM).

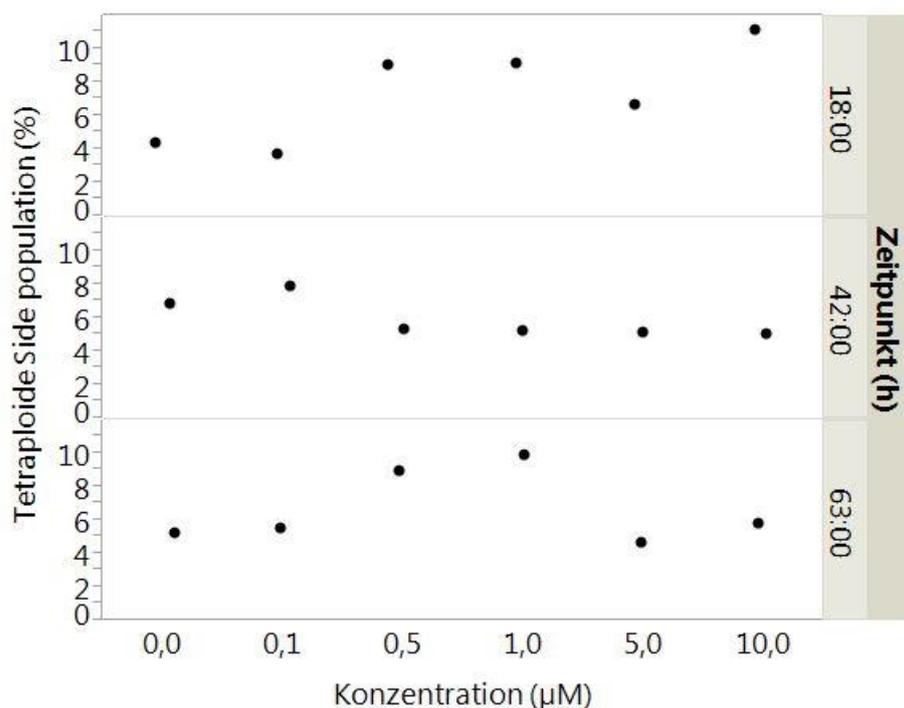


Abbildung 3-21: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von TDZD-8-Konzentration und -Behandlungsdauer

Der SP-Anteil nach 18 h liegt zwischen 3,7 % (0,1 µM) und 11,1 % (10,0 µM). Nach 42 h liegen sämtliche SP-Anteile zwischen 5,1 % und 7,9 %. Eine konzentrationsabhängige Zu- oder Abnahme der tetraploiden SP ist auch nach 63 h nicht eindeutig erkennbar.

Abkürzungen: SP: Side population.

3.5 Charakterisierung unbehandelter KG-1a-Zellen bezüglich Apoptoseverhalten und Stammzellmarker

Wir führten eine Annexin-Färbung durch und untersuchten, ob diese Färbung die Auswertung unserer Messungen vereinfachen würde oder eine Alternative bei der Eingrenzung vitaler Zellen darstellen könnte.

Exemplarisch verglichen wir außerdem diploide SP-Zellen mit der diploiden Hauptpopulation bei KG-1a-Zellen in Bezug auf folgende Eigenschaften:

- 1) Expression von CD34 und CD38
- 2) Expression von CD243 und CD338.

3.5.1 Methodischer Eingrenzungsversuch apoptotischer und toter Zellen

Wir färbten unbehandelte KG-1a-Zellen mit Annexin V und untersuchten, ob dies die Auswertung der Messungen verbessert. Falls aufgrund der Färbung sämtliche apoptotische Zellen intensiv fluoreszieren, könnte man den Auswertungsschritt des Live-cells-Gates (siehe 3.1.2 Eingrenzung vitaler Zellen, S.80) vereinfachen. In Abbildung 3-22 ist die Fluoreszenzstärke unbehandelter Zellen bezüglich Annexin auf der Abszisse und bezüglich PI auf der Ordinate dargestellt. Es präsentieren sich zwei größere Populationen: Eine Annexin negative und PI negative sowie eine Annexin positive und PI positive. Letztere repräsentiert die apoptotischen und toten Zellen. Da wir die nicht-apoptotischen, vitalen Zellen analysieren wollen, liegt das Gate eng um die erste Population.

Ebendiese Population stellten wir anschließend im Hoechst-blue-Hoechst-red-Plot dar (siehe Abbildung 3-23). Deutlich erkennbar sind nach wie vor Events außerhalb des Live-cells-Gates, die höchstwahrscheinlich apoptotisch oder tot sind. Links unten im Plot erkennt man Events, die für Zelltrümmer ohne DNA stehen. Oben rechts könnte es sich um Zellen mit vielfachem Chromosomensatz handeln.

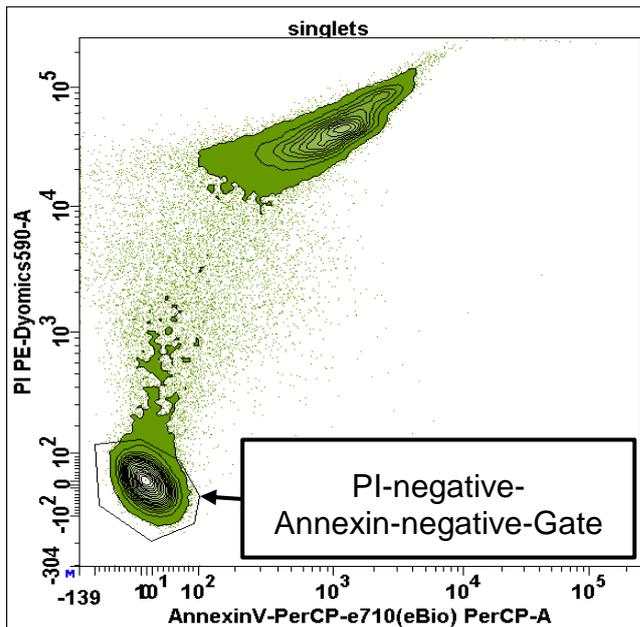


Abbildung 3-22: Annexin- und PI-Färbung von KG-1a-Zellen

Zur Diskriminierung bereits toter Zellen wurde eine PI-Färbung durchgeführt. Annexin soll frühapoptotische Zellen markieren. Intakte Zellen sind als PI negativ und Annexin negativ durch das Gate markiert.

Abkürzungen: A: Area, PI: Propidiumiodid.

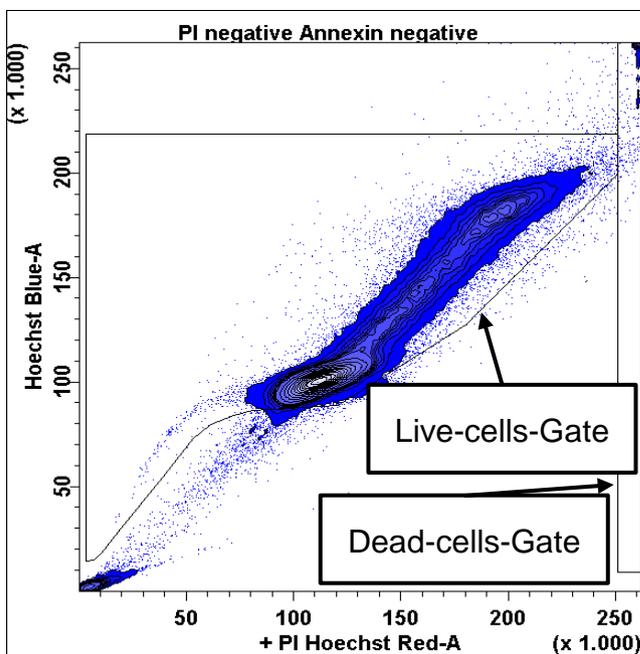


Abbildung 3-23: PI-negative, Annexin-negative Zellen im Hoechst-blue-Hoechst-red-Plot

Trotz des vorausgegangenen Gatings mit PI und Annexin sind nach wie vor Zellen jenseits des Live-cells-Gates vorhanden.

Abkürzungen: A: Area, PI: Propidiumiodid.

3.5.2 Vergleichende Betrachtung der diploiden SP mit der Hauptpopulation in Bezug auf Stammzellmarker

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, erwies sich bei Versuchen von Goodell et al. die Mehrzahl der SP-Zellen als CD34- (Goodell, Rosenzweig et al. 1997). Ziel unserer Analyse war es zu überprüfen, ob diese Tendenz sich auch bei KG-1a-Zellen beobachten lässt. Um zusätzliche Aussagen bezüglich der CD38-Expression der SP-Zellen treffen zu können, färbten wir unbehandelte KG-1a Zellen neben CD34-APC-Cy7 auch mit CD38-PE-Cy7.

Außerdem färbten wir die oben beschriebenen Kanalproteine mit den fluoreszierenden Antikörpern CD243-APC und CD338-PE.

Bei allen vier Antikörper-Färbungen war das Ziel, mögliche Unterschiede zwischen der diploiden SP und der entsprechenden Hauptpopulation von KG-1a-Zellen zu evaluieren.

In Abbildung 3-24 und Abbildung 3-25 sind die diploide SP bzw. Hauptpopulation von KG-1a-Zellen im CD38-CD34-Fenster dargestellt. Vergleicht man die Mediane der Fluoreszenzintensität im Kanal, der die Fluoreszenz des CD34-Antikörpers misst, so fällt auf, dass die SP insgesamt deutlich schwächer fluoresziert: Der Median liegt hier bei 4461, während der Median der Hauptpopulation bei 9696 liegt. Bei der CD38-Expression verhält es sich ähnlich: SP-Zellen weisen hier einen Median von 77 auf – die Hauptpopulation exprimiert mit einem Median von 245 deutlich stärker CD38-Moleküle.

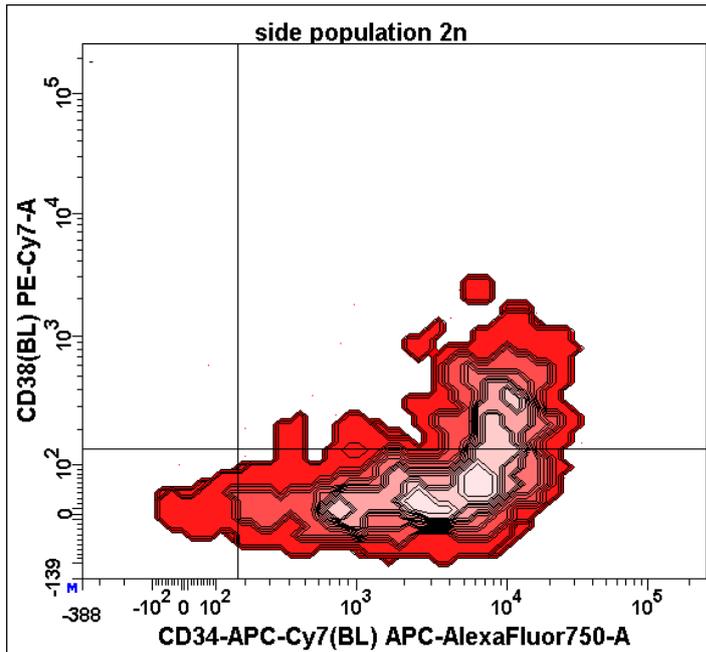


Abbildung 3-24: Diploide SP im CD38-CD34-Fenster

Die Mehrzahl der SP-Zellen ist CD34+/CD38-. Einige Zellen sind CD34+/CD38+, ein weiterer, kleinerer Anteil ist CD34-/CD38-.

Abkürzungen: CD: Cluster of differentiation, SP: Side population.

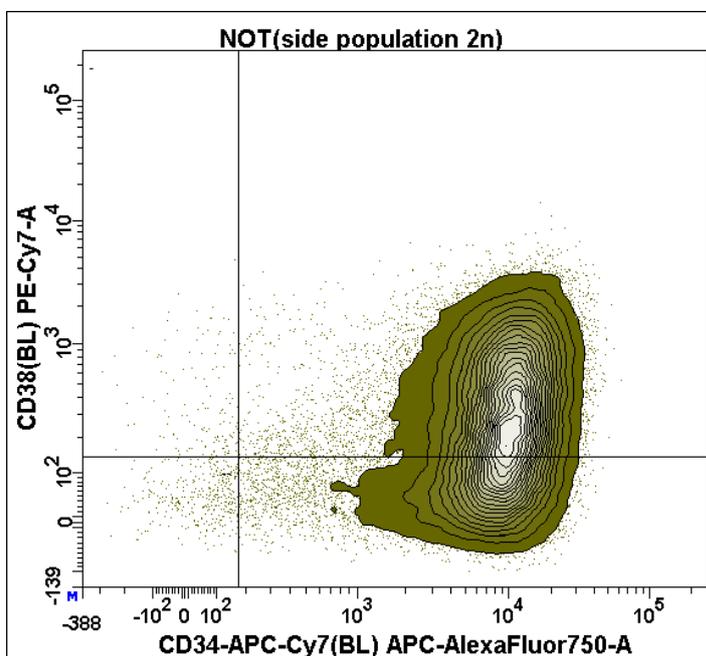


Abbildung 3-25: Diploide Hauptpopulation im CD38-CD34-Fenster

„NOT(sidepopulation 2n)“ entspricht allen zuvor gegateten diploiden Zellen außer der SP. Der Großteil der Zellen ist CD34+/CD38+. Die Konturlinien gehen fließend in den CD34+/CD38- Bereich über, der ebenfalls viele Zellen beinhaltet.

Abkürzungen: CD: Cluster of differentiation, SP: Side population.

In Abbildung 3-26 und Abbildung 3-27 sind die diploide SP bzw. Hauptpopulation von KG-1a-Zellen im CD338-CD243-Fenster dargestellt. Beinahe sämtliche Zellen sind CD338-. Vergleicht man die Mediane der Fluoreszenzintensitäten für CD243, fällt nur ein geringer Unterschied auf: Der Median der SP liegt bei 679, der Median der Hauptpopulation bei 868.

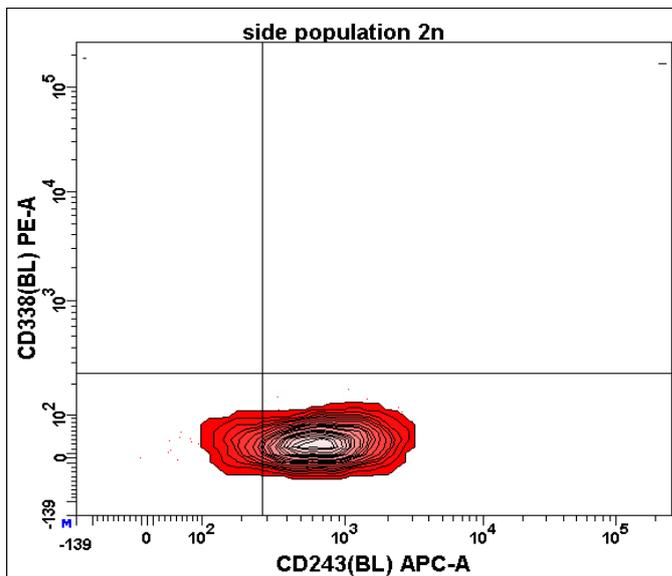


Abbildung 3-26: Diploide SP im CD338-CD243-Fenster

Sämtliche SP-Zellen sind CD338-. Die Mehrzahl ist außerdem CD243+.

Abkürzungen: CD: Cluster of differentiation, SP: Side population.

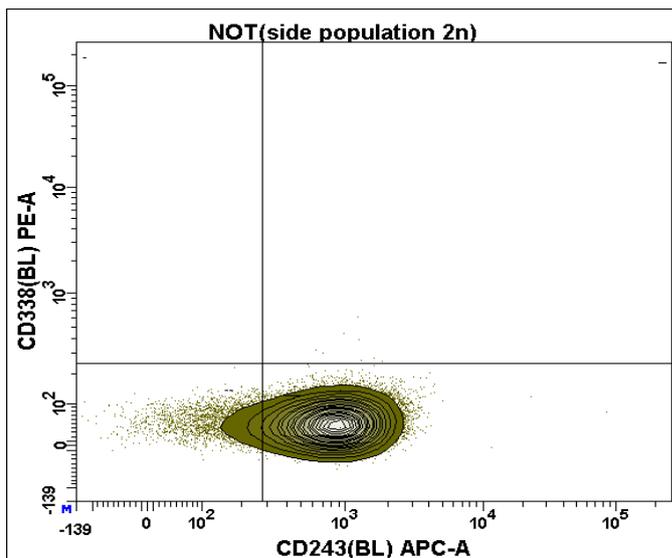


Abbildung 3-27: Diploide Hauptpopulation im CD338-CD243-Fenster

Nahezu alle KG-1a-Zellen sind CD338-. Der Großteil stellt sich außerdem CD243+ dar.

Abkürzungen: CD: Cluster of differentiation.

3.6 Zusammenfassende Gesamtbetrachtung der Ergebnisse

Mithilfe der in Kapitel 3.1 vorgestellten Auswertungsstrategie gelang es uns, zehn definierte Zelllinien auf ihre diploide SP als differenzielles Stammzellkriterium hin zu untersuchen.

Die relativ geringe Streuung bei den Messungen der gesamten SP, die Herkunft (akute Leukämie) und ein regelmäßig nachweisbarer Anteil besonders früher Vorläuferzellen veranlassten uns, die Zelllinie KG-1a für unsere Behandlungsversuche zu verwenden.

Es lassen sich nun einige Effekte von ATO auf KG-1a-Zellen zusammenfassen: Zum einen steigt der Anteil toter Zellen mit zunehmender ATO-Konzentration und -Inkubationsdauer deutlich an. Ebenso steigt der Anteil diploider Zellen mit Stammzeleigenschaften in Abhängigkeit dieser beiden Parameter. Bei höheren ATO-Konzentrationen (2,0 μM und 5,0 μM) ist dieser Zusammenhang auch für diploide Zellen mit frühen Stammzeleigenschaften (Early SP und Intermediate SP zusammengefasst) deutlich erkennbar.

Auch bei tetraploiden KG-1a-Zellen steigt der SP-Anteil mit zunehmender Konzentration und Behandlungsdauer an. Bei tetraploiden Zellen mit frühen Stammzeleigenschaften zeigt sich dieser Zusammenhang ebenfalls, hier bereits bei niedrigen ATO-Konzentrationen.

Eine exemplarische Bestimmung der für die Färbungen benötigten Volumina der mit 5,0 μM ATO behandelten sowie der unbehandelten Zellen nach 24 h, 48 h sowie 72 h ließ einen Vergleich mit dem SP-Anstieg unter ATO-Therapie zu. Auf diese Weise konnten wir zeigen, dass es sich bei der SP-Anreicherung um eine absolute und nicht nur relative handelt.

Das Verhältnis tetraploider zu diploider SP-Zellen ist bei unbehandelten Zellen ausgeglichen. Mit zunehmender ATO-Konzentration sowie Behandlungsdauer steigt dieses Verhältnis zugunsten der tetraploiden SP-Zellen deutlich an.

Unter TDZD-8-Therapie finden sich keine eindeutigen Effekte auf die SP: Eine konzentrationsabhängige Zu- oder Abnahme ist auch nach 63 h nicht eindeutig erkennbar, weder bei diploiden noch bei tetraploiden SP-Zellen.

Bei der Färbung von KG-1a-Zellen mit Stammzellmarkern fällt eine schwächere CD34- sowie schwächere CD38-Expression von diploiden SP-Zellen gegenüber der Hauptpopulation auf. Bei der Färbung der Kanalproteine CD243 und CD338 fallen die Unterschiede deutlich geringer aus – während beinahe sämtliche Zellen CD338- sind, fluoresziert die Hauptpopulation bei der CD243-Färbung insgesamt etwas stärker.

4 Diskussion

Dieses Kapitel beginnt mit einer kurzen Einführung in die Thematik leukämischer Vorläuferzellen und der damit verbundenen therapeutischen Indikationen vor dem Hintergrund aktueller Erkenntnisse über Stammzellen. Zusätzlich wird auf die Fragestellung dieser Arbeit sowie die methodische Herangehensweise eingegangen. Im zweiten Teil wird die Analyse differenzieller Stammzellkriterien mit Hilfe der Durchflusszytometrie diskutiert. Anschließend wird deren praktische Anwendung bei zehn von uns verwendeten leukämischen Zelllinien beleuchtet. Der zentrale vierte Teil des Kapitels geht auf die von uns evaluierten Effekte von ATO sowohl hinsichtlich der Hauptpopulation als auch der Side population (SP) von KG-1a-Zellen ein. Ebenso wird der derzeitige klinische Einsatz von ATO besprochen. Bei dem TDZD-8-Behandlungsversuch (siehe 3.4, S. 105) sowie bei den Versuchen zu Apoptoseverhalten und Stammzellmarkerexpression bei KG-1a-Zellen (siehe 3.5, S.107) handelt es sich um exemplarische Einzelmessungen. Sie werden unter 4.5 und 4.6 diskutiert. Ein Ausblick auf die Therapie akuter Leukämien schließt das Kapitel ab (siehe 4.7, S.131).

4.1 Einführung

Trotz zunehmender Erkenntnisse über die Entstehung und Aufrechterhaltung der akuten Leukämie während der letzten Jahrzehnte bleibt sie nicht zuletzt aufgrund ihrer Heterogenität und Komplexität ein oft letales Krankheitsbild. Insbesondere die hohen Rezidivraten der AML stellen eine große Herausforderung im therapeutischen Kontext dar. Seit einigen Jahren liegt ein Forschungsschwerpunkt auf der Charakterisierung früher leukämischer Vorläuferzellen, die als Ursache sowohl der eigentlichen Krankheit als auch deren Rezidive angesehen werden. Wie auch physiologische Stammzellen haben diese Vorläuferzellen Eigenschaften inne, die ihnen – im Vergleich zu den leukämischen Blasten – eine größere Resistenz verleihen. Eine dieser Eigenschaften ist die Quieszenz – ein Ruhezustand, in dem sich sowohl hämatopoetische Stammzellen (Hematopoietic stem cell, HSC), als auch

Leukämie-initiierende Zellen (Leukemia-initiating cell, LIC) meist befinden. Dieser Zustand kann nachweislich überwunden werden, beispielsweise durch den Entzug von Wachstumsfaktoren (Guan, Gerhard et al. 2003). Wie in der Einleitung beschrieben, existieren neben der Quieszenz noch weitere Eigenschaften, die die LIC von anderen Zellen unterscheiden (siehe 1.3.7 Therapeutische Konsequenzen, S.34).

Vor diesem Hintergrund ist man derzeit auf der Suche nach Medikamenten, die oben beschriebene Eigenschaften der LIC nutzen, um sie möglichst spezifisch angreifen zu können. Zwei diesbezüglich vielversprechende Medikamente wurden im Rahmen dieser Arbeit an leukämischen Zellen in vitro getestet.

Ziel war es, im ersten Schritt zehn definierte leukämische Zelllinien durchflusszytometrisch in Bezug auf Stammzellkriterien (SP-Anteil) zu charakterisieren und diese zu analysieren. Grundlage hierfür war eine von uns optimierte Charakterisierungsmethodik zur Eingrenzung leukämischer Zellen in Bezug auf Stammzellkriterien nach Hoechst-Inkubation. Die Ermittlung der SP mit Hilfe des Hoechst-Farbstoffs ist gut geeignet zur Identifizierung besonders früher Vorläuferzellen, bringt aber auch Herausforderungen mit sich, die im zweiten Teil des Kapitels diskutiert werden (siehe 4.2.2 SP-Eingrenzung und -Differenzierung, S. 118).

Diejenige Zelllinie, die uns aufgrund eines reproduzierbar hohen SP-Anteils bei relativ geringer Streuung am geeignetsten erschien, verwendeten wir im zweiten Schritt für Behandlungsversuche: Hierbei wurden differenzielle, also quantitativ einteilbare Effekte potenzieller Leukämie-Therapeutika (ATO sowie TDZD-8) auf den Stammzellanteil einer definierten Zelllinie (KG-1a) analysiert. Nachdem ATO zwischenzeitlich aufgrund potenzieller Nebenwirkungen infrage gestellt wurde, erlebt das über 4000 Jahre alte Medikament eine Renaissance – unter anderem bei der Therapie hämatologischer Erkrankungen. Aufgrund der beschriebenen Effekte auf maligne Zellen im Allgemeinen und LIC im Besonderen inkubierten wir KG-1a-Zellen mit ATO bei unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationsdauern (siehe 1.4.3 Wirkungsweise von ATO, S.38). Es wurde zwischen Effekten auf diploide (einfacher Chromosomensatz)

und tetraploide (doppelter Chromosomensatz) Zellen unterschieden. Darüber hinaus untersuchten wir den Effekt von ATO auf das Verhältnis der beiden Populationen zueinander. Exemplarisch betrachteten wir zusätzlich Effekte von TDZD-8 auf KG-1a-Zellen. Außerdem untersuchten wir Unterschiede zwischen der diploiden SP und der Hauptpopulation von KG-1a-Zellen in Bezug auf Oberflächenmarker, die vorrangig bei Vorläuferzellen beobachtet werden.

4.2 Kritische Beurteilung der durchflusszytometrischen Analyse differenzieller Stammzellkriterien

Mithilfe der Hoechst-Färbung ist es nachweislich möglich, frühe Vorläuferzellen aus der Gesamtheit leukämischer Zellen herauszufiltern. Diese SP-Zellen haben das Potenzial, in tödlich bestrahlten Mäusen ein hämatopoetisches System zu regenerieren (Goodell, Brose et al. 1996). Dennoch ist die durchflusszytometrische Bestimmung der SP mit Herausforderungen verbunden, ebenso ihre Eingrenzung und Differenzierung. Im Folgenden werden diese Aspekte kritisch beleuchtet und unsere Vorschläge zum Umgang mit ihnen vorgestellt.

4.2.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der SP

Eine detaillierte Beschreibung der Hoechstoffärbung findet sich in Kapitel 0 auf S. 64. Die exakte Einhaltung des Färbeprotokolls sowie möglichst kurze Bearbeitungszeiten der Zellen wie zum Beispiel beim Waschen sind unerlässlich. Die Hoechst-Konzentration sowie die Inkubationsdauer haben hierbei einen relevanten Einfluss auf die Größe der SP (Ibrahim, Diercks et al. 2007). Da der Übergang zwischen Hauptpopulation und SP fließend ist, steigt die SP bei niedrigeren Hoechst-Konzentrationen an. Hinzu kommt, dass teils unterschiedliche Färbeprotokolle verwendet werden, was den Vergleich der gemessenen SP-Werte erschwert (Greve, Kelsch et al. 2012).

Ein weiterer Aspekt bei der Auswertung durchflusszytometrisch akquirierter Daten ist das subjektive Moment beim Gating der einzelnen Populationen. Dies kann zu differierenden Ergebnissen bei unterschiedlichen Personen im

Auswertungsprozess führen. Im folgenden Unterkapitel wird auf diese Problematik in Bezug auf die Eingrenzung der SP genauer eingegangen.

4.2.2 SP-Eingrenzung und -Differenzierung

In Abbildung 4-1 ist der fließende Übergang der Hauptpopulation vitaler Zellen zur SP dargestellt. Die Frage ist nun, wie man das SP-Gate am besten legt: Einerseits sollte man keine Zellen der Hauptpopulation der SP zuordnen. Andererseits sollte man die SP durch die Auswertung auch nicht kleiner darstellen, als sie tatsächlich ist.

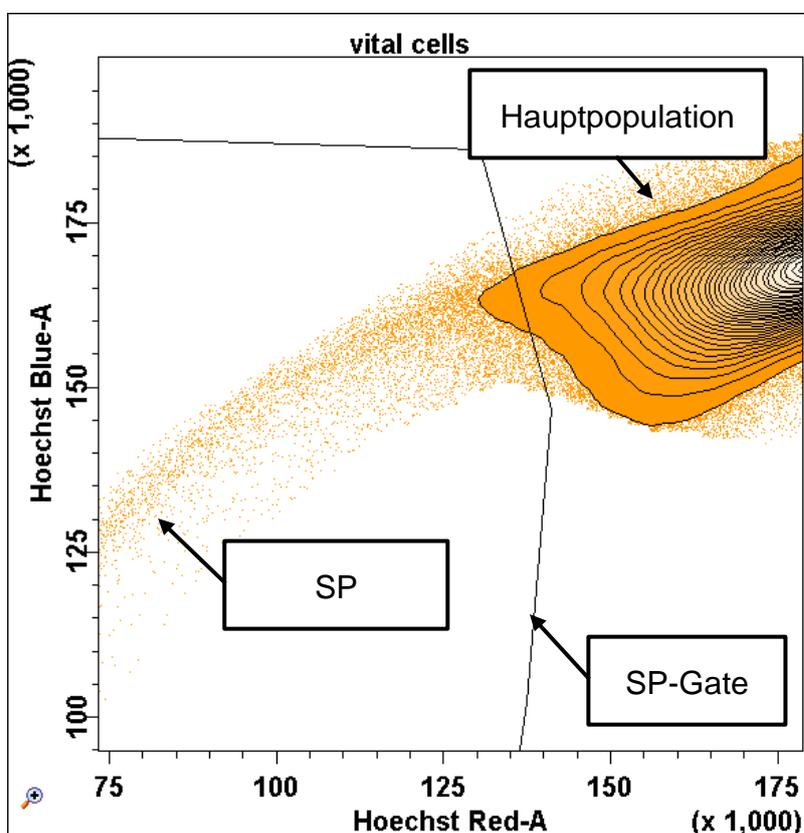


Abbildung 4-1: Schwierigkeit der SP-Eingrenzung

Die SP geht unmittelbar aus der Hauptpopulation der Vital cells hervor. Dadurch entsteht das Problem, wie man am besten das SP-Gate legt. Setzt man es zu weit rechts, werden Zellen der Hauptpopulation der SP zugeordnet. Setzt man es zu weit links, macht man die SP in der Auswertung kleiner, als sie eigentlich ist.

Abkürzungen: SP: Side population.

Bei der Auswertung unserer Behandlungsdaten wurden daher sämtliche Messungen von der gleichen Person ausgewertet, um interpersonell bedingte Schwankungen der SP zu vermeiden.

Notwendig ist ebenso ein einheitliches Vorgehen bei der Auswertung mit Hilfe der Software, in unserem Fall FACS Diva. Hier kann man sich die registrierten Events zum einen als Density oder Contour Plot, zum anderen unterschiedlich sensitiv anzeigen lassen. Insbesondere bei zahlreichen Auswertungsschritten empfiehlt es sich, nur ein Auswertungsblatt für alle Messungen zu verwenden, so dass die oben erwähnten Einstellungen beibehalten werden und das Gating hierdurch vereinfacht wird.

Weiter begegneten wir diesem Gating-Problem durch die Untergliederung der SP in die Subpopulationen Early SP, Intermediate SP sowie Late SP. Die Early SP und Intermediate SP liegen hierbei am nächsten zum Achsenursprung (siehe 3.1.4 Differenzierung der SP, S. 85). Die Zusammenfassung dieser beiden Subpopulationen zur „Zellpopulation mit frühen Stammzellkriterien“ ermöglicht es, quantitativ mehr Zellen erfassen zu können. Diese Zellen haben nun keinen fließenden Übergang mehr zur Hauptpopulation: Die Differenz zwischen dem Medianwert innerhalb der Hauptpopulation und der definierten minimalen Fluoreszenzintensität (10000 bzw. 8000 bei den Behandlungsversuchen) wird gedrittelt. Auf diese Weise sind die Grenzen zwischen den Subpopulationen klar definiert.

4.3 Differenzielle Stammzellkriterien in definierten Zelllinien

Im folgenden Unterkapitel wird zuerst die Methode der leukämischen Zellkultur kritisch beleuchtet. Anschließend werden die Ergebnisse der Untersuchung auf SP-Anteile bei definierten Zelllinien diskutiert. Um verlässliche Aussagen über Substanzeffekte auf die SP in vitro machen zu können, ermittelten wir primär eine Zelllinie, bei der reproduzierbar hohe SP-Anteile nachweisbar waren (siehe Kapitel 4.3.2). Zudem war es von Bedeutung, dass die Streuung der Ergebnisse nicht zu hoch war, da sonst Effekte der Substanzen schwerer nachweisbar gewesen wären.

4.3.1 Vorteile und Begrenzungen der leukämischen Zellkultur

Grundsätzlich haben In-vitro-Modelle einige Vorzüge, die sie für bestimmte Fragestellungen prädestinieren. So herrschen insgesamt konstantere Versuchsbedingungen als in vivo. Dies kann unter anderem zu einer höheren Reproduzierbarkeit von Experimenten führen. Ein großer Vorteil von Zelllinien ist die Möglichkeit, sehr große Mengen durch Einfrieren zu konservieren. So ist davon auszugehen, dass Zelllinien bei -196°C in flüssigem Stickstoff nahezu beliebig lange aufbewahrt werden können, ohne dass dabei relevante biologische Veränderungen eintreten würden (Drexler 2004).

Da etablierte Zelllinien gut charakterisiert sind, fällt der Vergleich zwischen verschiedenen Studien, die sich der gleichen Zelllinie bedienen, leicht (Bruserud, Gjertsen et al. 2001). Meist ist aufgrund der leichten Handhabung die Möglichkeit gegeben, viele Versuche in überschaubarer Zeit durchzuführen. Darüberhinaus müssen bei In-vitro-Versuchen keine Tiere geopfert werden. Hierbei ist jedoch kritisch anzumerken, dass die meisten Zellkulturen derzeit mit FCS ergänzt werden. Das FCS wird jungen Kälberföten noch im Mutterleib durch Punktion ins Herz entnommen, weshalb die serumhaltige Zellkultur durchaus umstritten ist. Neben der ethischen Fragwürdigkeit stellt das FCS aber auch einen Verunreinigungsfaktor dar, da aufgrund der Methodik der Hersteller nicht sicher sagen kann, dass das FCS frei von unerwünschten Mikroorganismen oder Kontaminationen mit Endotoxinen oder Viren ist. Derzeit gibt es bereits Bemühungen, die serumfreie Zellkultur als Alternative zur Kultur mit FCS zu etablieren (siehe hierzu www.sefrec.com).

Eine weitere Einschränkung von Zelllinien ist die Möglichkeit der Entstehung chromosomaler Abnormalitäten (Bruserud, Gjertsen et al. 2001). Die von uns behandelte Zelllinie KG-1a wies beispielsweise im Labor von Pelliccia et al. einen anderen Karyotyp auf als ihre Ursprungszelllinie KG-1. Ursprünglich waren die Karyotypen der beiden Zelllinien identisch (Pelliccia, Ubertini et al. 2012).

Sobald Zellen ihre ursprüngliche Umgebung entzogen wird, können auch phänotypische Veränderungen die Folge sein. Das Wachstum von

physiologischen wie auch malignen hämatopoetischen Zellen ist bedingt durch ein komplexes Wechselspiel zwischen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, so dass die Imitation dieses Milieus innerhalb der Zellkultur beschränkt bleibt. Daher müssen Ergebnisse aus In-vitro-Studien mit entsprechender Vorsicht interpretiert und möglichst in ihrer ursprünglichen Umgebung bestätigt werden (Drexler 2004).

Insbesondere für unser Projekt, im Rahmen dessen einige vielversprechende Substanzen an leukämischen Zellen getestet werden sollen, bieten sich Zellkultur-Versuche für initiale serielle Messungen an. Da Tiermodelle meist zuverlässigere Aussagen über potenzielle Prozesse im Menschen zulassen, reichen In-vitro-Modelle zur Erforschung von Medikamenten-Effekten langfristig nicht aus. Das Tiermodell eignet sich für aufbauende In-vivo-Versuche mit denjenigen Substanzen, die in vitro vielversprechende Ergebnisse mit sich brachten.

4.3.2 Die SP innerhalb definierter Zelllinien

Die SP als Population mit frühen Vorläuferzellen wurde bereits in einer Vielzahl an definierten Zelllinien untersucht. Aufgrund ihrer Potenz, ein hämatopoetisches System in vivo aufzubauen, eignet sie sich als therapeutisches Ziel bei Behandlungsversuchen mit möglichen stammzelltoxischen Medikamenten. Maligne hämatopoetische Zelllinien, die bereits in der Literatur auf eine SP hin untersucht wurden, sind unter anderem NB4, HL-60 (Jeong, Cui et al. 2011), THP-1 (Wang, Yin et al. 2013) sowie MOLT-4 und CEM-S (Chiarini, Grimaldi et al. 2010).

Die SP der von uns behandelten Zelllinie KG-1a wurde ebenfalls im Rahmen einer Expressionsanalyse des Transkriptionsfaktors SALL-4 untersucht (Jeong, Cui et al. 2011). Wir beobachteten bei unseren Messungen einen mittleren SP-Anteil von 1,2 % an den vitalen Zellen. Dieses Ergebnis deckt sich gut mit dem von Jeong et al. beschriebenen 1,3-prozentigen SP-Anteil. Hierbei wurden PI-positive Zellen durch Gating im Forward Scatter und Side Scatter herausgefiltert.

Auch bei K562-Zellen wurde die SP bereits untersucht. Wir ermittelten einen mittleren SP-Anteil von 3,8 %. Der frühe Stammzellanteil, bei dem die Early SP und Intermediate SP zusammengefasst werden, beträgt 0,91 %. Boesch et al. geben einen Anteil von 1,27 % an (Boesch, Reimer et al. 2012). Aufgrund eines sehr restriktiven SP-Gatings entspricht dieser Anteil am ehesten unserem frühen Stammzellanteil.

In den oben zitierten Veröffentlichungen finden sich keinerlei Angaben zur Streuung bei Messungen der SP. Unsere Ergebnisse zeigen eine deutlich moderatere Streuung bei KG-1a-Zellen (SD: 0,3 %) als bei K562-Zellen (SD: 2,0 %), weshalb uns erstere grundsätzlich günstiger hinsichtlich der Behandlungsversuche erschienen.

Huang et al. stellten bei Jurkat-Zellen einen SP-Anteil von 0,43 % fest. Die Standardabweichung betrug 0,14 % (Huang, Wu et al. 2013). Diese Ergebnisse sind höher als die bei unseren Messungen, bei denen der SP-Anteil bei der Zelllinie Jurkat unter 0,1 % lag. Denkbar wären hierbei quantitative Veränderungen der SP aufgrund zahlreicher Passagen.

Nach eingehender Literaturrecherche (Stand: 23. August 2014) mit Hilfe der Meta-Datenbank Pubmed fand sich keine in der Literatur beschriebene Auseinandersetzung mit dem SP-Anteil in den Zelllinien EOL-1, Kasumi-1, MHH, MV4-11, NALM-16, REH und SEM. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass das Phänomen der SP nicht auf einzelne Zelllinien beschränkt ist, sondern in sehr vielen Zelllinien – wenn auch in geringer Ausprägung – nachweisbar ist. Eine SP in einer Zellpopulation zu detektieren, ist bei akuten Leukämien folglich eher die Regel als die Ausnahme. Dieser Schluss steht im Einklang unter anderem mit den Untersuchungen von Wolf et al., die bei 80 % ihrer 61 AML-Patienten eine SP nachwiesen (Wulf, Wang et al. 2001). Auch wurden SP in anderen Tumorentitäten nachgewiesen, unter anderem beim Neuroblastom, kleinzelligen Bronchialkarzinom, Mamma-Adenokarzinom und Ewing-Sarkom (Hirschmann-Jax, Foster et al. 2004). Einige Ergebnisse über die SP in Zelllinien sind in der Literatur uneinheitlich: Während Hirschmann-Jax et al. keine SP unter anderem in der Osteosarkom-Zelllinie SaOs-2 fanden, wiesen Murase et

al. einen 0,05-prozentigen SP-Anteil in eben dieser Zelllinie nach (Murase, Kano et al. 2009). Neben der statistischen Streuung und eventuellen methodischen Unterschieden muss hier auch an die potenziellen Veränderungen innerhalb einer Zelllinie nach langfristiger Kultivierung gedacht werden.

4.4 Effekte von ATO auf die Zellpopulation mit Stammzellkriterien bei KG-1a-Zellen

4.4.1 Zytotoxizität von ATO

KG-1a-Zellen, die über 72 h mit 5 μM ATO behandelt wurden, haben einen Anteil toter Zellen von 30,2 %. Es besteht ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer einerseits und dem Anteil toter Zellen andererseits.

Girgis et al. zeigten, dass KG-1a-Zellen, die für 48 h mit 4,0 μM ATO behandelt wurden, einen Anteil spät-apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation von 16,97 % aufwiesen (Girgis, Mahoney et al. 2010). Der Anteil früh-apoptotischer Zellen war 10,10 %, der Anteil nekrotischer Zellen lag bei 0,59 %. Die Analyse erfolgte mittels Annexin- sowie PI-Färbung. Auf diese Weise konnten die Fluoreszenzen der beiden Kanäle in einem Plot angezeigt werden und eine Aufteilung in Quadranten erfolgen: PI+/Annexin- Zellen wurden als nekrotisch, PI+/Annexin+ Zellen als spät-apoptotisch definiert sowie PI-/Annexin- Zellen als frühapoptotisch definiert. Diese Einteilung wurde bei uns nicht durchgeführt, es ist aber davon auszugehen, dass Zellen im Dead-cells-Gate entweder spät-apoptotisch oder nekrotisch sind. Entsprechend kann man zum Vergleich die spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen addieren und erhält einen Anteil von 17,56 %. Nach 48 h Inkubation mit etwas höher dosiertem ATO (5,0 μM) lag der Anteil der Dead cells im Rahmen unserer Versuche bei 17,6 % (SD 2,3 %), also vergleichbar hoch.

Die grundsätzliche Tendenz, dass ATO in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer zunehmend zytotoxisch wirkt, bestätigt sich auch über die von

uns gewählten 72 h hinaus: Wie in der Einleitung beschrieben untersuchten Rojewski et al. die Potenz von ATO, bei leukämischen Zelllinien Apoptose zu induzieren: ATO-Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ reichten bei KG-1a-Zellen aus, um nach mehreren Wochen Apoptose sämtlicher Zellen zu induzieren (Rojewski, Baldus et al. 2002).

Die molekularen Mechanismen für die Dosis-abhängige Apoptose-Induktion von ATO sind Gegenstand aktueller Forschung und nicht vollständig verstanden. Neben der in der Einleitung erwähnten Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies führt Zhou unter anderem folgende Ursachen auf molekularer Ebene an (Zhou 2012):

- Aktivierung einer Caspasen-Kaskade
- Abnahme des Membranpotenzials der Mitochondrien
- Inhibierung des NF- κ B-Signalweges
- Herabregulierung des Wt1-Genes

Hinzu kommt eine Inhibition des Hedgehog-Signalwegs (Beauchamp and Uren 2012). Bei der Eliminierung der LSC bei der APL spielt das PML-RARA-Fusionsprotein eine entscheidende Rolle, das unter ATO abgebaut wird (Nasr, Guillemín et al. 2008), siehe hierzu auch 1.4.3 Wirkungsweise von ATO auf S. 38.

4.4.2 Effekte von ATO auf die diploide und tetraploide SP in Abhängigkeit von Behandlungsdauer und Konzentration

Wir konnten zeigen, dass der Anteil toter Zellen mit zunehmender ATO-Konzentration und Inkubationsdauer deutlich ansteigt. Gleichzeitig steigt der Anteil diploider Zellen mit Stammzeleigenschaften in Abhängigkeit dieser beiden Parameter. Bei höheren ATO-Konzentrationen (2,0 μM und 5,0 μM) ist dieser Zusammenhang auch für diploide Zellen mit frühen Stammzeleigenschaften (Early SP und Intermediate SP zusammengefasst) deutlich erkennbar.

Kritisch zu überdenken ist hierbei, ob es sich nicht in erster Linie um eine Verringerung der Hauptpopulationen handelt. Folglich könnte die SP dann zwar

relativ, aber nicht absolut gesehen angereichert sein. In einigen Veröffentlichungen ist von einer Anreicherung von Stammzellen die Rede, ohne dass auf diese Problematik eingegangen wird. So wurde eine Anreicherung von CD34+, CD38- KG-1a-Zellen unter Fluoruracil-Therapie beschrieben (Zhang, Yang et al. 2010). Leider geht nicht hervor, ob es sich nicht lediglich um eine relative Anreicherung der Vorläuferzellen handelt bei gleichzeitigem Untergang reifer Zellen. Wang et al. beobachteten ebenfalls eine Anreicherung der SP, und zwar in der AML-Zelllinie THP-1 unter Arabinosylcytosin-Behandlung (Wang, Yin et al. 2013).

Unter 4.4.1 wurde beschrieben, dass ATO zytotoxisch auf die Zellen wirkt. Ebenso ist bekannt, dass es sich bei der SP um verhältnismäßig resistente Zellen handelt. Die Efflux-Funktion wird auch zur Abwehr gegen der Zelle schädende Medikamente verwendet (Wulf, Wang et al. 2001). Da die Zellen der Hauptpopulation diese Funktion nicht haben, sind sie unter ATO-Behandlung deutlich ungeschützt. Wenn man beispielsweise nach 72 h Inkubation 5 Mal mehr Suspensionsvolumen aus der mit ATO behandelten Kultur entnimmt, um auf die gleiche Zellzahl für die anschließende Färbung zu kommen, könnte folgender Fall eintreten: Wenn ausschließlich Zellen der Hauptpopulation durch ATO abgetötet worden wären, fiel der Anteil der SP bei der Auswertung fünf Mal höher aus als in der unbehandelten Kontrolle. Dennoch wäre dieses Ergebnis nicht auf einen tatsächlichen Anstieg der SP zurückzuführen, sondern wäre schlicht der Methodik geschuldet.

Aufgrund dieser Problematik sind in Tabelle 3-1 auf S. 103 die benötigten Volumina der mit 5,0 μM ATO behandelten sowie der unbehandelten Zellen nach 24 h, 48 h sowie 72 h dargestellt. Der Volumenquotient wurde definiert als das benötigte Volumen der mit 5,0 μM ATO behandelten Zellen pro verwendetem Volumen der unbehandelten Zellen. Dem gegenüber steht der SP-Anteils-Quotient, also der SP-Anteil der mit 5,0 μM ATO behandelten Zellen geteilt durch den SP-Anteil unbehandelter Zellen. Für eine absolute Anreicherung der SP muss der Volumenquotient folglich kleiner sein als der SP-Anteils-Quotient.

Tabelle 3-1 zeigt eine leicht zunehmende Tendenz beim Volumenquotienten, nämlich von 0,9 nach 24 h auf 1,5 nach 72 h. Entsprechend wird mit fortschreitender Behandlungszeit bei den mit 5,0 μM ATO behandelten Zellen etwas mehr Volumen benötigt als bei den unbehandelten Zellen. Der SP-Anteils-Quotient hingegen ist bereits nach 24 h auf 6,9 angestiegen. In der gefärbten Suspensionsprobe der mit 5,0 μM ATO behandelten Zellen befanden sich also bereits nach 24 h 6,9 Mal so viele SP-Zellen wie in der Kontrolle. Dieser Quotient ist nach 72 h bereits auf 26,1 angestiegen. Ginge man einzig von einer relativen Anreicherung der SP aus, die durch ein Absterben von Nicht-SP-Zellen unter ATO-Behandlung entstünde, würden sich Volumenquotient und SP-Anteilsquotient nicht stark voneinander unterscheiden. Da der SP-Anteilsquotient von 26,1 allerdings den Volumenquotienten von 1,5 bei weitem übertrifft, ist auch von einer absoluten Anreicherung der SP unter ATO-Therapie auszugehen.

Auch bei tetraploiden KG-1a-Zellen steigt der SP-Anteil mit zunehmender ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer an. Bei tetraploiden Zellen mit frühen Stammzelleigenschaften zeigt sich dieser Zusammenhang ebenfalls, sogar bereits bei niedrigen ATO-Konzentrationen. Vor diesem Hintergrund ist es auch plausibel, dass mit zunehmender ATO-Konzentration sowie Behandlungsdauer das Verhältnis tetraploider zu diploider SP-Zellen zugunsten der tetraploiden SP-Zellen deutlich ansteigt, während es bei unbehandelten Zellen noch ausgeglichen ist.

Ein Grund hierfür könnte im Arrest der Zellen in der G2-Phase durch ATO bestehen. Dieser ATO-induzierte Stillstand ist bereits für andere AML-Zelllinien von Lam et al. beschrieben worden (Lam, Li et al. 2005). Auch in Myelom-Zelllinien wurde ein G2/M-Phasen-Arrest bei ATO-behandelten Zellen mit mutiertem p 53 festgestellt, das physiologischerweise ein wichtiges Tumorsuppressor-Protein darstellt (Liu, Hilsenbeck et al. 2003). Auf molekularer Ebene werden unterschiedliche Mechanismen für diesen Arrest beschrieben, die vermutlich auch von der Tumorentität abhängen. So zeigten Li et al., dass das in der Einleitung erwähnte Protein Akt (siehe 1.3.7 Therapeutische Konsequenzen, S. 34) bzw. dessen Signalweg bei ATO-induzierter Apoptose

der APL-Zelllinie NB4 sowie dem G2/M-Arrest von Magenkrebs-Zellen eine wichtige Rolle spielt (Li, Qu et al. 2009). Bei den hier genannten Untersuchungen handelte es sich allerdings nie um einen explizit auf frühe Vorläuferzellen beschränkten Vorgang. Stets wurde der Effekt auf die Gesamtheit der Zellen einer Zelllinie beschrieben. Geht man jedoch davon aus, dass dieser Effekt auch bei SP-Zellen der KG-1a-Linie besteht, könnte man die starke Zunahme zumindest der tetraploiden Zellen mit dem Arrest ebendieser unmittelbar vor der Zellteilung assoziieren. Da die Teilung der tetraploiden Zellen dann jedoch nicht eintritt, wären Wachstums- und Teilungssignale an die übrigen SP-Zellen denkbar, die in der Folge selbst in die S-Phase übergehen könnten. Auch die Zunahme des Verhältnisses zwischen tetraploiden und diploiden SP-Zellen wäre vor diesem Hintergrund nachvollziehbar. Mit Hilfe dieser Theorie schwerlich zu erklären wäre jedoch der massive Anstieg der diploiden SP unter ATO-Therapie.

Eine mögliche Erklärung für die absolute Anreicherung sowohl der diploiden als auch der tetraploiden SP-Zellen liegt in der Annahme, dass ATO eine vermehrte Zellteilung innerhalb der frühen Vorläuferzellen bewirkt. Dieser mitogene Effekt würde zu einer Zunahme derjenigen Zellen führen, die kurz vor der Zellteilung stehen. In der Folge käme es entsprechend auch zur Anreicherung der Zellen mit einfachem Chromosomensatz. Kritisch anzumerken ist hierbei jedoch, dass unter ATO-Behandlung bei In-vitro-Zellen bislang ein Mitose-Arrest beobachtet wurde und kein mitogener Effekt (Ling, Jiang et al. 2002). Denkbar wäre dennoch eine direkte oder indirekte Stimulation der frühen Vorläuferzellen zur Proliferation: Die massive ATO-induzierte Apoptose der Hauptpopulation könnte ein solcher Stimulus für die SP-Zellen sein, die sich in der Folge vermehrt teilen. In diesem Fall könnte der mitogene Effekt therapeutisch genutzt werden, da die Leukämie-initiiierenden Zellen offensichtlich den Zustand der Quieszenz temporär verlassen und damit angreifbar für zytotoxische Medikamente wären. Die Überwindung der Quieszenz hätte eine Kombinations-Chemotherapie als therapeutische Konsequenz. Neben ATO wäre ein weiteres Therapeutikum denkbar, das

speziell die frühen Vorläuferzellen angreift, die aufgrund von ATO den wichtigen Resistenzmechanismus der Quieszenz zumindest temporär aufgegeben haben.

4.4.3 Klinischer Einsatz von ATO

Bislang wird ATO sowohl in Europa als auch in den USA in der Therapie der APL eingesetzt.

In unseren Versuchen untersuchten wir Zellsuspensionen mit ATO-Konzentrationen zwischen 0,0 μM und 5,0 μM . Um mögliche Rückschlüsse auf In-vivo-Prozesse ziehen zu können, ist es wichtig, dass die Konzentrationen auch bei mit ATO behandelten Patienten realistisch sind. Shen et al. untersuchten die Pharmakokinetik von ATO bei Patienten mit APL-Rezidiv: Die Maxima von ATO im Plasma lagen hier zwischen 5,54 μM und 7,30 μM . Die häufigsten Nebenwirkungen waren unter anderem trockene Haut, Übelkeit, Erbrechen, Appetitverlust sowie Gelenk- oder Muskelbeschwerden. Sämtliche Nebenwirkungen wurden jedoch – teils unter symptomatischer Therapie – von den Patienten toleriert und führten nicht zu einem Absetzen von ATO (Shen, Chen et al. 1997). Vor diesem Hintergrund sind die von uns gewählten ATO-Konzentrationen auch im klinischen Bereich als durchaus realistisch anzusehen. Zu beachten ist hierbei, dass ATO in vivo methyliert wird und in der Leber in verschiedene Metaboliten umgewandelt wird, die jeweils unterschiedliche therapeutische Effizienz sowie Toxizität aufweisen. Dennoch gilt ATO pharmakologisch nach wie vor als Referenzsubstanz, da es sowohl therapeutisch als auch toxisch gesehen das höchste Potenzial im Vergleich zu seinen Metaboliten aufweist (Zhang, Chen et al. 2013).

4.5 Effekte von TDZD-8 auf die Zellpopulation mit Stammzellkriterien bei KG-1a-Zellen

Bei der Behandlung von KG-1a-Zellen mit TDZD-8 ist bezüglich diploider SP-Zellen keine klare Tendenz beobachtbar. Einzig die mit 0,5 μM und 1,0 μM TDZD-8 behandelten Zellen hatten einen etwas höheren SP-Anteil nach 18 h sowie 63 h. Jedoch zeigt sich zwischenzeitlich, nämlich nach 42 h, ein relativ ähnlicher SP-Anteil bei allen Konzentrationen. Daher ist ein eindeutiger Effekt von TDZD-8 in Bezug auf die SP – zumal es sich um eine exemplarische Einzelmessung handelt – nicht nachweisbar.

Eine konzentrationsabhängige Zu- oder Abnahme der SP ist auch bei tetraploiden Zellen nicht eindeutig erkennbar – auch nach 63 h liegen die SP-Anteile zwischen 4,7 % (5,0 μM TDZD-8) und 9,9 % (1,0 μM). Somit kann auch hier kein klarer Effekt – weder eine Zu- noch eine Abnahme – auf die SP abgeleitet werden.

Guzman et al. konnten zwar nachweisen, dass TDZD-8 innerhalb von mehreren Stunden apoptotisch auf leukämische Zellen, insbesondere frühe Vorläuferzellen (CD34+/CD38-), wirkt (Guzman, Li et al. 2007). Jedoch handelt es sich bei der SP keinesfalls um eine einheitliche CD34+/CD38- Population. Im Gegenteil: Man geht von einer mehrheitlich CD34- Population aus (vgl. 1.2.2 Nachweis hämatopoetischer Stammzellen, S.24). Vor diesem Hintergrund wäre es durchaus denkbar, dass TDZD-8 zwar frühe Vorläuferzellen, aber nicht spezifisch die SP angreift.

4.6 Zellmarker als methodische Hilfe bei der Charakterisierung unbehandelter KG-1a-Zellen

4.6.1 Die Rolle von Annexin V als Apoptose-Marker bei der Charakterisierung unbehandelter KG-1a-Zellen

Annexin V gilt als typischer Apoptosemarker. In Kombination mit PI ist zusätzlich eine zuverlässige Unterscheidung zwischen früher Apoptose und später Apoptose bzw. Permeabilisierung der Zellmembran als Grundlage für die PI-Färbung möglich (Aubry, Blaecke et al. 1999). Nachdem wir die Population der Annexin negativen und PI negativen Zellen in einem Gate zusammengefasst hatten, stellten wir sie im Hoechst-Blue-Hoechst-Red-Plot dar (siehe Abbildung 3-23, S. 109). Diese Ansicht verdeutlicht jedoch, dass sich nach wie vor Zellen sowie Zelltrümmer außerhalb des Live-cells-Gates befinden. Eine Vereinfachung der Auswertung, beispielsweise beim Gating durch das Live-cells-Gate, scheint durch die Annexin-Färbung nicht gegeben zu sein. Daher lohnt die Annexinfärbung in diesem Kontext entsprechend nicht.

4.6.2 Die Rolle von Stammzellmarkern bei der Differenzierung zwischen SP und Hauptpopulation unbehandelter KG-1a-Zellen

Bei der Färbung von KG-1a-Zellen mit Stammzellmarkern fällt eine schwächere CD34- sowie schwächere CD38-Expression von diploiden SP-Zellen gegenüber der Hauptpopulation auf. Diese Beobachtung deckt sich gut mit der in der Literatur beschriebenen Charakterisierung von SP-Zellen in Bezug auf Stammzellmarker. Auch Goodell et al. beschrieben SP-Zellen als vorrangig CD34- (Goodell, Rosenzweig et al. 1997). Zu beachten bleibt dennoch, dass die CD34- sowie CD38-Expression in verschiedenen Leukämien stark variieren kann.

Bei den Oberflächenmolekülen CD243 und CD338, die ja beide als Stammzellmarker gelten (vgl. 1.2.2 Nachweis hämatopoetischer Stammzellen, S.24), fallen die Unterschiede zwischen SP und Hauptpopulation deutlich geringer aus. Beide Populationen weisen eine hohe Expression von CD243 auf,

die Hauptpopulation sogar noch etwas stärker. Dies ist insofern verwunderlich, dass der Efflux-Mechanismus der SP auf die Expression unter anderem von CD243 zurückgeführt wird. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die Annahme, dass CD243 sowohl auf Zellen der SP als auch auf Zellen der Hauptpopulation exprimiert werden, aber unterschiedliche Aktivitäts-Niveaus aufweisen, so dass SP-Zellen den Efflux-Mechanismus stärker nutzen.

Außerdem färbten wir unbehandelte KG-1a-Zellen mit dem fluoreszierenden Antikörper CD338-PE: Sowohl SP als auch Hauptpopulation scheinen bei KG-1a-Zellen CD338 negativ zu sein. Dies legt den Schluss nahe, dass vermeintliche Stammzellmarker, zu denen auch CD338 zählt, nicht zwingend auf frühen Vorläuferzellen überexprimiert sein müssen. Vielmehr gibt es eine Vielzahl von Stammzellkriterien, die je nach Zelllinie bzw. Zellherkunft unterschiedlich zusammengesetzt sind. Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass CD338 den Hoechst-Farbstoff aus der Zelle herauspumpen kann (Kim, Turnquist et al. 2002). Auf der anderen Seite zeigen Studien, dass die CD338-Expression beispielsweise in Nabelschnurblut-Zellen weder mit der SP noch mit Eigenschaften hämatopoetischer Vorläuferzellen korrelieren (Alt, Wilhelm et al. 2009).

4.7 Ausblick

Als häufigste bösartige Neoplasien im Kindesalter sind Leukämien trotz großer therapeutischer Fortschritte während der vergangenen Jahrzehnte ein zentrales Forschungsanliegen. Frühen Blutvorläuferzellen werden sowohl bei der Entstehung von Leukämien als auch bei deren Rezidiven eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Entsprechend gelten sie als bedeutender therapeutischer Angriffspunkt. Eine Zelllinie mit reproduzierbar hohen SP-Anteilen bietet eine hervorragende Grundlage für In-vitro-Versuche, in deren Rahmen therapeutische Effekte verschiedener Substanzen auf die Vorläuferzellen differenziell beschrieben werden können.

Die größten SP-Anteile hatten in unseren Versuchen die Zelllinien KG-1a und K562. Aufgrund der geringeren Streuung, dem Ursprung (akute Leukämie)

sowie dem Vorkommen von SP-Zellen mit frühen Stammzellkriterien führten wir die Behandlungsversuche mit KG-1a-Zellen durch. ATO, ein Jahrtausende altes Medikament, wird heute als First-line-Therapie der APL eingesetzt. Wir konnten zeigen, dass die ATO-Behandlung von KG-1a-Zellen eine Dosis-abhängige Apoptose-Induktion hervorruft. Hierbei wird dem Fusionsprotein PML-RARA eine zentrale Rolle zugeschrieben.

Der Anteil sowohl diploider als auch tetraploider Zellen mit Stammzeleigenschaften steigt hingegen in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Inkubationsdauer. Neben dem Arrest der Zellen in der G2-Phase durch ATO könnte dies durch einen mitogenen Effekt auf die Vorläuferzellen erklärt werden. In diesem Fall könnte dieser therapeutisch genutzt werden, da die Leukämie-initiiierenden Zellen angreifbar für zytotoxische Medikamente wären, während sie den Zustand der Quieszenz verlassen. Denkbar wäre eine Kombinations-Chemotherapie: Neben ATO würde ein weiteres Therapeutikum benötigt, das diejenigen Vorläuferzellen angreift, die aufgrund von ATO den wichtigen Resistenzmechanismus der Quieszenz zumindest temporär aufgegeben haben.

Es konnte bereits vielfach gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie mit ATO einen therapeutischen Nutzen mit sich bringen kann: Girgis et al. evaluierten beispielsweise eine deutlich erhöhte Apoptose-Rate von KG-1a-Zellen unter ATO-Therapie durch Hinzugabe von Thalidomid, einem Glutaminsäurederivat (Girgis, Mahoney et al. 2010). Die Wirkung von Thalidomid wird unter anderem durch die Hemmung der Blutgefäß-Neubildung und Modulation pro-inflammatorischer Zytokine erklärt (Holzgrave 2007).

Verschiedene Enzyme konnten in AML-Zellen in erhöhter Konzentration bestimmt werden. Auf dieser Grundlage wurden Therapeutika in Kombination mit ATO untersucht, die diese Enzyme angreifen: Wie in der Einleitung beschrieben spielt der PI3-Kinase-Akt-Signalweg eine wesentliche Rolle bei der AML (siehe 1.3.7 Therapeutische Konsequenzen, S.34). Es konnte gezeigt werden, dass Akt-Inhibitoren die apoptotische Wirkung von ATO potenzieren (Ramos, Fernandez et al. 2005). Eine Übersicht über weitere

Kombinationstherapien mit ATO bei verschiedenen Neoplasien wurde von Takahashi 2010 zusammengefasst (Takahashi 2010).

Auf der Grundlage der Hypothese eines mitogenen Effekts von ATO wäre der nächste Schritt eine Kombinationstherapie aus ATO und einem klassischen Zytostatikum der AML-Therapie. Wie in der Einleitung beschrieben spielen bei der Induktionstherapie Cytosin-Arabinosid sowie Anthrazykline eine zentrale Rolle. Erstere fungieren als Antimetaboliten: Ihre aktive Form, nämlich Ara-C-Triphosphat, wird anstelle des physiologischen Cytidintriphosphat in die DNA eingebaut, was in der Apoptose der Zelle resultiert. Letztere wirken als Interkalatoren: Sie lagern sich in zwei benachbarte Basenpaare der DNA ein und behindern damit die Replikation und Transkription der Zelle. Beiden Substanzen gemein ist, dass sie vor allem in der S-Phase wirken, also genau dann, wenn die Zelle neue DNA bildet, um sich anschließend teilen zu können. Wenn ATO die S-Phase bei den leukämischen Vorläuferzellen induzieren kann, hätte dies eine deutlich erhöhte Angreifbarkeit durch klassische Zytostatika, womöglich bereits in reduzierter Dosierung, zur Folge.

Um langfristige Effekte der entsprechenden Therapeutika besser einschätzen zu können, bedarf es zusätzlich einer längeren Inkubationsdauer der Agentien sowie im darauffolgenden Schritt In-vivo-Untersuchungen. Bei Fragestellungen, die sich speziell mit dem Effekt auf SP-Zellen einer Zelllinie auseinandersetzen, ist ein zuvor am Durchflusszytometer durchzuführendes Sorting in Erwägung zu ziehen, da die SP physiologischerweise einen relativ kleinen Anteil der Gesamtpopulation an Zellen ausmacht.

Eine weitere Herausforderung bei der Bekämpfung von malignen Vorläuferzellen ist ihre Ähnlichkeit zu physiologischen hämatopoetischen Vorläuferzellen (siehe 1.3.3 Aktuelle Erkenntnisse zu LIC, S.30). Daher ist es von großer Bedeutung, weitere spezifische Merkmale der leukämischen Vorläuferzellen zu identifizieren und die Therapie entsprechend spezifisch zu gestalten. Ein Beispiel hierfür ist der bereits erwähnte NF- κ B-Inhibitor Parthenolid, dessen apoptotischer Effekt sich auf AML-Vorläuferzellen fokussiert, während physiologische Vorläuferzellen deutlich weniger angegriffen

werden als dies bei klassischen Chemotherapeutika der Fall ist (Guzman, Rossi et al. 2005).

Bei der Behandlung akuter Leukämien konnte die Prognose im Laufe der letzten Jahrzehnte insbesondere aufgrund der Chemotherapie sowie der MRD-Bestimmung deutlich verbessert werden. Das Risiko von Rezidiven bleibt allerdings eine große Herausforderung. In diesem Kontext scheint es notwendig, insbesondere die frühen Vorläuferzellen möglichst komplett zu eradizieren. Hier könnte die Überwindung der Quieszenz maligner Vorläuferzellen einen Baustein bei der Bekämpfung der Leukämie darstellen.

Bei den Leukämien handelt es sich nicht um ein einheitliches Krankheitsbild mit klar identifiziertem Pathomechanismus. Aufgrund dieser Heterogenität ist es wichtig, weiterhin möglichst spezifische Eigenschaften der einzelnen Entitäten zu evaluieren um darauf aufbauend gezielte Therapien zu entwickeln. Diese sollen einerseits möglichst effektiv sein, vor allem in Bezug auf Vorläuferzellen. Andererseits gilt es, gesunde Zellen möglichst zu schonen, um unerwünschte Arzneimittelwirkungen gering zu halten.

5 Zusammenfassung

Akute Leukämien stellen die häufigsten bösartigen Neoplasien im Kindesalter dar. Trotz großer therapeutischer Fortschritte während der vergangenen Jahrzehnte sind sie nach wie vor ein potenziell letales Krankheitsbild – nicht zuletzt aufgrund ihrer Heterogenität und Komplexität. Insbesondere die hohen Rezidivraten der akuten myeloischen Leukämie (AML) stellen eine große Herausforderung im therapeutischen Kontext dar. Seit einigen Jahren liegt ein Forschungsschwerpunkt auf der Charakterisierung früher leukämischer Vorläuferzellen, die als Ursache sowohl der eigentlichen Krankheit als auch deren Rezidive angesehen werden. Wie auch physiologische Stammzellen haben diese Vorläuferzellen Eigenschaften inne, die ihnen eine größere Resistenz als die übrigen leukämischen Zellen verleihen.

Ziel dieser Arbeit war es, im ersten Schritt zehn definierte leukämische Zelllinien durchflusszytometrisch in Bezug auf Stammzellkriterien, dem so genannten Side-population- (SP-) Anteil, zu charakterisieren und diese zu analysieren. Im zweiten Teil der Arbeit wurden differenzielle Effekte potenzieller Leukämie-Therapeutika untersucht. Grundlage der Versuche war eine von uns optimierte Charakterisierungsmethodik zur Eingrenzung leukämischer Zellen in Bezug auf Stammzellkriterien nach Inkubation mit dem Farbstoff Hoechst.

Die größten SP-Anteile hatten in unseren Versuchen die Zelllinien KG-1a und K562. Aufgrund der geringeren Streuung, dem Ursprung (akute Leukämie) sowie dem Vorkommen von SP-Zellen mit frühen Stammzellkriterien führten wir die Behandlungsversuche mit KG-1a-Zellen durch. Arsentrioxid (ATO), ein Jahrtausende altes Medikament, wird heute als First-line-Therapie der akuten Promyelozyten-Leukämie eingesetzt. Wir konnten zeigen, dass die ATO-Behandlung von KG-1a-Zellen eine Dosis-abhängige Apoptose-Induktion hervorruft. Hierbei wird unter anderem dem Fusionsprotein PML-RARA eine zentrale Rolle zugeschrieben.

Der Anteil sowohl diploider als auch tetraploider Zellen mit Stammzeleigenschaften steigt hingegen in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Inkubationsdauer. Neben dem Arrest der Zellen in der G2-

Phase durch ATO könnte dies durch einen mitogenen Effekt auf die Vorläuferzellen erklärt werden. In diesem Fall könnte dieser therapeutisch genutzt werden, da die Leukämie-initiierenden Zellen angreifbar für zytotoxische Medikamente wären, während sie den Zustand der Quieszenz verlassen.

Auf der Grundlage der Hypothese eines mitogenen Effekts von ATO wäre der nächste Schritt eine Kombinationstherapie aus ATO und einem klassischen Zytostatikum der AML-Therapie.

Die Prognose akuter Leukämien hat sich innerhalb der letzten Jahrzehnte in erster Linie aufgrund der Chemotherapie sowie eines Patienten-adaptierten therapeutischen Vorgehens mit Hilfe der Bestimmung der minimalen Resterkrankung (Minimal residual disease) massiv verbessert. Dennoch bleibt es eine große Herausforderung, insbesondere die frühen Vorläuferzellen möglichst komplett zu eradizieren. Die Überwindung der Quieszenz maligner Vorläuferzellen könnte hierbei im Rahmen von Kombinationstherapien ein potenter Behandlungsbaustein sein.

6 Literaturverzeichnis

- Ahlers, J. (2010). Identifikation einer Zellpopulation mit Stammzellmarkern mit Korrelation zum klinischen Verlauf bei Diagnosestellung, Universität Tübingen.
- Aladjidi, N., A. Auvrignon, et al. (2003). "Outcome in children with relapsed acute myeloid leukemia after initial treatment with the French Leucemie Aigue Myeloide Enfant (LAME) 89/91 protocol of the French Society of Pediatric Hematology and Immunology." J Clin Oncol **21**(23): 4377-4385.
- Alt, R., F. Wilhelm, et al. (2009). "ABCG2 expression is correlated neither to side population nor to hematopoietic progenitor function in human umbilical cord blood." Exp Hematol **37**(2): 294-301.
- Aubry, J. P., A. Blaecke, et al. (1999). "Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity." Cytometry **37**(3): 197-204.
- Beauchamp, E. M. and A. Uren (2012). "A new era for an ancient drug: arsenic trioxide and Hedgehog signaling." Vitam Horm **88**: 333-354.
- Blankenberg, F. G., P. D. Katsikis, et al. (1999). "Imaging of apoptosis (programmed cell death) with 99mTc annexin V." J Nucl Med **40**(1): 184-191.
- Boesch, M., D. Reimer, et al. (2012). "DyeCycle Violet used for side population detection is a substrate of P-glycoprotein." Cytometry A **81**(6): 517-522.
- Bonnet, D. (2005). "Normal and leukaemic stem cells." Br J Haematol **130**(4): 469-479.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.
- Borowitz, M. J., M. Devidas, et al. (2008). "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 **111**(12): 5477-5485.
- Briscoe, J. and P. P. Therond (2013). "The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(7): 416-429.
- Bruserud, O., B. T. Gjertsen, et al. (2001). "New strategies in the treatment of acute myelogenous leukemia (AML): in vitro culture of aml cells--the present use in experimental studies and the possible importance for future therapeutic approaches." Stem Cells **19**(1): 1-11.
- Buffler, P. A., M. L. Kwan, et al. (2005). "Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence." Cancer Invest **23**(1): 60-75.
- Bushman, F. D. (2007). "Retroviral integration and human gene therapy." J Clin Invest **117**(8): 2083-2086.

- Cedar, H. and Y. Bergman (2011). "Epigenetics of haematopoietic cell development." Nat Rev Immunol **11**(7): 478-488.
- Chen, S. J., G. B. Zhou, et al. (2011). "From an old remedy to a magic bullet: molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of arsenic in fighting leukemia." Blood **117**(24): 6425-6437.
- Chen, W., A. R. Kumar, et al. (2008). "Malignant transformation initiated by MLL-AF9: gene dosage and critical target cells." Cancer Cell **13**(5): 432-440.
- Cheung, A. M., T. S. Wan, et al. (2007). "Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential." Leukemia **21**(7): 1423-1430.
- Chiarini, F., C. Grimaldi, et al. (2010). "Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia." Cancer Res **70**(20): 8097-8107.
- Chotinantakul, K. and W. Leraanansaksiri (2012). "Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways." Bone Marrow Res **2012**: 270425.
- Chu, S., H. Xu, et al. (2005). "Detection of BCR-ABL kinase mutations in CD34+ cells from chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission on imatinib mesylate treatment." Blood **105**(5): 2093-2098.
- Cowan, A. J., G. S. Laszlo, et al. (2013). "Antibody-based therapy of acute myeloid leukemia with gemtuzumab ozogamicin." Front Biosci (Landmark Ed) **18**: 1311-1334.
- Cox, C. V., P. Diamanti, et al. (2009). "Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL." Blood **113**(14): 3287-3296.
- Cuzick, J., S. Evans, et al. (1982). "Medicinal arsenic and internal malignancies." Br J Cancer **45**(6): 904-911.
- Dalal, B. I., V. Wu, et al. (1997). "Induction failure in de novo acute myelogenous leukemia is associated with expression of high levels of CD34 antigen by the leukemic blasts." Leuk Lymphoma **26**(3-4): 299-306.
- de The, H. and Z. Chen (2010). "Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure." Nat Rev Cancer **10**(11): 775-783.
- Dean, M., T. Fojo, et al. (2005). "Tumour stem cells and drug resistance." Nat Rev Cancer **5**(4): 275-284.
- Dempke, W. (2006). Lehrbuch Hämato-Onkologie. Hans Huber Verlag, Bern.
- Doxani, C., M. Voulgarelis, et al. (2013). "MDR1 mRNA expression and MDR1 gene variants as predictors of response to chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis." Biomarkers **18**(5): 425-435.

- Drexler, H. G. (2004). "Isolation and culture of leukemia cell lines." Methods Mol Med **88**: 141-155.
- Ebinger, M., K. E. Witte, et al. (2010). "High frequency of immature cells at diagnosis predicts high minimal residual disease level in childhood acute lymphoblastic leukemia." Leuk Res **34**(9): 1139-1142.
- Freund, D., J. Oswald, et al. (2006). "Comparative analysis of proliferative potential and clonogenicity of MACS-immunomagnetic isolated CD34+ and CD133+ blood stem cells derived from a single donor." Cell Prolif **39**(4): 325-332.
- Gilliland, D. G., C. T. Jordan, et al. (2004). "The molecular basis of leukemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 80-97.
- Girgis, E., J. Mahoney, et al. (2010). "Arsenic trioxide enhances the cytotoxic effect of thalidomide in a KG-1a human acute myelogenous leukemia cell line." Oncol Lett **1**(3): 473-479.
- Goodell, M. A., K. Brose, et al. (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-1806.
- Goodell, M. A., M. Rosenzweig, et al. (1997). "Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species." Nat Med **3**(12): 1337-1345.
- Gore, S. D., I. Gojo, et al. (2010). "Single cycle of arsenic trioxide-based consolidation chemotherapy spares anthracycline exposure in the primary management of acute promyelocytic leukemia." J Clin Oncol **28**(6): 1047-1053.
- Greve, B., R. Kelsch, et al. (2012). "Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation." Cytometry Part A **81A**(4): 284-293.
- Griffin, J. D. and B. Lowenberg (1986). "Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia." Blood **68**(6): 1185-1195.
- Guan, Y., B. Gerhard, et al. (2003). "Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML)." Blood **101**(8): 3142-3149.
- Gutjahr, P. (1999). Krebs bei Kindern und Jugendlichen. 4. Auflage, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- Guzman, M. L. and C. T. Jordan (2004). "Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia." Cancer Control **11**(2): 97-104.
- Guzman, M. L., X. Li, et al. (2007). "Rapid and selective death of leukemia stem and progenitor cells induced by the compound 4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione (TDZD-8)." Blood **110**(13): 4436-4444.
- Guzman, M. L., S. J. Neering, et al. (2001). "Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells." Blood **98**(8): 2301-2307.

- Guzman, M. L., R. M. Rossi, et al. (2005). "The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells." Blood **105**(11): 4163-4169.
- Hauge, A. W., E. K. Haastrup, et al. (2013). "Addition of plerixafor for CD34+ cell mobilization in six healthy stem cell donors ensured satisfactory grafts for transplantation." Transfusion.
- Herzenberg, L. A., D. Parks, et al. (2002). "The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford." Clin Chem **48**(10): 1819-1827.
- Hess, D. A., T. E. Meyerrose, et al. (2004). "Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity." Blood **104**(6): 1648-1655.
- Hirschmann-Jax, C., A. E. Foster, et al. (2004). "A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14228-14233.
- Holzgrabe, U. (2007). "[An old drug as a carcinostatic. The new career of thalidomide]." Pharm Unserer Zeit **36**(6): 446-449.
- Hoppe, T. (2010). Untersuchungen zur Entwicklungsphysiologie und molekularen Phylogenetik ausgewählter Vertreter der Myxomyceten und zur Photosynthese fähiger Eugleniden (Organismenreich Protoctista). Kassel University Press, Kassel.
- Hörmann, R. (2013). Charakterisierung leukämischer Progenitorzellen im NOD/SCID-Mausmodell mittels Hoechst 33342, Universität Tübingen.
- Horton, S. J. and B. J. Huntly (2012). "Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology." Haematologica **97**(7): 966-974.
- Hosen, N., C. Y. Park, et al. (2007). "CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(26): 11008-11013.
- Hourigan, C. S. and J. E. Karp (2013). "Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia." Nat Rev Clin Oncol **10**(8): 460-471.
- Huang, F. F., D. S. Wu, et al. (2013). "Inactivation of PTEN increases ABCG2 expression and the side population through the PI3K/Akt pathway in adult acute leukemia." Cancer Lett **336**(1): 96-105.
- Ibrahim, S. F., A. H. Diercks, et al. (2007). "Kinetic analyses as a critical parameter in defining the side population (SP) phenotype." Exp Cell Res **313**(9): 1921-1926.
- Inaba, H., M. Greaves, et al. (2013). "Acute lymphoblastic leukaemia." Lancet **381**(9881): 1943-1955.
- Jeong, H. W., W. Cui, et al. (2011). "SALL4, a stem cell factor, affects the side population by regulation of the ATP-binding cassette drug transport genes." PLoS One **6**(4): e18372.

- Jolliffe, D. M. (1993). "A history of the use of arsenicals in man." J R Soc Med **86**(5): 287-289.
- Jordan, C. T. (2007). "The leukemic stem cell." Best Pract Res Clin Haematol **20**(1): 13-18.
- Kaatsch, P. and J. Spix (2012). German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2011 (1980-2010). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz.
- Kammel, M., A. Kummrow, et al. (2012). "Reference measurement procedures for the accurate determination of cell concentrations: present status and future developments." Laboratoriumsmedizin-Journal of Laboratory Medicine **36**(1): 25-35.
- Kentrou, N. A., N. J. Tsagarakis, et al. (2011). "An improved flow cytometric assay for detection and discrimination between malignant cells and atypical mesothelial cells, in serous cavity effusions." Cytometry B Clin Cytom **80**(5): 324-334.
- Kim, M., H. Turnquist, et al. (2002). "The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells." Clin Cancer Res **8**(1): 22-28.
- Konopleva, M., S. Zhao, et al. (2002). "The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells." Br J Haematol **118**(2): 521-534.
- Konopleva, M. Y. and C. T. Jordan (2011). "Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting." J Clin Oncol **29**(5): 591-599.
- Lam, H. K., K. Li, et al. (2005). "Arsenic trioxide mediates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis and cell cycle arrest in acute megakaryocytic leukemia." Int J Oncol **27**(2): 537-545.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-648.
- Li, Y., X. Qu, et al. (2009). "Arsenic trioxide induces apoptosis and G2/M phase arrest by inducing Cbl to inhibit PI3K/Akt signaling and thereby regulate p53 activation." Cancer Lett **284**(2): 208-215.
- Ling, Y. H., J. D. Jiang, et al. (2002). "Arsenic trioxide produces polymerization of microtubules and mitotic arrest before apoptosis in human tumor cell lines." Mol Pharmacol **62**(3): 529-538.
- List, A., M. Beran, et al. (2003). "Opportunities for Trisenox (arsenic trioxide) in the treatment of myelodysplastic syndromes." Leukemia **17**(8): 1499-1507.
- Liu, Q., S. Hilsenbeck, et al. (2003). "Arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloma cells: p53-dependent G1 or G2/M cell cycle arrest, activation of

- caspase-8 or caspase-9, and synergy with APO2/TRAIL." Blood **101**(10): 4078-4087.
- Maecker, H. T., T. Frey, et al. (2004). "Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity." Cytometry A **62**(2): 169-173.
- Mayani, H., E. Flores-Figueroa, et al. (2009). "In vitro biology of human myeloid leukemia." Leuk Res **33**(5): 624-637.
- Minden, M. D., J. E. Till, et al. (1978). "Proliferative state of blast cell progenitors in acute myeloblastic leukemia (AML)." Blood **52**(3): 592-600.
- Morrison, S. J., N. Uchida, et al. (1995). "The biology of hematopoietic stem cells." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 35-71.
- Moshaver, B., A. van Rhenen, et al. (2008). "Identification of a small subpopulation of candidate leukemia-initiating cells in the side population of patients with acute myeloid leukemia." Stem Cells **26**(12): 3059-3067.
- Murase, M., M. Kano, et al. (2009). "Side population cells have the characteristics of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in bone sarcomas." Br J Cancer **101**(8): 1425-1432.
- Nasim, S., M. L. Guzman, et al. (2011). "Discovery of 1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione analogs that exhibit unusual and selective rapid cell death kinetics against acute myelogenous leukemia cells in culture." Bioorg Med Chem Lett **21**(16): 4879-4883.
- Nasr, R., M. C. Guillemin, et al. (2008). "Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation." Nat Med **14**(12): 1333-1342.
- Ogawa, M. (2002). "Changing phenotypes of hematopoietic stem cells." Exp Hematol **30**(1): 3-6.
- Park, M. J., J. Y. Lee, et al. (2005). "Arsenic trioxide (As₂O₃) inhibits invasion of HT1080 human fibrosarcoma cells: role of nuclear factor-kappaB and reactive oxygen species." J Cell Biochem **95**(5): 955-969.
- Passegue, E., C. H. Jamieson, et al. (2003). "Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?" Proc Natl Acad Sci U S A **100** **Suppl 1**: 11842-11849.
- Pelliccia, F., V. Ubertini, et al. (2012). "The importance of molecular cytogenetic analysis prior to using cell lines in research: The case of the KG-1a leukemia cell line." Oncol Lett **4**(2): 237-240.
- Petit, J. M., M. Denis-Gay, et al. (1993). "Assessment of fluorochromes for cellular structure and function studies by flow cytometry." Biol Cell **78**(1-2): 1-13.
- Petriz, J. (2007). "Flow cytometry of the side population (SP)." Curr Protoc Cytom **Chapter 9**: Unit9 23.
- Powell, B. L., B. Moser, et al. (2010). "Arsenic trioxide improves event-free and overall survival for adults with acute promyelocytic leukemia: North

- American Leukemia Intergroup Study C9710." Blood **116**(19): 3751-3757.
- Ramos, A. M., C. Fernandez, et al. (2005). "Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukemia cells." Blood **105**(10): 4013-4020.
- Ravandi, F. and Z. Estrov (2006). "Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia." Clin Cancer Res **12**(2): 340-344.
- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Robert-Koch-Institut and G. d. e. K. i. D. e.V. (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe, Berlin.
- Robles-Escajeda, E., D. Lerma, et al. (2013). "Searching in mother nature for anti-cancer activity: anti-proliferative and pro-apoptotic effect elicited by green barley on leukemia/lymphoma cells." PLoS One **8**(9): e73508.
- Rojewski, M. T., C. Baldus, et al. (2002). "Dual effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation." Br J Haematol **116**(3): 555-563.
- Ross, J. A., L. G. Spector, et al. (2005). "Epidemiology of leukemia in children with Down syndrome." Pediatr Blood Cancer **44**(1): 8-12.
- Sack, U., A. Tárnok, et al. (2007). Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Karger Publishers, Basel.
- Schmitz, S. (2011). Der Experimentator: Zellkultur, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Shen, Z. X., G. Q. Chen, et al. (1997). "Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients." Blood **89**(9): 3354-3360.
- Steinbach, D. and O. Legrand (2007). "ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra?" Leukemia **21**(6): 1172-1176.
- Steinbach, D., W. Sell, et al. (2002). "BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia." Leukemia **16**(8): 1443-1447.
- Storms, R. W., A. P. Trujillo, et al. (1999). "Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9118-9123.
- Sutherland, H. J., A. Blair, et al. (1996). "Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells." Blood **87**(11): 4754-4761.

- Takahashi, S. (2010). "Combination therapy with arsenic trioxide for hematological malignancies." Anticancer Agents Med Chem **10**(6): 504-510.
- Taussig, D. C., F. Miraki-Moud, et al. (2008). "Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells." Blood **112**(3): 568-575.
- Till, J. E. and E. A. McCulloch (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat Res **14**: 213-222.
- van Rhenen, A., G. A. van Dongen, et al. (2007). "The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells." Blood **110**(7): 2659-2666.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." Nat Rev Cancer **2**(7): 489-501.
- Vormoor, H. J. (2009). "Malignant stem cells in childhood acute lymphoblastic leukemia: the stem cell concept revisited." Cell Cycle **8**(7): 996-999.
- Wang, Y., C. Yin, et al. (2013). "Sorting, identification and enrichment of side population cells in THP-1 acute monocytic leukemia cells." Oncol Rep **29**(5): 1923-1931.
- Waxman, S. and K. C. Anderson (2001). "History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy." Oncologist **6 Suppl 2**: 3-10.
- Weissman, I. L., D. J. Anderson, et al. (2001). "Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 387-403.
- Weltermann, A., C. Fonatsch, et al. (2004). "Impact of cytogenetics on the prognosis of adults with de novo AML in first relapse." Leukemia **18**(2): 293-302.
- Witte, K. E., J. Ahlers, et al. (2011). "High proportion of leukemic stem cells at diagnosis is correlated with unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia." Pediatr Hematol Oncol **28**(2): 91-99.
- Wulf, G. G., R. Y. Wang, et al. (2001). "A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia." Blood **98**(4): 1166-1173.
- Xu, Q., S. E. Simpson, et al. (2003). "Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation." Blood **102**(3): 972-980.
- Yang, D., F. Cao, et al. (2013). "Arsenic trioxide inhibits the Hedgehog pathway which is aberrantly activated in acute promyelocytic leukemia." Acta Haematol **130**(4): 260-267.
- Zhang, L., S. Yang, et al. (2010). "Fluorouracil selectively enriches stem-like leukemic cells in a leukemic cell line." Int J Biol Sci **6**(5): 419-427.
- Zhang, X. W., X. J. Yan, et al. (2010). "Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML." Science **328**(5975): 240-243.

Zhang, Z., Y. Chen, et al. (2013). "Determination of arsenic metabolites in patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide." Leuk Lymphoma **54**(9): 2041-2046.

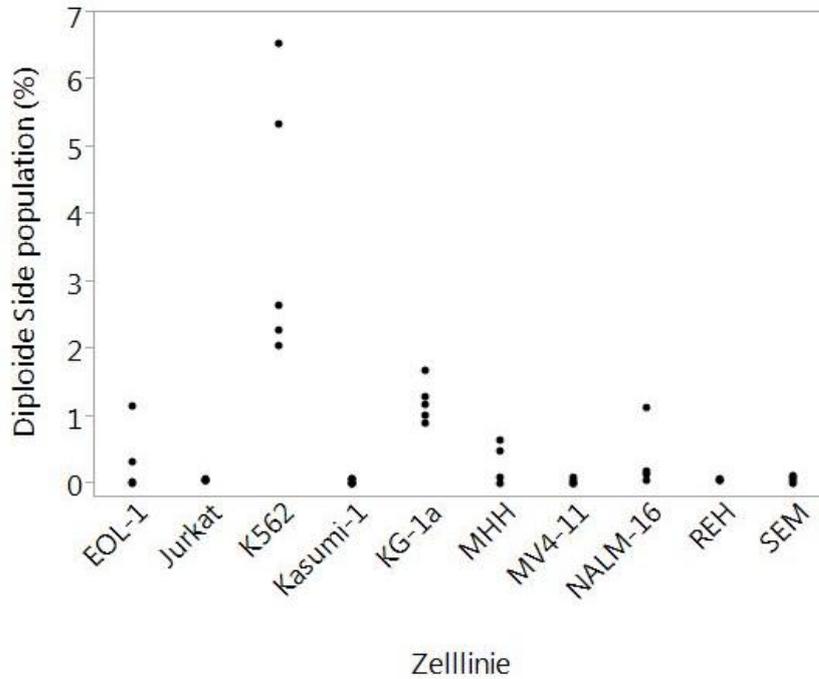
Zhou, J. (2012). "Arsenic trioxide: an ancient drug revived." Chin Med J (Engl) **125**(19): 3556-3560.

Internet:

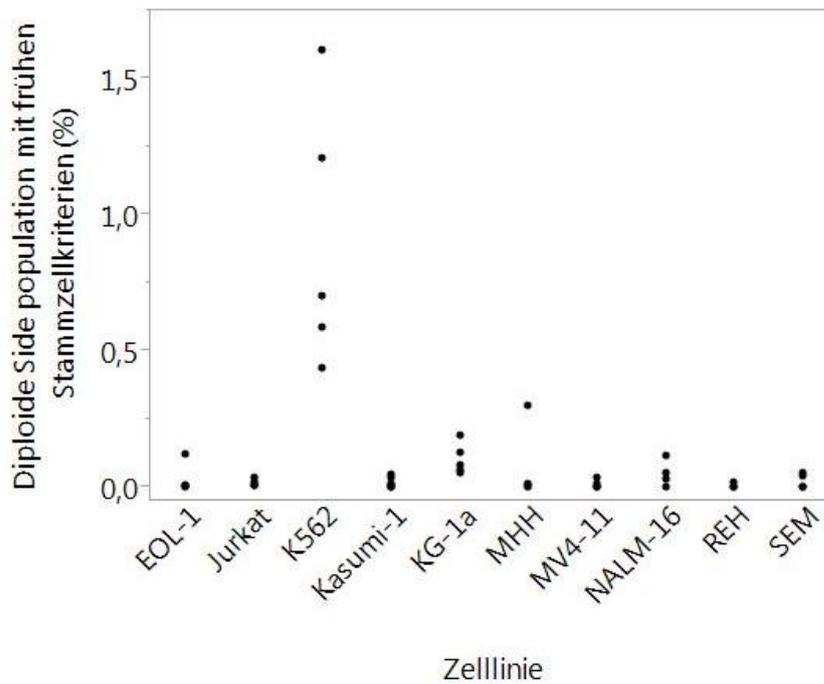
SEFREC (2014). Interaktive Datenbank zu serum-freien Medien und Zelllinien, www.sefrec.com (zuletzt abgerufen am 14.11.2014).

7 Anhang

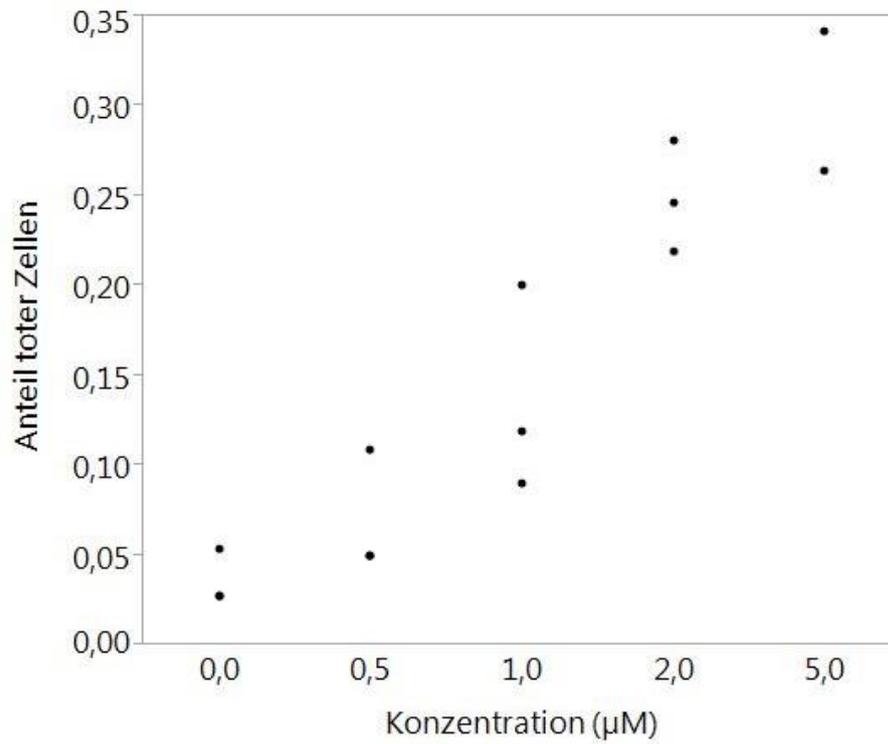
7.1 Einzelmessergebnisse



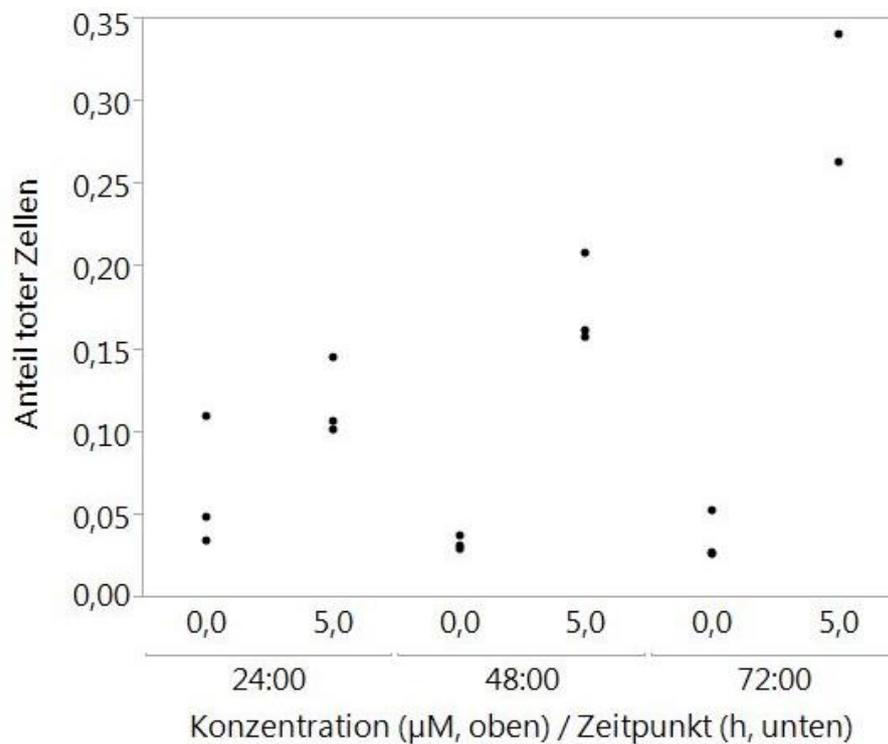
Alternative Abbildung 3-11 (7-1): Anteil der SP an den vitalen Zellen bei Zelllinien



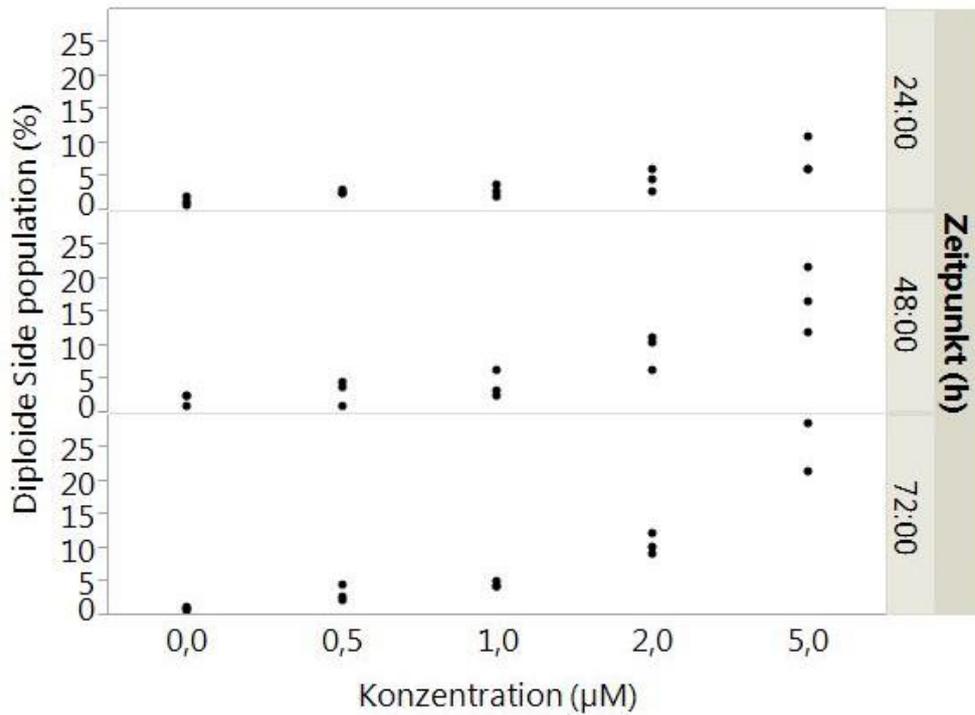
Alternative Abbildung 3-12 (7-2): Anteil der Early SP und Intermediate SP an den vitalen Zellen bei Zelllinien



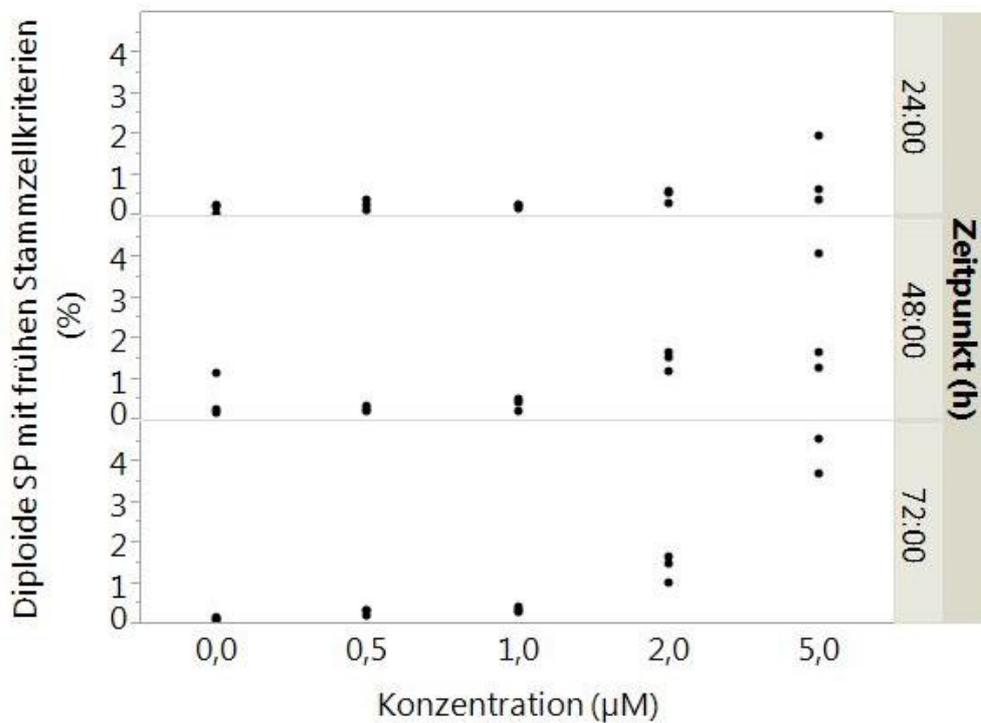
Alternative Abbildung 3-13 (7-3): Anteil der toten Zellen an den Singlets in Abhängigkeit von der ATO-Konzentration



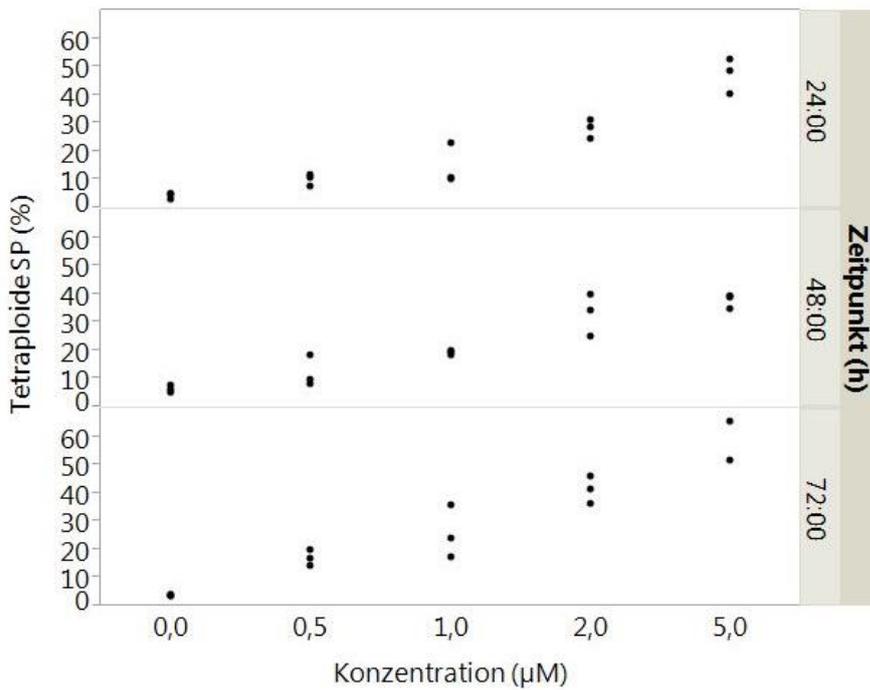
Alternative Abbildung 3-14 (7-4): Anteil der toten Zellen an den Singlets in Abhängigkeit von der ATO-Behandlungsdauer



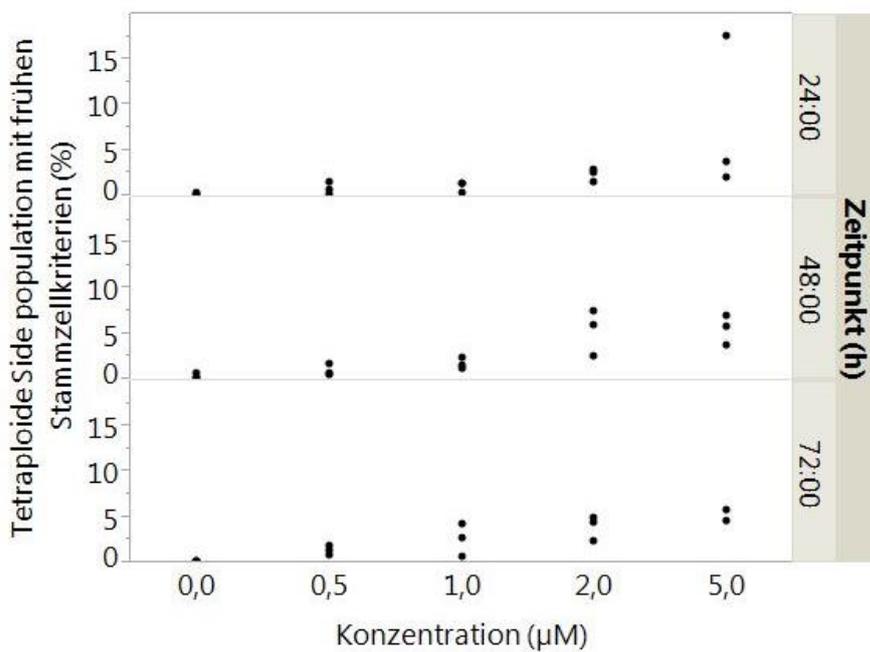
Alternative Abbildung 3-15 (7-5): Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer



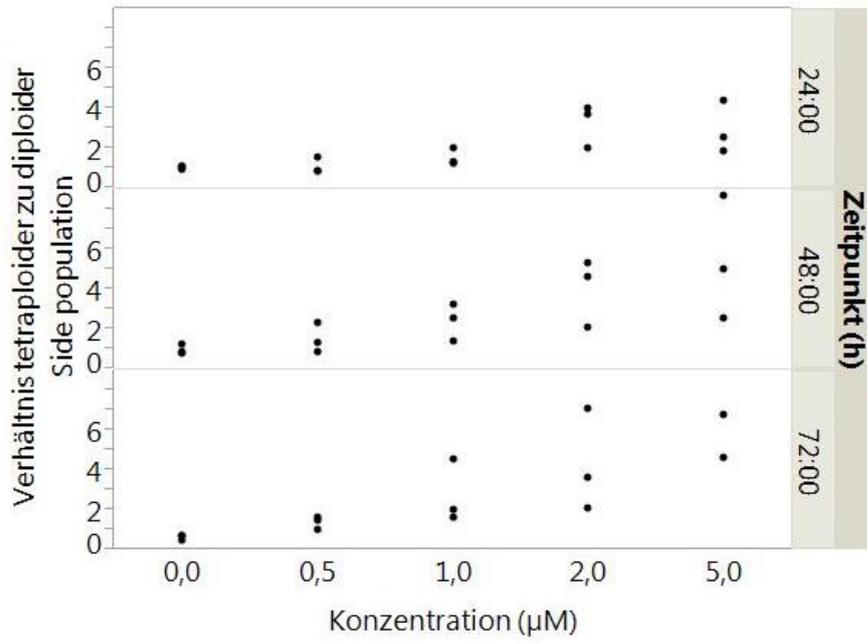
Alternative Abbildung 3-16 (7-6): Anteil der Early SP und Intermediate SP an der diploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer



Alternative Abbildung 3-17 (7-7): Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer



Alternative Abbildung 3-18 (7-8): Anteil der Early SP und Intermediate SP an der tetraploiden Hauptpopulation in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer



Alternative Abbildung 3-19 (7-9): Verhältnis der tetraploiden SP zur diploiden SP in Abhängigkeit von ATO-Konzentration und -Behandlungsdauer

7.2 Veröffentlichungen und Preise

Poster

Michael Mattes, Anja Schmitt, Kai Witte, Martin Ebinger (2014). Leukämie-induzierende Zellen verlassen ihre Quieszenz unter Arsentrioxid-Therapie in einer AML-Zelllinie. Süddeutscher Kongress für Kinder- und Jugendmedizin. Fellbach 2014, Deutschland.

Michael Mattes, Anja Schmitt, Kai Witte, Martin Ebinger (2012). Manipulation der Stammzellfraktion akuter Leukämien in Zelllinien. Forschungskolloquium der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen im Rahmen des IZKF Promotionskolleg 2012. Tübingen, Deutschland.

Vorträge

Michael Mattes, Martin Ebinger (2012). Manipulation der Stammzellfraktion der AML des Kindesalters im NSG Mausmodell. IZKF Promotionskolleg 2012. Tübingen, Deutschland.

Stipendien und Preise

Studienstipendium des Evangelischen Studienwerks Villigst e.V. (2009-2015).

Studienstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes e.V. (2009-2015).

Promotionsstipendium im Rahmen des IZKF Promotionskollegs der Eberhard Karls Universität Tübingen (2012).

2. Posterpreis der Süddeutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin für das Poster „Leukämie-induzierende Zellen verlassen ihre Quieszenz unter Arsentrioxid-Therapie in einer AML-Zelllinie“ (2014).

8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Messungen wurden in der Zeit von März 2012 bis März 2013 im Labor der Universitätskinderklinik Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. Rupert Handgretinger und unter Betreuung von PD Dr. Martin Ebinger, Dipl.-Biol. Kai Witte und Dipl.-Biochem. Anja Schmitt durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Ebinger, Kai Witte und Anja Schmitt. Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Kai Witte und Anja Schmitt von mir mit Unterstützung durch Anja Schmitt durchgeführt. Die statistische Darstellung und Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie in Tübingen. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

9 Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Handgretinger für die freundliche Aufnahme in die Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin sowie die Annahme als Doktorrand.

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Martin Ebinger, dessen zuverlässiger und äußerst freundlicher Begleitung ich mir stets gewiss sein durfte. Durch seine lösungsorientierte, kompetente Unterstützung war er für mich wertvoller Ansprechpartner und eine große Motivation, die Arbeit mit Freude anzugehen und durchzuführen. Die Erfahrungen der Arbeitsgruppengespräche und Journal Clubs empfinde ich darüber hinaus als großes Geschenk.

Weiter gilt ein herzlicher Dank Kai Witte für die praktische Begleitung im Labor und die individuelle Unterstützung. Die herzliche Arbeitsatmosphäre und freundliche Hilfestellung behalte ich in guter Erinnerung. Ebenso möchte ich Anja Schmitt für die Einarbeitung ins Labor sowie die fachliche Unterstützung danken.

Die sehr gute Zusammenarbeit mit dem Personal des Routinelabors der Kinderklinik behalte ich in bester Erinnerung – vielen Dank.

Bei den Mitgliedern des IZKF-Promotionskollegs bedanke ich mich herzlich für die fachliche Unterstützung und den kollegialen Austausch untereinander. Für die Organisation und Durchführung sei insbesondere Prof. Dr. Marlies Knipper, Dr. Tanja Rieß sowie Dr. Inka Montero gedankt.

Für die ausführliche statistische Beratung bin ich Frau Aline Naumann, Diplom-Statistikerin vom Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie, sehr dankbar, die sogar ihren wohlverdienten Feierabend opferte.

Ganz besonders danke ich Sebastian Mattes, Bruder und Freund, für die geduldige Unterstützung und die humor- sowie vertrauensvolle Begleitung über die gesamte Zeit. Meiner Verwandtschaft, insbesondere meinen Eltern, sowie meinen Freunden danke ich herzlich für den steten Rückhalt während des gesamten Studiums. Ich bin Gott für jeden Tag mit ihnen dankbar.