

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Großhadern
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**EXPRESSION VON ZYTOKINREZEPTOREN,
ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND KOSTIMULATORISCHEN MOLEKÜLEN
UND
DEREN KLINISCHE RELEVANZ
BEI DER
AKUTEN MYELOISCHEN LEUKÄMIE.**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Michaela Graf**

**aus
Starnberg**

2002

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Helga Schmetzer (Dipl. Biol.)

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Mocikat
Priv. Doz. Dr. H.M. Diepolder
Prof. Dr. J. R. Bogner

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: -/-

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K.Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2002

*„Es ist nicht genug zu wissen,
man muss es auch anwenden.
Es ist nicht genug zu wollen,
man muss es auch tun.“*

(J.W.Goethe)

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
a	alpha
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
AML-CG	German AML-Cooperative-Group
AML-M1	AML-FAB-Typ M1
AML-M2	AML-FAB-Typ M2
AML-M3	AML-FAB-Typ M3
AML-M3v	AML-FAB-Typ M3-Variante
AML-M4	AML-FAB-Typ M4
AML-M4 _{Eo}	AML-FAB-Typ M4 mit Eosinophilie
AML-M5	AML-FAB-Typ M5
AML-M6	AML-FAB-Typ M6
AML-M7	AML-FAB-Typ M7
AML-M0	AML-FAB-Typ M0
APZ	antigenpräsentierende Zelle
AraC	Cytosin-Arabinosid
ATRA	all-trans-Retinsäure
b	beta
bcr	Bruchpunktregion („breakpoint-cluster-region“)
BFU-E	erythropoetische Vorläuferzellen („burst-forming-units“)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA	Karzinom
CCT	Kardiotropin-1
CD	Differenzierungsantigen („cluster of differentiation“)
CFU	hämoopoetische Vorläuferzellen („colony forming units“)
CFU-E	erythroide CFU
CFU-Eo	eosinophile CFU
CFU-GEMM	gemischt determinierte CFU
CFU-GM	granulozytäre / makrophagozytäre CFU
CNTF	ziliärer neurotroper Faktor
CR-3	Komplementrezeptor 3
CSF	Kolonie-stimulierender-Faktor
d	Tage („days“)
d.h.	das heißt
del	Deletion
der	Derivat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor („epidermic growth factor“)
EGIL	European Group for Immunological classification of Leukemia
EORTC	Europäische Organisation für die Erforschung („research“) und Behandlung („treatment“) von Krebs („cancer“)
Fa.	Firma
FAB	Französisch-Amerikanisch-Britisch
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-R	Rezeptor für FL
g	gamma
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	Granulozyten/Macrophagen-CSF
HAM	Mitoxantron + AraC
HGF	hämoopoetischer Wachstumsfaktor („hemopoietic growth factor“)
HLA	siehe MHC
HPZ	hämoopoetische Progenitorzelle
H-IL-6	Hyper-Interleukin-6
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ins	Insertion
inv	Inversion
iz.	immunzytologisch bestimmt
Kap.	Kapitel
KM	Knochenmark
KM-MNZ	mononukleäre Zellen, aus dem KM gewonnen
KMT	Knochenmarkstransplantation
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzelle
LDH	Laktatdehydrogenase
LDV-Region	Leucin-Aspartat-Valin-Region
LFA-1	Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen-1
LIF	Leukämie-inhibierender-Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
L-Selektin	Leukozyten-Selektin
µl	Mikroliter
m±s	Mittelwert ± Standardabweichung
Mac-1	Makrophagen-Differenzierungs-Antigen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIC	Morphologie, Immunologie, Zytogenetik
min	Minute
ml	Milliliter
MNZ	mononukleäre Zelle
n	Fallzahl
n.d.	nicht durchgeführt
NCAM	Nervenzell-Adhäsionsmolekül
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NSE	nicht spezifische Esterase
p	Wahrscheinlichkeit ("probability")
p-Arm	kurzer Arm des Chromosoms
p-Wert	Wahrscheinlichkeits-Wert
pAML	primäre AML
PAS	Periodic Acid Schiff
PB	peripheres Blut
PBS	Phosphat-gepufferte ("buffered") Saline
PCLP-1	Podocalyxin ähnliches Protein
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	von Thrombozyten abstammender Wachstumsfaktor („platelet derived growth factor“)
PE	Phycoerythrin
PE-CY5	PE-Cy5-Tandemkonjugation
PML	Promyelozytenleukämie (= FAB Typ M3)
POX	Myeloperoxidase
PRR	dem Poliovirus-Rezeptor-zugeordnetes-Protein
q-Arm	langer Arm eines Chromosoms
r	rekombinant
R	Rezeptor
Rara	Retinsäurerezeptor alpha
RGD-Region	Arginin-Glycin-Asparat-Region
S-Phase	Synthese-Phase
sAML	sekundäre AML
SCF	Stammzell-Faktor
SCF-R	Stammzellfaktor-Rezeptor
sog.	sogenannt
t(9;22)(q34;q11)	Translokation zwischen den Chromosomen 9 (Bruchpunkt am q-Arm, Bande q34) und 22 (Bruchpunkt am q-Arm, Bande q11)
Tab.	Tabelle
TAD	9-Thioguanin + AraC + Daunorubizin
TGF	transformierender Wachstums-("growth") Faktor
TNF	Tumornekrosefaktor

U	Einheit ("unit")
UPA-R	Urokinasetyp-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
v.a.	vor allem
VCAM	vasculäres Zell-Adhäsionsmolekül
VLA	sehr spät exprimiertes ("very late") Antigen = β_1 -Integrine

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG..... 1

2. EINLEITUNG..... 3

2.1. DIE AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE.....	3
2.1.1. DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE.....	3
2.1.2. DAS KRANKHEITSBILD	3
2.1.3. ÄTIOLOGIE	4
2.1.4. PATHOGENESE	4
2.1.5. MECHANISMEN VERMINDERTER IMMUNANTWORT	5
2.1.6. DIAGNOSTIK UND KLASSIFIKATION.....	7
2.1.6.1. Unterscheidung nach der Ätiologie: Die primäre und sekundäre AML.....	7
2.1.6.2. Klassifikation nach Morphologie, Zytochemie, Immunphänotyp und Zytogenetik	7
2.1.6.3. Diagnostik der minimalen Residualleukämie	10
2.1.7. PROGNOSEKRITERIEN	10
2.1.7.1. Allgemeine Prognosekriterien.....	10
2.1.7.2. Zytogenetische Risikogruppen	10
2.1.8. THERAPIE	11
2.1.8.1. Chemotherapie nach der Münsteraner Gruppe (AML-CG).....	11
2.1.8.2. Knochenmarkstransplantation	11
2.1.8.3. Klinische Bedeutung von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen.....	11
2.2. DIE ROLLE DER ADHÄSIONSMOLEKÜLE UND DER ZYTOKINREZEPTOREN	13
2.2.1. AUFBAU DES KNOCHENMARKS.....	13
2.2.1.1. Die Zellen der Hämpoese	13
2.2.1.2. Das Knochenmarksstroma.....	15
2.2.2. DIE ROLLE DER HÄMPOETISCHEN ZYTOKINREZEPTOREN	16
2.2.2.1. SCF-R (CD117).....	16
2.2.2.2. FL-R (CD135)	17
2.2.2.3. IL-3-R (CD123).....	18
2.2.2.4. GM-CSF-R (CD116).....	19
2.2.2.5. G-CSF-R (CD114)	20
2.2.2.6. gp130-Subunit (CD130).....	21
2.2.2.7. Funktionelle Einteilung der Zytokinrezeptoren.....	21
2.2.3. DIE ROLLE DER ADHÄSIONSMOLEKÜLE IM KNOCHENMARK	22
2.2.3.1. L-Selektin (CD62L)	23
2.2.3.2. Integrine - Allgemeines	24
2.2.3.3. VLA-2 und VLA-3	24
2.2.3.4. LFA-1(CD11a).....	25
2.2.3.5. Mac-1 (CD11b)	26
2.2.3.6. ICAM-1 (CD54)	27
2.2.3.7. LFA-3 (CD58).....	27
2.2.3.8. NCAM (CD56).....	28
2.2.3.9. B7-1 (CD80)	29
2.2.3.10. B7-2 (CD86)	29
2.2.3.12. PRR-1 und PRR-2.....	30
2.2.3.13. UPA-R (CD87).....	30
2.2.3.14. Funktionelle Einteilung der Adhäsionsmoleküle	31
2.3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	35

3. MATERIAL UND METHODEN..... 36

3.1.	AUSWAHL DES PATIENTENKOLLEKTIVS	36
3.2.	VERARBEITUNG DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS	36
3.3.	MORPHOLOGISCHE UND ZYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN	36
3.4.	IMMUNZITOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN	37
3.5.	ZYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN	38
3.6.	STATISTISCHE BERECHNUNGEN	38

4. ERGEBNISSE..... 40

4.1.	ANTIGENEXPRESSION IN KM-PROBEN VON AML-PATIENTEN UND GESUNDEN PROBANDEN.....	40
4.1.1.	ZYTOKINREZEPTOREN	40
4.1.2.	ADHÄSIONSMOLEKÜLE.....	42
4.2.	ANTIGENEXPRESSION BEI PRIMÄRER UND SEKUNDÄRER AML.....	44
4.2.1.	ZYTOKINREZEPTOREN	44
4.2.2.	ADHÄSIONSMOLEKÜLE.....	45
4.3.	ANTIGENEXPRESSION INNERHALB VERSCHIEDENER FAB-TYPEN.....	47
4.3.1.	ZYTOKINREZEPTOREN	47
4.3.2.	ADHÄSIONSMOLEKÜLE.....	50
4.4.	ANTIGENEXPRESSION IN ZYTOGENETISCHEN RISIKOGRUPPEN	54
4.4.1.	ZYTOKINREZEPTOREN	54
4.4.2.	ADHÄSIONSMOLEKÜLE.....	56
4.5.	ANTIGENEXPRESSION UND REMISSIONSWAHRSCHEINLICHKEIT	58
4.5.1.	ZYTOKINREZEPTOREN	58
4.5.2.	ADHÄSIONSMOLEKÜLE.....	59
4.6.	ANTIGENEXPRESSION UND PROGRESSFREIE ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT	61
4.6.1.	ZYTOKINREZEPTOREN	61
4.6.2.	ADHÄSIONSMOLEKÜLE.....	65

5. DISKUSSION..... 68

5.1.	SYSTEMATISCHE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN AML- UND GESUNDEN KM-PROBEN	68
5.2.	SPEZIFISCHE UNTERSCHIEDE INNERHALB VON AML-SUBTYPEN	71
5.3.	PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG DER EXPRESSION VON ZYTOKINREZEPTOREN UND ADHÄSIONSMOLEKÜLE.....	74
5.3.1.	NIEDRIGE REMISSIONSWAHRSCHEINLICHKEIT BEI VLA-2-, UPA-R- UND NCAM- POSITIVEN AML-FÄLLEN.....	74
5.3.2.	PROGRESSFREIE ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT	87
5.3.2.1.	Hohe Expression von FL-R und SCF-R korreliert mit kurzem progressfreien Überleben.....	76
5.3.2.2.	Hohe Expression kostimulatorischer Moleküle korreliert mit kurzem progressfreien Überleben.....	76
5.3.2.3.	Trotz Korrelation von Mac-1, L-Selektin und PRR-1 mit den zytogenetischen Risikogruppen besteht kein Einfluss auf die Dauer des progressfreien Überlebens.....	78
5.3.2.4.	SCF und FL erhöhen die Expression kostimulatorischer Moleküle auf AML-Blasten in vitro Einfluss auf progressfreie Überlebenszeit in vivo?.....	79

5.4. DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG DER EXPRESSION VON ZYTOKINREZEPTOREN UND ADHÄSIONSMOLEKÜLEN 79

5.4.1. DIE NCAM⁺LEUKÄMIE-EINE EIGENE ENTITÄT MIT PROGNOSTISCH SCHLECHTEM VERLAUF.....79

5.4.2. DIAGNOSTIK DER MINIMALEN RESIDUALLEUKÄMIE.....80

5.5. THERAPEUTISCHE RELEVANZ DER EXPRESSION VON ZYTOKINREZEPTOREN UND ADHÄSIONSMOLEKÜLEN 80

5.5.1. THERAPEUTISCHE BEEINFLUSSBARKEIT VON ZYTOKINREZEPTOREN UND ADHÄSIONSMOLEKÜLEN80

5.5.2. GEZIELTES PRIMING81

5.5.3. VERKÜRZUNG DER NEUTROPENIEPHASE.....82

5.5.4. DIFFERENZIERUNGSTHERAPIE MIT G-CSF.....82

5.5.5. IMMUNTHERAPIE.....85

5.6. BEDEUTUNG VERÄNDERTER ZYTOKINREZEPTOR- UND ADHÄSIONSMOLEKÜL- EXPRESSION FÜR DIE BIOLOGIE DER AML85

5.6.1. UNKONTROLLIERTE PROLIFERATION AUFGRUND ERHÖHTER ZYTOKINREZEPTOR- EXPRESSION?.....85

5.6.2. VERMINDERTE MATURATION AUFGRUND VERMINDERTER EXPRESSION VON GM-CSF-R UND G-CSF-R?.....87

5.6.3. VERMINDERTE IMMUNANTWORT TROTZ EXPRESSION KOSTIMULATORISCHER MOLEKÜLE?.....88

5.6.4. BLASTENSCHUB AUFGRUND VERMINDERTER ADHÄSION AN DAS STROMA UND VERSTÄRKTER MIGRATION DURCH DAS ENDOTHEL?.....89

6. AUSBLICK..... 91

7. LITERATURVERZEICHNIS.....92

EIGENE PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....108

DANKSAGUNG.....109

LEBENS LAUF.....110

1. Zusammenfassung

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) stellen die unkontrollierte Proliferation und Reifungsblockade myeloider Vorläuferzellen, Expansion dieser Zellen in das periphere Blut, extramedulläre Manifestationen und verminderte Elimination der Leukämiezellen durch das Immunsystem grundlegende Pathomechanismen dar. Diese Vorgänge werden über ein komplexes Zusammenspiel von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen reguliert. In dieser Arbeit wurde daher mittels Durchflußzytometrie die Expression von Zytokinrezeptoren, Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen in Knochenmarks(KM-) Proben von 103 AML-Patienten bei Diagnosestellung und acht gesunden Probanden untersucht. Zytokinrezeptoren weisen bei der normalen Hämoese ein reifegradabhängiges und linienspezifisches Expressionsmuster auf. Es wurden daher zum einen Zytokinrezeptoren ausgewählt, die schon in der frühen Hämoese exprimiert werden, wie der SCF-R (CD117), FL-R (CD135), IL-3-R (CD123) und zum andern Zytokinrezeptoren, die erst in späteren Differenzierungsstadien der monozytären Zelllinie (v.a. GM-CSF-R; CD116) und der granulozytären Zelllinie (v.a. G-CSF-R, CD114) exprimiert werden. Die gp130-Subunit (CD130) stellt die signaltransduzierende Untereinheit von IL-6, IL-11, LIF etc. dar und wirkt synergistisch auf allen Stufen der Hämoese mit. Die untersuchten Adhäsionsmoleküle wurden in drei Gruppen unterteilt: a) Adhäsionsmoleküle, die den Kontakt zur KM-Matrix oder zu sich selbst beeinflussen: VLA-2 (CD49b), VLA-3 (CD49c) und die erst kürzlich auf hämoetischen Zellen gefundenen Adhäsionsmoleküle PRR-1 und PRR-2. b) Adhäsionsmoleküle, die den Kontakt zum Endothel fördern: LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b), L-Selektin (CD62L) und UPA-R (CD87) c) kostimulatorische Moleküle, die eine Rolle bei der Interaktion der Leukämiezellen mit immunkompetenten Zellen spielen: ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58), B7-1 (CD80), B7-2 (CD87) und NCAM (CD58). Eine KM-Probe wurde als positiv gewertet, wenn mehr als 20% der Blasten im Auswertefenster den entsprechenden Marker exprimierten.

Ergebnisse: Der durchschnittliche Anteil Zytokinrezeptoren exprimierender Zellen war in **KM-Proben von AML-Patienten** deutlich höher als in **KM-Proben von gesunden Probanden**. Einzige Ausnahme bildete die gp130-Subunit, die nur auf durchschnittlich 4% der AML-Blasten exprimiert wurde, während durchschnittlich 23% der Zellen in gesunden KM-Proben die gp130-Subunit exprimierten. Bei den Adhäsionsmolekülen zeigte sich im Vergleich zu den gesunden KM-Proben bei der AML ein höherer Anteil von Zellen, die kostimulatorische und Endothel-Kontakt-fördernde Moleküle exprimierten, während der Anteil von Zellen, die das Stroma-Kontakt-fördernde β 1-Integrin VLA-2 exprimierten, vermindert war. VLA-3 konnte dagegen in keinem der untersuchten AML-Fälle und der gesunden KM-Proben als positiv gewertet werden.

Innerhalb der AML-Subtypen konnte ein reifegrad- und linienspezifisches (monozytäres, granulozytäres) Verteilungsmuster der Zytokinrezeptoren festgestellt werden: Blasten unreifer Leukämien (M0; M1) exprimierten bevorzugt SCF-R und FL-R. Blasten von AML-Subtypen, die der granulozytären Differenzierungslinie zugeordnet werden (M2, M3), exprimierten v.a. G-CSF-R. Blasten monozytärer Leukämien (M4, M5) exprimierten v.a. GM-CSF-R und FL-R. Der IL-3-R wurde in fast allen AML-KM-Proben auf einem Großteil der Blasten exprimiert. Den größten Anteil positiver Zellen für Adhäsions- und kostimulatorische Moleküle (Integrine, B7-2, NCAM, UPA-R) wiesen die monozytären Leukämien auf. B7-1 wurde v.a. auf Blasten des FAB-Typs M3 exprimiert. L-Selektin, ICAM-1 und PRR-1/PRR-2 zeigten eine variable Expression innerhalb aller FAB-Typen. In der Gruppe der sekundären Leukämien waren signifikant mehr Fälle Mac-1-positiv als in der Gruppe der primären Leukämien ($p = 0.074$, Qui²-Test). Ansonsten zeigten sich zwischen primären und sekundären Leukämien keine signifikanten Unterschiede.

Wichtig für die Entscheidung über Art und Intensität der Therapie bei der AML ist das Abschätzen der **Prognose** eines Patienten bei Diagnosestellung. Bislang werden Patienten v.a. anhand zytogenetischer Untersuchungen von Karyotypanomalien in Prognosegruppen eingeteilt. Da aber nur ca. 50-60% der AML-Patienten chromosomale Veränderungen aufweisen, besteht ein Bedarf an Karyotyp-unabhängigen Prognosekriterien. Zytogenetische Analysen wurden bei allen AML-KM-Proben durchgeführt und die Expression der Marker sowohl mit den zytogenetischen Risikogruppen als auch mit dem tatsächlichen klinischen Verlauf der Patienten korreliert. In die klinische Auswertung wurden nur Patienten ($n = 55$) eingeschlossen, die nach dem Therapieprotokoll der German AML-Cooperative-Group behandelt worden waren. In der zytogenetisch günstigen Prognosegruppe zeigten sich im Vergleich zur zytogenetisch ungünstigen Prognosegruppe signifikant mehr G-CSF-R-positive Zellen ($p = 0.027$, T-Test), signifikant weniger L-Selektin-positive Fälle ($p = 0.037$, Qui²-Test) und signifikant mehr Mac-1- und PRR-1-positive Fälle ($p = 0.005$; $p = 0.009$; Qui²-Test). Diese Marker zeigten aber keine signifikanten Unterschiede bezüglich Remissionrate und progressfreier Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten. Dies läßt sich auf die zum Teil geringe Fallzahl und die kurze Beobachtungsdauer von im Mittel 11 Monaten nach Remission erklären.

Andere Marker zeigten dagegen keine Korrelation mit den zytogenetischen Risikogruppen, dagegen aber mit dem tatsächlichen klinischen Verlauf der Patienten: VLA-2-, NCAM-, UPA-R-positive Leukämien zeigten eine signifikant niedrigere Remissionsrate ($p = 0.049$, $p = 0.03$, $p = 0.03$, Qui²-Test). Patienten, in deren KM-Proben >85% der Blasten den FL-R oder >45,5% den SCF-R exprimierten, wiesen eine signifikant niedrigere Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben auf, ebenso wie Patienten, in deren KM-Proben >60,5% der Blasten ICAM-1-, >15% B7-1-, >65% B7-2- und >8% NCAM-positiv waren. NCAM korrelierte als einziger Marker negativ sowohl mit der Remissionsrate, als auch mit der progressfreien Überlebenswahrscheinlichkeit, allerdings nicht mit der Einteilung in zytogenetische Risikogruppen. Auch für die übrigen Marker konnten Cut-off-Werte für den Anteil Marker-positiver Blasten ermittelt werden, bei denen aus dem Vergleich der entstandenen Gruppen ein deutlicher Unterschied in der Dauer der progressfreien Überlebenszeit hervorging. Diese Unterschiede waren allerdings aufgrund der geringen Fallzahl nicht signifikant, so dass sich eine eindeutige prognostische Aussagen nicht treffen ließ. Dabei wiesen Patienten mit einem höheren Anteil von G-CSF-R-, GM-CSF-R- und einem niedrigeren Anteil von IL-3-R-exprimierenden Blasten eine längere progressfreie Überlebenszeit auf. Patienten mit sehr hohem Anteil PRR-2- oder mit geringem Anteil PRR-1-positiver Blasten tendierten zu einer eher kürzeren progressfreien Überlebenszeit. Umgekehrt wies eine niedrige Expression von Endothel-Kontakt fördernden Oberflächenmolekülen, wie z.B. L-Selektin, Mac-1 und UPA-R auf eine schlechte Prognose hinsichtlich der Dauer des progressfreien Überlebens hin.

Therapeutische Konsequenzen: Die in dieser Arbeit aufgezeigten Zusammenhänge zwischen der Expression bestimmter Oberflächenmarker und dem klinischen Verlauf der Patienten helfen, die **Prognoseeinschätzung von Patienten - über die Zytogenetik hinaus - weiter zu spezifizieren**: So stellt die NCAM-positive Leukämie eine eigene Entität mit prognostisch schlechtem Verlauf unabhängig vom Karyotyp dar. Bei UPA-R- und/oder VLA-2-positiven AML-Fällen sollten aufgrund der verminderten Remissionswahrscheinlichkeit intensivere therapeutische Induktionstherapien eingeleitet werden. Für die Remissionsdauer ist sowohl die hohe Expression kostimulatorischer Moleküle, als auch die hohe Expression von Zytokinrezeptoren, die v.a. auf Stammzebene wirksam sind und die die Expression von diesen kostimulatorischen Molekülen fördern, prognostisch ungünstig. Diese Patienten sollten bei intensiver Konsolidierungstherapie engmaschig kontrolliert werden und die Indikation zur Knochenmarkstransplantation sollte frühzeitig gestellt werden.

In der **Zytokintherapie** werden G-CSF und GM-CSF regelmäßig in der Klinik zur Verkürzung der Neutropeniephase nach Chemotherapie eingesetzt. Dagegen konnte mit dem Einsatz von G-CSF und GM-CSF als Priming-Medikamente bisher noch kein eindeutiger klinischer Benefit für die Patienten erzielt werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse einer linienspezifischen und reifegradabhängigen Expression der Zytokinrezeptoren legen nahe, dass G-CSF als Primingmedikament v.a. bei granulozytär-differenzierten AML-Subtypen und GM-CSF eher bei monozytär-differenzierten AML-Subtypen eingesetzt werden sollte. In der Supportivtherapie, bei der die Stimulation von AML-Blasten *nicht* mehr gewünscht ist, sollten G- und GM-CSF genau umgekehrt eingesetzt werden. Da eine hohe Expression von FL-R und SCF-R mit einer schlechten Prognose für die Dauer des progressfreien Überlebens korrelierte, kann sich eine Stimulation dieser Rezeptoren durch die Gabe von SCF und FL in der Supportivtherapie eher ungünstig auswirken, ebenso wie beim Priming, da auch gesunde Stammzellen stimuliert und damit sensibler gegen Zytostatika werden.

Darüber hinaus geben diese Ergebnisse auch Hinweise auf mögliche **pathobiologische Bedeutungen** und damit verbundener neuer therapeutischer Strategien bei der AML: So kann die erhöhte FL-R-Expression - wie bei der Tandemduplikation des FL-R auch - zu einer erhöhten, prognostisch ungünstigen Phosphorylierung von Tyrosinkinasen führen. Auch der SCF-R aktiviert intrazellulär Tyrosinkinasen. Neue Medikamente, wie z.B. Tyrosinkinase-Inhibitoren, oder Dexamethason, das die FL-R-Expression auf den AML-Blasten herunterreguliert, könnten bei diesen AML-Patienten neue benefit-bringende therapeutische Möglichkeiten darstellen. Ebenso scheint die Immunantwort bei AML-Patienten trotz, oder vielleicht sogar gerade bei Expression von kostimulatorischen Molekülen vermindert zu sein, was die Gabe von immunstimulierenden Medikamenten, wie rIL-2 oder CTLA-4-Inhibitoren im Bereich der Immuntherapie sinnvoll erscheinen lässt. So leistet diese Arbeit nicht nur einen Beitrag zur Diagnostik, Prognose und Biologie der AML, sondern entwickelt in Zusammenschau mit bereits publizierten Daten neue, therapeutische Möglichkeiten für die Behandlung der AML.

2. Einleitung

2.1. Die akute myeloische Leukämie

2.1.1. Definition und Epidemiologie

Der Begriff Leukämie (‘weißes Blut’) geht auf R. Virchow 1845 zurück und bezieht sich auf die verbreiterte, weiße Leukozytenmanschette (‘buffy coat’ auf der Erythrozytensäule nach Zentrifugieren des Blutes) bei Leukämiepatienten mit sehr hohen Leukozytenzahlen (Herold, 1998).

Leukämien sind definiert als maligne Neoplasien der hämatopoetischen Zellen. Sie werden heute als klonale Erkrankung aufgefasst. Nach einer klinisch inapparenten Phase der Proliferation kommt es zu einer Expansion des malignen Zellklons mit generalisierter Ausbreitung im gesamten hämatopoetischen Gewebe, Übergreifen auf extramedulläre Organe und Ausschwemmung leukämischer Zellen in das periphere Blut (Wilms K, 1984). Durch diese Akkumulation unreifer Vorläuferzellen (‘Blasten’) im Knochenmark (KM) und peripheren Blut (PB) werden gesunde, funktionsfähige, hämopoetische Zellen zurückgedrängt und es kommt zur Knochenmarksinsuffizienz, die mit Anämie, Thrombozytopenie, Granulozytopenie und den entsprechenden klinischen Folgeerscheinungen einhergeht.

Die Einteilung der Leukämien erfolgt zum einem nach dem Zelltyp, von dem die Leukämiezellen abstammen (lymphatisch/myeloisch), nach dem Differenzierungsgrad der pathologischen Zellen (reifzellig / unreifzellig), nach dem Krankheitsverlauf (chronisch/akut), sowie nach der Ätiologie (primär/sekundär).

Bei der akuten myeloischen Leukämie handelt es sich um eine klonale neoplastische Transformation auf der Ebene myeloischer, hämopoetischer Vorläuferzellen und anschließende Ausschwemmung dieses malignen Zellklons. Typisch ist die fehlende weitere Ausreifung dieser Zellen, die Proliferation unabhängig von physiologischen Regulierungsmechanismen und die Ausdehnung auf extramedulläre Organe. Die neoplastische Zellpopulation bei der akuten myeloischen Leukämie ist also durch **eine** unreife Blastenpopulation repräsentiert. Diese ‘Lücke’ in der Reifungsreihe der Granulozyten mit Vorherrschen unreifer Paramyelozyten und gesunder, ausdifferenzierter Granulozyten bei starker Verminderung der Zwischenstufen wird als ‘hiatus leucaemicus’ bezeichnet.

Die AML ist mit 80% der AML-Fälle zwischen dem 60. und 65. Lebensjahr eine Erkrankung des höheren Erwachsenenalters. Die Inzidenz liegt insgesamt bei ca 5/100000 Einwohnern pro Jahr, 10/100000 bei den über 70-jährigen (Schön D, 1996) und 0,6/100000 bei den unter 15-jährigen (Graf N, 1995). Die AML findet sich 1,5 mal häufiger beim männlichen als beim weiblichen Geschlecht. Frauen mit der Blutgruppe 0 haben eine geringere Erkrankungswahrscheinlichkeit (Jackson N, 1999).

2.1.2. Das Krankheitsbild

Das Krankheitsbild ist in erster Linie Ausdruck der hämopoetischen Insuffizienz und in zweiter Linie der Zellinfiltration von Organen und Geweben. Der Beginn ist meist plötzlich (‘akut’) und alarmierend. Neben Allgemeinsymptomen wie Mattigkeit, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, Kopfschmerzen und Schlaflosigkeit besteht als Folge der Verminderung funktionstüchtiger Leukozyten eine erhöhte Infektionsbereitschaft, die sich in nekrotisierender Tonsillitis, Stomatitis, Mundsoor, Zahnfleischnekrosen, Noma der Wangen und Gangrän des harten Gaumens manifestieren kann. Nicht selten entwickeln die Patienten schwer therapierbare, perianale Abszesse, die von entzündeten, thrombosierte Hämorrhoidalknoten ausgehen. Auch ohne nachweisbare entzündliche Veränderung tritt oft hohes Fieber auf. Dieses, möglicherweise durch den Krankheitsprozess selbst verursachte (systemische) Fieber zeigt mit morgendlich hohen und abendlich niedrigeren Temperaturen einen vom üblichen Fieberverlauf abweichenden Rhythmus. Aufgrund der ebenfalls verminderten Thrombozytenzahlen sowie durch einen Mangel an Gerinnungsfaktoren bei gesteigerter Fibrinolyseaktivität leiden die Patienten an einer z.T. lebensbedrohenden Blutungsbereitschaft. Lymphknoten, Milz und Leber sind nur selten vergrößert. (Büchner T, 1997; Begemann M, 1999) Eine Beteiligung des zentralen Nervensystems ist selten. 5-7% der Patienten zeigen jedoch asymptomatisch leukämische Blasten im Liquor cerebrospinalis (Dekker AW, 1985). Das zerebrale Leukostase-Syndrom, bei dem zu Verschlüssen kleiner Gehirngefäße durch Blasten bei sehr hoher Leukozytose kommt, tritt v.a. bei Kindern mit Monoblastenleukämien auf.

Monozytäre Leukämien (M4/M5) disponieren zur Infiltrationen von Organen und Geweben mit Lymphomen, Hepatosplenomegalie, Hautinfiltrationen und Gingivahyperplasie. Für den FAB-Typ M4 ist eine Häufung

tumoröser Infiltrationen des zentralen Nervensystems beschrieben (Holmes R, 1985). Typisch bei der M3 ist die hämorrhagische Diathese mit Thrombozytopenie, Fibrinogenmangel und anderen Gerinnungsdefekten aufgrund Freisetzung prokoagulatorischer Substanzen aus den promyelozytären Granula (Imaoka S, 1986; Wejemmans PW, 1989).

2.1.3. Ätiologie

Neuere Erkenntnisse haben zur Aufklärung der multifaktoriellen Ätiologie der AML beigetragen, auch wenn die genauen Abläufe der meisten leukämischen Transformationen noch nicht bis ins Detail erforscht sind. Bereits seit 1928 wurde bei Arbeitern, die vermehrt Kontakt zu **Benzol** hatten, eine erhöhte Erkrankungshäufigkeit an AML festgestellt (Austin H, 1988). Auch die Aufnahme von **alkylierender Substanzen** in der Nahrung sowie im Zigarettenrauch erhöht das Erkrankungsrisiko.

Lange bekannt ist, daß Kinder mit Down-Syndrom (Trisomie 21) ein 10 – 20-fach erhöhtes Risiko haben, im ersten Lebensjahrzehnt an einer AML zu erkranken (Rosner F, 1972). Eine erhöhte **genetische Disposition** zur AML besteht auch bei anderen hämatologischen-immunologischen Erkrankungen, die mit chromosomalen Aberrationen oder 'chromosomal breakage'- Syndromen einhergehen, wie z.B. das Bloom-Syndrom (Poppe B, 2001), die Fanconi- (Auerbach AD, 1992) und die Diamond-Blackfan-Anämie (Freedman MH, 2000), dem Kostmann Syndrom (Rosen RB, 1979) und der Ataxia teleangiectasia (Seidemann K, 2000).

Retrovirusinfektionen, deren genetische Information in das Genom integriert wird und zu onkogenen Fehlregulationen führen kann, wurden v.a. bei zahlreichen Tierleukämien als Auslöser für AML nachgewiesen (Largaespada DA, 2000). In letzter Zeit wurde die Koinkidenz von HIV-Infektionen und AML, v.a. des FAB-Typs M4 und M5 berichtet (Hentrich M, 2000).

Zu den am besten untersuchten Leukämie- und AML-auslösenden Umweltfaktoren zählen **Röntgen- und ionisierende Strahlen**, wie sie nach Radiotherapie des Morbus Bechterew (Darby SC, 1987), nach Anwendung von Thorotrast als Röntgenkontrastmittel (Janower ML, 1972), sowie nach dem Atombombenabwürfen in Hiroshima und Nagasaki (Ichimaru M, 1978), als auch nach dem Reaktorunfall in Tschernobyl im Jahre 1986 (Mole RH, 1991) beobachtet wurden. Ein etwas erhöhtes Erkrankungsrisiko zeigte sich auch nach Anwendung des Antibiotikums Chloramphenicol (Cohen HJ, 1973) und des NSARs Penylbutazon (Friedman GD, 1982).

Ein besonderes Problem stellen in der modernen Onkologie sekundäre AML-Erkrankungen dar, die infolge einer **Chemotherapie mit oder ohne Radiotherapie** einer anderen Neoplasie mit einer Häufigkeit von 10-15% auftreten. Dabei werden ursächlich die Gruppe der alkylierenden Substanzen (Mechloretamin, Cyclophosphamid, Busulfan, Chlorambucil, BCNU, CCNU) von Substanzen mit Wirkung auf die DNS-Topoisomerase II (Etoposid, Teniposid, Anthracycline) unterschieden. V.a. nach Therapie mit Cyclophosphamid des Morbus Hodgkins (Pedersen-Bjergaard J, 1984), mit Teniposid oder Etoposid der ALL im Kindesalter (Pui CH, 1989), mit Chlorambucil bei Polycythämien (Kwong YL, 1996) und mit Melphalan bei Myelomen (Cuzick J, 1987) wurde eine erhöhte AML-Inzidenz berichtet. In diesen Fällen geht üblicherweise bis zum Ausbruch der AML eine myelodepressive Phase voraus.

2.1.4. Pathogenese

Um die Pathogenese der AML verstehen zu können, muss auf die spezifischen Eigenschaften der AML-Zellen eingegangen werden:

Bei der AML handelt es sich, wie bei den meisten Krebserkrankungen, um eine **genetische Erkrankung**, d.h. es findet eine meist postzygotische, genetische Transformation statt, die die Eigenschaften der ursprünglich gesunden Zelle beeinflusst. Viele dieser veränderten Gene sind in die Regulation von Zellwachstum, Ausreifung oder Apoptose involviert. Sie werden als Proto-Onkogene bezeichnet. Meist blockieren diese Protoonkogene die Funktion sog. Transskriptionsfaktoren, über die die hämopoetische Differenzierung gesteuert wird (z.B. AML1/ETO). Bei ca. 30% der AML-Patienten werden Mutationen der ras-Protoonkogene gefunden (Needleman SW, 1986; Farr CJ, 1988), das in die Vermittlung wachstumsfaktorabhängiger Signale (GTP-Stoffwechsel) involviert ist (Satoh T, 1991). Ebenso findet man bei 20-30% der AML-Zellen Mutationen des Wachstumsfaktorsrezeptors FL-R, was zur ligandunabhängigen Stimulation des Rezeptors und Apoptoseresistenz der Zellen führt (Kiyoi H, 1999). Durch zytogenetische Untersuchungen konnten spezifische, nicht zufällige, klonale, chromosomale Aberrationen bei der AML nachgewiesen werden und durch molekularbiologische Analyse der Chromosomenbruchpunkte weitere spezifische Gene nachgewiesen werden. Eine Übersicht hierzu gibt Tab. 2.1.3.1.

Weiterhin handelt es sich bei der AML um eine **klonale Erkrankung**: Im Gegensatz zu den gesunden Blutzellen stammen die AML-Zellen alle von einer einzigen, genetisch veränderten hämopoetischen

Vorläuferzelle ab (Fialkow PJ, 1987). Selten sind auch oligoklonale Fälle berichtet worden (**Schmetzer H, 1993**).

Während bei der chronisch myeloischen Leukämie die (genetisch transformierte) Ursprungszelle immer eine pluripotente Stammzelle ist (Fialkow PJ, 1967), kann sich die AML aus **verschiedenen Reifungsstufen der myeloischen Stammzellreihe** entwickeln. 2/3 aller AML-Zellen stammen von reiferen, hämopoetischen Vorläuferzellen als die pluripotenten Stammzellen ab. Diejenigen AML –Fälle, die ihren Ursprung in den pluripotenten Stammzellen haben, scheinen v.a. bei älteren Patienten und bei Patienten mit sekundärer Leukämie und/oder vorausgegangenem MDS aufzutreten (Fialkow PJ, 1981 und 1987). Dies erklärt die klinische, morphologische, immunphänotypische und molekulare Heterogenität der AML.

Nur eine **kleine Anzahl hochproliferativer, sich selbst regenerierender leukämischer Ausgangszellen** (sog. leukämische Stammzellen) produzieren eine große Anzahl unreifer, nicht funktionstüchtiger Leukämiezellen, die das KM ausfüllen und die normale Hämoese verdrängen (=klonale Expansion) (Köffler HP, 1980). Je höher der Grad der Selbsterneuerungskapazität in vitro der AML-CFU ist, desto prognostisch ungünstiger wird der Verlauf der Erkrankung gesehen (McCulloch EA, 1982). Funktionelle Zellzyklusanalysen zeigten, dass sich **nur ca 30% (oder weniger) der klonogenen AML-Blasten in der chemotherapiesensiblen S-Phase** befinden. Dieser Anteil kann allerdings durch die Gabe von Wachstumsfaktoren verstärkt werden (Cannistra SA, 1989).

Die meisten AML-Zellen benötigen Zytokine wie z.B. GM-CSF, G-CSF, IL-3, IL-1 um zu proliferieren. Einige AML-Zellen besitzen eine **autokrine HGF-Produktion**, so dass sie in vitro auch unabhängig von extern zugeführten HGFs proliferieren können (Young DC, 1986 & 1987; Kaufman DC 1988).

Tab. 2.1.4.1. Genetische Veränderungen bei der AML

Chromosomen-Aberration	Molekulargenetische Veränderung	FAB-Typ	Häufigkeit aller zytogenetisch untersuchten Fälle [%]
+8		alle Subtypen	3.3
-7		sAML	1.3
+21		Alle Subtypen	0.6
+11		Alle Subtypen	0.4
+9		Alle Subtypen	0.6
-Y		Alle Subtypen	0.4
-5	GM-CSF, IL3, IL4, M-CSF	sAML	1.0
t(8:21)	Fusionsgen AML1/ETO	M2 mit Auerstäbchen, M2 eo	8.3
t(15:17)	RARa-Gen	M3/ M3v (APL)	8.3
del(16q) und/oder inv(16)	Fusionsgen CBFβ/MYH11	M4eo	2.9
11q23- Aberration	Rearrangement des MLL-Gens	M5, auch M4 sAML	2.9
12p Aberration		M2eo, M4eo, sAML	1.5
5q- und 7q-Aberrationen	meist an Zytokin-Genen	sAML	1.3
t(9:22)	bcr/abl	M1 oder M2	0.6
t(6,9)	Fusionsgen DEK-CAN	M2, M4 mit Basophilen	0.2
Andere			20.2

t translokation, del Deletion, sAML sekundäre AML, eo eosinophil, FAB French American British

2.1.5. Mechanismen verminderter Immunantwort

Normalerweise erkennt und bekämpft das körpereigene Immunsystem in den Körper eingedrungene Mikroorganismen ebenso wie im Körper entstandene Krebszellen. Man unterscheidet dabei zelluläre von humoralen Mechanismen. Zu den humoralen Mechanismen werden die von B-Zellen gebildeten Antikörper, sowie Zytokine und Komplementfaktoren gezählt. Bei der Tumorabwehr spielen B-Zellen eine eher untergeordnete Rolle, obwohl tumorspezifische Antigene von Tumorzellen gebildet und mit Hilfe von Antikörpern bekämpft werden (Lloyd KO, 1989). Zur bei der Tumorabwehr bedeutenderen zellulären Abwehr zählen T-Zellen, die mit antigenpräsentierenden Zellen zusammenarbeiten (Harrison BD, 2001) und natürliche Killer (NK-) Zellen (Archimbaud E, 1992; Oblakowski P, 1990).

T-Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche den sogenannten T-Zell-Rezeptor (TZR) zur Antigenerkennung. Dabei unterscheidet man Zellen, die den alpha/beta TZR tragen und einen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-) restringierten Erkennungsmechanismus des Antigens aufweisen (Hirano N, 1996), von T-Zellen mit einem delta/gamma-TZR, der Antigene auch in nicht MHC-restringierter Form erkennen kann. Zytotoxische (CD8+)-T-Zellen erkennen v.a. MHC-I präsentierte Antigene und T-Helfer-(CD4+)-Zellen erkennen v.a. MHC-II

präsentierte Antigene. MHC-II kommt v.a. auf professionell antigenpräsentierenden Zellen vor und wird erst nach Aktivierung dieser Zellen auf der Oberfläche exprimiert. Nahezu alle kernhaltigen Zellen besitzen dagegen MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Werden also Fremdartige, wie sie z.B. bei der AML durch mutierte Genprodukte entstehen, auf MHC-I auf der Oberfläche präsentiert, so werden sie durch den TZR einer naiven T-Zelle erkannt. Eine effektive T-Zell-Antwort ist allerdings an das Vorhandensein bestimmter Adhäsions- und kostimulatorischer Moleküle gebunden, zu denen LFA-3, ICAM-1, B7-1 und B7-2 und NCAM auf der antigenpräsentierenden Zellen gehören, die an CD2, LFA-1, CD28 und NCAM auf den T-Zellen binden (Bruserud O, 1999). Ohne kostimulatorischen Kontakt werden die T-Zellen in einen anergen Zustand versetzt und es erfolgt keine effektive T-Zell-Antwort mehr, auch bei späterer Stimulation von CD28 (Allison JP, 1995). Die Kostimulation der T-Zelle bewirkt zum einen die Produktion von IL-2 und zum anderen eine erhöhte Expression von IL-2-Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zelle, wodurch sich die aktivierte T-Zelle autokrin zur Proliferation stimuliert. Bei externer Zugabe von IL-2 benötigen die T-Zellen meist kein kostimulatorisches Signal für ihre Aktivierung. Die jetzt aktivierten T-Lymphozyten weisen eine höhere Expression an CD2 und LFA-1 auf, so dass sie auch an Zellen binden können die weniger ICAM-1 oder LFA-3 exprimieren. Ein weiteres kostimulatorisches Signal ist von Zellen, die das erkannte Antigen auf ihrer Oberfläche exprimieren, jetzt nicht mehr notwendig, um die Zielzelle zu lysieren. T-Effektor-Zellen können zum einen durch die Sekretion von Toxinen (IFN α / IFN β) die Zielzelle lysieren, zum anderen durch die Produktion von Fas-Ligand den programmierten Zelltod der Zelle induzieren. T-Helfer-Zellen sezernieren meist Zytokine, die die Aktivierung von B-Zellen (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10), Makrophagen (TNF gamma, LT, TNF-beta), zytotoxischer T-Zellen (IL-2) fördert und die Produktion von Abwehrzellen im KM (GM-CSF und IL-3) steigert. Professionell antigenpräsentierende Zellen, wie z.B. dendritische Zellen (DC) können aufgrund ihrer hohen Expression von MHC-I- und MHC-II-, sowie kostimulatorischer Moleküle und Adhäsionsmoleküle besonders effektiv eine T-Zellaktivierung hervorrufen (Harrison BD, 2001)

NK-Zellen stellen ca. 10-15% der Gesamtpopulation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes dar und lassen sich als große lymphatische Zellen mit deutlich erkennbaren, intrazellulären Granula von anderen lymphatischen Zellen unterscheiden. NK-Zellen exprimieren neben einigen anderen T-Zell-Antigenen auf ihrer Oberfläche den Fc γ -Rezeptor III (CD16), der auf der Zelle gebundene Immunglobuline erkennt (Opsonine), den Rezeptor Ly49, über den körpereigene MHC-Moleküle auf den Zielzellen erkannt werden und dessen Aktivierung das Töten der Zielzelle verhindert, und einige, ebenfalls für die Aktivierung wichtige Adhäsionsmoleküle, wie NCAM (CD56), LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b) und – allerdings nur eine Untergruppe - auch CD2. TZR-ähnliche Strukturen, die ein spezifisches Antigen erkennen, besitzen NK-Zellen dagegen nicht. NK-Zellen besitzen die Fähigkeit, bestimmte Tumorzelllinien ohne vorherige Stimulation und ohne MHC-Restriktion *in vitro* effektiv zu lysieren. Sie können auf eine Vielzahl biologischer Reagenzien mit einer erhöhten zytotoxischen und proliferativen Aktivität antworten. Vor allem Tumorzellen, die nicht mindestens ein MHC-Allel exprimieren, werden von den NK-Zellen zerstört. Es gibt auch Hinweise darauf, dass NK-Zellen die Einführung neuer Peptide in körpereigene MHC-I-Moleküle erkennen. Sie sind darüber hinaus in der Lage, bestimmte Zytokine, wie IL-2, IFN γ und TNF zu produzieren und reagieren rasch und effektiv auf biologische Wachstumsfaktoren mit einer Erhöhung ihrer Anti-Tumoraktivität und verstärkter Zytokinproduktion. NK-Zellen scheinen normalerweise das Wachstum und die Differenzierung von Stammzellen zu regulieren (Fardoun-Joalland D, 1994). Die nicht antigen-spezifische Unterscheidung zwischen malignen und gesunden Stammzellen wird über die Adhäsionsmoleküle LFA-1, Mac-1 und CD2 auf der Oberfläche der NK-Zellen und deren Liganden (ICAM 1-3, LFA-3) auf der Oberfläche der Tumorzellen reguliert (Oblakowski P, 1991, Raspadori D, 1993). Daher können möglicherweise reifere Tumorzelllinien, die MHC exprimieren, einer NK-Zell-Reaktion entgehen. Bei der AML konnte eine verminderte NK-Zell-Aktivität nachgewiesen werden (Foa R, 1991). *In vitro* konnte das klonogene Wachstum von Leukämiezellen durch NK-Zellen und v.a. LAK-Zellen vermindert werden (Braun S, **Schmetzer H, 2000a und 2000b**, Savary CA, 1989).). Dabei erhöhte die Gabe von GM-CSF die Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche der AML-Blasten und IL-2 die Expression von LFA-1 auf den NK-Zellen, was zu einer Verstärkung des antileukämischen Effekts bei der AML führte (Bendall LJ, 1995). *In vitro* konnten durch anti-LFA-3 Antikörper die gesunden Stammzellen geschützt werden (Oblakowski P, 1991).

Trotz des sehr vielschichtig wirkenden Immunsystems können AML-Zellen der **Immunantwort** entgehen. Dafür gibt es mehrere Möglichkeiten (Bruserud O, 1999): Nur einige der genetischen Transformationen bei der AML erzeugen mutierte oder fusionierte Peptide, wie z.B. das RAR α - und das bcr-abl-Fusionsprotein, die auf MHC-Molekülen als tumorspezifische, körperfremde Antigene präsentiert werden können. Obwohl bei

diesen Patienten spezifische T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten, erfolgte keine effektive T-Zell-Antwort. Dies könnte an einer verminderten Expression kostimulatorischer Moleküle auf den AML-Blasten liegen. B7-1 konnte kaum, B7-2 bei ca. 20% der AML-Fälle nachgewiesen werden (Brouwer RE, 2001). Auch eine verminderte ICAM-1 Expression und erhöhte Spiegel von löslichem sICAM-1 vermindern die Bindung von T-Lymphozyten und NK-Zellen. AML-Blasten können zudem selbst FAS-Ligand, TGFbeta und sIL-2-R produzieren und den Zelltod der adhärierenden, FAS-exprimierenden T-Zelle bewirken bzw. die Immunantwort schwächen oder inhibieren.

2.1.6. Diagnostik und Klassifikation

Im **Blutbild** kann die Leukozytenzahl normal, erhöht (20% der Patienten mit >100.000 Leukozyten/ μ l) oder erniedrigt (17% der Patienten mit <5000 Leukozyten/ μ l) sein. Meist besteht eine Anämie mit einem Hb-Wert <10g/dl und eine Thrombozytopenie mit <50.000 Thrombozyten/ μ l (Southam CM, 1951). Im **Blutausstrich** zeigen sich bei 93% der Patienten in der Regel mehr als 50% leukämischer Blasten neben reifen Granulozyten. Das **Knochenmark** ist in der Regel stark hyperzellulär, die Blasten des entsprechenden Zellklons überwiegen. Voraussetzung für die Diagnose der AML ist ein mindestens normozelluläres Mark mit **einem Blastenanteil von mindestens 30%**.

Für das weitere therapeutische Vorgehen ist zum einen die Abgrenzung der AML von akuten lymphatischen Leukämien entscheidend. Zum anderen stellt die AML selbst eine sehr heterogene Gruppe dar, sodass biologische Subtypen mit differierendem klinischen Erscheinungsbild und unterschiedlicher therapeutischer Beeinflussbarkeit sowie Prognose abgegrenzt werden müssen. Die weitere Diagnostik beruht auf der Klassifikation mittels ätiologischer, morphologischer, zytochemischer, immunologischer, zyto- und/oder molekulargenetischer Merkmale. Dabei erfolgt die endgültige Einteilung der Subklassifikationen durch eine Kombination dieser verschiedenen Merkmale.

2.1.6.1. Unterscheidung nach der Ätiologie: Die primäre und sekundäre AML

Man unterscheidet die sekundäre von der primären AML als eigene, sich abgrenzende Entität. Die primären Leukämien (pAML) sind mit der de novo AML gleichzusetzen. Die sekundären Leukämien (sAML) umfassen zum einen die Gruppe der Zweitneoplasien nach vorangegangener Radio- und/oder Chemotherapie eines anderen Malignoms, zum anderen entwickeln sie sich aus einem mehr als sechs Monate bestehenden myelodysplastischem Syndrom oder einer anderen myeloproliferativen Erkrankung (Karp JE, 1997). Als auslösende Chemotherapeutika gelten DNS-toxische Substanzen, die die Topoisomerase II hemmen oder zur Gruppe der Alkylantien gehören (siehe auch Kapitel 2.1.3). Die durch Gabe von Alkylantien hervorgerufene AML und die sich aus einem MDS hervorgegangene AML haben häufig Gemeinsamkeiten: Eine präleukämische Phase mit Dysplasie aller drei Zelllinien des KM, zytogenetische Aberrationen meist am kurzen Arm des Chromosoms 5 oder 7 und eine meist schlechte Prognose. Der durch Inhibitoren der Topoisomerase II induzierten sAML geht dagegen keine präleukämische Phase voraus und man findet häufig die t(11q23)-Aberration.

Die sAML stellen ca. 10-20% aller AML-Fälle dar. Die Inzidenz nimmt aufgrund der höheren Lebenserwartung und der erfolgreicherer Behandlung von Primärtumoren zu. Insgesamt liegt der Altersmedian in der sAML-Gruppe (Median: 63 Jahre) höher als bei der pAML-Gruppe (Median: 57 Jahre), wobei insgesamt mehr Frauen als Männer betroffen sind. In der Literatur wird eine im Vergleich zur pAML niedrigere CR-Rate von 36% bis 55% gefunden. Die durchschnittliche Überlebensdauer von 7 Monaten bei der sAML ist allerdings mit der bei der pAML vergleichbar und die Prognose korreliert eher mit den zugrundeliegenden zytogenetischen Aberrationen (Pagano L, 2001; Hoyle CF, 1989).

2.1.6.2. Klassifikation nach Morphologie, Zytochemie, Immunphänotyp und Zytogenetik

Zytomorphologische und zytochemische Methoden beruhen auf der lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellen des Knochenmarksausstriches. Die klassische Färbung mit der panoptischen May-Grünwald-Giemsa-Färbung nach Pappenheim erlaubt die Beurteilung der Zellmorphologie und eventueller Zelleinschlüsse wie Granula oder Auer-Stäbchen. Die mit zytochemischen Verfahren nachweisbaren Enzymaktivitäten (Myeloperoxidase MPO, unspezifische Esterase NSE) oder Glykogen (PAS-Färbung) helfen bei der weiteren

Differenzierung der Zellen. Auf der Synopsis dieser Befunde beruht **die klassische FAB (French-American-British)-Klassifikation** der akuten Leukämien (Bennet JM, 1976 & 1985).

5-20% der AML-Fälle (M0, M6 und M7, biphänotypische Leukämien) sind allerdings mit nur morphologischen und/oder zytochemischen Verfahren schwierig zu beurteilen. Hier gewinnt die **Immunphänotypisierung** ihre diagnostische Bedeutung. Mit Hilfe spezifischer Fluorochrom-markierter Antikörper können spezifische Antigene auf der Oberfläche der AML-Blasten mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Immunphänotypisierung können Linienzugehörigkeit und Reifegrad der Blasten festgestellt werden. Die **Linienzugehörigkeit** zur myeloischen Zellreihe wird anhand des immunologischen Nachweises der MPO festgestellt. Weitere typisch **panmyeloische Marker** sind CD13, CD33, CD65. Zur Definition des **immunologischen Subtyps** werden der monozytären Reihe CD64 und CD14, der granulozytären CD15, CD16 und LF, der erythrozytären Glykophorin A, der thrombozytären CD41 und CD61, den NK-Zellen CD16, CD56 und CD57 zugeordnet. **Reifegradassoziierte Antigene** sind CD34, HLA-DR und CD117.

Zytogenetische Untersuchungsmethoden weisen chromosomale Aberrationen nach und legen weitere diagnostische und auch prognostisch relevante Entitäten (siehe Kap. 2.1.7.2.) fest. Bestimmte Karyotypanomalien sind häufig mit spezifischen klinischen und morphologischen Subtypen der AML assoziiert. Die Translokation t(15;17) kann bei fast allen Leukämien des FAB-Typs M3 oder M3v, unterschiedliche Aberrationen des langen Armes des Chromosoms 16 bei denen des FAB-Typs M4eo nachgewiesen werden. Die Chromosomenaberration t(11q23) wird häufig bei der sAML nach Anwendung von Etoposid-Derivaten gefunden, Veränderungen am Chromosom 5 und 7 werden ebenfalls häufig bei sAML gefunden und gehen meist mit einer Trilineage-Dysmyelopoese einher.

Durch Immunphänotypisierung konnte eine präzisere Typisierung morphologisch und zytochemisch nur schwer einzuordnender AMLs erreicht werden. Durch die Zytogenetik konnten darüberhinaus zusätzlich klinisch und prognostisch relevante Untergruppen definiert werden und so die klassische FAB-Klassifikation sinnvoll ergänzt werden. Die derzeitige **Klassifikation der deutschen AML Cooperative Group (CG)** stellt eine Erweiterung der FAB-Klassifikation und ihrer NCI-Version (Cheson BD, 1990) mit immunphänotypischen und zytogenetischer bzw. molekulargenetischer Marker dar (Ludwig WD, 1993). Die in dieser Arbeit definierten FAB-Typen wurde mit Hilfe dieser Klassifikation festgelegt (Tab. 2.1.6.2.1)

Eine weitere internationale Klassifikation, die Morphologie, Immunologie und Zytogenetik vereint und häufig Anwendung findet, stellt die MIC-Klassifikation dar.

Erläuterungen zu Tab. 2.1.6.2.1:

Morphologie der AML-Blasten gemäß Konsens (Bennet JM, 1985):

Typ I-Blasten: traditionelle Myeloblasten

Typ II-Blasten: enthalten zusätzlich bis zu 15 feine azurophile Granula

Typ III-Blasten: enthalten relativ zahlreiche azurophile Granula, einen konzentrisch gelegenen Kern und kein erkennbares Golgi-Feld.

Neoplastische Promyelozyten: deutlich verstärkte azurophile Granulation (feingranulär bei Subtyp M3v) und häufig einzelne bis zahlreiche Auerstäbchen ('faggots'). Die Kerne sind oft zweigelappt.

Monoblasten: voluminöses, mittel basophiles Zytoplasma und Pseudopodien.

Promonozyten: cerebriforme Kerne, ein gräuliches Zytoplasma und feine azurophile Granula

Megakaryoblasten: stark polymorph, teils klein, zytoplasma-arm mit dichtem Chromatin, teils größer mit prominenten Nucleoli und angelagerten Thrombozyten. Erkennung ist nur mittels Immunmarkern möglich.

Tab. 2.1.6.2.1. Klassifikation der AML nach der deutschen AML-Cooperative Group.

FAB-Subtyp	Zelltyp	Anteil des Zelltyps	Auerstäbchen	Zytochemie		Immunmarker	Karyotyp-anomalie (Häufigkeit)*	Fusions-gen
				MPO	NSE			
M0 (undifferenzierte myeloische Leukämie)	undifferenziert	= 90% nicht erythroide Zellen	-	<3%	-	CD13, 33, 65, MPO	inv(3q26), t(3;3) selten (1%)	EV11
M1 (undifferenzierte Myeloblastenleukämie)	Blasten Typ I und II	= 90% nicht erythroide Zellen	-/+	=3%	-		t(19;22) selten	BCR/ABL
M2 (Myeloblastenleukämie mit geringer Differenzierung)	Blasten Typ II und III	30-89% nicht erythroide Zellen	+	=3%	-	CD 15, 19, 56	t(8;21) häufig (40%) t(6;9) selten (1%)	AML1/ETO DEK/CAN
M3 (promyelozytäre Leukämie)	Neoplastische Promyelozyten	Überwiegend	++	>3%	-/+	CD15 und HLA-DR negativ	t(15;17) regelmäßig (98%), t(11;17) selten (1%), t(5;17) selten (1%)	PML/RARα PLZF/RARα NPM/RARα
M3v (feingranuläre, promyelozytäre Leukämie)	Neoplastische Promyelozyten, feingranulär	Überwiegend	-/+	>3%	-/+	CD15 und HLA-DR negativ		
M4 (myelomonozytäre Leukämie)	Blasten Typ I-III	>20% nicht-erythroide Zellen	-/+	=3%			11q23 (20%) inv (3q26), t(3;3) selten (3%)	MLL EV11
	Monoblasten/ Promonozyten/ Monozyten	>20% nicht-erythroide Zellen	-/+		>20% ++		t(6;9) selten (1%)	DEK/CAN
M4Eo	Wie M4 + Eosinophilie mit abnormen Eosinophilen	wie M4	-/+	wie M4		CD2, 14, 15	inv(16), t(16;16) häufig (80%)	CBFB/ MYH11
M5a (monozytäre Leukämie)	Monoblasten	=80% nicht-erythroide Zellen	-	<3%	++	CD13 negativ CD14 negativ	11q23 teilweise (20%) t(9;11) teilweise	MLL/AF9
M5b	Promonozyten und Monozyten	=80% nicht-erythroide Zellen	-/+	=3%	++	CD14, 15		
M5b	mit Phagozytose	=80% nicht-erythroide Zellen	-/+	=3%	++	CD14, 15	t(8;16) typisch (2%)	MOZ/CBP
M6 (Erythroleukämie)	Blasten Typ I-III	= 30% nicht-erythroide Zellen	-/+	=3%				
	Erythroblasten, oft mit Dysmyelopoese	=50% insgesamt	-/+		+			
M7 (megakaryozytäre Leukämie)	=30% megakaryozytäre Blasten	=30% insgesamt	-	<3%	+	CD41, 61	Trisomie 8, t(1;22) selten (5%)	unbekannt
M variabel							-7/7q-	
M variabel	mit Dysmyelopoese						-5/5q-	
M variabel	mit Dysmyelopoese						Komplexe Anomalie	
M variabel	mit Dysmyelopoese						t(11q23)	

POX Myeloperoxidase, NSE nicht-spezifische Esterase, t Translokation, inv Inversion,

*Häufigkeit der Aberration innerhalb des jeweiligen FAB-Typs

(Tabelle in Anlehnung übernommen aus Hämatologie/Oncologie "Akute myeloische Leukämie" v. Büchner T, 1997)

2.1.6.3. Diagnostik der minimalen Residualleukämie

Bei der minimalen Residualleukämie (MRD, minimal residual disease) befindet sich der Patient klinisch und zytomorphologisch in einer Vollremission. Sensitivere Untersuchungsmethoden, wie Immunphänotypisierung, FISH und PCR, können jedoch residuelle Leukämiezellen im Knochenmark noch nachweisen. Der Nachweis von MRD ist nur dann möglich, wenn der Immunphänotyp, die Chromosomenaberrationen oder das Genrearrangement des ursprünglichen Leukämiekklons bekannt ist und sich diese Veränderungen nicht auf gesunden Knochenmarkszellen nachweisen lassen. Für genrearrangierte Fälle bietet sich die sehr sensitive RT-PCR an, um residuelle Leukämiezellen (sog. PCR-Rezidiv) nachzuweisen. Bei fehlenden chromosomalen oder genrearrangierten Nachweismöglichkeiten spielt die Erkennung aberranter Antigenexpressionen auf residuellen Leukämiezellen mittels Durchflusszytometrie eine wichtige Rolle. Mit einer Detektionsgrenze von 10^{-3} – 10^{-4} Blasten stellt die Durchflusszytometrie eine sehr sensible Methode dar (Campana D, 1995 & 1999). In Abhängigkeit von der Menge residueller Leukämiezellen im KM weisen AML-Patienten eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit und ein kürzeres Gesamtüberleben auf (San Miguel JF, 2001). Bisher gibt es nur wenig leukämiespezifische Marker, aber mittels Drei-Farben-Durchflusszytometrie lassen sich Antigen-Kombinationen auf AML-Zellen nachweisen, die sich auf gesunden KM-Zellen normalerweise nicht befinden und womit sich wenig leukämische Zellen im Knochenmark nachweisen lassen (Danhauser-Riedl S, 2000).

2.1.7. Prognosekriterien

2.1.7.1. Allgemeine Prognosekriterien

Einige funktionelle Parameter konnten bei der AML prognostische Bedeutung erlangen: Ein prognostisch eher ungünstiger Verlauf wird bei hohen initialen Leukozytenzahlen, einer Serum-LDH >700 U/l, einem Lebensalter >60 Jahre, bei fehlender Blastenreduktion nach initialer Chemotherapie, bei autonomem Koloniewachstum *in vitro* und bei Nachweis einer minimalen Residualerkrankung in Remission beobachtet.

2.1.7.2. Zytogenetische Risikogruppen

Die AML stellt eine sehr heterogene Gruppe bezüglich Klinik und Verlauf dar. Ziel einer Klassifikation ist es daher, Subtypen herauszuarbeiten, die aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften eine unterschiedliche Prognose haben und daher unterschiedlich therapeutisch beeinflusst werden müssen. Mittels zytogenetischer Untersuchungen konnten verschiedene genetische Transformationen bei der AML festgestellt werden, die aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften in prognostisch günstige, intermediäre und schlechte Prognosegruppen zusammengefasst werden können (Mrozek K, 1997). Tabelle 2.1.7.2.1. zeigt die Einteilung der AML-Fälle mit Karyotypanomalien in Prognosegruppen. Klinisch charakterisiert wird die günstige Prognosegruppe mit einer Wahrscheinlichkeit von 70% für 5-jähriges Überleben und 80% für das Auftreten einer kompletten Remission nach Induktionstherapie. Die intermediäre Risikogruppe beinhaltet 60% des gesamten Patientenkollektives und ihr entspricht eine 5-Jahres-Überlebens-Wahrscheinlichkeit von 40%. In der schlechten Prognosegruppe liegt die Wahrscheinlichkeit für 5-jähriges Überleben unter 20%, die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer kompletten Remission nur bei 55%. Sie wird weiterhin durch ein schnelleres Auftreten eines Rezidivs nach erster Remission charakterisiert.

Tab. 2.1.7.2.1. Zytogenetische Risikogruppen

Risikogruppe	Karyotypanomalien
Gute Prognose:	t(15;17); t(8;21); inv/t (16)
Schlechte Prognose:	del(5q), del(7q), -5,-7, inv/t(3), del/t (11q23) komplexer Karyotyp (=3 Aberrationen)
Intermediäre Prognose:	normaler Karyotyp, verbleibende Aberrationen.

t Translokation, del Deletion, inv Inversion

Bei der Prognosebeurteilung spielt natürlich die Wahl der Therapieform eine entscheidende Rolle, so hat z.B. die AML-M3 nur aufgrund der spezifischen Therapie mit ATRA eine so hohe Heilungschance. Fälle mit t(8;21) profitieren v.a. von der wiederholten Applikation mit Hochdosis ARA-C (Byrd JC, 1999). Da aber nur ca. 50-

60% aller Leukämien chromosomale Veränderungen aufweisen, besteht ein Bedarf an zytogenetisch unabhängigen Prognosekriterien.

2.1.8. Therapie

2.1.8.1. Chemotherapie nach der Münsteraner Gruppe (AML-CG)

Ziel jeder Behandlung der AML ist das Erreichen und Erhalten einer kompletten Remission (CR). Die Therapie gliedert sich in eine Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungsphase auf. Dabei ist die Art der Induktionsbehandlung und Post-Remissionsbehandlung, sowie die zeitliche Abfolge der verschiedenen Therapieabschnitte, als auch Art und Zeitpunkt der integrierten KMT Inhalt zahlreicher Studien. Die in die Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit eingeflossenen AML-Fälle wurden nach dem Therapieprotokoll der German AML-Cooperative-Group behandelt (AML-CG-Protokoll), so dass dieses hier kurz vorgestellt werden soll:

Die Induktionstherapie setzt sich aus der Gabe von Cytosin-Arabinosid (AraC), Daunorubicin und 9-Thioguanin (TAD) zusammen. Noch in der Chemotherapie-bedingten Aplasie wird am Tag 22 mit der Re-Induktion mit AraC und Mitoxantron (HAM) oder wieder TAD begonnen. Diese **Doppelinduktion** erhöht zwar die Remissionsrate nicht, allerdings kann die Remissionsdauer und das rezidivfreie Überleben verbessert werden. Signifikante Unterschiede zwischen der TAD/TAD- und der TAD/HAM- Doppelinduktion zeigten sich nicht, wobei die TAD/HAM –Gruppe etwas besser abschnitt. Die Notwendigkeit einer Konsolidierungstherapie nach Erreichen der Remission ist für eine längere rezidivfreie Überlebenszeit unbestritten: In der AML-CG-Studie wird eine **Frühkonsolidierung** mit TAD durchgeführt. In der anschließenden 2-3 Jahre dauernden **Erhaltungstherapie (Spätkonsolidierung)** werden nochmals 4 Zyklen Chemotherapie mit AraC und Daunorubicin oder Thioguanin oder Cyclophosphamid wechselnd durchgeführt. Jeder Zyklus führt wieder zu einer Zytopenie des Patienten.

Bei der **akuten Promyelozytenleukämie (APL)** wird zusätzlich All-trans-Retinsäure (ATRA) verabreicht. ATRA hat eine spezifische, ausreifende Wirkung auf die APL-Blasten. Durch das Überangebot von ATRA werden die durch die Zusammenlagerung der Gene RARα und PML entstandene Korepression des für die Differenzierung verantwortlichen DNA-Stranges aufgehoben und die APL-Blasten reifen innerhalb 4-5 Wochen aus. Durch ATRA alleine wird aber in der Regel keine stabile Remission erreicht. Zur Heilung ist die Kombination mit einer potenten Chemotherapie erforderlich (TAD/HAM) (Lengfelder E, 2001).

2.1.8.2. Knochenmarkstransplantation

Zur Postremissionstherapie gehört auch die Knochenmarkstransplantation (KMT). Man unterscheidet die allogene von der autologen KMT. Bei der allogenen KMT finden sich zwei Arten von KM-Spendern: HLA-identische, verwandte Spender oder unverwandte Spender bzw. HLA-differente Verwandte. Der Stellenwert der KMT ist beim Auftreten eines Rezidivs bzw. in zweiter Remission unbestritten. Bei der Indikationsstellung zur allogenen KMT in erster Remission spielt die **Prognose** des Patienten eine entscheidende Rolle. Die durch KMT deutlich gesenkte Rezidivrate muss mit dem erhöhten Risiko lebensbedrohlicher Komplikationen abgewogen werden. Die autologe Stammzelltransplantation nach myeloablativer Therapie und intensiver Konsolidierungstherapie zeigte ebenfalls eine signifikant verminderte Rezidivrate (bei ebenfalls erhöhter Mortalität und nicht verbessertem Gesamtüberleben). Durch verbesserte Methoden des Aufreinigens des Stammzellapheresates könnte diese Methode noch verbessert werden. Dazu sind spezifische Marker für AML-Blasten hilfreich.

2.1.8.3. Klinische Bedeutung von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen

Mit der klinischen Anwendung von Zytokinen lassen sich die biologischen Eigenschaften von gesunden Knochenmarkszellen und AML-Blasten beeinflussen. Werden Zytokine **nach** Chemotherapie eingesetzt, wird v.a. deren Effekt auf gesunde Knochenmarkszellen zur Verkürzung der Zytopeniephase oder zur Stammzellmobilisation gewünscht. Werden Zytokine **vor oder während** Chemotherapie eingesetzt, soll durch den proliferationssteigernden Effekt auf AML-Blasten die Toxizität der verabreichten Chemotherapeutika gesteigert werden (Priming). Bei allen Anwendungszeitpunkten gilt es zu beachten, dass die verabreichten Zytokine **sowohl gesunde als auch maligne Zellen** stimulieren können. In neueren, immunbiologischen Therapieansätzen wird versucht, durch Zytokine die Oberflächen- und Adhäsionseigenschaften der Zellen zu verändern und dadurch die AML-Blasten für Abwehrzellen sensibler zu machen.

Wirkung auf gesunde hämopoetische Zellen:

Problem bei der Behandlung der AML ist die lange, panzytopenische Induktionsphase, die vor allem ältere Patienten aufgrund von Infektionen und/oder Blutungen nicht überleben. Es werden deshalb mittlerweile routinemäßig Granulozyten- und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktoren (G-CSF und GM-CSF) als Supportivmedikamente eingesetzt. Unter G bzw. GM-CSF-Gabe **nach oder während** Chemotherapie zeigte sich eine **Verkürzung der Neutropeniephase** um 5 bis 7 Tage, dabei war in den ersten Monaten das Gesamtüberleben der Patienten (>55J) verbessert. Ein Einfluss auf die Remissionsdauer konnte nicht beobachtet werden (Rowe JM, 1995). In der bisher umfangreichsten Studie wurde eine verminderte Krankenhausaufenthaltsdauer, weniger Infektionen und damit auch ein verminderter Antibiotikaverbrauch nach G-/GM-CSF-Behandlung festgestellt (Heil G, 1995). In komplizierten klinischen Fällen, bei denen eine schnellere und effektivere hämatologische Rekonstitution erwünscht ist oder bei denen G/GM-CSF allein in vorausgegangenen Therapien keinen Benefit erbrachte, werden Kombinationen von verschiedenen Wachstumsfaktoren angewendet: z.B. wurde nach Applikation von SCF und G-CSF **eine schnellere hämopoetische Rekonstitution** nach myeloablativer Chemotherapie beobachtet (Hunt, 1992, Yan XQ, 1994). Die Gabe von IL-3 allein zeigte in der Verkürzung der Neutropeniephase eine weniger effiziente Wirkung als GM-CSF allein. Die Kombination der beiden Zytokine erzielte in einigen, aber nicht allen Studien einen früheren Anstieg der Thrombozyten (Eder M, 1997). Die Applikation von Interleukin-6 in Kombination mit GM-CSF befindet sich noch in Phase I der klinischen Studien, wobei sich eine wesentliche Verkürzung der Neutropeniephase ebenfalls noch nicht abzeichnete (Bracho F, 2001).

Weiteres Einsatzgebiet hämopoetischer Wachstumsfaktoren ist die **Stammzellmobilisation** zur autologen KMT. Auch hierzu werden vor allem G- und GM-CSF verabreicht. Sie bewirken sowohl eine Wachstumssteigerung als auch eine Veränderung der Adhäsionsmolekülexpression bei den zu mobilisierenden Stammzellen. Es wird ein bis zu 18-facher Anstieg von mobilisierten Stammzellen in der Peripherie beobachtet (Kronenwett R, 2000). Bei bereits mehrfach vorbehandelten Patienten, bei denen die Mobilisation mit G-oder GM-CSF allein keinen Erfolg erzielte, werden Zytokinkombinationen eingesetzt. Die Kombination von IL-3 mit GM-CSF steigerte die Zahl der CD34 positiven Zellen bis um das 22-fache im peripheren Blut (Eder M, 1997). Auch die Kombination von SCF und G-CSF zeigte einen deutlich höheren Anstieg mobilisierter Stammzellen in der Peripherie als G-CSF alleine (McNiece IK, 1994, Elwood NJ, 1996). Eine FL-Applikation bewirkt eine Mobilisation dendritischer Zellen bis um das 20-fache (Fong L, 2001).

Schließlich hat GM-CSF auch **antimikrobielle Eigenschaften**, indem es die Phagozytose von *Candida albicans* durch Makrophagen fördert und so in der Neutropeniephase gegen Pilzinfektionen schützt (Rowe JM, 1996).

Wirkung auf AML-Blasten:

Durch G/GM-CSF-Gabe **vor** Chemotherapie sollen ruhende AML-Blasten in die chemotherapeutika-sensible S-Phase gebracht werden. Dieser Vorgang wird als **Priming** bezeichnet (Cannistra, 1989). In mehreren bisher durchgeführten Untersuchungen konnte bisher kein eindeutig benefitbringender Einfluss auf die Remissionsrate, Frühodesrate, Überlebenszeit und Inzidenz von Infektionen festgestellt werden (Rowe JM, 1999). Es wurde sogar eine verlängerte Thrombopeniephase beobachtet, da auch normale hämopoetische Vorläuferzellen durch das Priming gegenüber der Chemotherapie sensibilisiert wurden (Büchner T, 1995). Auch IL-3 wurde zum Priming bei Rezidivpatienten (n=10) eingesetzt, zeigte aber ebenfalls keine eindeutig verbesserte Remissionsrate und Remissionsdauer (Eder M, 1997).

In vitro wurde nach GM-CSF-Gabe eine **erhöhte, intrazelluläre AraC- Konzentration** und damit auch eine Erhöhung dessen Toxizität auf AML-Blasten gefunden (Hiddemann W, 1992; Reuter C, 1994). Diese Variationen des AraC-Metabolismus scheinen allerdings klinisch nicht relevant zu sein (Jahns-Streubel G, 1995). Über den Zytokineffekt auf die Wirkung von Daunorubicin werden ebenfalls divergierende Ergebnisse berichtet: GM-CSF, G-CSF und IL-3 scheinen die Sensitivität der Blasten gegenüber Daunorubicin zu erhöhen (Santini 1990). Andere zeigten, dass GM-CSF und IL-3 die AML-Zellen **gegen die Daunorubicin-induzierte Apoptose schützen** (Kaplinsky , 1996). Bei einigen Fällen der Promyelozytenleukämie konnte in vivo durch G-CSF eine zunehmende **Differenzierung** der unreifen Blasten beobachtet werden (Katayama N, 1998). Durch die Wachstumsstimulation der CSFs auf AML-Blasten in vitro wurde auch ein **leukämogener Effekt** in vivo vermutet, der aber in **allen** bisher durchgeführten Studien **nicht bestätigt** werden konnte und damit unwahrscheinlich erscheint (Johnson PR, 1997).

Wirkung auf die Tumorabwehr

IL-2 bewirkt eine Stimulation von T-Zellen und NK-Zellen und es erhöht die Expression von LFA-1 auf den NK-Zellen, was zu einer Verstärkung des antileukämischen Effekts bei der AML führt (Oblakowski P, 1991). Bei Rezidiv-Patienten, deren Knochenmark nicht stark mit leukämischen Blasten infiltriert war, konnte durch Therapie mit rekombinantem IL-2 eine Remission induziert werden (Maraninchi D, 1998). Bei Patienten, denen eine rIL-2-Therapie nach Erreichen der ersten Remission verabreicht wurde, konnte eine verlängerte Remissionsdauer und ein verlängertes Gesamtüberleben beobachtet werden (Cortes JE, 1999).

Grundlage für neue Therapiekonzepte bilden sog. **Tumor-Vakzinierungen**, wodurch die körpereigene Immunantwort gegen AML-Zellen gesteigert werden soll. Dazu werden in vitro durch Stimulation von AML-Zellen mit IFNalpha, IFNgamma, IL-4+GM-CSF, SCF+FL+TNFalpha dendritischen Zellen mit hoher Expression kostimulatorischer Moleküle gezüchtet (Bruserud O, 1999), die geeignetere Stimulatoren für eine tumorspezifische T-Zell-Antwort als die AML-Zellen selbst darstellen (Gluckman JC, 1997, Choudhury AA, 1998, Harrison BD, 2001).

Viele weitere Zytokine können in vitro die Adhäsionseigenschaften von AML-Blasten verändern. Die klinische Relevanz ist bislang unklar.

2.2. Die Rolle der Adhäsionsmoleküle und der Zytokinrezeptoren

Die Ursache der AML ist eine genetische Transformation. Diese Transformation bewirkt eine Veränderung der Eigenschaften der myeloischen Progenitorzellen im Sinne einer Störung der Proliferation und Differenzierung (klonale Expansion unreifer Vorstufen), als auch Lokalisation (periphere Leukozytose, extramedulläre Manifestationen)

Das gesunde Knochenmarksstroma bildet das für die einzelnen Zelllinien spezifische, **hämatopoetische Mikromilieu**, in welchem hämatopoetische Progenitorzellen proliferieren, differenzieren und entsprechend dem physiologischen Bedarf an das periphere Blutsystem abgegeben werden können. Die Regulation von Wachstum und Differenzierung obliegt sogenannten **Zytokinen**, hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (HGF, hematopoietic growth factors). Sie werden von den Stromazellen (parakrin), aber auch von den hämatopoetischen Zellen selbst (autokrin) produziert und ihre Wirkung hängt von der Anwesenheit sowie der Affinität spezifischer Zytokinrezeptoren auf den Progenitorzellen ab. Die hämatopoetischen Zellen in dem für sie geeigneten Mikromilieu zu halten bzw sie in die Peripherie zu entlassen, ist schließlich Aufgabe der **Adhäsionsmoleküle**, die wiederum an spezifische Rezeptoren des Knochenmarkstromas binden.

2.2.1. Aufbau des Knochenmarks

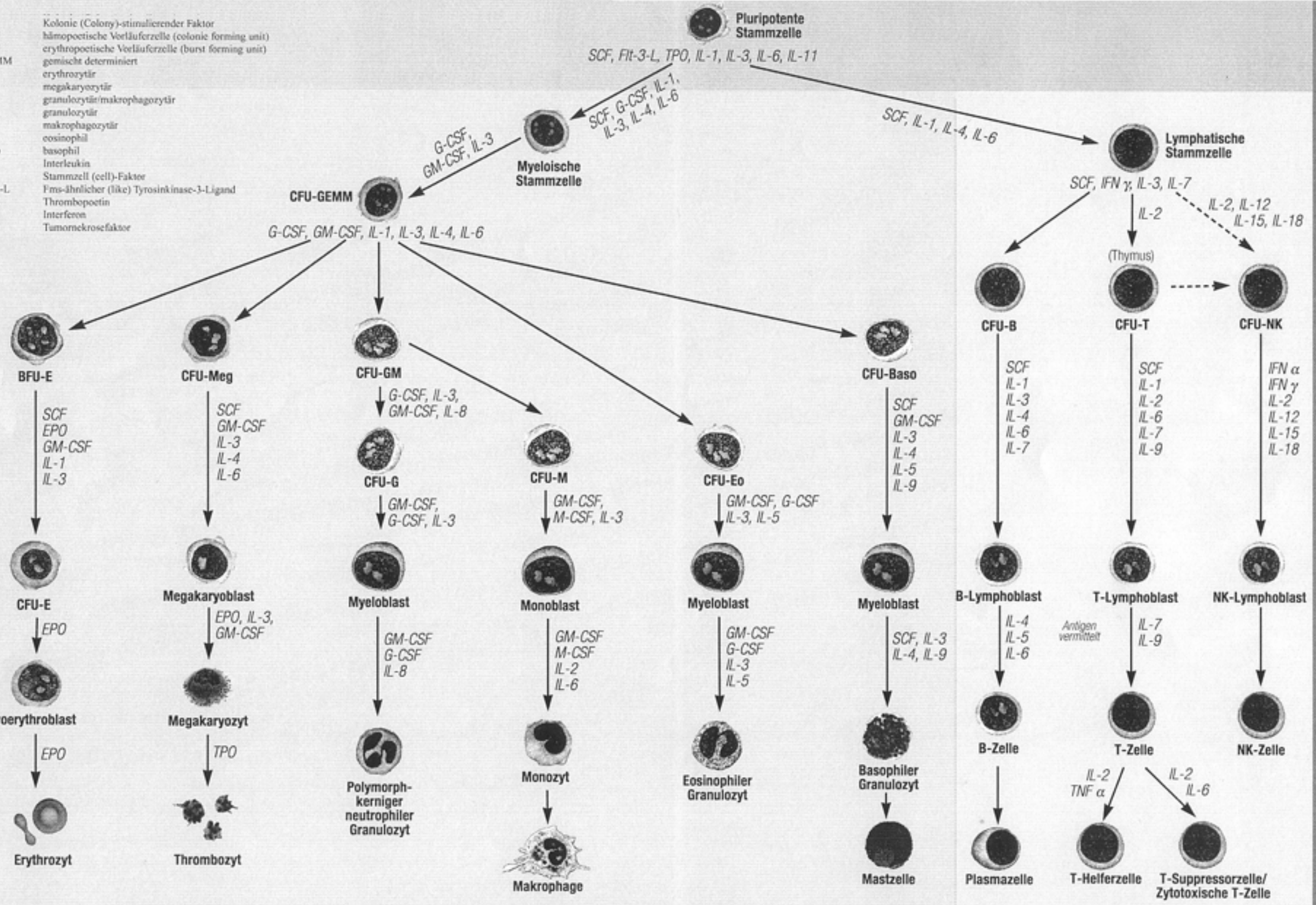
Das KM ist der Hauptort der Hämoese, die sich beim Gesunden in den kurzen und platten Knochen abspielt. Es setzt sich aus Zellen der Hämoese, Stromazellen und der extrazellulären Matrix zusammen und stellt ein dynamisches, hochproliferatives Funktionsorgan dar, dessen einzelne Bestandteile in komplexen Mechanismen miteinander kommunizieren und interagieren.

2.2.1.1. Die Zellen der Hämoese

Ursprung aller **Zelllinien der Hämoese** sind pluripotente, hämatopoetische Stammzellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen. Die Stammzellen des KM stehen in dynamischen Austausch mit den in der Peripherie zirkulierenden Stammzellen. In Abhängigkeit vom Mikromilieu des KM und vom Einfluß bestimmter Wachstumsfaktoren entstehen determinierte Vorläuferzellen der lymphatischen oder der myeloischen Zellreihen. Eine Übersicht über die verschiedenen Reifungsstufen der Hämoese und die Bedeutung der einzelnen Zytokine gibt Abbildung 2.2.1.1.1.

Abb. 2.2.1.1.1. Zytokinwirkung innerhalb verschiedener Reifestufen der Hämopoese

- CSF Kolonie (Colony)-stimulierender Faktor
- CFU hämopoetische Vorläuferzelle (colony forming unit)
- BFU erythroetische Vorläuferzelle (burst forming unit)
- GEMM gemischt determiniert
- E erythrozytär
- Meg megakaryozytär
- GM granulocytytär/makrophagozytär
- G granulocytytär
- M makrophagozytär
- Eo eosinophil
- Baso basophil
- IL Interleukin
- SCF Stammzell (cell)-Faktor
- Flt-3-L Fms-ähnlicher (like) Tyrosinkinase-3-Ligand
- TPO Thrombopoetin
- IFN Interferon
- TNF Tumornekrosefaktor



Da es sich bei der **AML um eine Störung der myeloischen Differenzierungslinie** handelt, die in jeder Reifungsstufe beginnen kann, soll hier kurz die Zellreifung am Beispiel der **Granulopoese** dargestellt werden, wobei betont werden muß, daß auch die anderen myeloischen Zelllinien betroffen sein können. Der Teilung der zunehmend granulopoetisch determinierten Stammzellen muß eine Reihe von $n? 2n$ Teilungen erfolgen, deren Anzahl unterschiedlich, aber begrenzt ist. Sie bilden 'colony-forming-units' (CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G). Die Teilungsschritte sind mit einer annähernd parallelen Differenzierung der Zellen verbunden. Die teilungsfähigen Zellelemente (Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten) bilden den Proliferationspool. Ab einem bestimmten Differenzierungsstadium (ab Metamyelozyt) finden keine Zellteilungen, sondern nur noch Zellreifungsprozesse statt. Diese Zellen befinden sich im sogenannten Reifungspool des KM. Werden die jetzt reifen Zellen nicht in der Peripherie benötigt, warten sie im sogenannten Reservepool auf den Austritt ins periphere Blut, der durch humorale Signale vermittelt wird (z.B. IL-1). Die Aufenthaltsdauer der kurzlebigen Granulozyten im Blut ist 6-10 Stunden, beim Übertritt ins Gewebe (z.B. bei Entzündungen) 3-5 Tage.

2.2.1.2. *Das Knochenmarksstroma*

Zu den Stromazellen des KM zählen die Osteoblasten und -klasten, Fettzellen, Retikulumzellen, Endothelzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten. Sie bilden zum einen durch ihre Oberflächenstrukturen, zum anderen durch die Produktion von Zytokinen und der extrazellulären Matrix das für die Hämopoese geeignete Mikromilieu. Das grobe Gerüst des Knochenmarks bildet die Knochenspongiosa, in dessen Höhlen und Kammern sich das feine Netz der Retikulumzellen befindet. Während die fibroblastischen Retikulumzellen ein Netzwerk zwischen den Kapillaren/Sinus und dem Endost bilden, begleiten die histiozytären Retikulumzellen den Lauf der Kapillaren und Sinus als sogenannte Uferzellen und haben phagozytierende Eigenschaften. Osteoblasten, Retikulumzellen und Fettzellen stammen von multipotenten KM-Stroma-Stammzellen ab und stellen ein äußerst variables phänotypisches System dar. So können ruhende Fettzellen je nach physiologischem Bedarf in myelosupportive Fibroblasten und umgekehrt differenzieren (Bianco P, 2000). Stroma-Stammzellen können aber im Gegensatz zu den hämopoetischen Stammzellen altern und haben nicht die unbegrenzte Eigenschaft zur Selbsterneuerung, so dass die verminderte Hämopoese im Alter auf ein Altern des KM-Stromas und den damit verminderten supportiven Eigenschaften zurückgeführt wird.

Die Blutversorgung des KM geschieht durch die Knochenwand hindurch (Vasa nutriticia). Nach Eintritt in die Markhöhle verlieren sich die Arteriolen und arteriellen Kapillaren in ein weitmaschiges Geflecht **venöser Sinus mit fenestrierten Endothelien**. In den Endothelien der Sinus werden ebenfalls Zytokine produziert. Zwischen den Blutgefäßen des Knochenmarks und den Maschen des retikulären Bindegewebes besteht keine offene Verbindung, so dass die Endothelzellen eine wichtige Barrierefunktion einnehmen. Zur Transmigration von Zellen ins periphere Blut bzw. beim Homing von Stammzellen aus dem peripheren Blut ins Knochenmark müssen die Zellen via Adhäsionsmolekülen bzw. Liganden der Adhäsionsmolekülen auf Endothel- und Vorläuferzellen miteinander kommunizieren.

Auch die **extrazelluläre Matrix** hat Einfluss auf die unterschiedliche Verteilung der Zytokine bzw. der Verteilung der entsprechenden CFU im Knochenmark (Long WM, 1992). Sie wird von Endothel- und Fibroblasten gebildet, setzt sich aus Glykoproteinen (Kollagen I, III, IV, V, VI, Fibronectin, Laminin, Thrombospondin und Hemonectin) und Proteoglycanen (Hyaluronsäure, Chondroitin-, Dermatan- und Heparinsulfat) zusammen. Diese Matrixmoleküle können mehrere Bindungsregionen für verschiedene Adhäsionsmoleküle der Zellen der Hämopoese haben und sind wichtiger Bestandteil des Mikromilieus. Zum Beispiel reagiert die RGD-Region des Fibronectins mit β 1-Integrinen (D Souza et al, 1991), Hyaluronsäure mit CD44 (Miyake K, 1990). Frühe Progenitorzellen adherieren über das β 2-Integrin CD11b und/oder CD45 an Heparansulfat (Gordon MY, 1988), das diesen IL-3 und GM-CSF präsentiert. (Roberts R, 1988; Deirdre R, 1994). Binden Promyelozyten an Heparansulfat, so reifen diese aus (Luikart SD, 1990).

2.2.2. Die Rolle der hämopoetischen Zytokinrezeptoren

Für einen geordneten und an den physiologischen Bedarf angepassten Ablauf der Hämopoese ist eine genau abgestufte Kommunikation zwischen den einzelnen oben aufgeführten Zell- und Stromakomponenten notwendig. Diese Aufgabe übernehmen **Zytokine** - von Zellen freigesetzte lösliche Protein- und Glykoprotein-Botenstoffe. Zytokine stellen den Oberbegriff für eine funktionell und strukturell sehr heterogene Gruppe an Zellmediatoren dar. Sie spielen eine Rolle bei der Immunantwort, bei Entzündungsreaktionen, Wundheilung und sind u.a. auch bei der Embryogenese beteiligt (Arai KJ, 1990, Henschler 1993). Bei der Hämopoese spielen v.a. die Zytokine eine Rolle, die auch als sog. **hämatopoetische Wachstumsfaktoren (HGF)** bezeichnet werden. Sie koordinieren die Selbsterneuerungskapazität der hämatopoetischen Stammzellen, stimulieren die Proliferation und Ausreifung determinierter Vorläuferzellen und beeinflussen die Funktion der Effektorzellen des peripheren Blutes. Mittlerweile stehen rekombinante Zytokine für in vitro und in vivo Studien zur Verfügung und machen funktionelle Untersuchungen der Zytokinwirkungen erst möglich.

Die **Regulation der physiologischen Zytokinbildung und -freisetzung** erfolgt auf der Ebene der Proteinneusynthese, die bei entsprechender Stimulation (z.B. physikalische Reize, proinflammatorische Substanzen, Bindung eines korrespondierenden Antigens) aus der Zelle freigesetzt werden („Burst“). Die **Zytokinwirkung** ist einerseits abhängig von der zellulären Verteilung **spezifischer Zytokinrezeptoren**, deren **Expressionshöhe** und **Affinität** ebenfalls reguliert werden, und andererseits vom **funktionellen Repertoire**, über das die Rezeptor tragende Zelle verfügt. Bei hohem Affinitätsstatus des Zytokinrezeptors können bereits sehr niedrige Zytokinkonzentrationen einen biologischen Effekt auslösen. Entsprechend der Lokalisation der Rezeptoren kann die Wirkung **autokrin, parakrin oder endokrin** sein. Die **intrazelluläre Signaltransduktion** erfolgt über Kaskaden von Phosphorylierungsreaktionen (Tyrosinkinasen), die letztendlich im Zellkern zu einer Aktivierung oder Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. In der Regel bedingt die **Kombination mehrerer an der Zielzelle angreifender Zytokine** die in vivo Antwort der Zelle. Ebenso findet man bei der normalen Hämopoese entsprechend der Linienzugehörigkeit und des Reifestadiums der Zellen spezifische HGF-R-Expressionsmuster (Wognum 1996, Shinjo 1997, Cannistra 1990). Aus diesem mehrfach regulierten, mit komplexen Wechselwirkungen zusammenhängenden System wird klar, dass aus der **Expression eines Zytokinrezeptors** innerhalb einer bestimmten Zellgruppe **nicht unmittelbar auf dessen Wirkung bzw. biologische Relevanz** geschlossen werden kann.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Zytokinrezeptoren werden in den nachfolgenden Abschnitten einzeln vorgestellt.

2.2.2.1. SCF-R (CD117)

Der Stammzellfaktor-Rezeptor (SCF-R; Syn. c-kit, CD117) ist ein transmembraler Tyrosinkinase-Rezeptor, der eine ähnliche Struktur wie der M-CSF-, flt 3- und der PDGF-Rezeptor aufweist. Er besteht extrazellulär aus 5 Immunglobulin-ähnlichen, ligandspezifischen Domänen und ist über eine transmembrale Region intrazellulär mit einer Tyrosinkinase verbunden, die bei erfolgter Ligand-Rezeptorbindung eine Phosphorylierungskaskade in Gang setzt. **Ligand** des SCF-R ist der Stammzellfaktor (SCF). Er wird von Stromazellen, Fibroblasten und Endothelzellen produziert. Der **Genort** des SCF-R-Protonkogens liegt beim Menschen auf dem Chromosom 4q11-34, der des SCF auf dem Chromosom 19q13.3-13.4.

Lokalisation: Bei der **normalen Hämopoese** findet sich eine hohe Expression von SCF-R **v.a. auf den unreifen myeloiden Vorläuferzellen (Stammzellen und CFUs)** (65% der CD33+, 73% auf HLA-DR+, 50% auf CD34+ Zellen). Mit zunehmender Differenzierung nimmt die SCF-R -Expression analog zur CD34-Expression ab (Escribano L, 1998, Wognum AW, 1996). Innerhalb der erythrozytären und megakaryozytären Zelllinie ist der SCF-R häufig, während er innerhalb der granulomonozytären Zelllinie geringer exprimiert ist. Reife Mastzellen, deren Vorstufen und Thrombozyten sind generell SCF-R positiv, während reife Erythrozyten, neutrophile Granulozyten und Monozyten SCF-R negativ sind. Innerhalb der Lymphopoese findet sich SCF-R auf proT-Zellen und NK-Zellen. B-Zelllinien, sowie reife T-Zellen sind c-Kit negativ (Lyman SD, 1998). Auf den **meisten AML-Blasten** wird der SCF-R ebenfalls exprimiert. In der größten Übersichtsarbeit von Bene MC et al (1998) wurden 1.103 AML-Patienten untersucht und der SCF-R als typisch myeloischer Marker in die Routinediagnostik mitaufgenommen.

Funktion: In vitro führte die Zugabe von SCF allein nur zu einer geringen **Proliferationssteigerung** gesunder KM-Progenitorzellen, erst zusammen mit FL und anderen Zytokinen ließ sich eine Proliferationssteigerung

erzielen. Eine funktionierende SCF und SCF-R-Bindung erhöht die Affinität der β -2 -Integrine VLA-4 und VLA-5, über die die hämopoetischen Progenitorzellen an Fibronectin und VCAM binden. (Broudy VC, 1996, Papyannopoulou T, 1998, Avraham H, 1992). Binden die Zellen via SCF-R an membrangebundenen SCF so hat er auch eine direkte adhärierende Wirkung (Kodama H, 1994). *In vivo* bewirkt die Applikation von SCF einen Anstieg der Neutrophilen und einem leichtem Anstieg der Lymphozyten im peripheren Blut. Ein Anstieg CD34+-Zellen wurde zwar nicht in der Peripherie, aber dafür im KM beobachtet (Tong J, 1993). SCF konnte *in vitro* auch die Proliferation von AML-Blasten fördern (Broudy VC, 1992). Eine Korrelation zwischen der Höhe der Rezeptorexpression und dem Affinitätsstatus des Rezeptors mit dem Wachstumsverhalten konnte nicht nachgewiesen werden. SCF scheint, ebenso wie GM-CSF die Apoptose zu supprimieren (Caceres-Cortes J, 1994), wobei er (zusammen mit GM-CSF und TNF) ohne Zelladhäsion an das Knochenmarkstroma nur in 50 % der Fälle die Lebensdauer der Zellen verlängern kann.

Klinische Relevanz: Eine Kombination von SCF und G-CSF bei der Stammzellmobilisation zeigt einen deutlich höheren Anstieg mobilisierter Stammzellen in der Peripherie als mit G-CSF alleine (McNiece IK, 1994, Elwood NJ, 1996). Desweiteren wurde nach Applikation von SCF und G-CSF eine schnellere, hämopoetische Rekonstitution nach myeloablativer Chemotherapie beobachtet (Hunt, 1992, Yan XQ, 1994). Nomdedeu et al (1999) zeigten, dass die Expression von SCF-R als myeloischer Marker v.a. bei der biphenotypischen AML eine signifikant höhere Spezifität als CD33 und CD13 hat. Die Kombination von SCF-R mit anderen myeloischen Markern wie CD11b und CD15 können für die Diagnose einer MRD verwendet werden (Macedo A, 1995). Einige Leukämien zeigen aber auch eine Überexpression von SCF-R, so dass in diesen Fällen die Überexpression oder der erneute Anstieg von SCF-R in Remission als Verlaufsparemeter einer MRD verwendet werden kann. Keine generelle Übereinstimmung herrscht in der Literatur, ob die SCF-R-Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Gadd SJ, 1985; Reuss-Borst MA, 1994; Lauria F; 1995. Schwartz S, 1999).

2.2.2.2. FL-R (CD135)

Ebenso wie SCF-R ist auch der FL-Rezeptor (Syn. flt3-R, flk2-R, Stk-1, CD135) ein transmembraner Tyrosinkinase-Rezeptor. Der Name stammt von einer dem G-CSF-Rezeptor (c-fms) ähnlichen DNA-Sonde, mit der der flt3 (fms-like tyrosine kinase 3) entdeckt wurde. **Ligand** des flt3-R ist FL (**Flt3-Rezeptor-Ligand**), der in den Stromazellen fast aller Gewebe produziert wird, am meisten aber in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes. **Genort** des FL-R ist Chromosom 13q12, der des FL auf Chromosom 19q13.3-13.4.

Lokalisation: Bei der **normalen Hämopoese** findet sich eine hohe Expression des FL-R überwiegend auf den **unreifen, myeloiden Vorläuferzellen mit Präferenz der granulomonozytären Zellreihe**, wobei die Höhe der Expression mit zunehmender Differenzierung der Zellen abnimmt. Zellzyklusanalysen zeigen, dass der FL-R vor allem auf aktivierten, nicht ruhenden Stammzellen exprimiert wird (Zeigler FC, 1994; Orlic D, 1993). Außerdem scheint der FL-R im Laufe der Zellreifung schon früher als der SCF-R auf der Zelloberfläche der Progenitorzellen zu verschwinden. Der FL-R wird innerhalb der megakaryozytären Zelllinie nur wenig und innerhalb der erythrozytären Zelllinie überhaupt nicht exprimiert. ProB und PräB-Zellen sind dagegen abnehmend mit zunehmendem Reifestadium FL-R positiv, während T-Zellen, deren Vorstufen sowie NK-Zellen FL-R negativ sind (Brasel K, 1995; Meierhoff G, 1995; DaSilva N, 1994). Bis auf einige wenige FL-R-positive Subpopulationen der Monozyten und Granulozyten (Rappold I, 1997) sind alle reifen Zellen der Hämopoese FL-R-negativ.

Auch auf **AML-Blasten** aller FAB-Gruppen wird der FL-R häufig exprimiert (Meierhoff G, 1995; DaSilva N, 1994, Drexler HG, 1996, Lyman SD, 1998, McKenna HJ, 1996, Carow CE, 1996, Birg F, 1992, Stacchini A, 1996, Piacibello W, 1995). Aufgrund kleiner Fallzahlen konnten bisher innerhalb der verschiedenen FAB-Gruppen keine spezifischen Unterschiede festgestellt werden.

Funktion: Wie auch der SCF führt die *in vitro* Stimulation mit FL allein nur zu einer geringen Proliferationssteigerung von hämopoetischen Progenitorzellen. Erst zusammen mit SCF und anderen Zytokinen läßt sich eine Wachstumssteigerung erzielen. Da man davon ausgeht, dass der FL-R auf einer früheren Entwicklungsstufe als der SCF-R abgebaut wird, scheint die Stimulation des FL-R (allein) die Vorläuferzellen auch in einem früheren Entwicklungsstadium zu halten (Shah AJ, 1996). Entsprechend der Rezeptorverteilung beeinflusst FL *in vitro* die Megakaryopoese nur wenig, die Erythropoese überhaupt nicht. (Turner AM, 1996, DaSilva N, 1994; Meierhoff G, 1995). Dagegen scheint FL aber Bedeutung (zusammen mit GM-CSF, IL4, TNF) in der Generierung von dendritischen Zellen (DC) aus AML-Blasten zu haben

(Maraskovsky E, 1995). Im Mausversuch konnte durch die Gabe von FL die Zahl der hämopoetischen Progenitorzellen im Blut um das ca.10-fache (Brasel K, 1996, Link DC, 2000) erhöht werden und in ersten klinischen Studien bewirkte die Applikation von FL einen Anstieg von DCs um das 20-fache in der Peripherie (Fong L, 2000).

Auch AML-Zellen proliferieren größtenteils nach Stimulation mit FL in vitro und FL zeigte additive und synergistische Effekte mit anderen HGFs. Trotz Expression des FL-R auf der Zelloberfläche reagierten aber auch einige AML-Zellen nicht auf FL-Stimulation, wohl aber auf andere HGFs (Stacchini A, 1996, Piacibello W, 1995). So kann man von der Höhe der FL-R Expression nicht unmittelbar auf das Verhalten der AML-Zellen unter FL-Stimulation schließen. In 20% aller AML-Fälle findet sich eine interne Tandem-Duplikation der juxtamedullären Domäne des FL-R-Gens (Yokota S, 1997). Der mutierte FL-R phosphoryliert ligandunabhängig Tyrosinreste und diese Mutation scheint weniger für die Initiation als für die Progression der AML verantwortlich zu sein. Damit geht die interne Tandemduplikation des FL-R mit einer schlechten Prognose der AML einher (Kiyoi H, 1999; Kottaridis PD, 2001). Meyer C et al (1999) zeigten, dass FL die Apoptose von AML-Zellen verhindert und dadurch das Leben der AML-Zellen verlängert.

Klinische Relevanz: Der Nachweis einer FL-R-Tandemduplikation gilt als ungünstiger Prognoseparameter bei der AML. Auch bei der Trisomie 19 liegt eine Überexpression des FL-R-Gens vor und dies scheint für die bei der Trisomie 19 sich häufig entwickelnden hämatologischen Neoplasien verantwortlich zu sein. In neueren Therapiekonzepten wie Anti-Tumor-Vakzinierungen spielt die Züchtung von DCs eine Rolle. Mit Hilfe von FL differenzieren aus AML-Zellen DC in vitro und in vivo bewirkt nur FL einen Anstieg von DC im Blut.

2.2.2.3. IL-3-R (CD123)

Der Interleukin-3-Rezeptor (IL-3-R) ist heterodimer aufgebaut. Er besteht aus einer ligandspezifischen α -Kette und einer signaltransduzierenden β -Kette (CD131), die er mit dem GM-CSF-R und dem IL-5-Rezeptor gemeinsam hat. Die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt über Rekrutierung von zur Gruppe der scr-Proteine gehörenden Tyrosinkinasen und/oder JAK2-Proteinkinasen.

Der Ligand des IL-3-R ist das Interleukin-3 (IL-3), das von aktivierten T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen sezerniert wird. Das die α -Kette des IL-3-R kodierende Gen IL3RA liegt neben dem des GM-CSF-R-Gen auf der pseudoautosomalen Region der Geschlechtschromosomen, das IL-3-kodierende Gen ist auf 5q31-q33 lokalisiert.

Lokalisation: Ähnlich wie beim SCF-R findet sich eine hohe Expression des IL-3-R v.a. auf den unreifen Vorstufen der normalen Hämoese. Die höchste Expression wird auf den myelomonozytären und B-lymphozytären Vorstufen gefunden. Mit zunehmender Differenzierung der Zellen nimmt die Expression von IL-3-R ab. Lediglich bei den basophilen Granulozyten ist sogar ein Anstieg der IL-3-R-Expression zu beobachten (Wognum AW, 1996). Jordan CT (2000) zeigte, dass sich im normalen Knochenmark in der den Stammzellen zugeordneten (CD34⁺CD38⁻) - Population <1% IL-3-R-positive Zellen befinden.

Im Gegensatz zur gesunden Stammzellpopulation sind bei der **AML** 98% der unreifen Blasten positiv für die α -Kette des IL-3-R, nicht aber für die β -Kette. Aufgrund von Implantationsversuchen dieser Zellen in SCID-Mäuse, die dann an einer AML erkrankten, konnten diese Zellen sog. leukämischen Stammzellen zugeordnet werden (Jordan CT, 2000). Koubek K et al (1998) stellten v.a. bei den unreiferen FAB-Typen M0 und M1 eine erhöhte IL-3 Expression fest.

Funktion: In vitro bewirkt eine IL-3-Stimulation zusammen mit anderen Zytokinen eine Proliferation aller CFUs der myeloiden Zellreihe. Somit hat IL-3 das breiteste Wirkungsspektrum aller CSFs. Obwohl nicht alle Zellen den IL-3-R exprimieren werden sie doch durch indirekte Effekte von IL-3 zur weiteren Differenzierung durch andere Wachstumsfaktoren rekrutiert. So stimuliert IL-3 die Sekretion von IL-6 und IL-6 induziert umgekehrt wiederum die Expression von IL-3-R auf diesen Zellen (Sachs L, 1996).

Auch auf **AML**-Blasten wurde in vitro eine Proliferationssteigerung des malignen Klons beobachtet, wobei nicht alle Zellen, die positiv für den IL-3-R waren, auch auf IL-3-Stimulation reagierten (Budell LM, 1989; Tsuzuki M, 1997, Nowak R, 1999). Die meisten Blasten sind allerdings negativ für die signaltransduzierende β -Kette und bei funktionellen Tests der leukämischen IL-3-R positiven Stammzellen wurde beobachtet, dass die Stimulation mit IL-3 nicht zu der sonst üblichen intrazellulären Signaltransduktion führt (Jordan CT, 2000). Ebenso wie GM-CSF schützt IL-3 die AML-Blasten vor dem programmierten Zelltod und kann die toxische Wirkung von Anthrazyklinen wie z.B. Daunorubizin in vitro vermindern. Auf der anderen Seite fördert IL-3 wiederum die Aufnahme von AraC in die Zellen und fördert damit auch dessen Toxizität. Zusammenfassend

kann man zum einen aus der Expression des IL-3-R nicht auf dessen Wirkung schließen und zum anderen bleibt bislang unklar, ob die erhöhte IL-3-R-Expression auf AML-Blasten Ausdruck einer aberranten Expression von Transkriptionsfaktoren entspricht oder Bedeutung bei der Pathogenese der AML hat.

Klinische Relevanz: IL-3 wird zusammen mit G- oder GM-CSF zur Verkürzung der Neutropeniephase und zum Priming eingesetzt. Bisher zeigte sich jedoch kein eindeutiger Benefit (Eder M, 1997).

2.2.2.4. GM-CSF-R (CD116)

Der Rezeptor für den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF-R) gewinnt ab der Reifungsstufe der CFUs an Bedeutung. Er ist *heterodimer* aufgebaut und besteht aus einer niedrig affinen, ligandspezifischen α -Kette (=CD116), die erst durch die Verbindung mit der signaltransduzierenden β -Kette (h β 5=CD131) hochaffin wird. **Ligand** des GM-CSF-R ist der GM-CSF, der durch zahlreiche Zellen (T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen) nach Stimulation durch Endotoxin oder Zytokine (z.B. IL-1) synthetisiert und freigesetzt wird. Das die α -Kette des GM-CSF-R kodierende **Gen** CDF-RA liegt auf der pseudoautosomalen Region der Geschlechtschromosomen. Der Genort der β -Kette auf Chromosom 22q13.1, der des GM-CSF auf dem Chromosom 5q31-q33.

Lokalisation: Die Expression und Bedeutung des GM-CSF-R bei der normalen Hämopoese beginnt auf einer etwas früheren Reifestufe als die des G-CSF-R. Obwohl GM-CSF-R für die frühe Hämopoese nicht essentiell ist, lässt sich eine geringe Anzahl von Rezeptoren auch auf den frühen determinierten Vorläuferzellen nachweisen. Eine rapide Zunahme der Rezeptordichte findet ab der Stufe der myelomonozytären Vorläuferzellen (CFU-GM) statt, die mit steigender Differenzierung innerhalb der monozytären Zelllinie und etwas weniger in Richtung der granulozytären Zelllinie zunimmt. Reife Monozyten, wie auch deren Vorstufen zeigen eine etwa 4-fach höhere Expression als neutrophile Granulozyten und deren Vorstufen. Auch auf basophilen und eosinophilen Granulozyten finden sich GM-CSF-Rs – wenn auch in geringerer Zahl. Weder auf Zellen der Erythropoese, noch auf Zellen der Lymphopoese lassen sich dagegen GM-CSF-Rs nachweisen (Wognum AW, 1996).

Auch auf **AML**-Blasten wurden GM-CSF-Rs nachgewiesen (Koubek K, 1998; Lanza F, 1997; Lowenberg B, 1993). Die höchste Expression von GM-CSF-R wurde v.a. auf reiferen AML-Blasten (M4 und M5) festgestellt, während GM-CSF-R nur selten auf unreiferen Leukämieformen (M0 und M1) exprimiert wurde. In 7% der Fälle (v.a. in FAB-M5) wurde auch eine Überexpression von GM-CSF-R nachgewiesen (Lanza F, 1997).

Funktion: GM-CSF-Stimulation fördert in vitro die **Granulo- und Monozytopoese** und nur im geringen Maße die Erythro- und Megakaryopoese (Gasson JC, 1991, Lieschke GJ, 1992). Desweiteren kann GM-CSF sowohl die eigene Sekretion, sowie die **Sekretion anderer Zytokine** wie M-CSF, IL6, IL1 und TNFa stimulieren (Sachs L, 1996), so dass die Effekte auf die Erythro- und Megakaryopoese eher sekundärer Natur sind. Auf die Regulation der **GM-CSF-Rezeptordichte** kann die GM-CSF-Stimulation zwei Effekte haben. V.a. auf reiferen Zellen der Myelopoese führt sie zu einer Herunterregulation der GM-CSF-Rs (=Klasse-1-Rezeptor). Auf unreiferen Vorstufen bewirkt GM-CSF keine Veränderung der Rezeptordichte oder sogar einen Anstieg der Rezeptorzahl (=Klasse-2-Rezeptoren). Beide Rezeptoren können auch nebeneinander - in ihrer Verteilung abhängig von der Reifungsstufe - auf den Zellen der Myelopoese vorkommen (Cannistra SA, 1990). Neutrophile, die durch GM-CSF stimuliert wurden, zeigen eine verminderte Migration, eine vermehrte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und eine verstärkte Phagozytose von Bakterien und Pilzen. Auch die Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls CD11b wird nach GM-CSF-Gabe auf neutrophilen Granulozyten hochreguliert (Cannistra, 1988).

Bei **AML**-Blasten wurde etwa in der Hälfte der Fälle in vitro eine Proliferationsteigerung des leukämischen Zellklons, in ca. ¼ der Fälle auch eine Ausreifung der Zellen beobachtet (Faussat-Suberville AM, 1993, **Schmetzer HM, 1999**). In vielen AML-Fällen wurde eine autokrine Sekretion von GM-CSF und Stimulation beobachtet (Rogers SY, 1994). Ca. 2/3 der AML-Fälle reagieren auf GM-CSF-Stimulation mit einer Herunterregulation der GM-CSF-Rs, 1/3 dagegen mit einer Steigerung der Rezeptordichte (Lanza F, 1997). Ebenso wie G-CSF schützt GM-CSF AML-Blasten vor dem programmierten Zelltod und vermag daher die in vitro-Wirkung von Anthrazyklinen wie z.B. Daunorubizin zu vermindern (Sachs L, 1996). Auf der anderen Seite fördert GM-CSF die selektive Aufnahme von AraC in die AML-Blasten. In vitro führt GM-CSF-Stimulation zu einer Hochregulierung von ICAM-1 und LFA-3 auf AML-Zellen, wodurch die Zerstörung der Blasten durch IL-2-aktivierte NK-Zellen gefördert wird (Bendall LJ, 1995; Braun S & **Schmetzer H, 2000a & 2000b**). Wenn AML-Zellen vor Kontakt mit den aktivierten NK-Zellen mit GM-CSF inkubiert werden, war ihr

Wachstum in klonogenen Assays vermindert. In vitro können durch Stimulation von AML-Zellen mit IFN α , IFN γ , IL-4+GM-CSF, SCF+FL+TNF α dendritischen Zellen mit hoher B7-1- und auch B7-2-Expression gezüchtet werden (Bruserud O, 1999). Dendritische Zellen sind geeignetere Stimulatoren der tumorspezifischen T-Zell-Antwort als die AML-Zellen selbst (Choudhury AA, 1998). *In vivo* steigt nach Applikation von GM-CSF die Zahl der Neutrophilen und Monozyten, sowie der Eosinophilen im Blut an. Die Produktionsrate der Neutrophilen wird auf das 2- bis 3-fache erhöht und deren Lebenszeit im peripheren Blut von ungefähr 8 auf 48h verlängert. Auch die Mortalität an Pilzinfektionen in der Neutropeniephase nach Chemotherapie nimmt unter GM-CSF – Gabe ab. Eine Steigerung des Wachstums der Leukämiezellen unter GM-CSF Applikation scheint *in vivo* nicht bedenklich zu sein (Rowe JM, 1999).

Klinische Relevanz: Routinemäßig wird GM-CSF - wie auch G-CSF - zur Mobilisation von Stammzellen zur Verkürzung der Neutropeniephase nach myeloablativer Chemotherapie und zum Priming eingesetzt. Eine Korrelation zwischen der GM-CSF-R – Expression und dem klinischen Verlauf bei der AML konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Lanza F, 1997).

2.2.2.5. G-CSF-R (CD114)

Der G-CSF-R ist ein homodimerer Rezeptor, der sich aus zwei gleichen aus 7 antiparallel gefalteten β -Ketten-Domänen besteht. Sie haben strukturelle Ähnlichkeit mit dem Hämatopoetinrezeptor, der konstanten Domäne der Immunglobuline und dem Fibronectin (Larsen A, 1990). Anders als die transmembranalen Tyrosinkinase-Rezeptoren SCF-R und FL-R wird bei spezifischer Ligand-Rezeptor-Bindung nicht direkt eine rezeptoreigene Tyrosinkinase aktiviert, sondern die zyttoplasmatische Signaltransduktion erfolgt über die Rekrutierung zur Gruppe der src-Proteine gehörenden Tyrosinkinasen und der JAK2 Proteinkinasen, die auch von anderen CSFs rekrutiert werden können (Kishimoto T, 1994). Ligand des G-CSF-R ist G-CSF, ein glykosyliertes Protein, das von aktivierten Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und auch Mesothelzellen produziert werden kann. Auslösender Reiz für die Produktion von G-CSF sind z.B. IL1, TNF und Lipopolysaccharide. Das G-CSF-R kodierende CSF3R-Gen liegt auf dem Chromosom 1p32-35, das Gen des G-CSF-R ist auf Chromosom 5 lokalisiert.

Lokalisation: Bei der normalen Hämopoese findet man schon auf primitiven Vorläuferzellen eine geringe Expression des G-CSF-R. Mit zunehmender Differenzierung dieser Zellen nimmt auch die Höhe der G-CSF-R-Expression zu (Lund-Johansen F, 1999; Shinjo K, 1997; Wognum AW, 1996). Vor allem innerhalb der granulozytären Zelllinie wird der G-CSF-R mit zunehmender Differenzierung häufig exprimiert, während er innerhalb der anderen Zelllinien der Myelo- und Lymphopoese nicht exprimiert wird. Einzige Ausnahme bilden reife Thrombozyten (aber nicht auf Megakaryozyten), auf denen wenig G-CSF-Rs nachgewiesen werden konnten. Der G-CSF-Rezeptor wird auch auf den Zellen des Knochenmarkstromas exprimiert. Liu F et al (2000) zeigten im Mausmodell, dass die Expression von G-CSF-R auf Stammzellen für die Mobilisation nicht unbedingt erforderlich ist, sondern vielmehr die Stimulation der **Stromazellen** mit G-CSF indirekt zu einer Mobilisation der Stammzellen führt.

Auch auf AML-Blasten wurden G-CSF-R nachgewiesen (Motoji T; 1990, Budel LM, 1989, Park LS, 1989, Piao YF, 1990, Kondo S 1991, Shimoda K, 1992, Koubek, K, 1998, Shinjo K, 1997, Avalos BR, 1998). Die höchste Expression des G-CSF-R wurde innerhalb der FAB-Typen M2, M3 und M4 beobachtet (Motoji T; 1990, Budel LM, 1989, Kondo S 1991). Weniger häufig werden G-CSF-Rs auch auf ALL-Zellen gefunden (Shinjo K, 1997). Auf AML-Blasten, die *in vitro* auch ohne Zugabe von G-CSF proliferieren, wurde auch eine **autokrine Stimulation** der G-CSF-Rs durch von den Blasten selbst produzierten G-CSF gefunden.

Funktion: *In vitro* stimuliert G-CSF in erster Linie die Granulozytopoese und aktiviert neutrophile Granulozyten (Demetri G, 1991). G-CSF steigert die Produktionsrate der Neutrophilen bis um das ca. 10-fache und verkürzt deren Ausreifungszeit von 5 auf 1 Tag. *In vivo* führt G-CSF fast ausschließlich zu einem Anstieg der Neutrophilen und weist somit ein engeres, linienspezifischeres Wirkungsspektrum als GM-CSF auf. Bei ca. der Hälfte aller **AML-Fälle** bewirkt eine G-CSF-Stimulation *in vitro* eine Steigerung der Proliferation des leukämischen Zellklons (Motoji T, 1991). Bei einem AML-Patienten des FAB-Typs-M3 konnte auch *in vivo* eine zunehmende Differenzierung der unreifen Blasten beobachtet werden (Katayama N, 1998). Zudem scheint G-CSF auch die AML-Blasten vor dem programmierten Zelltod zu schützen (Sachs L, 1993), andererseits fördert es die Aufnahme von Anthracyclinen in die AML-Zelle.

Klinische Relevanz: G-CSF wird zur Verkürzung der Neutropeniephase nach Chemotherapie, zur Mobilisation von Stammzellen für eine autologe KMT und zum Priming eingesetzt.

2.2.2.6. gp130-Subunit (CD130)

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Rezeptoren stellt die gp130-Subunit keinen ligandspezifischen Rezeptor dar, sondern sie ist die gemeinsame signaltransduzierende Untereinheit der Rezeptoren von IL-6, IL-11, LIF(Leukämie-inhibierender-Faktor), CNTF (ziliärer neurotroper Faktor), OSM (Oncostatin) und CCT-1(Kardiotrophin 1). Bindet das entsprechende Zytokin seinen Liganden kommt es zu einer Assoziation mit der gp130-Subunit. Eine Dimerisierung von gp130 führt dann zur intrazellulären Auslösung des spezifischen Signals und durch Aktivierung von JAK-Kinasen wird schließlich die Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt (Roeb E, 1996). Lösliche Formen dieser Rezeptoren können ihre Ligandspezifität und die Fähigkeit, die gp130-Subunit zu aktivieren beibehalten. So können z.B. auch Komplexe aus löslichen IL-6-R und IL-6 die gp130-Subunit aktivieren. Ein stärker wirksames, rekombinantes Fusionsprotein dieser beiden Komponenten wird Hyper-IL6 (H-IL-6) genannt und kann seine Wirkung direkt an der gp130-Subunit entfalten (Audet J, 2000). H-IL-6 oder auch physiologisch vorkommende IL-6/IL-6-R Komplexe können daher in Analogie zu den obigen Ausführungen als „Ligand“ der gp130-Subunit gesehen werden. Sie werden von AML-Blasten selbst produziert. Die die gp130-Subunit kodierenden Gene liegen auf Chromosom 5 und 17.

Lokalisation: Die gp130-Subunit ist ubiquitär auf allen Zellen verschiedener Gewebe und Organe lokalisiert. Auch auf allen Zellen der normalen Hämatopoese läßt sich die gp130-Subunit nachweisen. Dagegen ist die Expression der ligandspezifischen Rezeptoren stärker determiniert. Auch bei der AML konnte sowohl das Gen als auch die Expression der gp130-Subunit nachgewiesen werden (Koubek K, 1998, Kimura T, 1999, Inoue K, 1994).

Funktion: Die Zytokine, die ihre Signale via der gp130-Subunit weiterleiten, gehören zur Gruppe der synergistisch wirkenden Zytokine, d.h. bei nur geringem Effekt auf die Hämpoese allein, können sie v.a. in Kombination mit CSFs oder auf Stammzellebene wirksamen HGFs zu einer Steigerung der Hämpoese führen. So führt in vitro die gemeinsame Stimulation von SCF-R, IL-3-R und der gp130-Subunit zu einer massiven Steigerung der Hämpoese aller drei Zelllinien (Kimura T, 2000). Dabei scheint H-IL-6 in dieser Kombination nicht nur die Stammzellaktivierung zu erhalten (Audet J, 2000), sondern es kommt ihm v.a. eine Rolle bei der Differenzierung und Ausreifung der Progenitorzellen zu (Kimura T, 2000). Sowohl die Granulozyten als auch die Erythrozyten und Megakaryozyten können auch ohne Anwesenheit linienspezifischer Zytokine wie Erythropoetin und Thrombopoetin und G-CSF durch die Aktivierung der gp130-Subunit (zusammen mit SCF-R) zur Ausreifung gelangen (Sui X, 1999).

Auch auf das in vitro-Wachstum von AML-Blasten scheint die Signaltransduktion über die gp130-Subunit von Bedeutung zu sein. Auf der einen Seite können Punktmutationen in N-ras zu einer erhöhten autokrinen Produktion von IL-6 führen und so das autokrine Wachstum des malignen Zellklons in Verbindung mit dem ebenfalls auf AML-Blasten regelmäßig exprimierten IL-6-R fördern (Saily M, 1999). Auch die Gabe von IL-6-R allein stimuliert in vitro das Blastenwachstum. IL-6-R Stimulation auf AML-Blasten in vitro kann deren Apoptose fördern und somit die Wirkung von Anthrazyklinen verstärken (Rowe, JM 1999). Auch unter IL-11 Stimulation konnte in vitro die klonale Proliferation von AML-Blasten gesteigert werden (Kimura T, 1999). All diese Effekte wären ohne eine intakte Signaltransduktion über die gp130-Subunit nicht möglich.

2.2.2.7. Funktionelle Einteilung der Zytokinrezeptoren

Differenzierung, Proliferation und auch Mobilisation hämpoetischer Zellen hängen von der An- oder Abwesenheit bestimmter Zytokine und ihrer Rezeptoren ab. Dabei weisen die einzelnen Reifestufen der Hämpoese eine für sie charakteristische Zytokinrezeptorexpression auf. Entsprechend der Lokalisation ihrer Zytokinrezeptoren auf den verschiedenen hämpoetischen Entwicklungsstufen lassen sich die Zytokine in drei funktionelle Gruppen einteilen: Zytokine, die v.a. die Determinierung und Proliferation früher hämpoetischer Stammzellen beeinflussen werden als „Stammzellefaktoren“ bezeichnet. Zytokine, deren Wirksamkeit sich v.a. auf der Reifungsstufe der Kolonie-bildenden-Einheiten erstreckt, werden in die Gruppe der „CFU-wirksamen-Faktoren“ eingeteilt und schließlich werden Zytokine, die allein nur wenig Effekt haben, die Signale anderer Zytokinrezeptoren aber verstärken und/oder die Zellen dann zur Ausreifung bringen als „synergistische Faktoren“ bezeichnet. Tab. 2.2.2.1. gibt einen orientierenden Überblick über die hier

untersuchten HGF-Rezeptoren, deren Lokalisation und Funktion bei der Hämopoese. Anhand der Zytokinrezeptorexpression bei gesunden KM-Zellen kann auf den Reifegrad und die Linienzugehörigkeit (granulozytär, monozytär, erythrozytär usw.) der normalen hämopoetischen Zellen geschlossen werden. Dies scheint bei der AML schwieriger zu sein. Die bisher durchgeführten Untersuchungen der Zytokinrezeptorexpression auf AML-Blasten weisen eine große Heterogenität auf.

Tab.2.2.2.1: Zytokinrezeptoren und deren Hauptwirkung bei der normalen Hämopoese

CD	Rezeptor	Hauptfunktion
Stammzell-Faktoren		
CD117	SCF-R	Proliferation und Aktivierung v.a. unreifer Progenitorzellen und Mastzellen
CD135	FL-R	Proliferation und Aktivierung unreifer Progenitorzellen v.a. der myelomonozytären Zelllinie
Kolonie-stimulierende-Faktoren		
CD114	G-CSF-R	Proliferation, Differenzierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten
CD116	GM-CSF-R	Proliferation, Differenzierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten, geringerer Effekt auf Erythro- und Megakaryozytose
CD123	IL-3-R	Rekrutierung myeloider CFUs für Proliferation und Differenzierung durch andere Zytokine
Synergistisch- wirkende-Faktoren		
CD130	gp130-Subunit	Signaltransduzierende Einheit von spezifischen Rezeptoren für IL-6, LIF, CNTF, Onkostatine, IL-11, CT-1. Erhaltung der Stammzellaktivierung und Differenzierung zusammen mit anderen Zytokinen

(Tabelle in Anlehnung übernommen aus Wognum AW, 1996)

2.2.3. Die Rolle der Adhäsionsmoleküle im Knochenmark

Interaktionen der hämopoetischen pluripotenten Vorläuferzellen mit dem Knochenmarksstroma spielen eine wichtige Rolle bei der Hämopoese. Um mit der extrazellulären Matrix Kontakt aufzunehmen, findet sich auf den Oberflächen der Zellen ein variierendes Angebot von Adhäsionsmolekülen, die intrazellulär mit Tyrosin- bzw. Serumproteinkinasen verbunden sind. Bindet das Adhäsionsmolekül an seinen spezifischen Ligand, so erhalten die Zellen wichtige transmembranale Signale für Migration („mobilizing“, „homing“), Wachstum und Differenzierung. Meist wird die Zell-zu-Zell-Adhäsion nicht durch ein einziges Rezeptor/Liganden-Paar gewährleistet, sondern in der Regel sind mehrere dieser Bindungspaare für eine stabile und spezifische Adhäsion notwendig. In Abhängigkeit von Reifegrad und Differenzierung werden die hämopoetischen Zellen in einem bestimmten Mikromilieu, das die entsprechenden stimulierenden oder inhibierenden Zytokine bereit hält, gehalten. Daher werden – analog zu den Zytokinrezeptoren- während der Hämopoese abhängig von Reifegrad und Differenzierung unterschiedliche Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche exprimiert (Clark BR, 1992). Zytokinwirkung und Zelladhäsion stehen in einem wechselseitigen Abhängigkeitsverhältnis zueinander: Zum einen werden die Adhäsionseigenschaften der Zellen durch Zytokine moduliert, zum anderen ist die Adhäsion der Zellen für die Proliferation und damit auch für die Wirksamkeit der Zytokine erforderlich (Kovach NL, 1995; Levesque JP, 1996).

Da bei der AML nicht nur Proliferation und Differenzierung der Blasten, sondern auch deren Lokalisation gestört ist, kann dies mit veränderten Adhäsionseigenschaften zusammenhängen. Der veränderte Kontakt zwischen den Stromazellen und den Knochenmarkszellen kann sowohl zu einem Ungleichgewicht zwischen stimulierenden und inhibierenden Effekten von Zytokinen führen, als auch ein gestörtes Apoptoseverhalten bzw. einen verminderten Abbau der Blasten durch zytotoxische Zellen bedingen (de Waele M, 1999). Dowding C (1991) konnte bei der CML bereits nachweisen, dass primitive Vorläuferzellen, die das Philadelphia-Chromosom trugen, einen Defekt in der Bindungskapazität aufwiesen. Um die Funktion und die Interaktion der einzelnen Adhäsionsmoleküle bei der AML zu verstehen, sollen diese in den nachfolgenden Abschnitten einzeln vorgestellt werden.

Aufgrund ihrer Struktur werden vier Gruppen von Adhäsionsmolekülen unterschieden, die Selektine (z.B. L-Selektin), die β 1- und β 2-Integrine (z.B. VLA, LFA-1, Mac-1) und die zur Superfamilie der Immunglobuline gehörenden Moleküle (z.B. ICAM, NCAM, LFA-3, B7, PRR und UPA-R).

2.2.3.1. L-Selektin (CD62L)

Die Selektine (Syn.: Lektin-Adhäsionsmoleküle, LEC-CAMs, CD62) sind transmembranale Glykoproteine mit typischer Struktur: Eine lektinartige Domäne ist über eine EGF - ähnliche Region mit mehreren Komplement – regulierenden Proteinbausteinen verbunden. Es folgt eine hydrophobe Transmembran- und eine kurze, C-terminale, zytoplasmatische Region. Je nach überwiegendem Auftreten auf den Zellen unterscheidet man das L (Leukozyten)-, das P (Platelets, Thrombozyten)- und das E (Endothel)- Selektin. Da sowohl P- als auch E-Selektin sehr selten auf AML-Blasten exprimiert werden (Reuss-Borst MA, 1995; Liesveld JL, 1997), wurden sie in dieser Arbeit nicht untersucht. Im folgenden wird auf die Rolle des L-Selectins (Syn. CD62L, LEC-CAM 1, LAM-1, Leu 8, MEL-14) eingegangen. Liganden des L-Selectins sind auf den kubischen, postkapillären Venen der Lymphknoten CD34, PCLP-1 und Gly-CAM-1, auf den versorgenden Gefäßen der lymphatischen Organe v.a. Mad-CAM-1 (Stamencovic I, 1995), auf zytokin-aktivierten peripheren Endothelien fukosylierte, sialyrierte Kohlenwasserstoffe, sogenannte Sialomucine (z.B. Sialyl LeX, Sgp-200, PCLP-1) und auf hämopoetischen Progenitorzellen neben CD34 und PCLP-1 ein bisher nur als 'Selektin-Ligand' bezeichnetes Glykoprotein. Das kodierende Gen des L-Selectins liegt auf Chromosom 1.

Lokalisation: Bei der normalen Hämpoese wird L-Selektin v.a. auf den unreifen myeloiden und lymphatischen hämopoetischen Vorläuferzellen exprimiert. Während differenziertere, linienzugehörige Vorläuferzellen L-Selektin nicht mehr exprimieren, sind reife B-, T-Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen/Monozyten wieder L-Selektin positiv. Auf Zellen der erythrozytären und megakaryozytären Linie wird L-Selektin nicht gefunden (Sackstein R, 1997). Auch AML-Blasten exprimieren CD62L (Kortlepel K, 1992, Reuss-Borst MA, 1995, Liesveldt JL, 1997), wobei eine geringere Expression von CD62L auf den CD34⁺ AML-Blasten als auf gesunden CD34⁺ Vorläuferzellen festgestellt wurde (De Waele M, 1999).

Funktion: Die Bindung via L-Selektin spielt beim **Zell-Endothel-Kontakt** als auch bei der **Hämopoese** eine Rolle: Bei neutrophilen Granulozyten vermittelt L-Selektin die Bindung an Endothelien, die in Entzündungsherden durch Zytokine (TNF-alpha, IL-1 und IFN-alpha) aktiviert worden sind. L-Selektin bindet dabei reversibel, calcium-abhängig an den Kohlenhydratanteil von mucinähnlichen Molekülen wie z.B. Sialyl-LeX. Die Erkennung des Liganden durch L-Selektin erfolgt rasch, jedoch mit niedriger Affinität, so dass die Leukozyten sich „rollend“ auf dem Endothel fortbewegen können („**Rolling**“). Durch diese L-Selektin-Aktivierung wird die Bindung von LFA-1 zu ICAM-1 induziert, wodurch eine affinere Adhäsion an das Endothel geschaffen und die Migration der Zellen in das periphere Gewebe initiiert wird. Die Bindung der T-Lymphozyten via L-Selektin an sog. vaskulären Adressine ist verantwortlich für das spezifische Homing naiver T-Lymphozyten in die lymphatischen Organe. L-Selektin scheint auch eine Rolle bei der Extravasation der AML-Blasten aus dem peripheren Gefäßen in den extravasalen Raum ein Rolle zu spielen. Neben dem membrangebundenen L-Selektin gibt es auch eine biologisch aktive, lösliche Form des L-Selectins, das von der Oberfläche L-Selektin-tragender Zellen bei der Transmigration durch das Endothel abgespalten wird (**Rezeptor -Shedding**). Auch die Bindung von β 2-Integrinen führt zum Rezeptor-shedding von L-Selektin (Möhle R, 1997). Bindet diese lösliche Form an die entsprechenden Rezeptoren, so wird die Bindung der L-Selektin-tragenden Zellen verhindert. Bei der AML wurden erhöhte Spiegel von sL-Selektin in Abhängigkeit von der Blastenzahl nachgewiesen (Bruserud O, 1999), während insgesamt die Expression von L-Selektin auf den Blasten geringer ist. Je höher die sL-Selektin-Konzentration im Serum ist, desto höher ist die Inzidenz extramedullärer Manifestationen und desto ungünstiger ist der klinische Verlauf der Patienten (Extermann M, 1998). Wie auch die Granulozyten binden die AML-Blasten via CD62L an das Endothel. Migrieren sie in die Peripherie wird L-Selektin abgespalten (Möhle R, 1997) und kann in löslicher Form sowohl das Homing ins KM und eine weitere Transmigration verhindern. Dies kann u.a. die hohen peripheren Blastenzahlen bei der AML erklären.

Welche Rolle CD62L bei der **Transmigration** der hämopoetischen Zellen vom KM in die Peripherie spielt, ist noch unklar. Während in einige Arbeiten vermutet wurde, dass sich die hämopoetischen Zellen via L-Selektin an das Sinusendthel des KM binden (Bradstock K, 1995, Dercksen MW, 1995, Möhle R, 1995, Asosingh K, 1998) konnten intravitale Elektronenmikroskopaufnahmen an murinem KM zeigen, dass L-Selektin keine Rolle beim Rolling der hämopoetischen Zellen an den KM-Sinusendothelien spielt (Chan JH, 2001).

In vitro wurde gezeigt, dass bei der Hämpoese die L-Selektin-Expression auf den hämopoetische Vorläuferzellen mit deren klonogenem Potential korreliert. Bindungspartner des L-Selektins bei der Hämpoese ist ein Glykoprotein, das sich von den Sialomucin-Rezeptoren auf dem Endothel unterscheidet und dem eine entscheidende Rolle für die Zellinteraktion zwischen Progenitorzellen/Progenitorzellen,

Progenitorzellen/T-Lymphozyten und Progenitorzellen/KM-Stroma bei der Hämopoese zugeordnet wird (Sackstein R, 1997). Es wird vermutet, dass auch die Sialomucine CD34 und das dem CD34 ähnliche PCLP-1 als Liganden wirken. Ihre genaue Rolle ist jedoch noch unklar (Chan JY, 2001). In vivo zeigten Dercksen MW et al. (1995) eine Steigerung der Hämopoese nach zytotoxischer Therapie nach Transplantation von **CD62L**+CD34+Stammzellen. Dies kann zum einen mit einem verbesserten Homing, zum andern mit einer gesteigerten Hämopoese zusammenhängen.

2.2.3.2. Integrine - Allgemeines

Integrine sind heterodimere Glykoproteine, bestehend aus einer α - und β -Kette, die in der Membran verankert sind. Je nach Struktur der β -Kette unterscheidet man β_1 -Integrine, die auch Very-late-Antigene (VLA) genannt werden, β_2 -Integrine, zu denen LFA-1, Mac-1 und p150/95 gehören, und β_3 -Integrine, die alle jeweils mit ca. 16 verschiedenen Alpha-Ketten kombiniert sein können. Als integraler Membranbaustein stehen sie mit ihrem zytoplasmatischen Bestandteil mit dem Zytoskelett (Aktinin und Talin) der Zellen in Verbindung (Otey CA, 1990; Burn P, 1988). Über die Phosphorylierung von Tyrosin und die Mobilisation von Calcium können Integrine nach Bindung ihrer entsprechenden Liganden Signale von der extrazellulären Matrix ins Zellinnere übertragen („Outside-in-Signaling“) (Haimovich B, 1993). Umgekehrt kann sich der Affinitätsstatus der Integrine in Abhängigkeit von zytoplasmatischen Signalen ändern („Inside-out-Signaling“). Während sich die Selektine via „Shedding“ regulieren, werden die Integrine via Affinitätsänderungen zu ihrem Bindungspartner reguliert, so daß man über die Expression eines Integrins auf der Zelloberfläche nicht notwendigerweise auf dessen Funktions- bzw. Aktivitätsstatus schließen kann (Sanchez-Aparicio P, 1994, Clark B, 1992).

Eine Übersicht über einige ausgewählte, bei der Hämopoese wichtige Integrine, ihrer Gewebeverteilung und ihrer Liganden gibt Tab. 2.2.3.2.1

Tab. 2.2.3.2.1 Integrine, Liganden und Gewebeverteilung

Integrin-Familie	Name	CD-Nomenklatur	Ligand	Gewebeverteilung
β_1-Integrine	VLA-1 ($\alpha_1\beta_1$)	CD49a	Kollagen, Laminin	Aktiviert T- und B-Lymphozyten, Fibroblasten, Basalmembran, Knochenmarkszellen (35%)
	VLA-2 ($\alpha_2\beta_1$)	CD49b	Kollagen I, III- VI	Endothel, Epithel, Fibroblasten, Thrombozyten, aktivierte T-Zellen, 5% mononukleäre Knochenmarkszellen (5-10% der KM-Stromazellen, nicht auf Makrophagen)
	VLA-3 ($\alpha_3\beta_1$)	CD49c	Fibronnektin, Laminin, Kollagen I, IV	Epithel, Basalmembran, 20-40% KM-Stroma-Zellen.
	VLA-4 (LPAM-1) ($\alpha_4\beta_1$)	CD49d	VCAM-1, Fibronnektin	B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, 30-40% der mononukleären KM-Zellen, Fibroblasten, Neuralzellen, Thymus
	VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$)	CD49e	Fibronnektin(Fn)	T-Zellen, Thrombozyten, Thymozyten, Endothel, Epithel, Fibroblasten
β_2-Integrine	LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$)	CD11a	ICAMs	T- u. B-Lymphozyten, NK-Zellen, Granulozyten und Monozyten,
	Mac-1, CR3 ($\alpha_M\beta_2$)	CD11b	ICAMs, iC3b	NK-Zellen, Monozyten, Granulozyten, 21-70% der mononukleären KM-Zellen.

(In Anlehnung an Knapp W, 1989)

2.2.3.3. VLA-2 und VLA-3

Obwohl die α/β -Nomenklatur eine große Vereinfachung zur Klassifizierung der Integrine darstellt, ist die VLA-Nomenklatur, für eine Gruppe von Molekülen, die erst 14 – 21 Tagen nach der Aktivierung von Lymphozyten hochreguliert werden (daher der Name „Very-Late-Antigen“), noch weit verbreitet und gebräuchlich.

Die β 1-Integrine VLA-4 und VLA-5 spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion der Vorläuferzellen an das Knochenmark (Möhle R, 1995; Prosper F, 1998; Yamaguchi M, 1998, Lichterfeld M, 2000) und bei der Unterstützung der Proliferation (Kronenwett R, 1998) der hämopoetischer Zellen durch Zytokine. Es zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied in der Expression auf AML-Blasten im Vergleich zu normalen hämopoetischen Vorläuferzellen (de Waele M, 1999), so dass sie in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden. Es wurde daher auf die weniger untersuchten β 1-Integrine VLA-2 und VLA-3 eingegangen: Wichtiger Ligand der β 1-Integrine ist das Fibronectin, mit dessen Arginin-Glycin-Aspartat-(RGD)-Region (D'Souza SE, 1991) als auch mit dessen Leucin-Aspartat-Valine-(LDV)-Region (=CS-1) (Mould AP, 1991) Interaktionen mit den β 1-Integrinen stattfinden. Weitere Liganden von VLA-2 und VLA-3 sind Laminin und Kollagen I und IV, VLA-3 bindet auch an Kalinin (Liesveldt JL, 1997). Der Genort der β 1-Kette liegt auf Chromosom 10p11.2, der der α 2-Kette auf Chromosom 5.

Lokalisation: Auf **gesunden** CD34⁺Vorläuferzellen konnte Reuss-Borst MA et al. (1995) weder VLA-2 noch VLA-3 durchflusszytometrisch nachweisen, während DeWaele M et al. (1999) mit der sensibleren Streptavidin-Biotin-Methode VLA-2 und VLA-3 in niedriger Expressionshöhe finden konnte. Bei den reifen hämopoetischen Vorläuferzellen wird VLA-2 auf Monozyten, Megakaryozyten und Lymphozyten nachgewiesen (Soligo D, 1990). Auf Fibroblasten finden sich sowohl VLA-2, als auch VLA-3. Auf Endothelzellen läßt sich nur VLA-3 nachweisen. Auch auf AML-Blasten konnte eine Expression von VLA-2 (DeWaele M, 1999, Reuss-Borst MA, 1995, Liesveldt JL, 1997, Vila L, 1995) und VLA-3 (DeWaele M, 1999, Reuss-Borst MA, 1995) nachgewiesen werden. Allerdings war die Expression stets sehr niedrig, so dass einige Gruppen auch keine Expression dieser β 1-Integrine nachweisen konnten (Kortlepel K, 1993).

Funktion: β 1-Integrine binden die hämopoetischen Vorläuferzellen an das Knochenmarksstroma der entsprechenden Knochenmarksnische (Liesveldt JL 1991 & 1993, Teixido J, 1992). Wie alle β -1 Integrine verbinden auch VLA-2 und VLA-3 das Zytoskelett der Zellen mit der extrazellulären Matrix und können dadurch die Proliferation und Migration der Zellen beeinflussen (Soligo D, 1990). Welche Funktion VLA-2 und VLA-3 bei der AML haben, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Vila L et al (1995) konnten keine Korrelation der Expression von VLA mit dem Krankheitsverlauf bei der AML feststellen.

2.2.3.4. LFA-1(CD11a)

LFA-1 (Syn. lymphocyte function associated antigen-1, CD11a/CD18) spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion an das Endothel und beim Kontakt zu immunkompetenten Zellen. LFA-3 bindet an die Adhäsionsmoleküle ICAM 1-3. Das die α 1-Kette kodierende Gen des LFA-1 liegt auf Chromosom 16p11-p13.1, das die β 2-Kette kodierende Gen auf Chromosom 21q22.

Lokalisation: LFA-1 wird auf einer reiferen Untergruppe CD34⁺CD38⁻Stammzellen (Gunji Y, 1992) und auf den meisten myeloid und lymphoid determinierten hämopoetischen CD34⁺Vorläuferzellen nachgewiesen (DeWaele M, 1999, Kansas GS, 1990). Während die Expression von LFA-1 im Laufe der granulozytär-monozytären Zellreifung zunimmt, verschwindet sie auf den Zellen, die der erythrozytären Linie angehören. LFA-1 wird schließlich auf reifen neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Megakaryozyten, T-, B- Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert. Generell wird LFA-1 auf *allen* Leukozyten exprimiert, am meisten findet man LFA-1 aber auf reiferen Stadien der Monozytopoese (Yoder MC, 1995). Auch auf **AML-Blasten** wird LFA-1 sehr häufig nachgewiesen (Kortlepel K, 1993, De Waele M, 1999), es kann aber auch völlig fehlen (Archimbaud E, 1992). Soligo D et al (1990) stellte fest, dass v.a. Blasten einer reiferen Entwicklungsstufe der Myelopoese LFA-1 exprimieren. Brouwer RE et al (2000) fanden die höchste Expression von LFA-1 innerhalb des FAB-Typs M5 und die niedrigste Expression innerhalb des FAB-Typs M3.

Funktion: LFA-1 spielt eine Rolle bei der **Transmigration** hämopoetischer Vorläuferzellen durch das Endothel der KM-Sinus. Torensma R et al (1996) stellten fest, dass frühe CD34⁺KM-Zellen im Knochenmark meist LFA-1 negativ sind. Unter in vitro Kulturbedingungen wird aber die Expression von LFA-1 rasch hochreguliert. Sie stellten die Hypothese auf, dass unter normalen Bedingungen im Knochenmark die LFA-1-Expression im KM niedrig gehalten wird. Kommt es z.B. bei Entzündungen zu einem veränderten Zytokinmilieu und damit zur raschen Proliferation der Zellen im Knochenmark verlieren einige Zellen den Kontakt zum KM-Stroma und diese Zellen exprimieren dann LFA-1 als Vorbereitung für die Migration in die Peripherie. Diese These wird durch weitere Untersuchungen erhärtet: Durch LFA-1-blockierende monoklonale Antikörper kann die

Adhäsion und die Migration durch das Endothel inhibiert werden (Möhle R, 1997), allerdings weniger effizient als durch Antikörper gegen β 1-Integrine (Teixido J, 1992). Gleichzeitig zeigen Zellen, die an das KM-Endothel adhären, in vitro eine erhöhte Expression von LFA-1. Die zunächst reversible Bindung des L-Selektin an das Endothel beeinflusst den Affinitätsstatus von LFA-1 und es wird eine irreversible Bindung an ICAM-1 und Migration durch das Endothel induziert. Umgekehrt –als eine Art negative Rückkopplung- induziert die LFA-1/ICAM-1-Bindung das Rezeptorshedding von CD62L und durch die erhöhte Konzentration von sL-Selektin wird die weitere Bindung an das Endothel vermindert bzw inhibiert. Auf zirkulierenden Vorläuferzellen nach G-CSF-Behandlung (bei Patienten mit verschiedenen Malignomen) wird LFA-1 niedriger exprimiert als auf gesunden KM-Zellen (Möhle R, 1995). Asosingh K. et al (1998) stellte dagegen auf G-CSF mobilisierten Stammzellen von Patienten mit hämatologischen Malignomen eine höhere Expression von LFA-1 als bei KM-Zellen von Gesunden fest. T-Zellen, NK-Zellen, LAK-Zellen und Monozyten/Makrophagen binden über LFA-1 an antigenpräsentierende Zellen, die ICAM 1-3 exprimieren (Dustin ML, 1989).

Klinische Relevanz: Da Kinder mit einem LAD-Syndrom (Leukocyte-Adhäsion-Defect-Syndrom) keine Defekte in der **Hämopoese** aufweisen, wird dem LFA-1 **keine bedeutende Rolle** bei der Proliferation und Zellreifung der hämopoetischen Progenitorzellen beigemessen (Coulombel L, 1997).

Brouwer RE et al (2001) konnte bei einer hohen (>80%) LFA-1-Expression eine signifikant verminderte 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) bei AML-Patienten innerhalb der FAB-Typen M4 und M5 nachweisen.

2.2.3.5. Mac-1 (CD11b)

Das Makrophagen-Differenzierungs-Antigen (Syn. Mac-1, Mo-1, CD11b/CD18) ist ein Komplementrezeptor für C3 und wird deshalb auch oft CR-3 (Complement-Rezeptor-3) genannt. Er hat ein sehr breites Bindungsverhalten: Mac-1 bindet iC3b, ICAM-1, Fibrinogen, Lipopolysaccharide, β -Glucane und den Gerinnungsfaktor X (Diamond MS, 1990; Rosen H, 1990). Das Gen der α_M -Kette liegt auf Chromosom 16, das der β_2 -kette auf Chromosom 21q22.

Lokalisation: Auf gesunden Stammzellen wird Mac-1 in der Regel nicht, bei der Mehrzahl der CD34+Progenitorzellen wird er ebenfalls nicht oder nur geringgradig exprimiert (De Waele M, 1999, Reuss-Borst MA, 1995). Im Gegensatz zu LFA-1 wird Mac-1 v.a. auf Zellen der myeloiden Zelllinie exprimiert, dabei v.a. auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten. Eine geringe Expression findet man auch auf NK-Zellen und –aktivierungsabhängig- auf T-Lymphozyten (Wagner C; 2001). Auch auf AML-Blasten konnte in der Mehrzahl der Fälle eine Mac-1-Expression nachgewiesen werden, wobei die Höhe der Expression stark variierte und einige Fälle sogar eine Überexpression aufwiesen (De Waele M, 1999). Reuss-Borst MA et al (1995) konnten v.a. innerhalb der monozytären Leukämien eine hohe Mac-1-Expression nachweisen. Obwohl Mac-1 typischerweise auf Monozyten exprimiert wird, weisen AML-Blasten im Gegensatz hierzu keine weiteren Monozytenmerkmale auf, sondern eher Unreife-Zeichen wie die Expression des SCF-R (Paietta E, 1998). Bei der APL konnte eine Mac-1-Expression auf den Blasten nicht nachgewiesen werden (Thin HF, 1995). Rosenfeld C et al (2001) konnten bei sekundären Leukämien, die aus einem MDS hervorgingen, eine häufigere Expression von CD11b feststellen.

Funktion: Der Mac-1 spielt eine Rolle bei der Adhäsion von hämopoetischen Vorläuferzellen an das Endothel und der damit verbundenen Transmigration in die Peripherie (Denkers I, 1993). IL-8 führt zu einer Aktivierung der Neutrophilen und zu einer Hochregulation von Mac-1 (Link D, 2000). Dies könnte eine Schlüsselrolle bei der Mobilisation peripherer Stammzellen sein. In vitro konnte nach Zugabe von ATRA eine erhöhte Expression von Mac-1 auf den AML-Blasten beobachtet werden (DiNoto R, 1996).

Mac-1 spielt zusammen mit dem F_c -Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Phagozytose infektiöser Agenzien, und bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten.

Klinische Relevanz: Über den Einfluss der Expression von Mac-1 auf den klinischen Verlauf der AML divergierten die Ergebnisse in den bisher veröffentlichten Arbeiten. Einige konnten einen signifikant schlechteren Verlauf bei Expression von Mac-1 feststellen (Tien HF, 1995, Bradstock K, 1994, Paietta E, 1998), andere konnten keinen Einfluss auf die Klinik beobachten (Tucker J, 1990, Callea V, 1991), wieder andere sogar einen günstigen Verlauf (Amirghofran Z, 2001).

2.2.3.6. ICAM-1 (CD54)

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1, CD54) ist ein integrales Membranglykoprotein mit fünf extrazellulären, immunglobulinähnlichen Domänen, die über eine Disulfid-Brücke verbunden sind. Es gehört damit zur Superfamilie der Immunglobuline. ICAM-1 bindet an die β 2-Integrine LFA-1 und Mac-1 auf T-Zellen und an CD43. Genort des ICAM-1 liegt auf Chromosom 19.

Lokalisation: ICAM-1 wird bei der normalen Hämopoese v.a. auf der Stufe der CFU exprimiert und dann mit zunehmender Differenzierung der Zellen herunterreguliert. Konstitutionell exprimieren nur Monozyten und Endothelzellen ICAM-1. Die Expression kann jedoch auf einer Vielzahl von Zellen durch Zytokine induziert werden. Dies erklärt möglicherweise auch die divergierenden Ergebnisse in der Literatur über die ICAM-1 Expression bei der **AML**: Reuss-Borst MA et al (1995) zeigte, dass in 43% der untersuchten Fälle mehr als 70% ICAM-1-positive Blasten nachgewiesen werden konnten. Auch deWaele M et al. (1999) konnten auf AML-Blasten eine gesteigerte ICAM-1 Expression nachweisen, während Brouwer RE et al. (2000) und Hirano N et al. (1996) eine niedrige bis keine Expression auf AML-Blasten feststellten.

Funktion: Die Bindung von ICAM-1 an LFA-1 und/oder Mac-1 ist an der Aggregation der Leukozyten untereinander, an der Migration der Leukozyten und an der Steuerung der T- und B-Zellantwort beteiligt. ICAM-1 stellt ein wichtiges Zielantigen für T- und NK-Zellen dar, die via LFA-1 an ICAM-1 binden. Er kann durch Zytokine wie IL-2, GM-CSF, IFN γ , TNF α auf leukämischen Blasten hochreguliert werden (Bruserud O, 1999). All diese Zytokine werden in vivo von aktivierten T-Zellen produziert und die T-Zellantwort dadurch amplifiziert (Semnani RT, 1994). Die Hochregulierung von ICAM-1 durch GM-CSF und IL-2 wird für die gesteigerte Immunantwort gegen die leukämischen Blasten durch NK-Zellen oder T-Killer-Zellen verantwortlich gemacht (Olive D, 1991, Bendall LJ, 1995). In ersten klinischen Studien konnte durch IL-2-Gabe, das nach Erreichen der ersten Remission verabreicht wurde, ein längeres, progressfreies Intervall erreicht werden, als bei Patienten, die keine IL-2 Therapie erhalten haben (Cortes JE, 1999). Eine verminderte Empfindlichkeit von AML-Zellen gegen NK-Zellen in vitro konnte einer verminderten ICAM-1-Expression zugeordnet werden (Archimbaud E, 1992). Ohne Aktivierung von LFA-1 (oder CD2) durch ICAM-1 (oder LFA-3) kann der FAS-Ligand induzierte programmierte Zelltod der antigenpräsentierenden Zellen nicht stattfinden (in vitro) (Zhou YW, 1998).

Neben der membrangebundenen Form des ICAM-1 gibt es auch eine **lösliche, biologisch aktive Form** von ICAM-1, die als s(soluble)ICAM-1 bezeichnet wird und die sowohl von gesunden, als auch von AML-Zellen abgespalten werden kann. Der sICAM-1 kann sowohl die Adhäsion der Blasten an andere Zellen (z.B. Endothel), als auch die Kostimulation der T-Zellen durch ICAM-1-exprimierende AML-Blasten verhindern. Bei Patienten mit einer unbehandelten AML wurden erhöhte sICAM-1-Spiegel im Serum nachgewiesen. Ein weiterer Anstieg wurde bei noch zusätzlich aufgetretenen Infektionen beobachtet (Bruserud O, 1996). Da ICAM-1 auch auf Endothelzellen exprimiert wird, spielt die LFA-1/ICAM-1 Bindung auch bei der **Mobilisation und dem Homing** von Stammzellen eine wichtige Rolle.

Klinische Relevanz: Thomas X et al (1995) konnte **keine** Korrelation der ICAM-1-Expression mit dem Krankheitsverlauf der AML feststellen.

2.2.3.7. LFA-3 (CD58)

LFA-3 (leukocyte function associated antigen-3, CD58) ist ein kostimulatorisches Molekül, das zur Superfamilie der Immunglobuline gehört. Es bindet an CD2 auf T-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen. Das LFA-3 kodierende Gen liegt auf Chromosom 1q13, wie auch das Gen für seinen Liganden CD2.

Lokalisation: LFA-3 wird auf einer Vielzahl hämopoetischer und nicht hämopoetischer Zellen exprimiert: Auf gesunden hämopoetischen CD34⁺Progenitorzellen, Erythrozyten und antigenpräsentierenden Zellen wie DC, Monozyten/ Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und B-Lymphozyten, wird LFA-3 regelmäßig hoch exprimiert (De Waele M, 1999). Auch auf **AML**-Blasten konnten verschiedene Arbeitsgruppen eine hohe und häufige LFA-3 Expression nachweisen (Archimbaud E, 1992, Reuss-Borst MA, 1995, Liesveldt JL, 1997, De Waele M, 1999, Brouwer RE, 2000). Dabei ist die LFA-3 Expression innerhalb der FAB-Gruppen M4 und M5 am höchsten (Brouwer RE, 2001). Auch bei der sekundären AML, der eine Dyshämopoese vorrausging, wurde eine höhere LFA-3-Expression beobachtet (Meckenstock G, 1998).

Funktion: Für eine effektive Immunantwort benötigen die T-Zellen nicht nur die Bindung des TCR an ein MHC-präsentiertes, spezifisches Antigen, sondern auch die Bindung von LFA-3 an CD2. Die Adhäsion der antigenpräsentierenden Zelle an die T-Zelle wird dadurch vermittelt, das CD3-Signal intrazellulär unterstützt und eine effektive T-Zell-Antwort durch die Produktion von IL-2 und dessen Rezeptor hervorgerufen. Über die LFA-3/CD2-Bindung können – im Gegensatz zur ICAM-1/LFA-1-Bindung - T- und/ oder NK-Zellen auch antigenunabhängig aktiviert werden. Daher spielt die LFA-3/CD2 –Bindung v.a. bei der frühen Immunantwort eine wichtige Rolle. Es wird angenommen, dass bei fehlenden Zielantigenen die T-Zellen die Affinität von CD2 für LFA-3 hochregulieren (Hahn WC, 1992). Daneben werden v.a. auch CD4-Helfer-Zellen von LFA-3 über CD2 stimuliert und produzieren IL-5 und IFN γ ? (Semnani RT, 1994), die die T-Zellantwort verstärken. Ohne Aktivierung von CD2 durch LFA-3 kann der Fas-Ligand induzierte programmierte Zelltod nicht stattfinden (in vitro) (Zhou YW, 1998). Die Erkennung und Lyse der AML-Blasten durch zytotoxische T-Zellen kann durch die Gabe von LFA-3-Antikörpern teilweise inhibiert werden (Brouwer RE, 2000). LFA-3 wird durch GM-CSF, IL-3 und IL-2 auf den AML-Blasten hochreguliert und dadurch eine verstärkte zytotoxische Zellantwort initiiert. (Bendall LJ, 1995; Bruserud O, 1999, Olive D, 1991).

Klinische Relevanz: Hohe LFA-3 Expression auf AML-Blasten konnte klinisch mit relativ niedrigen peripheren Blastenzahlen und einer guten Prognose korreliert werden (Archimbaud E, 1992). Es wird daher angenommen, dass durch die hohe LFA-3-Expression die Interaktion zu NK-Zellen und T-Zellen unterstützt und damit eine Elimination der Tumorzellen erleichtert wird.

2.2.3.8. NCAM (CD56)

Das NCAM (neural cellular adhesion molecule, Syn. leukocyte protein L1, Leu 19; Calprotectin) ist ein aus sechs immunoglobulin-ähnlichen Domänen bestehendes Glykoprotein und gehört ebenfalls zur Familie der Immunglobuline. Es bindet zum einen an sich selbst, zum anderen kann es auch an $\alpha\beta_3$ -Integrine des Endothels binden.

Lokalisation: Bei der normalen Hämoese wird NCAM auf den unreifen CD34⁺Progenitorzellen nicht exprimiert (Reuss-Borst MA, 1995). Typischerweise ist NCAM ein Marker für NK-Zellen, er wird aber auch auf Zellen der myelomonozytären und lymphozytären Zellreihe (T-, B-Zellen) exprimiert. Auf peripheren Monozyten kann NCAM noch nachgewiesen werden, während er auf Gewebemakrophagen nicht mehr exprimiert ist. Ebenso kann NCAM auf Vorläuferzellen der dendritischen Zellen, nicht aber auf reifen dendritischen Zellen gefunden werden. Werden dendritische Zellen z.B. durch LPS, PHA oder TNF α aktiviert, so wird die Expression von NCAM induziert (Pancook JD, 1997).

Bei ca ¼ der AML Patienten kann NCAM auf mehr als 70% der Blasten nachgewiesen werden (Reuss-Borst MA, 1995). Einige AML-Blasten können –im Gegensatz zu den gesunden KM-Zellen- gleichzeitig CD34 und NCAM exprimieren (Coustan-Smith E, 1993). Skott AA et al (1994) konnten bei 6% von 350 untersuchten AML-Patienten eine spezifische Entität feststellen, die HLA-DR⁺, CD33⁺, CD56⁺, CD11a⁺, CD34⁺ und CD16⁻ ist und die er als „akute myeloische-NK-Zell-Leukämie“ bezeichnet. Sie ähnelt morphologisch der FAB-M3v-Leukämie, zeigt aber kein Ansprechen auf die ATRA-Therapie. V.a. beim FAB-Typ M5, bei der AML-ETO sowie bei der AML-Formen mit Trisomie 8 wurde eine NCAM-Expression gefunden (Seymour JF, 1994, Baer MR, 1997).

Funktion: NCAM wurde ursprünglich auf neuronalen Zellen gefunden und beeinflusst eine Vielzahl neurologischer Prozesse wie z.B. die Neurozytogenese und Migration der Kleinhirnzellen. Da es auch auf Zellen der Hämoese gefunden wird, scheint es auch in Abhängigkeit vom Aktivitätsstatus den Zell-zu-Zell-Kontakt zu Abwehrzellen und Endothelzellen zu beeinflussen. Damit scheint es zum einen an der Aktivierung von immunkompetenten Zellen und an der Extravasation von Zellen beteiligt zu sein (Pancook JD, 1997). NK-Zellen, die eine hohe NCAM-Expression aufweisen, produzieren nach Stimulation mit Monokinen signifikant mehr IFN γ , TNF β , GM-CSF, IL-10 und IL-13 (Cooper MA, 2001). AML-Zellen können unter Zugabe von Zytokinen in vitro zu professionell antigenpräsentierenden Zellen differenzieren und eine erhöhte Expression von B7-1 und NCAM wurde hierunter beobachtet (Boyer MW, 2000). Werden AML-Zellen mit blockierenden Antikörpern gegen NCAM-1 inkubiert, weisen sie in den anschließenden funktionalen Assays eine deutlich verminderte Empfindlichkeit gegenüber LAK-Zellen auf (Palucka AK, 1992).

Klinische Relevanz: Bezüglich der Korrelation zwischen dem Verlauf der AML und der NCAM-Expression zeigten sich in der Literatur widersprüchliche Meinungen: Einige stellten eine erhöhte Inzidenz an extramedullären Manifestationen (Byrd JC, 1995) und Myeloblastomen (Iizuka Y, 1993) und einen schlechteren klinischen Verlauf fest (Baer MR, 1997), andere konnten keine Korrelation zwischen der NCAM-Expression und der Inzidenz von extramedullären Manifestationen und dem klinischen Verlauf feststellen. (Thomas X, 1995, Seymour JF, 1994). Für die Diagnose eines MRD ist der Nachweis einer Koexpression von CD34 und NCAM geeignet (Couston-Smith E, 1993).

2.2.3.8. B7-1 (CD80)

B7-1 (Syn. BB1, CD80) ist ein kostimulatorisches Molekül, das v.a. bei der Aktivierung naiver T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (wie auch ICAM-, LFA-1 und LFA-3) eine Rolle spielt. B7-1 gehört zur Familie der Immunglobuline und ist homodimer aufgebaut. Ligand des B7-1 Moleküls ist CD28 auf allen T-Zellen und CTLA-4 v.a. auf den zytotoxischen Zellen. Das Gen für B7-1 ist nahe dem Gen für B7-2 auf Chromosom 3q13.3-q21 lokalisiert.

Lokalisation: B7-1 wird v.a. auf professionell, antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, zu denen Monozyten/Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen gehören. Die Expression von B7-1 auf Monozyten/Makrophagen und B-Zellen erfolgt erst nach deren Aktivierung, während dendritische Zellen von vornherein eine konstitutive hohe B7-1 Expression aufweisen. Andere hämatopoetische Vorläuferzellen exprimieren ohne Aktivierung B7-1 nicht. Bei den bisher untersuchten AML-Fällen konnte B7-1 bisher nicht oder nur sehr selten nachgewiesen werden (Brouwer RE, 2000; Hirano N, 1996).

Funktion: Die spezifische Bindung des T-Zell-Rezeptors (TZR) an das auf MHC-Molekülen präsentierte Antigen reicht nicht aus, um eine klonale Expansion der T-Zellen und damit eine effektive T-Zell-Antwort hervorzurufen, sondern ein zweites **kostimulatorisches Signal durch B7-1 oder B7-2**, das an das CD28-Molekül der T-Zelle bindet, ist notwendig. Erst durch diese Bindung wird eine effektive T-Zell-Antwort möglich. Fehlt dieses kostimulatorische Signal, so wird die T-Zelle –trotz spezifischer Bindung des TZR– in einen anergen Zustand versetzt und sie reagiert nicht mehr auf weitere Aktivierung. 2-3 Tage nach T-Zell-Stimulation wird CTLA-4 auf den T-Zellen exprimiert, der ebenfalls an B7-1 oder B7-2 bindet und als negativ – regulatorisches Signal an die T-Zell-Proliferation begrenzt (Allison JP, 1995). Erniedrigte Expression kostimulatorischer Signale ist ein möglicher Mechanismus, wie Tumorzellen der körpereigenen Immunantwort entgehen können. Eine verstärkte Expression von B7-1 wurde bei der Züchtung von dendritischen Zellen aus AML Blasten unter Stimulation mit IFN α , IFN γ , IL-4+GM-CSF, SCF+FL+TNF α beobachtet (Bruserud O, 1999, Freedman AS, 1991). Dendritische Zellen sind geeignetere Stimulatoren des Immunsystems als die AML-Zellen selbst (Choudhury AA, 1998). Dies bildet die Grundlage für neue Therapiekonzepte in Form von **Tumor-Vakzinierungen**, in denen die körpereigene Immunantwort durch die Gabe dieser dendritischen Zellen gesteigert werden soll (Gluckman JC, 1997).

2.2.3.9. B7-2 (CD86)

B7-2 ist ein dem B7-1 im Aufbau sehr ähnliches kostimulatorisches Molekül der Immunglobulinsuperfamilie und bindet ebenfalls an CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen.

Lokalisation: B7-2 wird v.a. auf ruhenden Monozyten, dendritischen Zellen, sowie auf aktivierten T- und B-Lymphozyten exprimiert. Im Gegensatz zu B7-1 wird B7-2 konstitutionell auf den hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert, ohne dass eine Aktivierung dieser Zellen vorher stattfinden muss.

In 33-50% der untersuchten AML-Fälle konnte eine B7-2 Expression nachgewiesen werden (Hirano N, 1996, Maeda A, 1998, Brouwer RE, 2000) B7-2 wurde dabei innerhalb der Gruppe der monozytären Leukämien hoch, innerhalb der FAB-Typen M0, M3 und M6 niedrig exprimiert.

Funktion: B7-2 hat ähnliche Funktionen wie B7-1 bei der Kostimulation von T-Zellen (Yang G, 1995). Maeda A et al (1998) zeigten, dass B7-2 positive AML-Patienten eine signifikant kürzere progressfreie Überlebenszeit aufwiesen.

2.2.3.11. PRR-1 und PRR-2

Das Poliovirus-Rezeptor-Related-1-Protein (PRR-1, Nektin1-delta, Herpes virus entry mediator C, HveC) und PRR-2 (Syn. Nektin2-alpha, HveB) sind verwandte, transmembrale Glykoproteine, deren extrazellulärer Anteil aus drei Immunglobulin-domänen besteht. Sie gehören damit beide zur Superfamilie der Immunglobuline. PRR-1 und PRR-2 sind interzelluläre Adhäsionsmoleküle. Sie binden zum einen homophil an sich selbst, zum anderen binden sie an Afadin. Sowohl die PRR-Proteine als auch Afadin kommen v.a. auf Zellverbindungen vor, die über sog. Cadherine vermittelt werden (Reymond NJ, 2001). Die Gene für PRR-1 und PRR-2 sind auf Chromosom 19q23 lokalisiert.

Lokalisation: PRR-1 und PRR-2 waren zunächst als Rezeptoren für den Eintritt der humanen Herpes Viren 1 und 2, Pseudo-Rabies-Viren (PRV) und des bovinen Herpes-Virus (BHV-1) in die Zellen bekannt (Gerathy RJ, 2001). Beide werden auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert. PRR-1 konnte auf 50% der CD34⁺Zellen des KM, PRR-2 auf 20-60% der CD34⁺Zellen des KM und des peripheren Blutes nachgewiesen werden. Dabei wurde PRR-2 v.a. innerhalb der monozytären Zelllinie exprimiert. Ca. 50% der Zellen der megakaryozytären Zelllinie exprimierten ebenfalls PRR-2, während es auf der erythrozytären und lymphozytären Zelllinien nicht nachgewiesen werden konnte. Auch auf Endothelzellen konnte PRR-2 nachgewiesen werden (Lopez M, 1998).

Funktion: PRR-2 exprimierende Zellen besitzen die Fähigkeit zur homophilen Adhäsion und spielen damit eine Rolle beim Zell-zu-Zell-Kontakt der hämopoetischen Zellen untereinander und zum Endothel. Das Bindungsverhalten der Zellen ist proportional zur PRR-2-Expressionsdichte auf den Zellen. Da PRR-2 nur auf der interzellulären Seite der Endothelien nachgewiesen werden konnte, scheint PRR-2 zum einen die Adhäsion der Endothelzellen untereinander zu regulieren, zum anderen an der transendothelialen Migration von Monozyten beteiligt zu sein. Desweiteren kann PRR-2 auch an Signaltransduktion beteiligt sein, da über dessen Aktivierung intrazelluläre Tyrosinkinasen rekrutiert werden können (Lopez M, 1998). Bei der AML wurden PRR-1 und PRR-2 bisher nicht untersucht.

2.2.3.12. UPA-R (CD87)

Urokinase-type plasminogen activator receptor (UPA-R; CD87) kann auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen gefunden werden. Die Urokinase ist eine spezifische Serin-Protease, die die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin katalysiert. Diese Aktivierung von Plasmin erfolgt auf der Oberfläche von Zellen, die den UPA-R exprimieren. Der UPA-R besteht aus einer einzelnen, ligandspezifischen und hochaffinen glykosylierten Proteinkette, die jedoch keine zytoplasmatischen Domäne besitzt, d.h. zur intrazellulären Signalübertragung benötigt der UPA-R die Hilfe anderer Moleküle, die eine intrazelluläre Domäne besitzen. Man vermutet, dass Komplexe aus UPA-R und den Integrinen, v.a. dem β_2 -Integrin Mac-1 Signale z.B. an das Zytoskelet weiterleiten (Simon D, 1996). Ligand des UPA-R ist der Urokinase-Plasminogen-Aktivator. Der Genort des UPA-R liegt auf Chromosom 19.

Lokalisation: Der UPA-R kann auf einer Vielzahl von gesunden und malignen Zellen gefunden werden. Bei der Hämoese wird der UPA-R auf unreifen CD34⁺ Zellen kaum exprimiert. Während er mit zunehmender Differenzierung verstärkt auf Myeloblasten und Monoblasten, Promyelozyten, Metamyelozyten, sowie auf reifen Granulozyten, Monozyten, und einer Untergruppe aktivierter NK-Zellen nachgewiesen werden kann. Dabei wird UPA-R auf neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes höher exprimiert als auf denen des KM. Auf Lymphozyten wird UPA-R nicht exprimiert. Zudem kann er auch auf vielen anderen Bindegewebszellen, wie Endothelzellen, Fibroblasten und Muskelzellen, sowie auf bestimmten Tumorzellen, wie dem Fibrosarkom, Rhabdomyosarkom, dem Melanom, dem Mamma-, Prostata- und Kolon-CA, nachgewiesen werden (Lanza F, 1998). Auch bei der **AML** konnte eine UPA-R Expression in 69-81% der Fälle nachgewiesen werden. Die höchste Expression wurde dabei innerhalb des FAB-Typs M5 gefunden, die niedrigste innerhalb des FAB-Typs M0. Im Gegensatz zu den Ergebnissen auf gesunden hämopoetischen Vorläuferzellen zeigte sich in ca. 20% der AML-Fälle auch eine Koexpression von UPA-R und CD34, bei einigen (ca. 8%) wurde auch Überexpression des UPA-Rs v.a. bei der FAB-M5 beobachtet. Auf leukämischen Blasten des peripheren Blutes zeigte sich eine signifikant höhere Expression des UPA-Rs als auf Blasten des KM (Lanza F, 1998).

Funktion: Der UPA-R scheint an der Extravasation von Zellen durch proteolytische Spaltung der die Zelle verankernden Adhäsionsproteinen beteiligt zu sein. Es konnte auch ein Zusammenhang der Expression von UPA-R mit der Metastasierungsfähigkeit von Zellen nachgewiesen werden (Lijnen HR, 1996). Funktionelle Analysen in vitro zeigten, dass eine Aktivierung des UPA-R auf neutrophilen Granulozyten v.a. Zytoskelett-abhängige Prozesse, wie Beweglichkeit und Degranulation beeinflusst. Es wurde auch gezeigt, dass intrazellulär der UPA-R in Vesikeln gespeichert wird und bei Aktivierung der Zellen an der Oberfläche exprimiert wird. Ebenso kann der UPA-R auch wieder internalisiert werden. (Plesner T, 1994). Eine erhöhte Expression von UPA-R kann Plasmainhibitoren konsumieren und dadurch eine Blutungsneigung fördern (Lijnen, 1996).

Klinische Relevanz: Lanza F et al. (1998) korrelierten die UPA-R-Expression mit dem klinischen Erscheinungsbild und dem Verlauf der AML. Sie konnten bei Patienten mit einer sehr hohen UPA-R Expression ein gehäuftes Auftreten von mukokutanen Infiltrationen und Hepatosplenomegalien feststellen. Der immunzytologische Nachweis des UPA-R kann zum einen als panmyeloischer Marker zu dienen, zum anderen kann die Koexpression von CD34 und UPA-R bei der Diagnose eines MRD helfen (Lanza F, 1998). Ein (Wieder-)Anstieg des UPA-R wurde bei Rezidiven beobachtet.

2.2.3.13. Funktionelle Einteilung der Adhäsionsmoleküle

Interaktionen zwischen hämopoetischen Zellen und dem Knochenmarksstroma haben eine wichtige Bedeutung bei der Hämoese.

Die Adhäsion an das Knochenmarksstroma und der hämopoetischen Zellen untereinander beeinflussen v.a. die Lokalisation im KM und indirekt auch Proliferation und Differenzierung der Zellen. Die Adhäsion an das Endothel regelt die Transmigration/Mobilisation der Zellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut. Eine Übersicht über die beteiligten Adhäsionsmoleküle bei der Bindung an das Knochenmarksstroma und an das Endothel gibt Abb. 2.2.3.13.1.

Eine weitere wichtige Rolle spielen die Adhäsionsmoleküle beim Kontakt der AML-Blasten zu T-Zellen und NK-Zellen, die bei der Tumorabwehr eine Rolle spielen. Nach unspezifischer Bindung der Adhäsionsmoleküle auf den Blasten an die T-Zellen, kann der T-Zellrezeptor das MHC-präsentierte Antigen erkennen und weitere wichtige kostimulatorische Signale sind für eine tatsächliche T-Zell Aktivierung erforderlich. Abbildung Nr. 2.2.3.13.2. zeigt die Interaktion der in dieser Arbeit untersuchten Adhäsionsmoleküle mit den T-Zellen.

Entsprechend ihrer Hauptfunktionen lassen sich die Adhäsionsmoleküle in drei funktionelle Gruppen einteilen. Dies wird in Tab. 2.2.3.13.1 dargestellt.

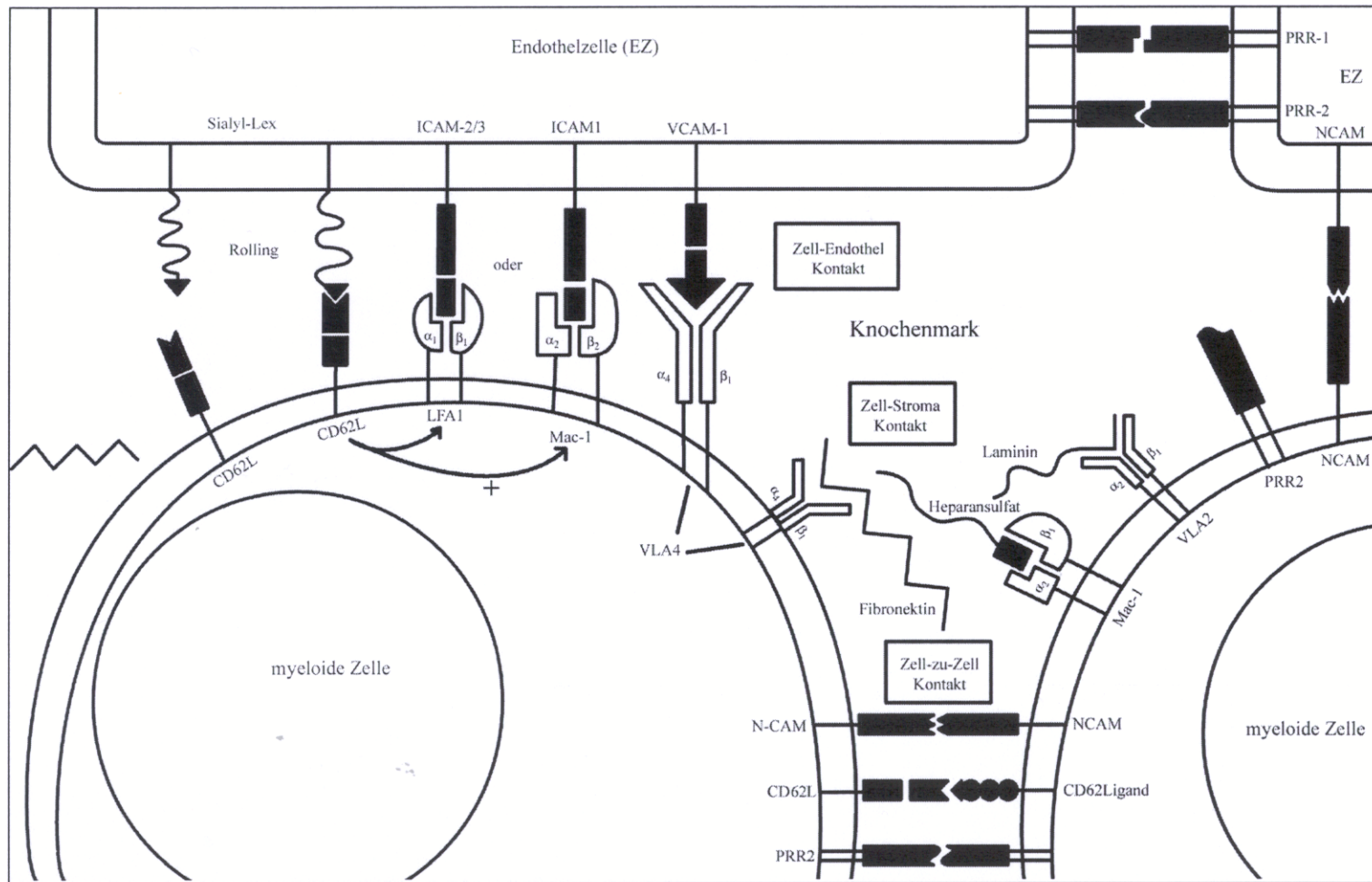
Über die Expression eines Adhäsionsmoleküls allein kann noch nicht auf dessen funktionellen Status geschlossen werden. V.a. Integrine und Immunglobuline werden über Affinitätsänderungen zum Liganden reguliert. Ein anderer Regulationsmechanismus ist das Abspalten funktioneller, löslicher Rezeptoren, die kompetitiv das Binden der rezeptortragenden Zelle verhindern können (z.B. ICAM-1, CD62L). Andere Adhäsionsmoleküle werden durch Internalisierung des Moleküls in intrazellulären Vesikeln, die bei Bedarf wiederum auf der Zelloberfläche exprimiert werden, reguliert (z.B. UPA-R).

Tab. 2.2.3.13.1. Lokalisation und Funktion der Adhäsionsmoleküle

CD	Adhäsionsmolekül	bindet an	Lokalisation	Funktion bei gesunden Zellen	Beobachtungen bei AML (soweit bekannt)
Zell-Stroma-Kontakt fördernd/ Zell-zu-Zell-Kontakt fördernd					
CD49b	VLA-2	Kollagen I, III-VI	Endothel, Epithel, Fibroblasten, Thrombozyten, aktivierte T-Zellen, mononukleäre Knochenmarkszellen, KM-Stromazellen	- Adhäsion an das KM-Stroma	nicht untersucht
CD49c	VLA-3	Fibronektin, Laminin, Kalinin Kollagen, I-IV,	Epithel, Basalmembran, KM-Stroma-Zellen.	- Adhäsion an das KM-Stroma	nicht untersucht
-	PRR-1	PRR-1, Afadin	CD34+ KM-Zellen, monozytäre Zellen, megakaryozytäre Zellen, Endothelzellen	- Zell-zu-Zell-Kontakt - Zell-Endothel-Kontakt - Eintritt für verschiedene Viren	nicht untersucht
-	PRR-2	PRR-1, Afadin	CD34+ KM-Zellen, monozytäre Zellen, megakaryozytäre Zellen, Endothelzellen	- Zell-zu-Zell-Kontakt - Zell-Endothel-Kontakt - Eintritt für verschiedene Viren	nicht untersucht
Zell-Endothel-Kontakt fördernd					
CD62L	L-Selektin	CD34, PCLP-1, Gly-CAM, Mad-CAM-1, Sialomucine	Unreife, myeloide Progenitorzellen, B-, T-Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen, Monozyten,	- Zell-Endothel-Kontakt („Rolling“, „Homing“) - Induktion der LFA-1/ICAM-Bindung - Differenzierung und Proliferation hämopoetischer Stammzellen	- Hohe lösliche CD62L-Konzentrationen im Serum - Extravasation der AML-Blasten
CD11a	LFA-1	ICAM 1-3	CD34+CD38 Stammzellen, myeloid und lymphoid determinierten Progenitorzellen, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Megakaryozyten, T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen	- Zell-Endothel-Kontakt (Transmigration) - Induktion des „Shedding“ von CD62L	- Häufige Expression (>80% der Blasten) korreliert mit verminderter 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten
CD11b	Mac-1	IC3b, ICAM-1, Fibrinogen, Lipopolysaccharide, β-Glukane, Gerinnungsfaktor X	CD34+Progenitorzellen (selten), Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen und aktivierte T-Zellen	- Zell-Endothel-Kontakt (Transmigration) - Phagozytose infektiöser Agenzien	- ATRA reguliert Expression von CD11b hoch - Hohe Expression korreliert mit ungünstigen klinischen Verlauf der Patienten (divergierende Meinungen)
CD87	UPA-R	Urokinase-Plasminogen-Aktivator (UPA)	Myelomonozytäre Progenitorzellen, Granulozyten, Monozyten, aktivierte NK-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Muskelzellen, solide Tumorzellen	- Umwandlung von Plasminogen in Plasmin - Extravasation durch proteolytische Spaltung der die Zelle verankernden Adhäsionsmoleküle - Steuerung zytoskelettabhängiger Prozesse (Beweglichkeit, Degranulation) - fördert Blutungsneigung	- Gehäuftes Auftreten von mukokutanen Infiltrationen und Hepatosplenomegalien
Kontakt zu immunkompetenten Zellen fördernd					
CD54	ICAM-1	LFA-1, Mac-1, CD43	hämopoetische Progenitorzellen, Monozyten, Endothelzellen	- Aggregation der Granulozyten untereinander - Zell-Endothel-Kontakt (Transmigration) - Steuerung der T- und B-Zellantwort	- Erhöhte lösliche ICAM-1-Konzentration im Serum - Steuerung der LAK-Zellantwort
CD58	LFA-3	CD2	hämopoetische Progenitorzellen, Erythrozyten, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, B-Lymphozyten	- Steuerung der T-Zellantwort - Steuerung der FAS-induzierten Apoptose	- Unterstützung der T-Zell-Antwort gegen AML-Blasten - Hohe Expression korreliert mit guter Prognose
CD80	B7-1	CD28, CTLA-4	Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, dendritische Zellen (nach Aktivierung)	- Aktivierung der T-Zell-Antwort (CD28) - Limitierung der T-Zell-Antwort (CTLA-4)	- Unterstützung der T-Zell-Antwort gegen AML-Blasten - Nach Züchtung von DC aus AML-Blasten wird B7-1 exprimiert
CD86	B7-2	CD28, CTLA-4	Monozyten, Makrophagen (konstitutionell), B-Zellen, dendritische Zellen (nach Aktivierung)	- Aktivierung der T-Zell-Antwort (CD28) - Limitierung der T-Zell-Antwort (CTLA-4)	- Unterstützung der T-Zell-Antwort gegen AML-Blasten - Nach Züchtung von DC aus AML-Blasten wird B7-2 verstärkt exprimiert - Hohe Expression korreliert mit schlechter Prognose
CD56	NCAM	NCAM, β3-Integrine	myelomonozytäre und lymphozytäre Progenitorzellen, NK-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen, neuronale Zellen	- Zell-zu-Zell-Kontakt - Extravasation der Zellen - Steuerung der T- oder NK-Zell-Antwort	- Nach Züchtung von DC aus AML-Blasten wird NCAM verstärkt exprimiert - Steuerung der NK-Zell-Antwort - Erhöhte Inzidenz extramedullärer Manifestationen und Myeloblastomen

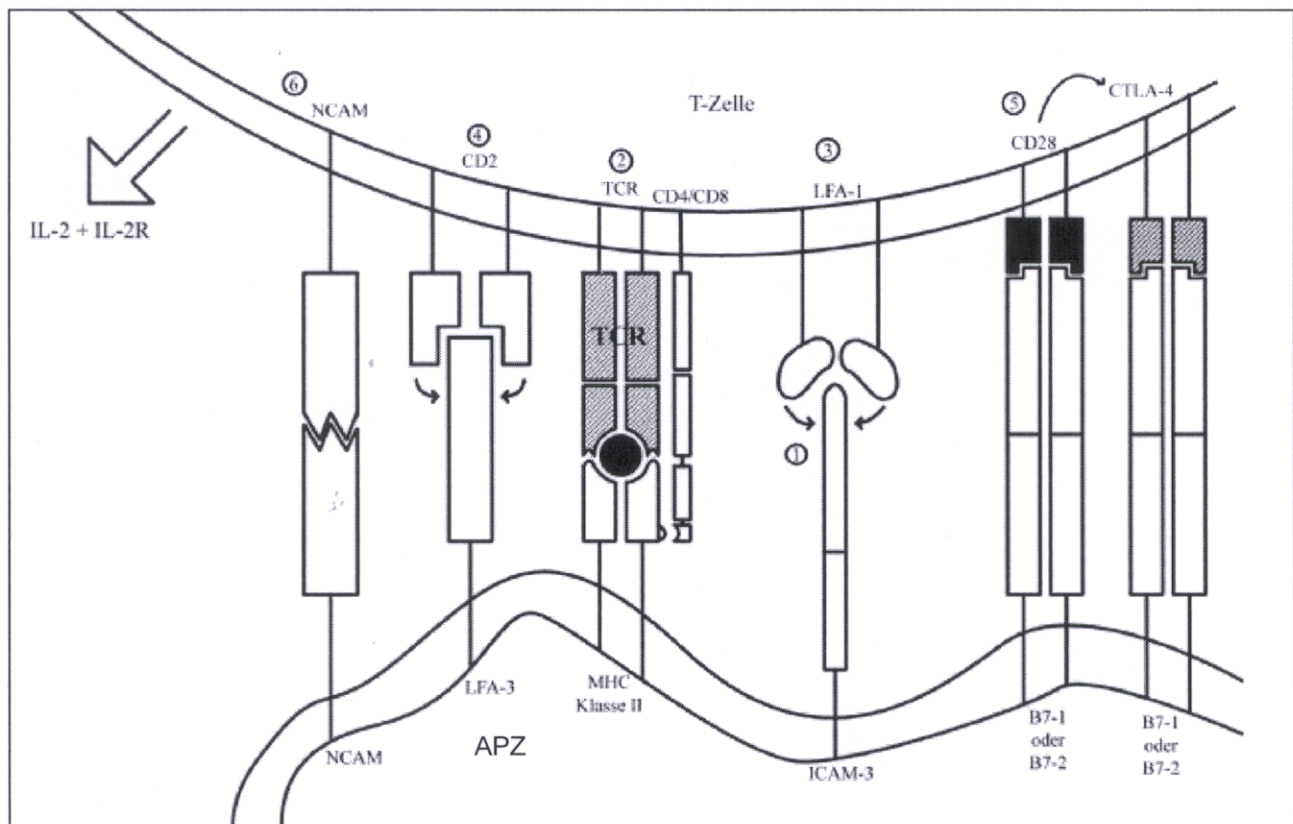
Anmerkung: Diese Tabelle fasst Informationen zu den einzelnen Adhäsionsmolekülen zusammen, die bereits in den vorherigen Kapiteln genau erläutert wurden. Es wurde daher auf die jeweiligen Literaturangaben in der Tabelle verzichtet.

Abb. 2.2.3.13.1. Adhäsionsmoleküle im Knochenmark



Unreife myeloide Vorläuferzellen binden über VLA-Moleküle ans KM-Stroma (Fibronectin, Heparansulfat, Laminin, u.a.). Durch homophile Adhäsion der KM-Zellen über NCAM und PRR-2 bilden die Vorläuferzellen Zellaggregationen. Die Bindung über CD62L an CD62Ligand hat Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen. Will die reife myeloide Zelle (Monozyt, Granulozyt) aus dem Knochenmark in das periphere Blut gelangen, muss sie Kontakt mit den Endothelzellen der Knochenmarksinus aufnehmen. Dies geschieht zunächst niedrig affin über CD62L, der an Sialomucine des Endothels bindet. Diese Bindung erhöht den Affinitätsstatus von LFA-1 und Mac-1, die an ICAM 2/3 des Endothels binden und die Zelle kann transmigrieren. Auch über NCAM, VLA-4 und PRR-2 können die Zellen ans Endothel binden.

Abb. 2.2.3.13.2: Aktivierung einer T-Zelle durch eine antigenpräsentierende Zelle (APZ)



- 1) Die APZ bindet zunächst niedrig affin über ICAM-3 an LFA-1.
- 2) Bindet der T-Zell-Rezeptor spezifisch an das MHC-II präsentierte Antigen, so erfolgt eine
- 3) Konformationsänderung des LFA-1-Rezeptors, der dann eine höhere Affinität zu ICAM-1 entwickelt.
- 4) Ebenso erfolgt eine Konformationsänderung des CD2-Moleküls, das an LFA-3 bindet.
- 5) Die Bindung von CD28 an die kostimulatorischen Moleküle B7-1 oder B7-2 induziert die Expression von CTLA-4, das ebenfalls an B7-1/-2 bindet, wodurch das kostimulatorische Signal inhibiert wird. Nur durch die kostimulatorischen Signale von CD2 und CD28 beginnen die T-Zellen zu proliferieren bzw. die Zelle zu lysieren.
- 6) Die über NCAM vermittelte Bindung an die T-Zelle unterstützt die T-Zellantwort.

2.3. Zielsetzung der Arbeit

Übermäßige Proliferation unreifer hämopoetischer Vorstufen, Expansion dieser Zellen in die Peripherie, extramedulläre Manifestationen und verminderte Elimination der transformierten, malignen Zellen durch das Immunsystem stellen grundlegende pathologische Veränderungen bei der AML dar. Da diese Pathomechanismen sowohl über Zytokine und Zytokinrezeptoren, als auch über Adhäsionsmoleküle und ihren Bindungspartnern gesteuert werden, wurde in dieser Arbeit die Expression von ausgewählten Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen auf AML-Blasten und gesunden KM-Zellen untersucht.

Die AML ist eine sehr heterogene Erkrankung, die sich klonal aus verschiedenen Reifungsstufen der myeloiden Zellreihe entwickeln kann. Bei der normalen Hämoese werden Zytokinrezeptoren in Abhängigkeit von Reifegrad und Linienzugehörigkeit (granulozytär, monozytär) der hämopoetischen Zellen exprimiert. Daher wurden in dieser Arbeit Zytokinrezeptoren ausgesucht, die auf verschiedenen Reife- und Differenzierungsstufen exprimiert werden. Auch die Adhäsionsmoleküle haben unterschiedliche Funktionen im komplexen Zusammenspiel der Zellen untereinander, im Kontakt mit dem Endothel, mit dem KM-Stroma und den Abwehrzellen, so dass auch aus diesen „funktionellen Gruppen“ entsprechende Adhäsionsmoleküle ausgesucht wurden.

Ziel dieser Arbeit war es daher zunächst, charakteristische Unterschiede in der Expression von Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen zum einen zwischen gesunden und leukämischen KM-Proben, zum anderen innerhalb der verschiedenen Subtypen der AML (FAB-Typen, primäre und sekundäre AML) herauszuarbeiten.

Wichtig für therapeutische Entscheidungen bei der AML ist die Einteilung in prognostische Risikogruppen, die mittels zytogenetischer Analysen ermittelt werden. Da sich aber nur bei ca. 50-60% der Patienten chromosomale Aberrationen nachweisen lassen, besteht ein Bedarf an karyotypunabhängigen Prognosekriterien. Dazu wurden bei allen Patienten zytogenetische Untersuchungen durchgeführt. Die Expression von Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen wurde sowohl mit den zytogenetischen Risikogruppen verglichen als auch mit dem tatsächlichen klinischen Verlauf der Patienten. An klinischen Daten wurde die Remissionsrate und die Dauer der progressfreien Überlebenszeit erfasst.

Zytokine (v.a. G- und GM-CSF) werden in der Therapie der AML regelmäßig eingesetzt. Man unterscheidet dabei den Einsatz vor (=Priming) und nach (=Supportivtherapie) Chemotherapie. Bislang ist jedoch wenig über die Expression der Zytokinrezeptoren auf den AML-Blasten bzw. AML-Subtypen bekannt. So sollte diese Arbeit auch dazu dienen, gezieltere Strategien für die Zytokintherapie anhand der Untersuchung von individuellen Expressionsmustern der entsprechenden Zytokinrezeptoren zu finden.

Obwohl die Funktionalität der Oberflächenmoleküle in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, macht doch die Expression auf der Oberfläche der Zellen ihre Funktionalität - entsprechend den in anderen Arbeiten durchgeführten funktionellen Untersuchungen - wahrscheinlicher. Im letzten Teil dieser Arbeit wurden daher mögliche biologischen Auswirkungen veränderter Zytokinrezeptor- und Adhäsionseigenschaften dargestellt. Damit sollte schließlich ein Beitrag zum besseren Verständnis der Biologie der AML geleistet werden und Ausblicke in neue diagnostische und therapeutische Ansätzen gegeben werden.

3. Material und Methoden

3.1. Auswahl des Patientenkollektivs

In diese Arbeit gingen Untersuchungen von insgesamt 103 AML Patienten bei Erstdiagnose und 8 Knochenmarksproben von gesunden Probanden ein, die zwischen 1997 bis 2001 dem Labor für Leukämiediagnostik der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Grosshadern zugesandt wurden. Die morphologischen, zytochemischen und diagnostischen Befunde wurden von Hr. PD Dr. Dr. T. Haferlach, zytogenetische Befunde von Fr. Dr. C. Schoch erstellt. Immunzytologische Charakterisierungen der KM-Proben wurden von Fr. Dr. S. Danhauser-Riedl und Fr. PD Dr. H. Schmetzer durchgeführt. Sämtliche Befunde bzw. immunzytologischen Messergebnisse wurden für weitere Auswertungen und Reanalysen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Um die klinische Relevanz der erhobenen Befunde zu erfassen wurde von 61 Patienten der klinische Verlauf (Art der Therapie, Ansprechen auf die Therapie, Knochenmarkstransplantation, Rezidiv, Versterben) erfasst. Nur diejenigen Patienten, die nach dem AML-CG-Protokoll (siehe Kap 2.1.8.1) behandelt wurden, wurden in die Beurteilung der Ansprechraten und der progressfreien Überlebenszeiten mitaufgenommen. Eine hämatologische/klinische Vollremission wurde nach den EORTC-Kriterien festgelegt (Zittoun R; 1996): Kein Nachweis von Leukämiezellen im peripheren Blut, Erholung des Blutbildes (Leukozyten $>2000-10000/\text{mm}^3$, Granulozyten $>1.500/\text{mm}^3$, Thrombozyten $>100.000/\text{mm}^3$, Hb $>12\text{g/dl}$), Normalisierung von Organvergrößerungen, weniger als 5% Blasten aller kernhaltigen Zellen im Knochenmark. Wenn der Anteil der blastären Zellen durch einen Induktionszyklus nach Regeneration des Knochenmarks dagegen gleich geblieben oder gar angestiegen war, wurde dies als **refraktäre Leukämie** oder **Persistenz** der Erkrankung definiert. Nach dem Erreichen einer Remission wurde als Rezidiv bezeichnet, wenn der Blastenanteil im Knochenmark wieder auf mehr als 5 % anstieg. Als **Frührezidiv** wurde eine Rezidiv innerhalb eines ½ Jahres nach Diagnosestellung bezeichnet (Wilmanns W, 1996). Als **Frühtod** wurde das Versterben eines Patienten innerhalb von einem Monat nach Diagnosestellung definiert (Wilmanns W, 1996).

3.2. Verarbeitung des Untersuchungsmaterials

Das Knochenmark wurde nach Aufklärung der Patienten durch Punktion des hinteren Beckenkammes gewonnen. Als Kontrolle wurden Knochenmarkspunktionen von gesunden KM-Spendern verwendet. Die Antikoagulation der KM-Proben erfolgte mit Heparin oder EDTA. Zur morphologischen und zytochemischen Beurteilung wurden KM-Ausstriche angefertigt. Für zytogenetische Untersuchungen wurden heparinisierte Voll-KM-Proben angesetzt. Zur Erstellung der übrigen Befunde wurden frisch separierte mononukleäre Zellen (MNZ) verwendet, die nach Verdünnung der Proben mit Hank's Puffer über Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Hypaque) gewonnen wurden (Böyum, 1984). Dadurch wurden ausdifferenzierte Zellen, wie Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten oder Megakaryozyten, abgetrennt und gesunde bzw. leukämische hämopoetischen Vorläuferzellen, sowie Lymphozyten und Monozyten weiter untersucht. Bereits separierte MNZ, die nicht am selben Tag weiterverarbeitet werden konnten, wurden nach Zugabe von fetalem Kälberserum oder Terasaki-Medium über Nacht bei 4° Grad Celsius im Kühlschrank gelagert. Für Fragestellungen dieser Arbeit wurden zum Teil MNZ verarbeitet, die nach Kryokonservierung in flüssigen Stickstoff bei -196° Grad Celsius aufgetaut worden waren (Fliedner 1977).

3.3. Morphologische und zytochemische Untersuchungsmethoden

Die Knochenmarksausstriche wurden nach der panoptischen Methode von Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) gefärbt und morphologisch entsprechend den FAB-Kriterien beurteilt (siehe Tab. 2.1.7.1). Ebenso wurde der Anteil der Blasten zu allen MNZ im Ausstrich beurteilt (=morphologisch bestimmter Blasten-Anteil). Zur genaueren Differenzierung wurden die Knochenmarksausstriche zusätzlich zytochemisch mit Myeloperoxidase Sudanschwarz, alpha-Naphthylacetat-Esterase, Naphthol-ASD-Chloracetat-Esterase und PAS (Periodic Schiff Säure) gefärbt.

3.4. Immunzytologische Untersuchungsmethoden

Zur Immunphänotypisierung wurden die Zellen durchflusszytometrisch mit Hilfe direkt Fluorochrom-markierter monoklonaler Maus-Antikörper des IgG-1- oder IgG-2-Subtyps untersucht. Um Unterschiede in der Antigenerkennung zu vermeiden wurde bei allen Analysen derselbe Antikörperklon mit demselben konjugierten Fluorochrom verwendet. Bei der Auswahl des Farbstoffs wurden Antigene, die in der Regel nur schwach auf der Zelloberfläche der untersuchten Zellen exprimiert werden, mit dem stark fluoreszierenden Fluorochrom R-Phycoerythrin (R-PE) oder dem etwas weniger stark fluoreszierenden Cy5-Tandem-Konjugat (PE/Cy5) untersucht. Während eher hoch exprimierte Antigene mit Antikörpern untersucht wurden, die mit dem etwas schwächer fluoreszierenden Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert waren. Zu den Probenröhrchen mit 100µl der fikollierten MNZ-Suspension mit ca 1x10⁶ Zellen wurde nach den Vorschriften des Herstellers entsprechende Mengen Fluorochrom-gekoppelter Antikörper und jeweils 10% Kaninchenserum zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 15-20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 3ml PBS zugegeben und 5min bei 800U/min (400g) mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 500µl PBS resuspendiert. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper gibt Tabelle 3.4.1.

Tab. 3.4.1 Fluorochrom markierte Antikörper

MausAntikörper (MoAb) Anti-	Markiertes Fluorochrom	Zellklon	Isotyp	Firma
Anti-Zytokinrezeptor-MoAb				
CD114	PE	LMM 775	IgG1	Serotec
CD116	PE	SC06	IgG1	Beckman Coulter
CD117	PE-CY5	95C3	IgG1	Beckman Coulter
CD123	PE	9F5	IgG1	Beckton-Dickinson
CD130	PE	AM64	IgG1	PharMingen
CD135	PE	SF1.340	IgG1	Beckman Coulter
Anti-Adhäsionsmolekül -MoAb				
CD11a	FITC	25,3	IgG1	Beckman Coulter
CD11b	FITC	Bear1	IgG1	Beckman Coulter
CD49b	FITC	Gi9	IgG1	Beckman Coulter
CD49c	FITC		IgG1	SBA
CD54	PE	84H10	IgG1	Beckman Coulter
CD56	PE	N901(nKH1)	IgG1	Beckman Coulter
CD62L	FITC	DRE G56	IgG1	Beckman Coulter
CD58	PE	AICD 58	IgG2a	Beckman Coulter
CD80	PE-CY5	DAL-1	IgG1	Serotec
CD86	PE	MCA1118PE	IgG1	Serotec
CD87	PE		IgG1	Beckman Coulter
PRR-1	PE	R1.302.12	IgG1	Beckman Coulter
PRR-2	PE	R2.477.1	IgG1	Beckman Coulter
Isotypkontrollen:	FITC		IgG1	Beckman Coulter
	PE		IgG1	Beckman Coulter
	PE		IgG2a	Beckman Coulter
	PE-CY5		IgG1	Beckman Coulter

Alle Messungen wurden an einem Durchflusszytometer der Firma BD (FACSCalibur) durchgeführt. Das Gerät wurde den Herstellerangaben entsprechend gewartet, Geräteeinstellungen wurden regelmäßig durch Messungen mit Fluorochrom konjugierten Beads überprüft. Isotypkontrollen (IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG2a-PE, IgG1PE-CY5) wurden regelmäßig mitgeführt und 1% positive Zellen wurden in der Isotypkontrolle toleriert.

Die durchflusszytometrische Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit dem Programm CellQuest (Fa. BD). Die Leukämiepopulation zeigte entsprechend ihrer zellulären Charakteristika (Zellgröße, Granularität) in der Dot-Plot-Darstellungsform 'Vorwärtsstreuung (y-Achse) gegen Seitwärtsstreuung (x-Achse)' ein typisches Scatterbild, über das ein Auswertefenster gelegt wurde. Bei leukämischen Proben wurde das Auswertefenster um die leukämischen Population und darin enthaltene (residuelle) Monozyten und Lymphozyten gelegt (Abb. 3.4.1). Bei Analyse von KM-Proben gesunder Probanden wurde das Auswertefenster über die Lymphozyten und Monozyten und die darin enthaltene Progenitorzellpopulation gelegt. In der Histogrammdarstellung konnte zum einen der Anteil der Antikörper-tragenden Zellen (%) zu allen Zellen, zum anderen auch die Lichtintensität zur

Abschätzung der relativen Rezeptordichte bestimmt werden. Sie wurde als die mittlere Peak-Fluoreszenzintensität (mFI) des Farbkanals mit Hilfe des Cell-Quest-Programms berechnet ($mFI = \frac{\sum ?_i}{n}$, $?_i$ = Wert des Farbkanals für das *i*th-Event, n = Anzahl der untersuchten Events). Ein KM-Probe wurde als positiv für das entsprechende Antigen gewertet, wenn mehr als 20% aller gegateten Zellen den entsprechenden Antikörper exprimierten (Bene MC, 1995).

3.5. Zytogenetische Untersuchungsmethoden

Bei allen Patienten wurden zytogenetische Untersuchungen durchgeführt. Die Präparation der Chromosomen zum Auffinden von numerischen oder strukturellen Aberrationen erfolgte an unstimuliertem, heparinisiertem Knochenmarksaspirat nach eintägiger Kultivierung der Zellen und Arretierung des Zellzyklus in der Metaphase durch das Spindelgift Colchicin. Durch Giemsa-Färbung wurden bestimmte Abschnitte der Chromosomen unterschiedlich stark angefärbt, so dass anhand dieser spezifischen Bandenmusterung neben der Größe der Chromosomen auch eine Sortierung nach ihrem Färbeverhalten und somit auch die Bestimmung des Karyotyps vorgenommen werden konnte (Schoch C, 1997). Durch Erstellung solcher Karyogramme konnten fehlende oder zusätzliche Chromosomen, sowie Chromosomenumlagerungen dargestellt und chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden (Schmetzer H, 1997, Rooney 1992). Die Chromosomen wurden entsprechend den ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)-Kriterien interpretiert (Mitelman K, 1995) Anschließend wurden die untersuchten Fälle in günstige, intermediäre und schlechte zytogenetische Prognosegruppen eingeteilt (Mrozek K, 1997) (siehe Tab. 3.5.1).

Tab.3.5.1. Einteilung in zytogenetische Risikogruppen.

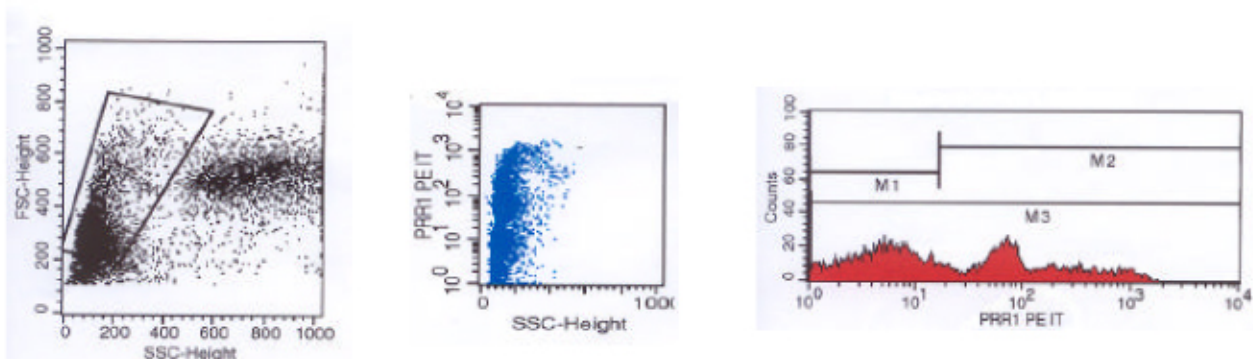
Prognose	Chromosomenaberration
Günstig	inv/t 16, t (8;21), t (15;17)
Ungünstig	del (5q), -5, del (7q), -7, inv/t(3), del/t (11q23), t(6;9), komplexer Karyotyp (=3 Aberrationen)
Intermediär	normaler Karyotyp, übrige Aberrationen

3.6. Statistische Berechnungen

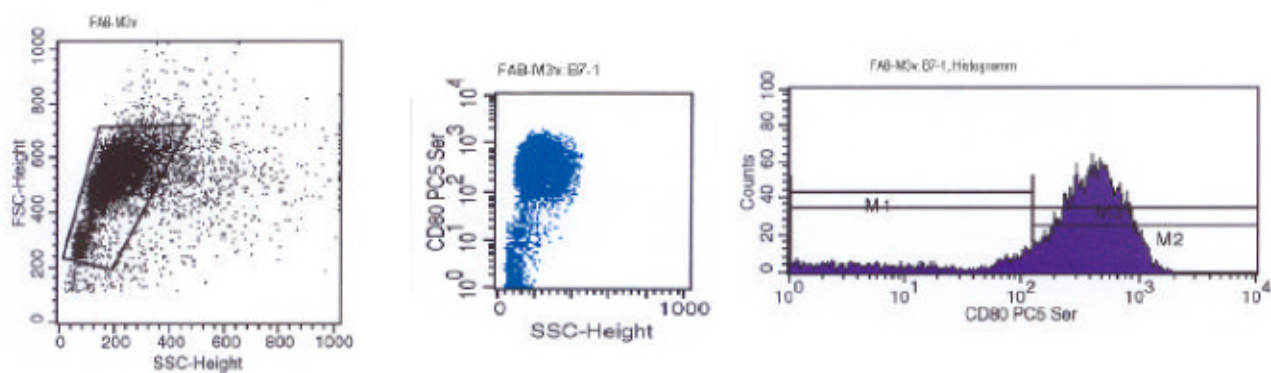
Die statistischen Auswertungen dieser Arbeit wurden mit dem Programm Excel (Microsoft) durchgeführt. Dabei wurden Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane, Schwankungsbereiche sowie Gruppenvergleiche mit dem zweiseitigen T-Test bzw. Qui-Quadrat-Test ermittelt. Für die Berechnung der progressfreien Überlebenszeiten wurden diejenigen Patienten zensiert, die eine Knochenmarkstranplantation erhielten und die an anderen nicht Leukämie-bedingten Ursachen verstorben sind. Patienten, die nicht nach dem AML-CG-Protokoll behandelt wurden, wurden aus den Berechnungen ausgeschlossen. Cut-off-Werte für den Anteil an für ein Antigen positiver Blasten (%) und der progressfreien Überlebenszeit wurden anhand derjenigen Werte abgeschätzt, bei denen aus dem Vergleich der jeweils entstandenen Gruppen, der höchste Chi-Quadrat-Wert hervorgegangen war. Die Cut-off-Werte entsprachen damit demjenigen Anteil positiver Blasten, bei dem die höchste Wahrscheinlichkeit für einen signifikanten Unterschied im progressfreien Überleben zwischen den jeweils entstandenen Patientenkollektiven bestand. Die den entsprechenden Cut-off-Werten zugeordneten progressfreien Überlebenszeiten wurden mit Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und der statistische Unterschied mittels Log-rank-Test ermittelt (Reif S, 2001). Ein p-Wert < 0.05 galt als statistisch signifikant.

Abb. 3.4.1. Beispiele für FACS Dot-Blot- und Histogramm-Analysen bei einem gesunden KM-Spender und einem AML-Patienten (FAB-Typ M3v)

a) PRR-1-Expression bei einem gesunden KM-Spender



b) B7-1-Expression bei einem Patienten mit einer AML-M3v



4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Expression von Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen in KM-Proben von insgesamt 103 AML-Patienten bei Erstdiagnose und acht gesunden Probanden untersucht. Da nicht immer *alle* Marker bei *allen* Patienten untersucht wurden, variierten die Fallzahlen innerhalb der einzelnen Gruppen. Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt (siehe Kap. 2.2.2.7 und 2.2.2.13) und in dieser Reihenfolge in den Tabellen aufgeführt. Zunächst wurde die Expression von Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen in AML-KM-Proben mit der Expression innerhalb gesunder KM-Proben verglichen. Anschließend wurde die Expression innerhalb der verschiedenen FAB-Typen, bei der primären und sekundären AML und innerhalb der zytogenetischen Risikogruppen untersucht. Zuletzt wurde die prognostische Bedeutung der einzelnen Oberflächenmoleküle in Bezug auf das Erreichen einer Remission und der progressfreien Überlebenswahrscheinlichkeit untersucht.

4.1. Antigenexpression in KM-Proben von AML-Patienten und gesunden Probanden

4.1.1. Zytokinrezeptoren

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv (Tab. 4.1.1.1.) umfasste 19 Patienten mit unreifen Leukämien (M0, M1), 30 Patienten mit Leukämien, die der granulozytären Differenzierungslinie zugeordnet werden (M2, M3), 35 Patienten mit monozytären Leukämien (M4, M5) und jeweils einen Fall mit einer Erythroleukämie (M6) und megakaryozytären Leukämie (M7). Bei 82% bestand eine primäre AML, bei den übrigen Patienten eine sekundäre AML. Das Verhältnis Frauen zu Männer betrug 1,3 : 1. Der Altersmedian bei Diagnosestellung rangierte bei 59 Jahren.

Tab 4.1.1.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs

	AML-Patienten bei Erstdiagnose (n=89) ^{7,8}
Alter (Median/Schwankungsbereich) [y]	59 (18-84)
morph-Blasten (m±s) [%]	69±20
iz-Blasten (m±s) [%]	81±15
FAB-Typen	
M0 [n]	2
M1 [n]	17
M2 [n]	21
M3 [n]	10
M4 [n]	25
M5 [n]	10
M6 [n]	1
M7 [n]	1
pAML [n]	73
sAML [n]	15
Zytogenetische Risikogruppen ¹	
Günstig [n]	18
Intermediär [n]	51
Schlecht [n]	20
Remissionrate ³ (Ansprecher/alle) [n/n] ²	51/82 (62%)
Beobachtungszeit ⁴ (m±s) [d]	176 ± 133
Rezidivrate (Rezidive/ Ansprecher) [n/n] ²	19/51 (37%)
Progressfreie Überlebenszeit ⁵ (m±s) [d]	181 ± 75
Todesrate (Verstorbene/alle) [n/n] ²	38/82 (46%)
Überlebenszeit ⁶ (m±s) [d]	80 ± 92

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, n Anzahl, y Jahr, d Tag, morph morphologisch bestimmt; iz immunzytologisch bestimmt; FAB French-American-British, pAML primäre AML, sAML sekundäre AML

¹Einteilung entsprechend Tabelle 3.5.1.; ²Prozentwerte in Klammern; ³nur Patienten analysiert, die therapiert wurden und von denen der klinische Verlauf erfasst werden konnte; ⁴reichte von Diagnosestellung bis KMT, Rezidiv, Versterben oder letzten Kontakt, falls Patient in CR; ⁵nur Patienten analysiert, die eine Remission erreichten und rezidiert sind; ⁶nur Patienten analysiert, die verstorben sind; ⁷zwei Patienten waren nicht FAB-klassifiziert; ⁸bei einem Patient keine Angabe, ob p/sAML.

Die morphologisch bestimmten Blastenzahlen im KM lagen bei durchschnittlich 69%, die immunzytologisch bestimmten Blastenzahlen bei 81%. 60% der Patienten (n=53) wurden nach dem Therapieregime der German-AML-Cooperative-Group (AML-CG-Protokoll) mit Doppelinduktion behandelt. Alle bis auf einen der 10 Fälle mit

Promyelozytenleukämie wurden mit TAD und ATRA behandelt. 10 AML-Patienten wurden nach anderen Therapieprotokollen (ICE, IVA, OSHO97 usw.) behandelt. 2 Patienten verstarben an der Leukämie noch vor Therapiebeginn. Bei den übrigen 24 Patienten lagen keine Angaben zur Therapie vor. Die Ansprechraten (=Erreichen einer Vollremission) auf *alle* therapeutische Maßnahmen lag bei 62%, die Ansprechrate auf die AML-CG-Therapie lag mit 70% etwas höher. Insgesamt wurden 16 Früh Todesfälle verzeichnet. Die Überlebenszeit der insgesamt 36 verstorbenen Patienten betrug nach Diagnosestellung im Durchschnitt 2,7 Monate, die rezidivfreie Zeit der 19 (rezidierten) Patienten im Durchschnitt ca. 6 Monate. Die Beobachtungsdauer pro Patient lag zwischen 1 Tag und 16 Monaten, durchschnittlich wurden die Patienten ca. 6 Monate lang beobachtet. Die Beobachtungszeit endete, wenn die Patienten sich einer Knochenmarkstransplantation unterzogen, ein Rezidiv erlitten oder verstarben. Bei Patienten in CR wurde der Zeitpunkt des letzten Kontakts als Endpunkt des Beobachtungszeitraumes gesetzt. 18 Patienten wiesen einen prognostisch günstigen Karyotyp, 20 Patienten einen prognostisch ungünstigen Karyotyp auf.

Die Ergebnisse der Zytokinrezeptorexpression auf AML-Blasten im Vergleich zu gesunden KM-Proben werden in Tab. 4.1.1.2. dargestellt:

Tab. 4.1.1.2. Zytokinrezeptorexpression bei AML-Patienten und gesunden Probanden.

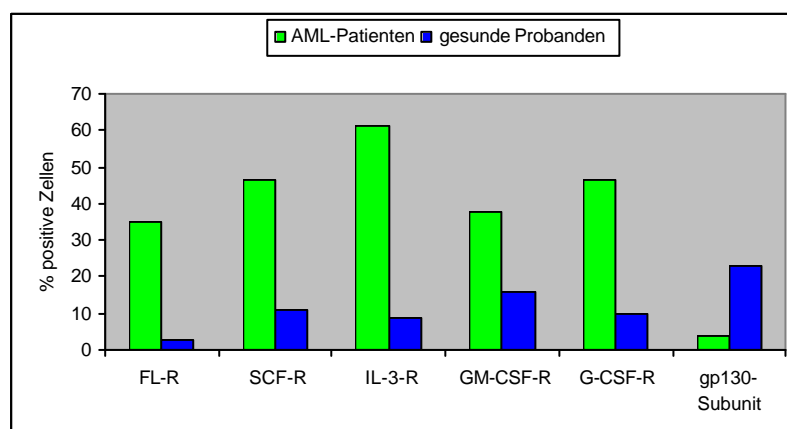
	AML-Patienten bei Erstdiagnose			Gesunde Probanden		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. Fälle/ alle [n/n]	Anteil pos. Zellen (m±s) [%]	mFI (m±s)
FL-R	55/89 (62%)	35±30	48±35	0/7 (0%)	3±3	42±8
SCF-R	36/48 (75%)	46±30	100±68	0/8 (0%)	11±4	120±36
IL-3-R	32/36 (89%)	61±27	121±93	0/4 (0%)	9±5	118±94
GM-CSF-R	56/89 (63%)	38±30	94±80	2/7 (29%)	16±7	192±60
G-CSF-R	15/37 (41%)	25±29	45±69	0/4 (0%)	10±5	59±4
gp130-Subunit	0/36 (0%)	4±4	27±29	1/4 (25%)	23±23	78±70

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, pos positiv, mFI mittlere Fluoreszenz-Intensität;

¹Eine KM-Probe wird als „positiv“ bezeichnet, wenn mehr als 20% der Zellen im Auswertefenster den entsprechenden Marker exprimieren; ²Prozentwerte in Klammern; ³Anteil der Rezeptor-exprimierenden Zellen im Auswertefenster; ⁴Maß für relative Rezeptordichte auf den Rezeptor-exprimierenden Zellen

Die meisten KM-Proben von AML-Patienten waren positiv für den IL-3-R (90% der Fälle) und den SCF-R (75% der Fälle). 62% der AML-KM-Proben waren positiv für den FL-R, 63% für den GM-CSF-R und nur 41% für den G-CSF-R. Die gp130-Subunit war bei keinem der untersuchten AML-Fälle positiv. Im Gegensatz hierzu waren zwei von sieben untersuchten KM-Proben der gesunden Probanden positiv für den GM-CSF-R und eine von vier Proben für die gp130-Subunit. Für alle anderen Zytokinrezeptoren mussten die gesunden KM-Proben als negativ gewertet werden. Aus Abb. 4.1.1.1. geht hervor, dass der durchschnittliche Anteil Zytokinrezeptor-exprimierender Zellen im Auswertefenster innerhalb der KM-Proben von AML-Patienten deutlich höher als der von den gesunden Probanden war. Einzige Ausnahme bildete die gp130-Subunit, deren Anteil bei der AML niedriger als bei Gesunden war. Umgekehrt war die mittlere, relative Rezeptordichte (mFI) bei AML-Patienten niedriger als bei gesunden Probanden.

Abb. 4.1.1.1. Zytokinrezeptor-Expression (%) im KM gesunder Probanden und AML-Patienten bei Erstdiagnose



4.1.2. Adhäsionsmoleküle

Bei insgesamt 103 AML-Patienten und 8 gesunden Probanden wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen untersucht. Das untersuchte Patientenkollektiv bei Erstdiagnose umfasste 24 Patienten mit unreifen Leukämien (M0, M1), 34 Patienten mit Leukämien, die der granulozytären Differenzierungslinie zugeordnet werden (M2, M3), und 42 Patienten mit monozytären Leukämien (M4, M5). Bei 82% der Patienten bestand eine primäre Leukämie, bei den übrigen eine sekundäre Leukämie. Das Verhältnis Frauen zu Männern betrug 1,2 : 1. Der Altersmedian rangierte bei 58 Jahren. Die morphologisch bestimmten Blastenzahlen im KM lagen bei durchschnittlich 71%, die immunzytologisch bestimmten Blasten bei 83%. 19% der Patienten wiesen einen prognostisch günstigen, 25% einen prognostisch ungünstigen Karyotyp auf. Die meisten Patienten (n=61, 66%) wurden nach dem AML-CG-Protokoll behandelt. Alle bis auf einen der 10 Fälle mit einer Promyelozytenleukämie wurden mit ATRA und TAD therapiert. Die übrigen Patienten wurden nach anderen Therapieprotokollen behandelt. Insgesamt 90 der 103 Patienten wurden über einen durchschnittlichen Zeitraum von ca. sechs Monaten beobachtet. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von einem Tag bis hin zu zwei Jahren. Drei Patienten verstarben noch vor Therapiebeginn. Die Ansprechrate auf die Therapie lag bei 61%. Bei den Patienten, die ausschließlich nach dem AML-CG-Protokoll behandelt wurden, lag die Ansprechrate mit 70% etwas höher. Von den Patienten, die eine Remission erreichten, rezidierten 42% nach durchschnittlich sechs Monaten. Die Hälfte der von uns untersuchten Patienten verstarb nach durchschnittlich drei Monaten. 18 Patienten verstarben bereits innerhalb des ersten Monats nach Diagnosestellung (=Frühtod), die übrigen Patienten nach durchschnittlich fünf Monaten.

Tab 4.1.2.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs

	AML-Patienten bei Erstdiagnose (n=103) ⁷
Alter (Median/Schwankungsbereich) [y]	58 (18-84)
morph-Blasten (m±s) [%]	73±19
iz-Blasten (m±s) [%]	84±12
FAB-Typen	
M0 [n]	2
M1 [n]	22
M2 [n]	24
M3 [n]	10
M4 [n]	29
M5 [n]	12
pAML [n]	86
sAML [n]	17
Zytogenetische Risikogruppen ¹	
Günstig [n]	20
Intermediär [n]	58
Schlecht [n]	25
Remissionrate ³ (Ansprecher/alle) [n/n] ²	61/90 (67%)
Beobachtungszeit ⁴ (m±s)[d]	182±146
Rezidivrate (Rezidive/ Ansprecher) [n/n] ²	25/61 (41%)
Progressfreie Überlebenszeit ⁵ (m±s)[d]	191±84
Todesrate (Verstorbene/alle) [n/n] ²	44/90 (49%)
Überlebenszeit ⁶ (m±s)[d]	98±108

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, n Anzahl, y Jahr, d Tag, morph morphologisch bestimmt; iz immunzytologisch bestimmt; FAB French-American-British, pAML primäre AML, sAML sekundäre AML

¹Einteilung entsprechend Tabelle 3.5.1.; ²Prozentwerte in Klammern; ³nur Patienten analysiert, die therapiert wurden und von denen der klinische Verlauf erfasst werden konnte; ⁴reichte von Diagnosestellung bis KMT, Rezidiv, Versterben oder letzten Kontakt, falls Patient in CR; ⁵nur Patienten analysiert, die eine Remission erreichten und rezidiert sind; ⁶nur Patienten analysiert, die verstorben sind; ⁷vier Patienten waren nicht FAB-klassifiziert.

Tabelle 4.1.2.2. zeigt die durchschnittliche Expression von Adhäsionsmolekülen in KM-Proben von AML-Patienten und gesunden Probanden. Bei den AML-KM-Proben wurden die Oberflächenmoleküle PRR-2, Mac-1, UPA-R, B7-1, B7-2 und NCAM deutlich häufiger exprimiert (höherer Anteil positiver Zellen im Auswertefenster, höherer Anteil positiver Fälle) als bei den gesunden KM-Proben (siehe Abb. 4.1.2.1). Die mittlere, relative Rezeptordichte dieser Marker war dagegen bei den AML-Patienten niedriger (Mac-1, B7-1, B7-2) oder vergleichbar (PRR-2, UPA-R, NCAM). VLA-2, PRR-1, L-Selektin wurden weniger häufig (Anteil positiver Zellen/ Anteil positiver Fälle) und auch weniger hoch (mFI) in den AML-KM-Proben als in den gesunden KM-Proben exprimiert. Keine wesentlichen Unterschiede konnten für LFA-1, LFA-3 und ICAM-1 gefunden werden. Lediglich die mittlere, relative Rezeptordichte für ICAM-1 war bei den gesunden KM-Proben höher. VLA-2 war in beiden Gruppen sehr gering (3-4% der Zellen positiv) exprimiert.

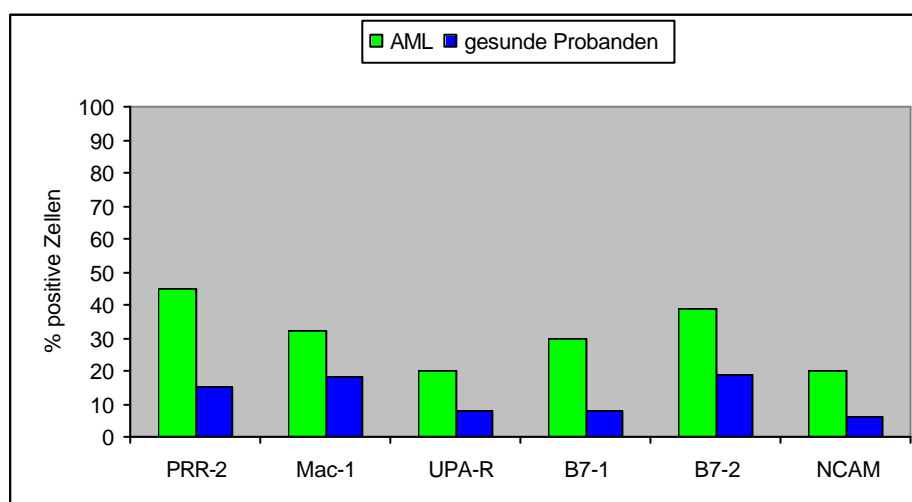
Tab. 4.1.2.2. Expression von Adhäsionsmolekülen bei AML-Patienten und gesunden Probanden

	AML-Patienten bei Erstdiagnose			Gesunde Probanden		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)
Stroma-Kontakt fördernd						
VLA-2	23/36 (64%)	45±40	79±56	4/4 (100%)	38±9	214± 128
VLA-3	0/32 (0%)	3±4	26±20	0/4 (0%)	3±1	53±10
PRR-1	29/55 (53%)	35±33	68±63	7/8 (88%)	49±19	233± 61
PRR-2	41/55 (75%)	45±30	52±36	3/8 (38%)	15±8	50±12
Endothel-Kontakt fördernd						
L-Selektin	14/36 (39%)	31±50	69±65	4/4 (100%)	43±15	241± 88
LFA-1	27/29 (93%)	71±29	283± 259	4/4 (100%)	53±8	291± 68
Mac-1	29/48 (60%)	32±26	217± 271	3/8 (38%)	18±6	350± 84
UPA-R	36/93 (39%)	20±23	77± 162	0/8 (0%)	8±5	69±16
T-Zell/ NK-Zell-Kontakt fördernd						
ICAM-1	23/33 (70%)	37±28	76±54	3/ 4 (75%)	31±15	201± 106
LFA-3	29/29 (100%)	95±13	255± 171	4/4 (100%)	81±10	297± 135
B7-1	13/28 (46%)	30±30	96± 112	0/4 (0%)	8±2	128± 26
B7-2	19/29 (66%)	39±31	82±68	0/4 (0%)	19±7	115±9
NCAM	24/93 (26%)	20±30	345± 359	0/7 (0%)	6±2	360± 144

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, pos positiv, mFI mittlere Fluoreszenz-Intensität;

¹Eine KM-Probe wird als „positiv“ bezeichnet, wenn mehr als 20% der Zellen im Auswertefenster den entsprechenden Marker exprimieren; ²Prozentwerte in Klammern; ³Anteil der Rezeptor-exprimierenden Zellen im Auswertefenster; ⁴Maß für relative Rezeptordichte auf den Rezeptor-exprimierenden Zellen

Abb. 4.1.2.1. PRR-2, Mac-1, UPA-R, B7-1, B7-2, NCAM wurden im Durchschnitt häufiger im KM von AML-Patienten als im KM gesunder Probanden exprimiert.



4.2. Antigenexpression bei primärer und sekundärer AML

4.2.1. Zytokinrezeptoren

74 Patienten mit einer primären (pAML) und 15 Patienten mit einer sekundären AML (sAML) wurden bezüglich ihrer Expression von Zytokinrezeptoren verglichen. Der Altersmedian in der sAML-Gruppe lag mit 70 Jahren deutlich höher als in der pAML-Gruppe (Altersmedian: 57 Jahre). Bei der sAML überwogen mit 60% v.a. die monozytären Leukämien. Keiner der Patienten in dieser Gruppe war an der prognostisch günstigen Promyelozytenleukämie erkrankt. 23% der pAML-Patienten, aber nur 6% der sAML-Patienten wiesen einen prognostisch günstigen Karyotyp auf. Der Anteil der prognostisch schlechten Karyotypen war in beiden Gruppen vergleichbar. Entsprechend dem höheren Lebensalter und dem geringeren Anteil zytogenetisch günstiger Karyotypen zeigte sich in der sAML-Gruppe eine deutlich verminderte Remissionsrate und eine deutlich erhöhte Todesrate. Nach dem Erreichen einer Remission war dagegen sowohl die Rezidivhäufigkeit, als auch die progressfreie Überlebenszeit bis zum Rezidiv in beiden Gruppen vergleichbar. Eine Übersicht über die untersuchten Patientenkollektive gibt Tab. 4.2.1.1

Tab. 4.2.1.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs von primärer und sekundärer AML

	pAML (n=74) ⁷	sAML (n=15) ⁷
Alter (Median/Schwankungsbereich) [y]	57 (18-84)	70 (53-80)
morph-Blasten (m±s) [%]	71±20	61±19
iz-Blasten (m±s) [%]	83±14	74±19
FAB-Typen		
M0 [n]	2	
M1 [n]	15	2
M2 [n]	18	3
M3 [n]	10	
M4 [n]	19	6
M5 [n]	7	3
M6 [n]	1	
M7 [n]	1	
Zytogenetische Risikogruppen ¹		
Günstig [n]	17	1
Intermediär [n]	41	10
Schlecht [n]	16	4
Remissionsrate ³ (Ansprecher/alle) [n/n] ²	45/68 (68%)	5/15 (33%)
Beobachtungszeit ⁴ (m±s)[d]	176 ± 129	177 ± 154
Rezidivrate (Rezidive/ Ansprecher) [n/n] ²	17/45 (38%)	2/5 (40%)
Progressfreie Überlebenszeit ⁵ (m±s)[d]	182 ± 80	170 ± 12
Todesrate (Verstorbene/alle) [n/n] ²	29/68 (43%)	9/15 (60%)
Überlebenszeit ⁶ (m±s)[d]	78 ± 85	85 ± 117

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, n Anzahl, y Jahr, d Tag, morph morphologisch bestimmt; iz immunzytologisch bestimmt; FAB French-American-British, pAML primäre AML, sAML sekundäre AML

¹Einteilung entsprechend Tabelle 3.5.1.; ²Prozentwerte in Klammern; ³nur Patienten analysiert, die therapiert wurden und von denen der klinische Verlauf erfasst werden konnte; ⁴reichte von Diagnosestellung bis KMT, Rezidiv, Versterben oder letztem Kontakt, falls Patient in CR; ⁵nur Patienten analysiert, die eine Remission erreichten und rezidiert sind; ⁶nur Patienten analysiert, die verstorben sind; ⁷ein Patient war nicht FAB-klassifiziert;

Tabelle 4.2.1.2. zeigt die Zytokinrezeptorexpression innerhalb der pAML- und sAML-Gruppe. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich **keine signifikante Unterschiede**. Es konnten daher lediglich Tendenzen angegeben werden: Bei der pAML zeigte sich ein höherer Anteil positiver Blasten für die unreifen Marker SCF-R und IL-3-R, sowie für den G-CSF-R. Ein geringerer Anteil positiver Blasten zeigte sich dagegen für den GM-CSF-R und –nur sehr gering – für den FL-R.

Tab.3.2.1.2. Zytokinrezeptorexpression bei sekundärer und primärer AML

	Primäre AML			Sekundäre AML			Gesunde Probanden		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)
FL-R	44/74 (60%)	34±32	48±34	10/15 (67%)	36±27	47±43	0/7 (0%)	3±3	42±8
SCF-R	32/42 (76%)	47±30	97±69	4/6 (67%)	38±27	125±54	0/8 (0%)	11±4	120±36
IL-3-R	29/32 (91%)	68±22	124±98	3/4 (75%)	49±30	96±17	0/4 (0%)	9±5	118±94
GM-CSF-R	44/74 (60%)	36±30	88±76	11/15 (73%)	45±30	124±89	2/7 (29%)	16±7	192±60
G-CSF-R	14/33 (42%)	23±24	44±72	1/4 (25%)	18±21	54±37	0/4 (0%)	10±5	59±4
gp130- Subunit	0/32 (0%)	4±4	27±30	0/4 (0%)	4±4	34/20	1/4 (25%)	23±23	78±70

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, pos positiv, mFI mittlere Fluoreszenz-Intensität:

¹Eine KM-Probe wird als „positiv“ bezeichnet, wenn mehr als 20% der Zellen im Auswertefenster den entsprechenden Marker exprimieren; ²Prozentwerte in Klammern; ³Anteil der Rezeptor-exprimierenden Zellen im Auswertefenster; ⁴Maß für relative Rezeptordichte auf den Rezeptor-exprimierenden Zellen

4.2.2. Adhäsionsmoleküle

Die Expression von Adhäsionsmolekülen wurden bei 86 Patienten mit einer primären und 17 Patienten mit einer sekundären AML untersucht. Der Altersmedian in der sAML-Gruppe lag mit 62 Jahren etwas höher als in der pAML-Gruppe (Altersmedian: 56 Jahre). Auch in diesem Patientenkollektiv waren in der sAML-Gruppe mehr monozytäre Leukämien vertreten als in der pAML-Gruppe (47% vs 37% positive Zellen). Kein Patient mit einer sAML präsentierte den FAB-Typ M3. Bei den pAML-Patienten wurde ebenso häufig ein prognostisch günstiger wie ein prognostisch ungünstiger Karyotyp diagnostiziert, während in der sAML-Gruppe nur ein Patient (5%) einen günstigen Karyotyp und 37% der Patienten einen prognostisch schlechten Karyotyp aufwiesen. Durchschnittlich wurden 80 pAML und 17 sAML-Patienten ca. sechs Monate lang beobachtet. Entsprechend dem geringeren Anteil zytogenetisch günstiger Karyotypen zeigte sich in der sAML-Gruppe eine deutlich verminderte Remissionsrate. Dagegen rezidierten 43% der Patienten in der pAML Gruppe, aber nur 25% in der sAML Gruppe nach durchschnittlich 6,4 bzw. 5,6 Monaten. Die Sterberate innerhalb des Beobachtungszeitraumes war in beiden Gruppen weitgehend vergleichbar (siehe Tabelle 4.2.2.1)

Tab. 4.2.2.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs von primärer und sekundärer AML

	pAML (n=86) ⁷	sAML (n=17) ⁸
Alter (Median/Schwankungsbereich) [y]	56 (18-84)	62 (47-80)
morph-Blasten (m±s) [%]	73±19	71±18
iz-Blasten (m±s) [%]	84±12	83±12
FAB-Typen		
M0 [n]	2	0
M1 [n]	19	3
M2 [n]	20	4
M3 [n]	10	0
M4 [n]	23	6
M5 [n]	9	3
Zytogenetische Risikogruppen ¹		
Günstig [n]	19	1
Intermediär [n]	48	10
Schlecht [n]	19	6
Remissionrate ³ (Ansprecher/alle) [n/n] ²	53/80 (66%)	8/18 (44%)
Beobachtungszeit ⁴ (m±s)[d]	187±147	169±150
Rezidivrate (Rezidive/ Ansprecher) [n/n] ²	23/53 (43%)	2/8 (25%)
Progressfreie Überlebenszeit ⁵ (m±s)[d]	193±87	170±12
Todesrate (Verstorbene/alle) [n/n] ²	38/80 (48%)	9/18 (50%)
Überlebenszeit ⁶ (m±s)[d]	101±103	85±117

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, n Anzahl, y Jahr, d Tag, morph morphologisch bestimmt; iz immunzytologisch bestimmt; FAB French-American-British, pAML primäre AML, sAML sekundäre AML ¹Einteilung entsprechend Tabelle 3.5.1.; ²Prozentwerte in Klammern; ³nur Patienten analysiert, die therapiert wurden und von denen der klinische Verlauf erfasst werden konnte; ⁴reichte von Diagnosestellung bis KMT, Rezidiv, Versterben oder letztem Kontakt, falls Patient in CR; ⁵nur Patienten analysiert, die eine Remission erreichten und rezidiert sind; ⁶nur Patienten analysiert, die verstorben sind; ⁷drei Patienten waren nicht FAB-klassifiziert; ⁸ein Patient war nicht FAB-klassifiziert

Tabelle 4.2.2.2. zeigt die Expression von Adhäsionsmolekülen im KM von Patienten, die an einer pAML oder sAML erkrankt waren. Es zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl Mac-1- positiver Fälle in der sAML-Gruppe als in der pAML-Gruppe ($p=0.034$, Qui²-Test). Auch die relative Rezeptordichte für Mac-1 war in der sAML-Gruppe mit einem mFI-Wert von 427 vs. 188 in der pAML-Gruppe höher, allerdings nicht signifikant ($p=0.37$, T-Test). Deutlich, aber gerade nicht signifikant ($p=0.074$, Qui²-Test), war der Unterschied in der Anzahl positiver Fälle für PRR-2 zwischen den beiden Gruppen. Ansonsten war die Expression von Adhäsionsmoleküle in beiden Gruppen vergleichbar (siehe Abb. 4.2.2.1.)

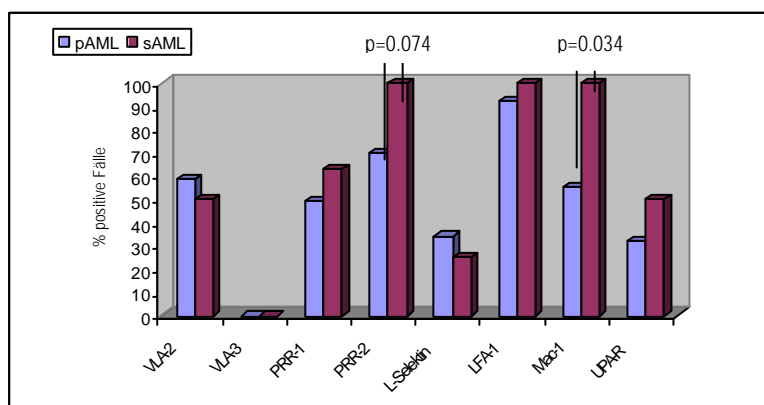
Tab. 4.2.2.2. Expression von Adhäsionsmolekülen bei primärer und sekundärer AML

Adhäsionsmoleküle	Primäre AML			Sekundäre AML			Gesunde Probanden		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle Fälle	Anteil pos. Zellen [%] ³ m±s	Expressions dichte*** m±s
Stroma-Kontakt fördernd									
VLA-2	19/32 (59%)	45±39	78±59	2/4 (50%)	45±50	85±32	4/4 (100%)	38±9	214± 128
VLA-3	0/28 (0%)	2±4	22±17	0/4 (0%)	7±8	50±29	0/4 (0%)	3±1	53±10
PRR-1	23/47 (49%)	36±35	69±69	5/8 (63%)	28±22	63±27	7/8 (88%)	49±19	233± 61
PRR-2	33/47 (70%)	44±31	51±34	8/8 (100%)	52±23	57±54	3/8 (38%)	15±8	50±12
Endothel-Kontakt fördernd									
L-Selektin	11/32 (34%)	25±32	70±69	1/4 (25%)	18±23	85±18	4/4 (100%)	43±15	241± 88
LFA-1	23/25 (92%)	70±29	271±254	4/4 (100%)	77±31	257±324	4/4 (100%)	53±8	291± 68
Mac-1	23/42 (55%)	34±27	188±181	6/6 (100%)	40±21	427±603	3/8 (38%)	18±6	350± 84
UPA-R	25/77 (32%)	19±22	77±77	8/16 (50%)	27±25	76±58	0/8 (0%)	8±5	69±16
T-Zell/ Nk-Zell -Kontakt fördernd									
ICAM-1	19/29 (66%)	35±28	69±50	3/4 (75%)	52±31	129±58	3/4 (75%)	31±15	201± 106
LFA-3	25/25 (100%)	95±14	237±173	4/4 (100%)	99±2	372±112	4/4 (100%)	81±10	297± 135
B7-1	11/24 (46%)	28±28	93±117	2/4 (50%)	44±44	116±84	0/4 (0%)	8±2	128± 26
B7-2	16/25 (64%)	38±31	80±72	3/4 (75%)	45±37	88±32	0/4 (0%)	19±7	115±9
NCAM	19/29 (66%)	35±28	69±50	3/4 (75%)	52±31	129±58	0/7 (0%)	6±2	360± 144

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, pos positiv, mFI mittlere Fluoreszenz-Intensität;

¹Eine KM-Probe wird als „positiv“ bezeichnet, wenn mehr als 20% der Zellen im Auswertfenster den entsprechenden Marker exprimieren; ²Prozentwerte in Klammern; ³Anteil der Rezeptor-exprimierenden Zellen im Auswertfenster; ⁴Maß für relative Rezeptordichte auf den Rezeptor-exprimierenden Zellen

Abb. 4.2.2.1. Expression von Adhäsionsmolekülen bei primärer und sekundärer AML



4.3. Antigenexpression innerhalb verschiedener FAB-Typen

4.3.1. Zytokinrezeptoren

Die Zytokinrezeptor-Expression wurde bei zwei Patienten mit dem FAB-Typ M0, 17 Patienten mit M1, 21 Patienten mit M2, zehn Patienten mit M3, 25 Patienten mit M4 und zehn Patienten mit M5 und jeweils bei einem Patienten mit M6 und M7 untersucht. Der Altersmedian innerhalb der meisten FAB-Typen lag bei ca. 59 Jahren, lediglich bei den unreifen FAB-Typen M0 und M1 war er mit 70 bzw. 66 Jahren nach oben und bei der M3 mit 35 Jahren deutlich nach unten hin verschoben. Prognostisch günstige Karyotyp-Anomalien wurden bei 23% der M2-Fälle, bei 16% der M4-Fälle und bei 90% der M3-Fälle diagnostiziert. Prognostisch ungünstige Karyotypanomalien wurden in 50% der M5-Fälle, in 28% der M2-Fälle und in 21% der M4-Fälle festgestellt. Die unreifen Leukämien (M0 und M1) setzten sich überwiegend aus prognostisch intermediären Karyotypen zusammen.

Tab. 4.3.1.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs innerhalb verschiedener FAB-Typen

Zytokinrezeptoren	M0 (n=2)	M1 (n=17)	M2 (n=21)	M3 (n=10)	M4 (n=25)	M5 (n=10)	M6 (n=1)	M7 (n=1)
Alter[y] (Median/Schwankungsbereich)	70 (64 – 76)	66 (25 – 77)	58 (19 – 73)	35 (19 – 65)	59 (18 – 84)	58 (54 – 79)	34	62
morph-Blasten (m±s) [%]	91±9	80±16	54±20	76±21	67±16	79±12	48	nd
iz-Blasten (m±s) [%]	86±12	88±11	74±16	90±5	84±8	80±19	20	53
pAML [n]	2	15	18	10	19	7	1	1
sAML [n]		2	3		6	3	0	0
zytogenet. Risikogruppen ¹								
Günstig [n]	0	0	5	9	4	0	0	0
Intermediär [n]	2	16	10	0	15	5	1	0
Schlecht [n]	0	1	6	1	6	5	0	1
Remissionrate ³ (Ansprecher/alle) [n/n] ²	2/0 (100%)	10/17 (59%)	14/20 (70%)	7/10 (70%)	16/25 (64%)	2/8 (25%)	nd	0/1
Beobachtungszeit ⁴ (m±s)[d]	328±11	168±140	170±90	238±166	208±136	71±98	nd	56
Rezidivrate (Rezidive/ Ansprecher) [n/n] ²	0/0 (0%)	6/10 (60%)	7/14 (50%)	0/7 (0%)	4/16 (25%)	2/2 (100%)	nd	0/1 (0%)
Progressfreie Überlebenszeit ⁵ (m±s)[d]		186±92	155±61		242±61	132±42	nd	
Todesrate (Verstorbene/alle) [n/n] ²	0/2 (0%)	10/17 (59%)	4/20 (20%)	3/10 (30%)	9/25 (36%)	8/8 (100%)	nd	1/1 (100%)
Überlebenszeit ⁶ (m±s)[d]		122±127	89±43	15±7	76±72	71±98	nd	56

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, n Anzahl, y Jahr, d Tag, morph morphologisch bestimmt; iz immunzytologisch bestimmt; FAB French-American-British, pAML primäre AML, sAML sekundäre AML

¹Einteilung entsprechend Tabelle 3.5.1.; ²Prozentwerte in Klammern; ³nur Patienten analysiert, die therapiert wurden und von denen der klinische Verlauf erfasst werden konnte; ⁴reichte von Diagnosestellung bis KMT, Rezidiv, Versterben oder letztem Kontakt, falls Patient in CR; ⁵nur Patienten analysiert, die eine Remission erreichten und rezidiert sind; ⁶nur Patienten analysiert, die verstorben sind;

Den günstigsten klinischen Verlauf mit einer Remissionrate von 70% auf TAD/ATRA-Therapie und keinem Rückfall innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von durchschnittlich fast acht Monaten zeigten Patienten, die an einer Promyelozytenleukämie (FAB-Typ M3) erkrankt waren. Die drei M3-Patienten, die nicht auf die Therapie ansprachen, verstarben bereits nach durchschnittlich 27 Tagen an den für die Promyelozytenleukämie typischen Blutungskomplikationen. Ebenso günstig, aber wegen der kleinen Fallzahl (n=2) nicht verallgemeinbar, war der Verlauf innerhalb der M0-Gruppe: Beide Patienten erreichten eine Vollremission, die seit über einem Jahr anhält. Entsprechend dem hohen Anteil prognostisch ungünstiger Karyotyp-Anomalien wiesen Patienten mit dem FAB-Typ M5 den unerfreulichsten klinischen Verlauf auf: Die Remissionsrate lag nur bei 25%, die Todesrate war mit 90% nach durchschnittlich 2,3 Monaten sehr hoch. Innerhalb der M1-, M2- und M4-Patienten waren die Remissionsraten mit 58-64% vergleichbar. Die M1 und M2 zeigten jedoch eine deutlich höhere Rezidivrate (60%, 50%) als die M4 (25%). 58% der Patienten mit M1 verstarben nach durchschnittlich vier Monaten, während nur 19% der Patienten in der M2- und 25% der Patienten in der M4-Gruppe nach durchschnittlich 2,5 bzw. drei Monaten verstarben (siehe Tab. 4.3.1.1.)

Tabelle 4.3.1.2. zeigt die Zytokinrezeptorexpression innerhalb der einzelnen FAB-Typen:

Tab. 4.3.1.2. Zytokinrezeptorexpression innerhalb der verschiedenen FAB-Typen

	FAB-M0			FAB-M1			FAB-M2			FAB-M3		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)
FL-R	1/2 (50%)	27±38	16±6	10/17 (59%)	38±33	36±22	7/21 (33%)	24±30	39±33	5/10 (50%)	21±21	64±38
SCF-R	0/2 (0%)	6±8	19±18	7/7 (100%)	72±17	80±56	13/14 (93%)	50±23	115±44	4/6 (67%)	47±29	125±59
IL-3-R	0/1 (0%)	13	66	7/7 (100%)	88±15	159±122	7/8 (88%)	44±21	119±149	4/4 (100%)	75±22	169±56
GM-CSF-R	0/2 (0%)	12±2	68±19	8/17 (47%)	27±28	59±60	9/21 (43%)	25±22	60±46	5/10 (50%)	20±19	83±36
G-CSF-R	0/1 (0%)	0	6	3/7 (43%)	21±27	22±19	7/8 (88%)	25±21	33±17	2/5 (40%)	33±35	148±150
gp130- Subunit	0/1 (0%)	0	5	0/7 (0%)	3±3	29±32	0/8 (0%)	6±4	21±15	0/4 (0%)	1±1	73±45

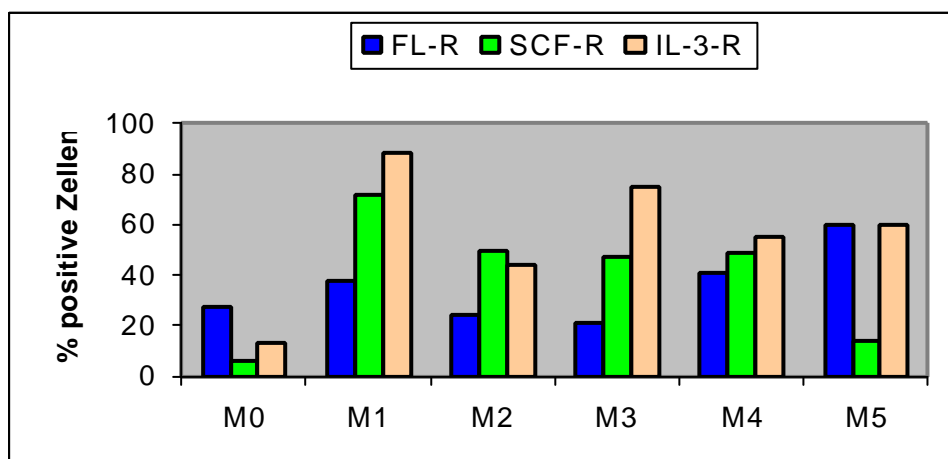
	FAB-M4			FAB-M5			FAB-M6			FAB-M7		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)
FL-R	20/25 (80%)	41±24	50±38	8/10 (80%)	60±37	77±38	0/1 (0%)	12	10	0/1 (0%)	1	94
SCF-R	9/12 (75%)	49±32	63±22	1/5 (20%)	14±21	59±78	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IL-3-R	8/9 (89%)	55±29	101±40	6/6 (100%)	60±24	84±20	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GM-CSF-R	22/25 (88%)	58±27	148±103	10/10 (100%)	77±38	77±38	0/1 (0%)	1	6	1/1 (100%)	34	50
G-CSF-R	3/9 (33%)	17±18	23±16	1/6 (16%)	12±18	23±16	nd	nd	nd	nd	nd	nd
gp130- Subunit	0/9 (0%)	5±5	14,3	0/9 (0%)	5±5	14±14	nd	nd	nd	nd	nd	nd

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, pos positiv, mFI mittlere Fluoreszenz-Intensität;

¹Eine KM-Probe wird als „positiv“ bezeichnet, wenn mehr als 20% der Zellen im Auswertefenster den entsprechenden Marker exprimieren; ²Prozentwerte in Klammern; ³Anteil der Rezeptor-exprimierenden Zellen im Auswertefenster; ⁴Maß für relative Rezeptordichte auf den Rezeptor-exprimierenden Zellen

Insgesamt war die Expression von Zytokinrezeptoren innerhalb aller FAB-Gruppen heterogen. Es konnten allerdings Parallelen zu Reifegrad und Linienzugehörigkeit entsprechend der Expression bei der normalen Hämoese herausgearbeitet werden. Abbildung 4.3.1.1. zeigt zunächst die Expression von Zytokinrezeptoren (FL-R, SCF-R und IL-3), die schon auf frühen Vorstufen der Hämoese wirksam sind.

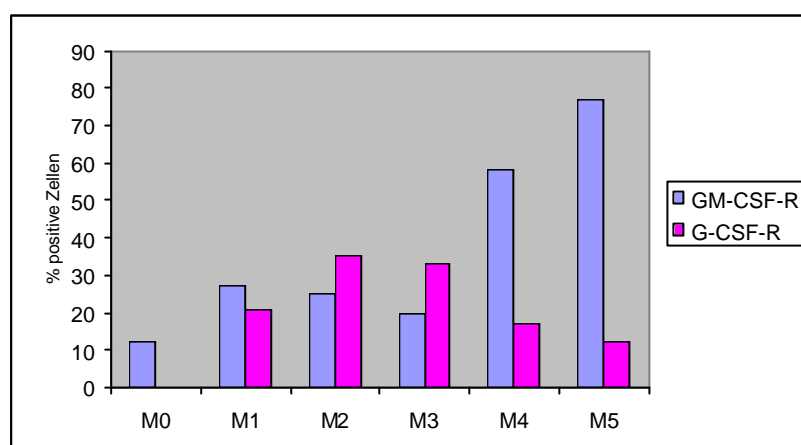
Abb. 4.3.1.1. Expression von FL-R, SCF-R und IL-3 innerhalb der FAB-Typen M0-M5



Bei der sehr unreifen M0 konnte lediglich der FL-R in einem von zwei untersuchten KM-Proben als positiv gewertet werden. Nur wenige Blasten innerhalb des Auswertefensters exprimierten den SCF-R (6%) und den IL-3-R (13%). Mit zunehmendem Reifegrad der Leukämieform (M1<M2<M3) konnte eine Abnahme der Expression von FL-R und SCF-R beobachtet werden. Der deutlichste Unterschied zeigt sich dabei zwischen den M1- und M2-Leukämien. Auch innerhalb der monozytären Zelllinie exprimierten deutlich mehr Zellen den SCF-R innerhalb der unreiferen M4-Gruppe als innerhalb der reiferen M5-Gruppe. Dagegen wurde der FL-R in der M5-Gruppe am höchsten exprimiert. Der IL-3-Rezeptor zeigt bei - bis auf FAB-Typ M0 - generell hoher Expression keine Korrelationen zu Reifegrad und Linienzugehörigkeit. Der höchste durchschnittliche Anteil IL-3-R positiver Zellen wurde in der M1- und M3-Gruppe beobachtet.

Abbildung 4.3.1.2. zeigt die Expression der Zytokinrezeptoren (GM-CSF-R und G-CSF-R), die bei der normalen Hämopoese vor allem auf höheren Differenzierungsstufen (CFUs) vorkommen.

Abb. 4.3.1.2. Expression von G- und GM-CSF-R innerhalb der FAB-Typen M0-M5



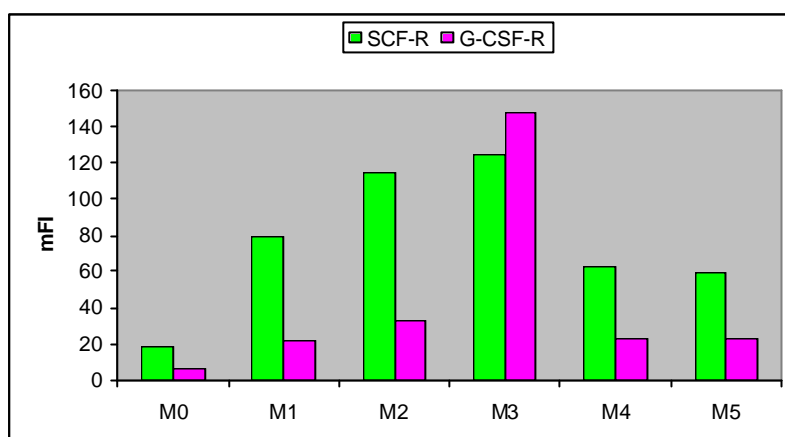
Diese „reiferen“ Zytokinrezeptoren zeigten ein linienspezifisches Expressionsmuster: Der G-CSF-R wurde v.a. bei Leukämieformen exprimiert, die der granulozytären Zellreihe zugeordnet werden (M2 und M3). Die unreifere M1-FAB-Typen zeigten eine etwas geringere G-CSF-R-Expression. Innerhalb der monozytären Leukämie-Subtypen (M4/ M5) wurde der G-CSF-R nur sehr wenig exprimiert.

Der GM-CSF-R wurde dagegen v.a. innerhalb der monozytären Leukämien exprimiert. So wurde GM-CSF-R bei der M4 auf durchschnittlich 58% der Blasten im Auswertefenster und bei der M5 auf durchschnittlich 77% der Blasten exprimiert. Bei den FAB-Typen M1 bis M3 war die mittlere GM-CSF-R-Expression dagegen geringer (20-27% positive Blasten).

Bei den beiden KM-Proben von Patienten mit der undifferenzierten M0-Leukämie wurde der G-CSF-R überhaupt nicht und der GM-CSF-R nur auf 12% der Blasten exprimiert.

Auch die relative Rezeptordichte (mFI) war innerhalb der FAB-Klassen sehr heterogen. Signifikante Unterschiede konnten nur bei der Expressionsdichte des SCF-R und G-CSF-R festgestellt werden. Abbildung 4.3.1.3. zeigt, dass innerhalb des FAB-Typs AML-M3 die mit Abstand höchste G-CSF-Rezeptordichte beobachtet werden konnte, während innerhalb der anderen FAB-Typen die Rezeptordichte eher im unteren Messbereich lag. Nicht so gravierend war der Unterschied bei der Expressionsdichte des SCF-R. Die Expressionsdichte nahm innerhalb der M1-, M2- und M3-Leukämieformen stetig zu. Die höchste Expressionsdichte wurde wiederum bei der M3 beobachtet, eine nur niedrige Rezeptordichte konnte bei der M4 und M5 beobachtet werden. Verglich man die Expressionsdichte mit dem Anteil SCF-R-positiver Zellen, so fiel auf, dass der Anteil positiver Zellen mit zunehmender Reifung der granulozytären Leukämieformen abnahm, die Expressionsdichte dagegen zunahm. Bei der G-CSF-R-Expression verlief der Anteil positiver Zellen im Vergleich zur relativen Rezeptordichte parallel, wenn auch der Unterschied in der Rezeptordichte zwischen M3 und den übrigen FAB-Typen am ausgeprägtesten war.

Abb. 4.3.1.3. Relative Rezeptordichte von SCF-R und G-CSF-R innerhalb der FAB-Typen M0-M5



Deutlich zeigten sich Parallelen zum klinischen Verlauf der Patienten: Den günstigsten Verlauf zeigte die AML-M3. Hier wurde die höchste G-CSF-R-, eine niedrige GM-CSF-R- und die niedrigste FL-R-Expression beobachtet.

Den ungünstigsten klinischen Verlauf wies die AML-M5 auf. Hier zeigte sich die höchste GM-CSF-R- und FL-R-Expression und die niedrigste G-CSF-R- und SCF-R-Expression. Alle M5-Patienten, die G-CSF-R negativ waren, sind verstorben.

4.3.2. Adhäsionsmoleküle

Die Expression von Adhäsionsmolekülen wurde bei 2 Patienten mit dem FAB-Typ M0, 22 Patienten mit M1, 24 Patienten mit M2, 10 Patienten mit M3, 29 Patienten mit M4, 13 Patienten mit M5 untersucht. Der Altersmedian lag innerhalb der meisten FAB-Typen zwischen 56 und 62 Jahren. Lediglich die beiden Patienten mit dem FAB-Typ M0 waren mit einem Altersmedian von 70 Jahren deutlich älter, während die Patienten, die an einer Promyelozytenleukämie erkrankt waren, mit einem Altersmedian von 35 Jahren deutlich jünger waren. Prognostisch günstige Karyotypanomalien wurden in 20% der M2, in 90% der M3 und in 20% der M4-Fälle diagnostiziert. Prognostisch ungünstige Karyotypanomalien wurden in 54% der M5-, 29% der M2- und in 21% der M4-Fälle festgestellt. Die unreifen Leukämien M1 und M2 setzten sich überwiegend aus Fällen mit prognostisch intermediären Karyotypen zusammen.

Tab. 4.3.2.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs innerhalb der FAB-Typen M0-M5

	M0 (n = 2)	M1 (n = 22)	M2 (n = 24)	M3 (n = 10)	M4 (n = 29)	M5 (n = 13)
Alter [y] (Median/Schwankungsbereich)	70 (64-76)	62,5 (25-77)	54 (19-73)	35 (19-65)	59 (18-84)	56 (19-79)
morph-Blasten (m±s) [%]	93±4	82±13	51±19	73±23	70±13	86±6
iz-Blasten (m±s) [%]	80±5	88±12	76±16	89±5	84±7	92±5
pAML [n]	2	19	20	10	23	9
sAML [n]	0	3	4	0	6	4
zytogenet. Risikogruppen ¹						
Günstig [n]	0	0	5	9	6	0
Intermediär [n]	2	19	12	0	17	6
Schlecht [n]	0	3	7	1	6	7
Remissionsrate ³ (Ansprecher/alle) [n/n] ²	2/0 (100%)	13/21 (61%)	16/22 (72%)	7/10 (70%)	19/28 (68%)	4/12 (33%)
Beobachtungszeit ⁴ (m±s)[d]	328± 11	150±127	201±148	238±166	228±144	76 ±104
Rezidivrate (Rezidive/ Ansprecher) [n/n] ²	0/2 (0%)	8/13 (62%)	7/16 (44%)	0/7 (0%)	6/19 (32%)	4/4 (100%)
Progressfreie Überlebenszeit ⁵ (m±s)[d]		175±87	155±61		258±56	188±114
Todesrate (Verstorbene/alle) [n/n] ²	0/2 (0%)	14/21 (67%)	5/22 (23%)	3/10 (30%)	11/28 (39%)	11/12 (92%)
Überlebenszeit ⁶ (m±s)[d]		122±113	121±81	15±7	99±97	99±144

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, n Anzahl, y Jahr, d Tag, morph morphologisch bestimmt; iz immunzytologisch bestimmt; FAB French-American-British, pAML primäre AML, sAML sekundäre AML ¹Einteilung entsprechend Tabelle 3.5.1.; ²Prozentwerte in Klammern; ³nur Patienten analysiert, die therapiert wurden und von denen der klinische Verlauf erfasst werden konnte; ⁴reichte von Diagnosestellung bis KMT, Rezidiv, Versterben oder letztem Kontakt, falls Patient in CR; ⁵nur Patienten analysiert, die eine Remission erreichten und rezidiert sind; ⁶nur Patienten analysiert, die verstorben sind;

Die Patienten mit einer Promyelozytenleukämie zeigten den erfreulichsten klinischen Verlauf, während Patienten, die an einer AML-M5 erkrankt waren, mit einer Ansprechrate von nur 33% auf Therapie den unerfreulichsten Verlauf zeigten: All diese Patienten rezidierten nach durchschnittlich sechs Monaten und alle bis auf einen der zwölf Patienten verstarben schon nach kurzer Zeit nach Diagnosestellung (siehe Tab. 4.3.2.1). Ansonsten war der klinische Verlauf der verschiedenen Untergruppen im Wesentlichen dem des Patientenkollektivs der Zytokinrezeptoren ähnlich, so dass auf eine weitere detaillierte Beschreibung verzichtet wird.

Eine Übersicht über die Expression von Adhäsionsmolekülen innerhalb der verschiedenen FAB-Typen gibt Tabelle 4.3.2.2.

VLA-2 war durchschnittlich bei 39% bis 54% der untersuchten FAB-Subtypen positiv. Patienten mit FAB-Typ M3 zeigten die höchste **PRR-1-Expression**, innerhalb der FAB-Typen M1, M2 und M4 schwankte der Anteil PRR-1 positiver Zellen zwischen 27% und 60%, während die wenigsten Zellen innerhalb der unreifen M0 (5%) und der monozytären M5 (13%) für PRR-1 positiv waren. Alle bis auf eine KM-Probe der M3-Patienten waren für **PRR-2** positiv. Ebenso hoch war der Anteil der PRR-2 positiven Fälle innerhalb der M4-Gruppe. Aber auch in den übrigen FAB-Gruppen waren meist mehr als 60% der untersuchten KM-Proben positiv für PRR-2. Innerhalb der M1-, M4- und M5-Gruppe war der Anteil PRR-2 positiver Zellen mit durchschnittlich 60% positiver Blasten am höchsten. In den anderen FAB-Gruppen schwankte der Anteil PRR-2 positiver Zellen zwischen 25% (M0) und 40% (M3). Abb. 4.3.2.1. zeigt den Anteil PRR-1 und PRR-2 positiver Fälle innerhalb der FAB-Typen M0 bis M5.

Tab. 4.3.2.2. Expression von Adhäsionsmolekülen innerhalb der verschiedenen FAB-Typen

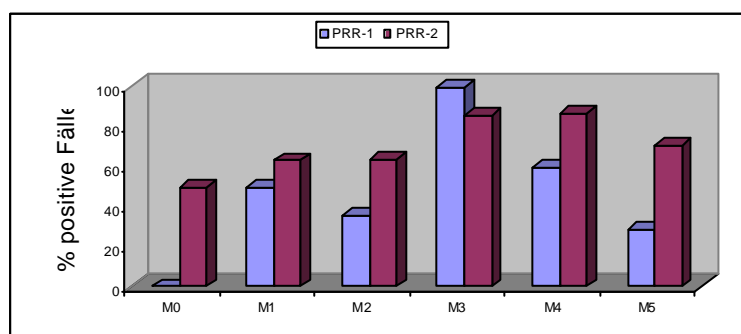
	M0			M1			M2			M3		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)
Stroma-Kontakt fördernd												
VLA-2	0/1 (0%)	0	19	5/7 (71%)	46±36	46±23	5/8 (63%)	47±42	87±61	2/4 (50%)	39±42	91±21
VLA-3	0/1 (0%)	0	10	0/6 (0%)	1±0,4	25±19	0/7 (0%)	1±0,8	20±18	0/3 (0%)	2±2	40±26
PRR-1	0/2 (0%)	5±7	18±15	4/8 (50%)	27±21	43±33	5/14 (36%)	29±34	60±65	7/7 (100%)	81±18	178± 51
PRR-2	1/2 (50%)	25±28	35±13	5/8 (63%)	60±38	41±23	9/14 (64%)	33±27	34±23	6/7 (86%)	40±18	87±45
Endothel-Kontakt fördernd												
L-Selektin	0/1 (0%)	0	10	2/7 (29%)	19±31	56±46	3/8 (38%)	33±32	87±67	1/4 (25%)	18±19	73±39
LFA-1	nd	nd		7/7 (100%)	75±21	155± 129	6/6 (100%)	75±25	347± 255	2/3 (66%)	44±47	180± 104
Mac-1	0/2 (0%)	26±6	121± 21	5/7 (71%)	29±20	84± 74	6/14 (43%)	23±21	158± 170	0/6 (0%)	8±6	90±57
UPA-R	0/2 (0%)	4±0	48±35	4/20 (20%)	16±31	124± 336	4/21 (19%)	11±9	43±31	3/10 (30%)	15±15	73±47
T-Zell/ NK-Zell-Kontakt fördernd												
ICAM-1	1/1 (100%)	24	93	4/6 (67%)	26±10	41±28	4/8 (50%)	38±40	70±58	2/3 (67%)	25±17	90±19
LFA-3	nd			7/7 (100%)	98±2	129± 88	6/6 (100%)	98±2	327± 140	3/3 (100%)	94±7	261± 256
B7-1	nd			3/6 (50%)	27±23	60±51	3/6 (50%)	29±40	82±78	3/3 (100%)	53±27	231± 170
B7-2	nd			5/7 (71%)	34±35	48±42	6/6 (100%)	54±28	109± 50	1/3 (33%)	20±27	71± 41
NCAM	0/2 (0%)	4±3	108±137	4/20 (20%)	14±27	401± 408	7/21 (33%)	18±27	269± 392	0/10 (0%)	2±2	311± 334

	M4			M5			M6			M7		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)
Stroma-Kontakt fördernd												
VLA-2	5/9 (56%)	48±44	85±77	4/6 (66%)	54±43	110±49	nd			nd		
VLA-3	0/9 (0%)	7±7	22±19	0/5 (0%)	2±0,9	34±30	nd			nd		
PRR-1	9/15 (60%)	40±34	57±44	2/7 (29%)	13±10	50±43	nd			nd		
PRR-2	13/15 (87%)	59±21	51±34	5/7 (71%)	58±37	81±45	nd			nd		
Endothel-Kontakt fördernd												
L-Selektin	4/9 (44%)	37±40	92±94	1/6 (17%)	10±14	57±39	nd			nd		
LFA-1	10/10 (100%)	75±26	391± 345	1/1 (100%)	97	364	nd			nd		
Mac-1	9/12 (75%)	41±26	395± 449	5/5 (100%)	73±26	336± 180	nd			nd		
UPA-R	16/26 (62%)	27±18	78±73	8/10 (80%)	40±30	77±50	0/1	1	6	0/1	12	37
T-Zell/ NK-Zell-Kontakt fördernd												
ICAM-1	6/9 (67%)	57±28	114± 63	3/5 (60%)	26±13	58±46	nd			nd		
LFA-3	10/10 (100%)	91±22	282± 184	1/1 (100%)	100	524	nd			nd		
B7-1	3/10 (30%)	26±32	75± 126	0/1 (0%)	3	79	nd			nd		
B7-2	7/10 (70%)	39±31	70±74	1/1 (100%)	79	256	nd			nd		
NCAM	5/26 (19%)	15±25	262± 250	10/11 (91%)	70±31	640± 400	nd			nd		

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, pos positiv, mFI mittlere Fluoreszenz-Intensität;

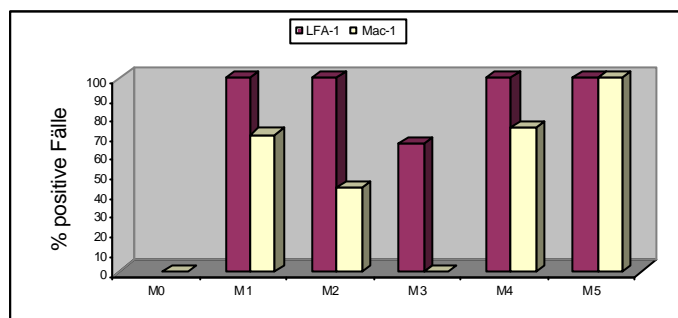
¹Eine KM-Probe wird als „positiv“ bezeichnet, wenn mehr als 20% der Zellen im Auswertefenster den entsprechenden Marker exprimieren; ²Prozentwerte in Klammern; ³Anteil der Rezeptor-exprimierenden Zellen im Auswertefenster; ⁴Maß für relative Rezeptordichte auf den Rezeptor-exprimierenden Zellen

Abb. 4.3.2.1. Expression von PRR-1 und PRR-2 innerhalb der FAB-Typen M0- M5



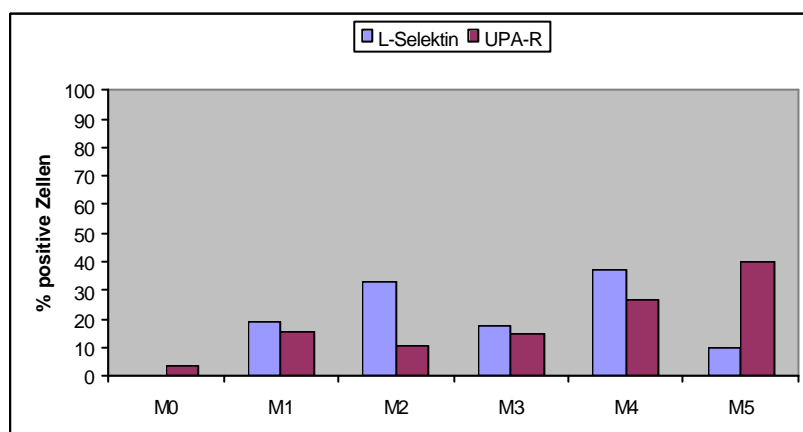
Fast alle untersuchten KM-Proben waren für das $\beta 2$ -Integrin **LFA-1** positiv. Durchschnittlich lag der Anteil LFA-1 exprimierender Blasten bei den FAB-Typen M1, M2, M4 bei 75%. Am höchsten war er mit 97% innerhalb der M5, am niedrigsten mit 44% in der M3-Gruppe. Deutlich heterogener war die Expression von **Mac-1**. Entsprechend seinem Namen zeigte die Monozyten-Leukämie M5 die höchste mittlere Mac-1-Expression. Dagegen war keiner der sechs untersuchten M3- und keiner der zwei untersuchten M0-Fälle Mac-1-positiv. Innerhalb der Leukämien, die verschiedenen Reifungsstufen der Granulopoese (M2, M3) zugeordnet werden, nahm die Mac-1-Expression mit zunehmendem Reifegrad der Leukämieform ab. Eine Übersicht über den Anteil positiver Fälle für LFA-1 und Mac-1 innerhalb der FAB-Typen M0 bis M5 gibt Abbildung 4.3.2.2.

Abb. 4.3.2.2. LFA-1 und Mac-1 positive Fälle innerhalb der FAB-Typen M0 bis M5.



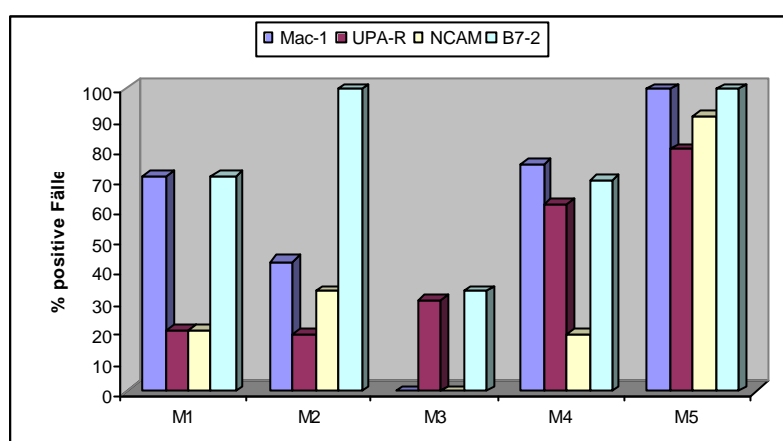
Die Expression von **L-Selektin** innerhalb der verschiedenen FAB-Typen war heterogen und insgesamt niedrig, die höchste Expression wurde beim FAB-Typ M4 beobachtet, wobei 4 von 9 untersuchten Fällen eine Inv(16)-Karyotypanomalie aufwiesen. Die niedrigste Expression wurde beim FAB-Typ M0 und M5 beobachtet. Der **UPA-R** wurde dagegen - bei ebenfalls generell eher niedriger Expression - v.a. in der Gruppe der monozytären Leukämien exprimiert. Dort waren 60% (M4) bzw. 80% (M5) der untersuchten Fälle positiv für den UPA-R, während nur 20-30% der Fälle in den FAB-Gruppen M1- M3 UPA-R-positiv waren. Die relative Rezeptordichte war dagegen am höchsten auf Blasten des FAB-Typs M2. Abbildung 4.3.2.3. zeigt den durchschnittlichen Anteil L-Selektin und UPA-R- exprimierender Blasten innerhalb der FAB-Gruppen M0-M5. Insgesamt schien sich die L-Selektin und UPA-R- Expression fast gegenläufig zu verhalten.

Abb. 4.3.2.3. L-Selektin- und UPA-R- Expression innerhalb der FAB-Gruppen M0-M5



In der Gruppe der **NK- bzw T-Zell-Kontakt fördernden Molekülen** zeigte sich, dass alle KM-Proben innerhalb der verschiedenen FAB-Typen LFA-3 in hoher Rezeptordichte exprimierten. Der Anteil **ICAM-1** positiver Fälle war mit 50-60% innerhalb der FAB-Typen M1 –M5 vergleichbar, am im Mittel meisten ICAM-1 exprimierende Blasten wurden bei den monozytären Leukämien (M5>M4) gefunden, wobei die M5 zusätzlich auch die höchste relative ICAM-1-Rezeptordichte aufwies. Die höchste NCAM-Expression wurde bei Patienten des FAB-Typs M5 beobachtet. Fast gegensätzlich schien die Expression der kostimulatorischen Moleküle **B7-1** und **B7-2** zu sein. Während B7-2 wiederum die höchste Expression in der Gruppe der M5 zeigte, konnte B7-1 dort überhaupt nicht positiv gewertet werden und zeigte die höchste Expression in der M3- (positive Fälle, Rezeptordichte) und der M2-Gruppe (positive Zellen). Es lässt sich zusammenfassen, dass die Expression von NCAM, ICAM und B7-2 v.a. in der Gruppe der M5 am höchsten war, während B7-1 v.a. in M2/ M3 exprimiert wurde und LFA-3 bei einer generell hohen Expression keinen Unterschied innerhalb der verschiedenen FAB-Typen zeigte. Zusammenfassend zeigte sich innerhalb der monozytären Leukämien (M5>M4) insgesamt eine deutlich höhere Expression kostimulatorischer Moleküle und Adhäsionsmoleküle als bei den übrigen Subtypen der AML (siehe Abbildung 4.3.2.4.).

Abb. 4.3.2.4. Expression von Mac-1, UPA-R, NCAM und B7-2 innerhalb der FAB-Typen M1-M5.



4.4. Antigenexpression in zytogenetischen Risikogruppen

4.4.1. Zytokinrezeptoren

Die Expression von Zytokinrezeptoren wurde bei 18 Patienten mit prognostisch günstigem, 51 Patienten mit prognostisch intermediärem und 20 Patienten mit prognostisch schlechtem Karyotyp untersucht. Der Altersmedian lag mit 37 Jahren in der guten Prognosegruppe deutlich unterhalb dem der intermediären und schlechten Prognosegruppe (Altersmedian: 62 bzw. 57 Jahre). Die prognostisch günstige Gruppe setzte sich zu 27% aus M2-, zu 50% aus M3- und zu 23% aus M4-Patienten zusammen. Der Anteil von monozytären Leukämien lag in der schlechten Prognosegruppe bei über 50%. Die intermediäre Risikogruppe war heterogen zusammengesetzt, am meisten waren Patienten mit dem FAB-Typ M2 und M4 vertreten.

Tab. 4.4.1.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs in den zytogenetischen Risikogruppen

	Gute Prognose (n=18)	Intermediäre Prognose (n=51)	Schlechte Prognose (n=20)
Alter [y] (Median/ Schwankungsbereich)	37 (20-73)	62 (19-84)	57 (18-70)
morph-Blasten (m±s) [%]	71±20	72±20	65±19
iz-Blasten (m±s) [%]	85±9	83±14	75±19
FAB-Typen			
M0 [n]	0	2	0
M1 [n]	0	16	1
M2 [n]	5	10	6
M3 [n]	9	0	1
M4 [n]	4	15	6
M5 [n]	0	5	5
M6 [n]	0	1	0
M7 [n]	0	0	1
pAML [n]	17	41	16
sAML [n]	1	10	4
Remissionrate ³ (Ansprecher/alle) [n/n] ²	12/17 (70%)	29/45 (64%)	8/19 (42%)
Beobachtungszeit ⁴ (m±s)[d]	239 ± 136	162 ± 139	153 ± 107
Rezidivrate (Rezidive/ Ansprecher) [n/n] ²	3/12 (25%)	11/29 (38%)	5/8 (63%)
Progressfreie Überlebenszeit ⁵ (m±s)[d]	201 ± 53	177 ± 76	176 ± 96
Todesrate (Verstorbene/alle) [n/n] ²	3/17 (18%)	25/45 (56%)	10/19 (53%)
Überlebenszeit ⁶ (m±s)[d]	15 ± 7	84 ± 98	87 ± 85

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, n Anzahl, y Jahr, d Tag, morph morphologisch bestimmt; iz immunzytologisch bestimmt; FAB French-American-British, pAML primäre AML, sAML sekundäre AML

¹Einteilung entsprechend Tabelle 3.5.1.; ²Prozentwerte in Klammern; ³nur Patienten analysiert, die therapiert wurden und von denen der klinische Verlauf erfasst werden konnte; ⁴reichte von Diagnosestellung bis KMT, Rezidiv, Versterben oder letztem Kontakt, falls Patient in CR; ⁵nur Patienten analysiert, die eine Remission erreichten und rezidiert sind; ⁶nur Patienten analysiert, die verstorben sind;

In der guten Prognosegruppe erreichten 70% der Patienten nach Induktionstherapie eine Remission. 18% der Patienten verstarben nach durchschnittlich 15 Tagen v.a. an den für die Promyelozytenleukämie typischen Blutungskomplikationen. Nur 25% der Patienten erlitten nach ca. 6,5 Monaten ein Rezidiv. In der schlechten Prognosegruppe lag die Ansprechrate auf die Induktionstherapie nur bei 53%. 52% der Patienten verstarben nach durchschnittlich drei Monaten. Fünf Patienten rezidierten nach durchschnittlich 6 Monaten. In der intermediären Risikogruppe lag die Ansprechrate auf die Therapie bei 59%, die Rezidivrate bei 38% und 51% der Patienten sind nach durchschnittlich 3 Monaten verstorben (siehe Tab. 4.4.1.1)

Die Ergebnisse der untersuchten Zytokinrezeptorexpressionen innerhalb der verschiedenen zyto-genetischen Risikogruppen sind in Tabelle 3.2.3.1.2. dargestellt.

Tab 4.4.1.2. Zytokinrezeptorexpression in verschiedenen zyto-genetischen Risikogruppen

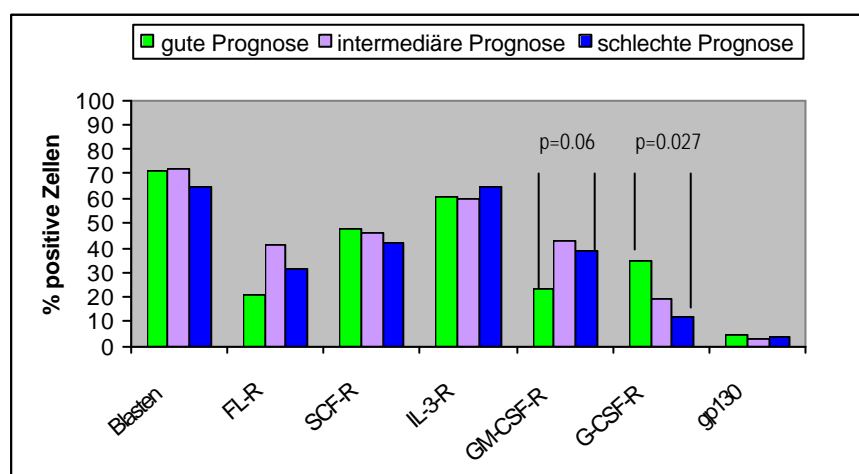
	Gute Prognose			Intermediäre Prognose			Schlechte Prognose		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)
FL-R	10/18 (56%)	21±15	46±35	31/51 (61%)	41±33	50±38	10/20 (50%)	31±30	44±31
SCF-R	13/15 (87%)	48±24	144±69	18/25 (72%)	46±32	79±58	5/8 (63%)	42±37	86±61
IL-3-R	9/9 (100%)	61±22	125±59	18/22 (36%)	60±31	106±82	5/5 (100%)	65±21	178±167
GM-CSF-R	9/18 (50%)	23±18	83±59	34/51 (67%)	43±32	108±93	13/20 (65%)	39±31	69±47
G-CSF-R	6/10 (60%)	25±26	92±117	7/22 (32%)	19±23	28±24	2/5 (40%)	12±9	24±28
gp130-Subunit	0/9 (0%)	5±4	41±43	0/22 (0%)	3±3	24±22	0/5 (0%)	4±7	18±28

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, pos positiv, mFI mittlere Fluoreszenz-Intensität;

¹Eine KM-Probe wird als „positiv“ bezeichnet, wenn mehr als 20% der Zellen im Auswertefenster den entsprechenden Marker exprimieren; ²Prozentwerte in Klammern; ³Anteil der Rezeptor-exprimierenden Zellen im Auswertefenster; ⁴Maß für relative Rezeptordichte auf den Rezeptor-exprimierenden Zellen

Vergleicht man den Anteil positiver Zellen für die entsprechenden Zytokinrezeptoren, so erkennt man in der günstigen Risikogruppe einen signifikant ($p=0.027$, T-Test) höheren Anteil G-CSF-R exprimierender Blasten als in der schlechten Risikogruppe. Umgekehrt waren in der günstigen Risikogruppe weniger Zellen für den GM-CSF-R positiv als in der schlechten Risikogruppe. Der Unterschied war mit einem $p=0.06$ (T-Test) gerade nicht mehr signifikant. Bei den anderen Zytokinrezeptoren liesen sich - wie in Abb. 4.4.1.1. dargestellt - keine signifikanten Unterschiede innerhalb der verschiedenen zyto-genetischen Risikogruppen feststellen.

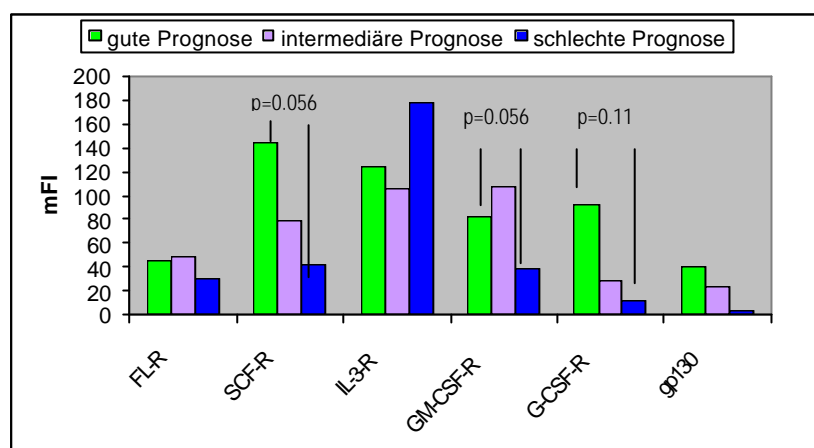
Abb 4.4.1.1. Zytokinrezeptorexpression in zyto-genetischen Risikogruppen



Vergleicht man die relative Rezeptordichte innerhalb der zyto-genetischen Risikogruppen, so fällt auf, dass in der prognostisch günstigen Risikogruppe die relative Rezeptordichte des SCF-R deutlich höher war als in der schlechten Risikogruppe. Der Unterschied war mit einem p-Wert von 0.056 (T-Test) fast signifikant. Der Unterschied in der G-CSF-R -Rezeptordichte zeigte eine deutlich höhere Dichte der Rezeptoren in der günstigen Risikogruppe als in der schlechten Risikogruppe. Der Unterschied war jedoch mit $p=0.11$ (T-Test) nicht

signifikant. (siehe Abb. 4.4.1.2) Bei den übrigen Zytokinrezeptoren konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Rezeptorexpression gefunden werden.

Abb. 4.4.1.2. Relative Rezeptordichte von Zytokinrezeptoren in zytogenetischen Risikogruppen



4.4.2. Adhäsionsmoleküle

Die Expression von Adhäsionsmolekülen wurden bei 20 Patienten mit prognostisch günstigen, 59 Patienten mit prognostisch intermediärem und 26 Patienten mit prognostisch schlechtem Karyotyp untersucht. Tabelle 4.4.2.1 zeigt die Zusammensetzung der untersuchten AML-Patienten. Trotz der etwas höheren Fallzahlen unterscheiden sich die klinischen Daten nur unwesentlich von denen des Patientenkollektivs, das auf die Expression von Zytokinrezeptoren hin untersucht wurde, so dass auf eine detaillierte Beschreibung verzichtet wurde.

Tab. 4.4.2.1. Patientencharakteristik innerhalb der verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen

	Gute Prognose (n = 20)	Intermediäre Prognose (n = 58) ⁷	Schlechte Prognose (n = 25) ⁷
Alter [y] (Median/Schwankungsbereich)	36 (20-73)	61 (19-84)	56 (18-72)
morph-Blasten (m±s) [%]	68±22	73±18	68±19
iz-Blasten (m±s) [%]	86±8	86±10	78±18
FAB-Typen			
M0 [n]	0	2	0
M1 [n]	0	19	3
M2 [n]	5	12	7
M3 [n]	9	0	1
M4 [n]	6	17	6
M5 [n]	0	6	6
pAML	19	48	19
sAML	1	10	6
Remissionrate ³ (Ansprecher/alle) [n/n] ²	15/18 (83%)	32/55 (58%)	13/25 (52%)
Beobachtungszeit ⁴ (m±s) [d]	251±134	171±158	148±111
Rezidivrate (Rezidive/ Ansprecher) [n/n] ²	4/15 (27%)	13/32 (41%)	8/13 (62%)
Progressfreie Überlebenszeit ⁵ (m±s) [d]	230±72	186±74	180±107
Todesrate (Verstorbene/alle) [n/n] ²	4/18 (22%)	31/55 (56%)	12/25 (48%)
Überlebenszeit ⁶ (m±s) [d]	90±151	90±98	121±126

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, n Anzahl, y Jahr, d Tag, morph morphologisch bestimmt; iz immunzytologisch bestimmt; FAB French-American-British, pAML primäre AML, sAML sekundäre AML

¹Einteilung entsprechend Tabelle 3.5.1.; ²Prozentwerte in Klammern; ³nur Patienten analysiert, die therapiert wurden und von denen der klinische Verlauf erfasst werden konnte; ⁴reichte von Diagnosestellung bis KMT, Rezidiv, Versterben oder letztem Kontakt, falls Patient in CR; ⁵nur Patienten analysiert, die eine Remission erreichten und rezidiert sind; ⁶nur Patienten analysiert, die verstorben sind; ⁷zwei Patienten waren nicht FAB-klassifiziert;

Die durchschnittliche Expression der einzelnen Adhäsionsmoleküle innerhalb den verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen sind in Tabelle 4.4.2.2. dargestellt.

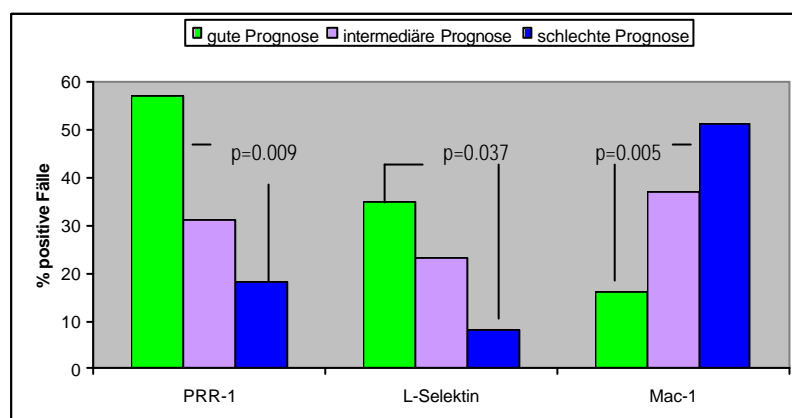
In der guten Prognosegruppe fanden sich signifikant mehr PRR-1 ($p=0.009$, Qui²-Test) und L-Selektin ($p=0.037$, Qui²-Test) positive Fälle als in der schlechten Prognosegruppe. Umgekehrt fanden sich in der guten Prognosegruppe signifikant weniger Mac-1 ($p=0.005$, Qui²-Test) positive Fälle als in der schlechten Prognosegruppe (siehe Abbildung 4.4.2.1.) Ebenso verhielt es sich mit dem Anteil positiver Zellen innerhalb der verschiedenen zytopenetischen Risikogruppen. Dabei exprimierten in der guten Prognosegruppe signifikant mehr Zellen PRR-1 ($p=0.001$, T-Test) und deutlich mehr L-Selektin ($p=0.077$, T-Test), ebenso exprimieren signifikant weniger Zellen Mac-1 ($p=0.015$, T-Test) als in der schlechten Prognosegruppe. Ansonsten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede aus dem Vergleich dieser beiden Gruppen.

Tab. 4.4.2.2. Expression von Adhäsionsmolekülen in zytopenetischen Risikogruppen.

	Gute Prognose			Intermediäre Prognose			Schlechte Prognose		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)
Stroma-Kontakt fördernd									
VLA-2	5/9 (55%)	43±44	81±49	13/22 (59%)	44±40	76±63	3/5 (60%)	45±42	88±49
VLA-3	0/7 (0%)	3±2	31±22	0/21 (0%)	2±4	27±21	0/4 (0%)	6±6	11±5
PRR-1	11/15 (73%)	57±37	115±77	14/28 (50%)	31±30	55±51	3/12 (25%)	18±21	42±39
PRR-2	12/16 (75%)	35±18	61±41	21/28 (75%)	32±34	51±36	9/11 (32%)	46±32	44±32
Endothel Kontakt fördernd									
L-Selektin	5/9 (55%)	35±33	100±70	9/22 (41%)	23±32	68±65	0/5 (0%)	8±8	39±39
LFA-1	4/5 (80%)	68±37	211±143	14/15 (93%)	77±24	327±303	8/9 (89%)	63±33	248±240
Mac-1	4/15 (27%)	16±11	151±131	18/25 (72%)	37±26	256±338	7/8 (88%)	51±31	226±231
UPA-R	6/19 (32%)	15±13	56±45	21/53 (40%)	24±27	95±211	6/21 (29%)	15±15	49±38
T-Zell/ NK-Zell –Kontakt fördernd									
ICAM-1	7/8 (88%)	61±35	79±36	13/21 (62%)	29±17	68±53	4/4 (100%)	55±24	116±81
LFA-3	5/5 (100%)	96±6	140±78	15/15 (100%)	93±18	272±193	9/9 (100%)	98±2	293±155
B7-1	3/5 (60%)	28±27	83±96	7/14 (50%)	34±34	91±110	3/9 (33%)	25±27	110±133
B7-2	3/5 (60%)	37±27	56±38	11/15 (73%)	42±32	85±69	5/9 (56%)	33±34	89±82
NCAM	7/8 (88%)	61±35	79±36	13/21 (62%)	24±18	68±53	4/4 (100%)	55±24	116±81

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, pos positiv, mFI mittlere Fluoreszenz-Intensität; ¹Eine KM-Probe wird als „positiv“ bezeichnet, wenn mehr als 20% der Zellen im Auswertefenster den entsprechenden Marker exprimieren; ²Prozentwerte in Klammern; ³Anteil der Rezeptor-exprimierenden Zellen im Auswertefenster; ⁴Maß für relative Rezeptordichte auf den Rezeptor-exprimierenden Zellen

Abb. 4.4.2.1. Expression von PRR-1, L-Selektin- und Mac-1 in den zytopenetischen Risikogruppen



4.5. Antigenexpression und Remissionswahrscheinlichkeit

In den folgenden Abschnitten wurde die Expression der Oberflächenmoleküle mit dem Ansprechen bzw Nicht-Ansprechen auf Induktionstherapie verglichen. Mit dieser retrospektiven Auswertung sollten Zusammenhänge zwischen der Expression von Oberflächenmarkern bei Diagnosestellung und einer Wahrscheinlichkeit für das spätere Erreichen einer Remission herausgearbeitet werden. Um den Einfluss verschiedener Therapieformen auszuschließen, gingen nur Patienten in die Auswertung ein, die eine Doppelinduktionstherapie nach dem AML-CG-Protokoll erhalten hatten.

4.5.1. Zytokinrezeptoren

37 AML-Patienten erreichten nach Induktionstherapie eine Remission (=Therapieansprecher), während bei 16 Patienten die Leukämie trotz Induktionstherapie persistierte (=Therapieversager). Diese beiden Gruppen wurden bezüglich ihrer Zytokinrezeptorexpression bei Diagnosestellung verglichen. Der Altersmedian lag bei den Therapieansprechern mit 46 Jahren deutlich unterhalb dem der Therapieversager (Altersmedian: 57 Jahre). Die Patienten, bei denen die Therapie ansprach, wiesen überwiegend den FAB-Typ M4 (35%), M2 (21%) und M3 (16%) auf. Kein Patient in dieser Gruppe war dagegen an einer AML-M5 erkrankt und nur bei zwei Patienten (5%) bestand eine sekundäre AML. Die Therapieversager-Gruppe setzte sich dagegen überwiegend aus dem FAB-Typ M2 und M4 (jeweils 25%) zusammen. Nur ein Patient war an einer AML-M3 erkrankt und bei 31% dieser Patienten bestand eine sekundäre AML. Entsprechend dem günstigeren Verlauf von Patienten, die eine Remission erreichten, wiesen 27% der Patienten einen prognostisch günstigen Karyotyp und nur 27% einen prognostisch schlechten Karyotyp auf. In der Gruppe der Therapieversager dagegen wiesen 43% einen prognostisch schlechten und nur 6% der Patienten einen prognostisch günstigen Karyotyp auf. 81% der Therapieversager verstarben nach durchschnittlich 1,5 Monaten, während 26% in der Therapieansprecher-Gruppe nach durchschnittlich 8,5 Monaten verstarben (siehe Tabelle 4.5.1.1.)

Tab. 4.5.1.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs von Therapieansprechern und Therapieversagern

	Therapieansprecher (n=37) ⁷	Therapieversager (n=16)
Alter (Median/Schwankungsbereich) [y]	46 (19-77)	57 (18-80)
morph.-Blasten (m±s) [%]	70±23	67±21
iz-Blasten (m±s) [%]	82±15	84±13
FAB-Typen		
M0 [n]	2	
M1 [n]	5	2
M2 [n]	8	5
M3 [n]	6	1
M4 [n]	13	3
M5 [n]	0	4
M6 [n]	1	0
M7 [n]	0	1
pAML [n]	35	11
sAML [n]	2	5
Zytogenetische Risikogruppen ¹		
Günstig [n]	10	1
Intermediär [n]	21	8
Schlecht [n]	6	7
Beobachtungszeit ⁴ (m±s)[d]	255 ± 103	64 ± 72
Rezidivrate (Rezidive/ Ansprecher) [n/n] ²	9/37 (24%)	
Progressfreie Überlebenszeit ⁴ (m±s)[d]	204 ± 89	
Todesrate (Verstorbene/alle) [n/n] ²	9/37 (24%)	13/16 (81%)
Überlebenszeit ⁴ (m±s)[d]	255 ± 103	44 ± 51

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, n Anzahl, y Jahr, d Tag, morph morphologisch bestimmt; iz immunzytologisch bestimmt; FAB French-American-British, pAML primäre AML, sAML sekundäre AML

¹Einteilung entsprechend Tabelle 3.5.1.; ²Prozentwerte in Klammern; ³nur Patienten analysiert, die therapiert wurden und von denen der klinische Verlauf erfasst werden konnte; ⁴reichte von Diagnosestellung bis KMT, Rezidiv, Versterben oder letztem Kontakt, falls Patient in CR; ⁵nur Patienten analysiert, die eine Remission erreichten und rezidiert sind; ⁶nur Patienten analysiert, die verstorben sind; ⁷zwei Patienten waren nicht FAB-klassifiziert;

Die durchschnittliche Expression von Zytokinrezeptoren bei Therapieansprechern und Therapieversagern ist in Tabelle 4.5.1.2. dargestellt. Da nicht bei allen Patienten alle Zytokinrezeptoren untersucht worden sind, ist die Fallzahl zum Teil in der Gruppe der Non-Responder sehr klein (v.a. bei G-CSF-R und IL-3-R). Insgesamt konnten **keine signifikanten Unterschiede** zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden. Daher können lediglich Tendenzen angegeben werden: Die Expression von G-CSF-R war bei den Therapieansprechern höher und die

von GM-CSF-R niedriger als bei den Therapieansprechern. Unterschiede in der Rezeptordichte für den SCF-R waren nur minimal. So entsprachen die Tendenzen zwar denjenigen Ergebnissen, die aus dem Vergleich der zytogenetischen Risikogruppen hervorgegangen sind, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Tab.4.5.1.2. Zytokinrezeptorexpression bei Therapieansprechern und Therapieversagern

	Therapieansprecher			Therapieversager		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)
FL-R	25/37 (68%)	32±26	43±30	10/16 (36%)	44±33	45±21
SCF-R	18/22 (82%)	51±32	108±74	7/8 (88%)	49±22	106±69
IL-3-R	15/16 (94%)	59±22	123±106	5/5 (100%)	78±22	101±57
GM-CSF-R	22/37 (60%)	34±30	81±54	13/16 (81%)	49±31	98±82
G-CSF-R	9/17 (53%)	25±27	53±97	2/5 (40%)	21±23	34±29
gp130-Subunit	1/16 (0%)	5±5	20±21	0/5 (0%)	4±4	35±34

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, pos positiv, mFI mittlere Fluoreszenz-Intensität;

¹Eine KM-Probe wird als „positiv“ bezeichnet, wenn mehr als 20% der Zellen im Auswertefenster den entsprechenden Marker exprimieren; ²Prozentwerte in Klammern; ³Anteil der Rezeptor-exprimierenden Zellen im Auswertefenster; ⁴Maß für relative Rezeptordichte auf den Rezeptor-exprimierenden Zellen

4.5.2. Adhäsionsmoleküle

Die Expression von Adhäsionsmolekülen bei Diagnosestellung wurden bei 43 Patienten untersucht, die nach einer Induktionstherapie eine Remission erreichten, und 18 Patienten, bei denen die Leukämie trotz Induktionstherapie persistierte.

Tab. 4.5.2.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs von Therapieansprechern und Therapieversagern

	Therapieansprecher (n=43) ⁷	Therapieversager (n=18) ⁷
Alter (Median/Schwankungsbereich) [y]	54 (19-79)	56 (18-80)
morph-Blasten (m±s) [%]	68±12	72±14
iz-Blasten (m±s) [%]	84±16	81±13
FAB-Typen		
M0 [n]	2	0
M1 [n]	9	4
M2 [n]	9	4
M3 [n]	6	1
M4 [n]	15	3
M5 [n]	1	5
pAML [n]	40	14
sAML [n]	3	4
Zytogenetische Risikogruppen ¹		
Günstig [n]	11	1
Intermediär [n]	24	11
Schlecht [n]	8	6
Beobachtungszeit ⁶ (m±s)[d]	263±108	56±69
Rezidivrate (Rezidive/ Ansprechere) [n/n] ²	10/43 (23%)	
Progressfreie Überlebenszeit ⁶ (m±s)[d]	218±97	
Todesrate (Verstorbene/alle) [n/n] ²	15/43 (35%)	15/18 (83%)
Überlebenszeit ⁶ (m±s)[d]	214±92	42±49

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, n Anzahl, y Jahr, d Tag, morph morphologisch bestimmt; iz immunzytologisch bestimmt; FAB French-American-British, pAML primäre AML, sAML sekundäre AML

¹Einteilung entsprechend Tabelle 3.5.1.; ²Prozentwerte in Klammern; ³nur Patienten analysiert, die therapiert wurden und von denen der klinische Verlauf erfasst werden konnte; ⁴reichte von Diagnosestellung bis KMT, Rezidiv, Versterben oder letztem Kontakt, falls Patient in CR; ⁵nur Patienten analysiert, die eine Remission erreichten und rezidiert sind; ⁶nur Patienten analysiert, die verstorben sind; ⁷ein Patient war nicht FAB-klassifiziert;

Die Therapieansprecher setzten sich überwiegend aus Patienten des FAB-Typs M4 (35%), M1 (21%), M2 (21%) und M3 (14%) zusammen. Nur ein Patient mit dem FAB-Typ M5 erreichte eine Remission. Umgekehrt setzten sich die Therapieversager zum Großteil aus Patienten des FAB-Typs M5 (28%), M1(22%), M2 (22%) und M4 (16%) zusammen. Nur ein Patient war in dieser Gruppe an einer AML-M3 erkrankt. Der Anteil sekundärer AML-

Erkrankungen war mit 22% deutlich höher als in der Therapieansprecher-Gruppe (7%). Entsprechend dem günstigeren klinischen Verlauf von Patienten, die eine Remission erreichten, wiesen 27% der Patienten einen prognostisch günstigen Karyotyp und nur 27% einen prognostisch schlechten Karyotyp auf. In der Gruppe der Therapieversager dagegen wiesen 43% einen prognostisch schlechten und nur 6% der Patienten einen prognostisch günstigen Karyotyp auf. Der Anteil zytogenetisch günstiger Karyotypen war in der Therapieansprecher-Gruppe mit 26% deutlich höher als in der Therapieversager-Gruppe (5,5%) und umgekehrt war der Anteil prognostisch ungünstiger Karyotypen in der Therapieversager-Gruppe mit 33% deutlich höher als in der Therapieansprecher-Gruppe (18%). 88% der Therapieversager verstarben nach durchschnittlich 1,4 Monaten, während nur 23% der Therapieansprecher nach 7,2 Monaten verstarben (siehe Tabelle 4.5.2.1.)

Tab. 4.5.2.2. zeigt die durchschnittliche Expression von Adhäsionsmolekülen innerhalb der Therapieansprecher- und Therapieversager-Gruppe.

Tab. 4.5.2.2. Expression von Adhäsionsmolekülen bei Therapieansprechern und Therapieversagern nach Doppelinduktionstherapie (AML-CG-Protokoll)

	Therapieansprecher			Therapieversager		
	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)	Pos. ¹ Fälle/ alle [n/n] ²	Anteil pos. Zellen ³ (m±s) [%]	mFI ⁴ (m±s)
Stroma-Kontakt fördernd						
VLA-2	9/16 (56%)	40±39	83±68	5/5 (100%)	72±24	61±38
VLA-3	0/15 (0%)	3±4	22±19	0/5 (0%)	2±1	30±24
PRR-1	14/25 (56%)	41±36	70±59	7/10 (70%)	40±31	70±69
PRR-2	19/25 (76%)	40±27	50±32	9/10 (90%)	62±32	62±43
Endothel-Kontakt-fördernd						
L-Selektin	5/16 (31%)	28±36	78±80	2/5 (40%)	17±13	44±24
LFA-1	13/15 (87%)	65±33	266±206	4/4 (100%)	68±32	237±369
Mac-1	13/22 (59%)	28±22	195±195	5/8 (63%)	44±29	179±165
UPA-R	10/38 (26%)	14±15	52±34	9/17 (53%)	31±28	149±362
T-Zell-/ NK-Zell-Kontakt fördernd						
ICAM-1	10/15 (67%)	33±24	87±51	3/5 (60%)	26±12	71±54
LFA-3	15/15 (100%)	92±18	259±175	4/4 (100%)	100±3	150±122
B7-1	5/15 (33%)	21±25	96±114	1/3 (33%)	19±13	91±73
B7-2	7/15 (47%)	28±25	85±66	2/4 (50%)	45±49	47±57
NCAM	4/38 (11%)	11±21	279±291	6/17 (35%)	27±35	320±277

m±s Mittelwert ± Standardabweichung, pos positiv, mFI mittlere Fluoreszenz-Intensität;

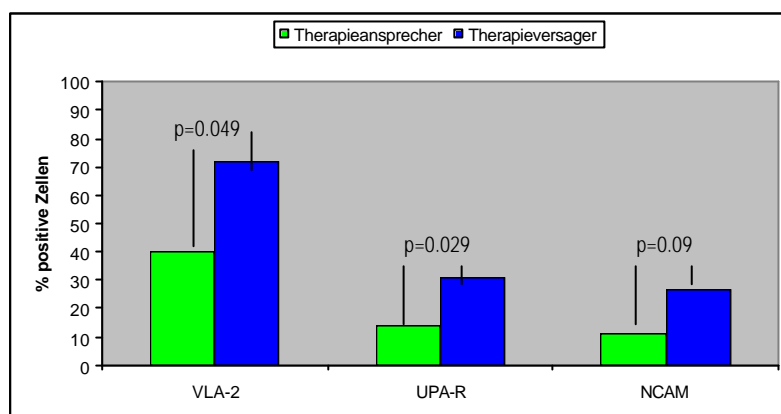
¹Eine KM-Probe wird als „positiv“ bezeichnet, wenn mehr als 20% der Zellen im Auswertefenster den entsprechenden Marker exprimieren; ²Prozentwerte in Klammern; ³Anteil der Rezeptor-exprimierenden Zellen im Auswertefenster; ⁴Maß für relative Rezeptordichte auf den Rezeptor-exprimierenden Zellen

Signifikante Unterschiede zeigten sich in der Expression von NCAM, UPA-R und VLA-2: KM-Proben, die NCAM positiv waren, waren signifikant häufiger in der Therapieversager-Gruppe vertreten ($p=0.028$, Qui²-Test), während bei den Therapieansprechern nur 4 von 38 untersuchten KM-Proben NCAM-positiv waren. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Anteil NCAM-exprimierender Blasten zu allen untersuchten Blasten war dagegen mit einem p-Wert von 0.09 (T-Test) gerade nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied ($p=0.029$, T-Test) zeigte sich auch in der Anzahl UPA-R-tragender Zellen, die bei den Therapieversagern deutlich höher war. Der Unterschied bezüglich UPA-R positiver Fälle war mit $p=0.055$ (Qui²-Test) gerade nicht mehr signifikant. In der Expression von VLA-2 zeigten sich bei den Therapieansprechern signifikant weniger VLA-2 exprimierende Blasten als in der Therapieversager-Gruppe ($p=0.049$, T-Test). Der Unterschied in der Anzahl positiver Fälle war mit einem p-Wert von 0.07 (Qui²-Test) gerade nicht mehr signifikant. Obwohl beim Vergleich der zytogenetischen Risikogruppen eine hohe Expression von CD62L, PRR-1 und eine niedrige Expression von CD11b mit einer

zytogenetisch bestimmten guten Prognose korrelierte, waren die erwarteten Unterschiede im Therapieansprechen bei diesen Markern nicht signifikant.

Abbildung 4.5.2.1. zeigt den durchschnittlichen Anteil VLA-2, UPA-R und NCAM exprimierender Blasten bei Patienten, die auf die Therapie ansprachen im Vergleich zu Patienten, die trotz Induktionstherapie keine Remission erreichten.

Abb. 4.5.2.1. Expression von VLA-2, UPA-R, NCAM bei Therapieansprechern und Therapieversagern



4.6. Antigenexpression und progressfreie Überlebenswahrscheinlichkeit

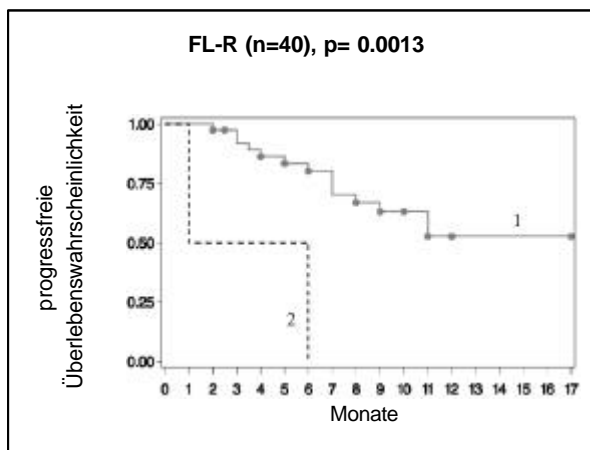
In diesem Kapitel wurde die Expression von Oberflächenmolekülen auf AML-Blasten bei Diagnosestellung mit der Dauer der jeweiligen progressfreien Überlebenszeit verglichen. Für jedes Oberflächenmolekül wurde ein Cut-off-Wert über den Anteil positiver Blasten im Auswertefenster ermittelt, bei dem der Unterschied (Log-rank-Test) aus dem Vergleich der progressfreien Überlebenszeiten in den jeweils entstandenen Gruppen am signifikantesten war. Kaplan-Meier-Kurven wurden für das progressfreie Überleben von Patienten erstellt, deren Anteil positiver Blasten in den KM-Proben größer oder kleiner-gleich dem ermittelten Cut-off-Wert war. Es wurden nur Patienten eingeschlossen, die eine Remission erreicht hatten und weiterhin nach dem AML-CG-Protokoll behandelt worden waren.

4.6.1. Zytokinrezeptoren

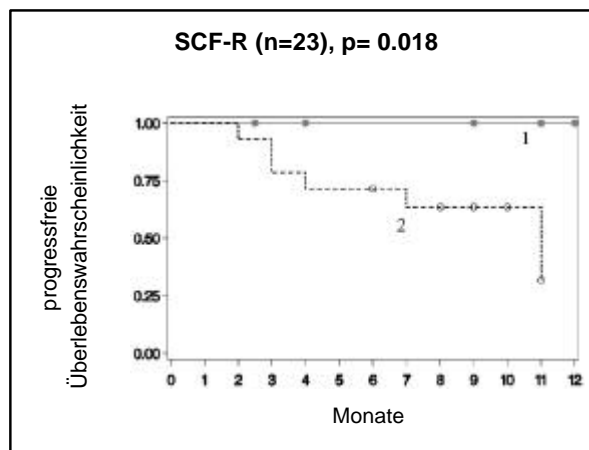
Insgesamt gingen 42 Patienten, die eine Remission erreichten, in die Cut-off-Analysen ein. Da nicht bei allen Patienten jeder Zytokinrezeptor untersucht wurde, variierten die Fallzahlen innerhalb der jeweiligen Gruppen. In Tabelle 4.6.1.1. werden die ermittelten Cut-off-Werte, und die über log-rank-Test ermittelten p-Werte dargestellt. Den Fällen, die ein längeres progressfreies Überleben aufwiesen und deren Anteil positiver Zellen über- oder unterhalb der ermittelten Cut-off-Werten lag, wurde eine günstige Prognose zugeordnet. Entsprechend wurde den Fällen, die eine kürzere progressfreie Überlebenszeit zeigten, eine schlechte Prognose zugeordnet. Abbildung 4.6.1.1. zeigt die zu dieser Tabelle gehörenden Kaplan-Meier-Kurven.

Der statistisch signifikanteste Unterschied ($p=0.001$, Log-Rank-Test) in der progressfreien Überlebenswahrscheinlichkeit zeigte sich in der FL-R-Expression. Beide Patientinnen (FAB-Typ M1 und M4, beide prognostisch intermediären Karyotyps, flt3-Duplikation 1x nachgewiesen, 1x nicht untersucht), deren Anteil FL-R positiver Zellen $>85,5\%$ war, rezidierten nach durchschnittlich 2,7 Monaten. In der Gruppe der Patienten ($n=38$), deren Anteil FL-R-positiver Zellen $=85,5\%$ war, rezidierten nur 24 (36%) Patienten nach durchschnittlich 6,1 Monaten. Die beiden Patientinnen mit mehr als 85% FL-R positiven Blasten waren mit 71,5 Jahren deutlich älter als die übrigen Patienten (Altersmedian: 50 Jahren) (siehe Tabelle 4.6.1.2.)

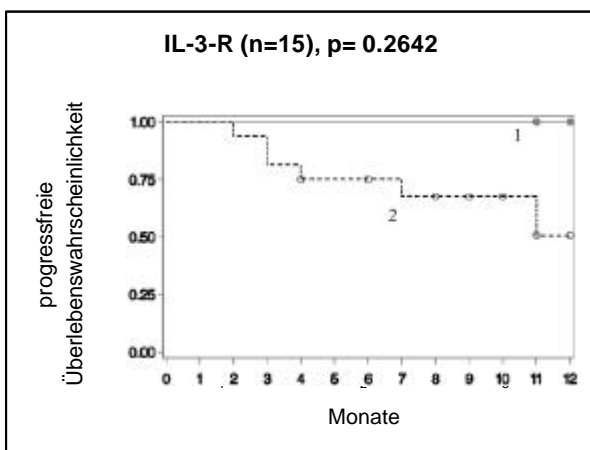
Abbildung 4.6.1.1. Kaplan-Meier-Kurven für progresssfreie Überlebenswahrscheinlichkeiten von AML-Patienten mit mehr bzw. weniger Zellen positiv für den entsprechenden Zytokinrezeptor



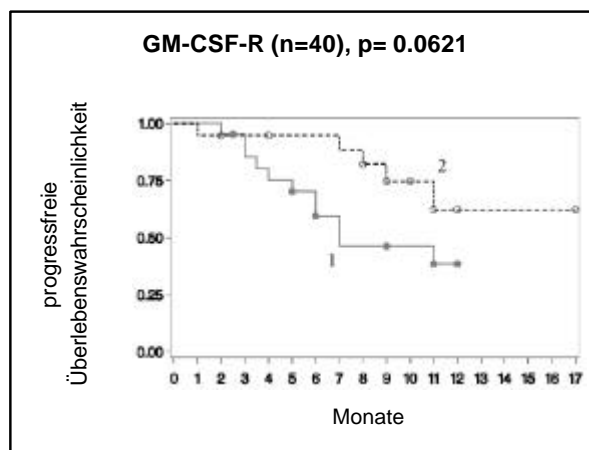
1=Fälle mit $\leq 85,5\%$ FL-R (n=38)
2=Fälle mit $> 85,5\%$ FL-R (n=2)



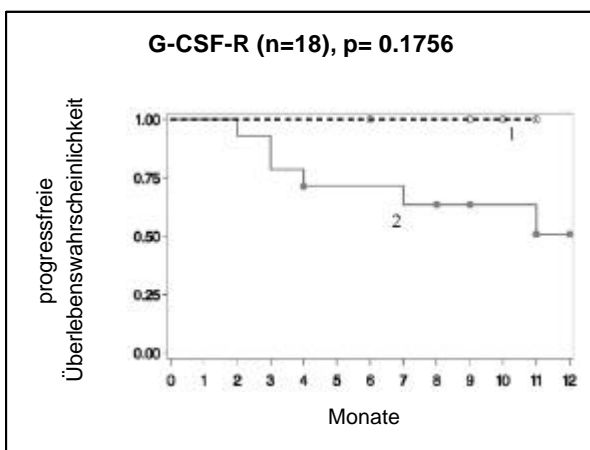
1=Fälle mit $\leq 45,5\%$ SCF-R (n=9)
2=Fälle mit $> 45,5\%$ SCF-R (n=2)



1=Fälle mit $\leq 32,5\%$ IL-3-R (n=2)
2=Fälle mit $> 32,5\%$ IL-3-R (n=16)



1=Fälle mit $\leq 33\%$ GM-CSF-R (n=21)
2=Fälle mit $> 33\%$ GM-CSF-R (n=19)



1=Fälle mit $> 52\%$ G-CSF-R (n=4)
2=Fälle mit $\leq 52\%$ G-CSF-R (n=14)

Tab. 4.6.1.1. Unterschiede in der progressfreien Überlebenszeit anhand retrospektiv ermittelter Cut-off-Werte

Zytokinrezeptoren	Gute Prognose (=längere progressfreie Überlebenszeit)	Schlechte Prognose (= kürzere progressfreie Überlebenszeit)	p-Wert
FL-R	= 85,5% (n=38)	>85,5% (n=2)	0.001
SCF-R	= 45,5% (n=14)	>45,5% (n=9)	0.02
IL-3-R	= 32,5% (n=2)	>32,5% (n=16)	0.26
GM-CSF-R	>33% (n=19)	= 33% (n=21)	0.06
G-CSF-R	>52% (n=4)	= 52% (n=14)	0.18

Alle AML-Fälle (n=9), deren Anteil SCF-R positiver Zellen kleiner als 45,5% war, befanden sich nach einer durchschnittlichen Beobachtungszeit von 9,2 Monaten noch in Remission, während bereits 6 von 14 (42%) Patienten, deren Anteil SCF-R positiver Zellen größer als 45,5% ist, nach durchschnittlich 5,3 Monaten rezidierten. Auch dieser Unterschied war mit einem p-Wert von 0.018 (Log-Rank-Test) statistisch signifikant. Vergleicht man das Patientenkollektiv dieser beiden Gruppen, so zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen im Anteil prognostisch guter (33% vs. 28%) bzw. schlechter Karyotypen (11% vs. 15%), wobei in beiden Gruppen die prognostisch intermediären Karyotypen überwogen. Auch die FAB-Typ Verteilung war in beiden Gruppen in etwa vergleichbar (siehe. Tab. 4.6.1.1 und Tab. 4.6.1.2.)

Tab.4.6.1.2. Zusammensetzung der Patientenkollektive in den Gruppen > oder = der Cut-off-Werte von FL-R und SCF-R.

	FL-R >85,5%	FL-R = 85,5%	SCF-R >45,5%	SCF-R = 45,5%
Prognose*	ungünstig	günstig	ungünstig	günstig
Alter (Median/Spannweite) [y]	66(55-77)	48,5(19-79)	47(19-77)	54(22-76)
Fallzahl (n)	2	39	14	9
FAB M0/M1 (n/n)	0/1	2/8	0/4	2/0
FAB M2/M3 (n/n)	0/0	12/4	5/2	3/0
FAB M4/M5 (n/n)	1/0	13/0	3/0	4/0
Iz-Blasten (m±s) [%]	87±4	83±13	87±10	86±9
Günstig/intermediär/ schlecht**	0/2/0 (0/100/0%)	9/23/7 (22/59/18%)	4/8/2 (28/57/14%)	3/4/1 (33/57/11%)
Rezidivrate (Rez/ alle)	100% (2/2)	39% (15/38)	42% (6/14)	0% (0/8)
Remissionsdauer (m±s) [d]	112±91	173±86	154±94	>276

m±s = Mittelwert und Standardabweichung, d= Tage, y= Jahre; Rez = Rezidierte Patienten, *bezgl progressfreies Überleben. **zytogenetische Risikogruppen)

Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich dagegen in der IL-3-R-Expression. Tendenziell zeigten auch hier Patienten mit einer höheren Expression als 32,5% kürzere progressfreie Überlebenszeiten.

Bei den `reiferen` Zytokinrezeptoren (GM-CSF-R und G-CSF-R) verhielt es sich in Bezug auf die progressfreie Überlebensdauer im Vergleich zu den v.a. auf unreifen Zellen exprimierten Zytokinrezeptoren (FL-R/ SCF-R/ IL-3-R) genau umgekehrt: Diejenigen Patienten, deren Anteil GM-CSF-R-positiver Blasten größer 33% war, zeigten eine längere progressfreie Überlebenszeit als Patienten, deren Anteil kleiner oder gleich 33% war. Im untersuchten Patientenkollektiv befand sich jedoch kein Patient mit einer AML-M5, bei der die höchste GM-CSF-R-Expression beobachtet wurde. Insgesamt befanden sich in der Gruppe mit >33% GM-CSF-R positiven Zellen ein deutlich höherer Anteil der monozytären AML-M4 (47%), während in der Gruppe mit <33% GM-CSF-R positiven Zellen nur zwei Fälle (9,5%) eine AML-M4 präsentierten. In der >30% GM-CSF-R exprimierenden, günstigeren Gruppe rezidierten 31% der Patienten nach durchschnittlich 6,5 Monaten, während in der GM-CSF-R niedrig exprimierenden, ungünstigeren Gruppe 52% der Patienten nach durchschnittlich 5,1 Monaten rezidierten (Daten nicht dargestellt). Die Unterschiede waren allerdings mit einem p-Wert von 0.06 (Log-rank-Test) gerade nicht signifikant.

Wesentlich geringer war der Unterschied (p=0.18, Log-Rank-Test) in der Expression des G-CSF-R, wobei tendentiell diejenigen Patienten, deren Anteil G-CSF-R-positiver Blasten größer als 52% war, eine längeres progressfreies Intervall aufwiesen. Auffallend war, dass die Patienten, die >52% G-CSF-R positive Blasten aufwiesen, mit einem Altersmedian von 36 Jahren deutlich jünger als die Patienten mit <52% G-CSF-R positiven Blasten (Altersmedian 58Jahre) waren. Alle Patienten mit mehr als 52% G-CSF-R exprimierenden Blasten lebten nach durchschnittlich 8,2 Monaten noch in Vollremission, während 50% der Patienten, deren Anteil G-CSF-R

positiver Zellen kleiner oder gleich 52% war, nach durchschnittlich 5,2 Monaten progredierten (Daten nicht dargestellt).

Zusammenfassend läßt sich für die Wahrscheinlichkeit progressfreien Überlebens bei Patienten des FAB-Typs M0 bis M4 feststellen: Lassen sich bei Patienten bei Diagnosestellung im Knochenmark auf mehr als 45,5% der Blasten der SCF-R oder auf mehr als 85,5% der FL-R nachweisen, so haben diese Patienten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit, nach dem Erreichen einer Remission zu rezidivieren. Tendentiell scheint eine niedrige Expression „reiferer“ Zytokinrezeptoren (GM-CSF-R, G-CSF-R) ebenfalls mit einer schlechteren Prognose für progressfreie Überlebenszeit einherzugehen.

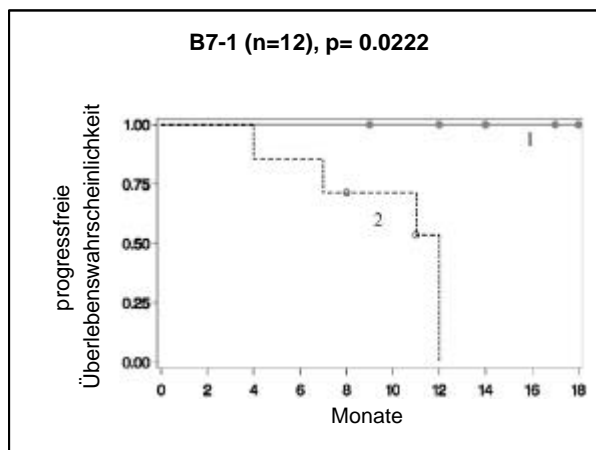
4.6.2. Adhäsionsmoleküle

Insgesamt gingen 38 Patienten, die eine Remission erreichten, in die Cut-off-Analysen ein. Da nicht bei allen Patienten jedes Adhäsionsmolekül untersucht worden ist, variierten die Fallzahlen bei den jeweiligen Adhäsionsmolekülen. In Tabelle 4.6.2.1 werden die ermittelten Cut-off-Werte und die dazugehörigen p-Werte (Log-Rank-Test), die aus dem Vergleich der progressfreien Überlebenszeiten resultierten, dargestellt. Die Fälle, die ein längeres progressfreies Überleben zeigten und deren Anteil positiver Zellen über- oder unterhalb den ermittelten Cut.off-Werten lagen, wurden einer günstigen Prognose zugeordnet. Entsprechend wurden den Fällen, die ein kürzere progressfreie Überlebenszeit zeigten, eine schlechte Prognose zugeordnet. Abbildung 4.6.2.1. zeigt die zu dieser Tabelle gehörenden Kaplan-Meier-Kurven.

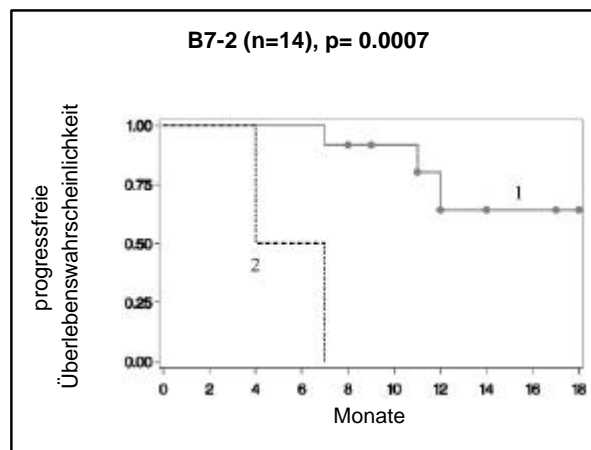
Tab. 4.6.2.1. Unterschiede in der progressfreien Überlebenszeit anhand retrospektiv ermittelter Cut-off-Werte der Adhäsionsmoleküle

	Gute Prognose (=längere progressfreie Überlebenszeit)	Schlechte Prognose (= kürzere progressfreie Überlebenszeit)	p-Wert
Stroma-Kontakt fördernd			
VLA-2	> 63,5% (n= 5)	= 63,5% (n= 11)	0.37
VLA-3	> 2,5% (n= 3)	= 2,5 % (n = 10)	0.07
PRR-1	= 5% (n = 5)	> 5% (n = 19)	0.06
PRR-2	= 93% (n= 24)	> 93% (n= 1)	0.08
Endothel-Kontakt fördernd			
L-Selektin	> 30% (n= 12)	= 30% (n= 6)	0.43
LFA-1	= 71,5% (n= 8)	> 71,5% (n= 6)	0.30
Mac-1	> 9% (n = 17)	= 9% (n = 6)	0.19
UPA-R	> 26,5% (n=9)	= 26,5% (n= 31)	0.05
T-Zell/ NK-Zell-Kontakt fördernd			
ICAM-1	= 60,5% (n= 11)	> 60,5% (n= 4)	0.007
LFA-3	> 98% (n= 10)	= 98% (n= 4)	0.33
B7-1	= 15% (n= 5)	> 15% (n= 7)	0.02
B7-2	= 65% (n= 12)	> 65% (n= 2)	0.0007
NCAM	= 8% (n= 32)	> 8% (n= 9)	0.03

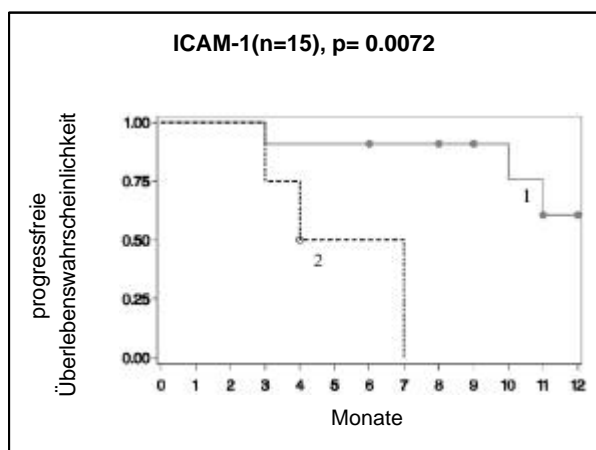
Abbildung 4.6.2.1. Kaplan-Meier-Kurven für progressfreie Überlebenswahrscheinlichkeiten von AML-Patienten mit mehr bzw. weniger Zellen positiv für das entsprechende Adhäsionsmolekül.



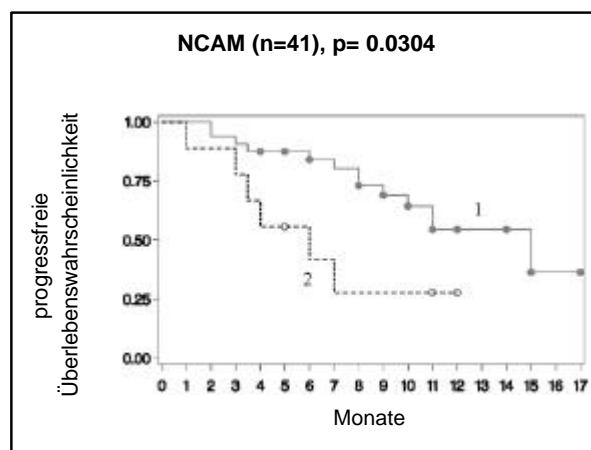
1=Fälle mit = 15% B7-1 (n=5)
2=Fälle mit > 15% B7-1 (n=7)



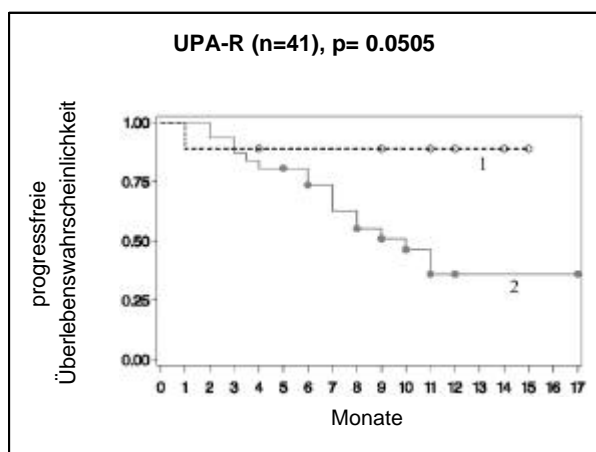
1=Fälle mit = 65% B7-2 (n=12)
2=Fälle mit > 65% B7-2 (n=2)



1=Fälle mit = 60,5% ICAM-1 (n=11)
2=Fälle mit > 60,5% ICAM-1 (n=4)



1=Fälle mit = 8% NCAM (n=32)
2=Fälle mit > 8% NCAM (n=9)



1=Fälle mit > 26,5% UPA-R (n=31)
2=Fälle mit = 26,5% UPA-R (n=9)

Der statistisch signifikanteste Unterschied wurde bei der Expression des kostimulatorischen Moleküls B7-2 mit einem p-Wert von 0.0007 nachgewiesen. Dabei hatten Patienten, die mehr als 65% B7-2 positive Blasten präsentierten, eine 75%ige Wahrscheinlichkeit nach ca. vier Monaten nicht zu rezidivieren, während Patienten, die =65% B7-2 positive Blasten aufwiesen, eine 75%ige Wahrscheinlichkeit hatten, nach ca. elf Monaten noch in Remission zu sein. Die beiden Patienten mit mehr als 65% B7-2-positiven Blasten waren mit einem Altersmedian von 68 Jahren deutlich älter als die Patienten, die eine höhere Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben hatten und deren Altersmedian bei 47 Jahren lag. Auch Unterschiede in der Expression von B7-1 hatte signifikanten Einfluss auf die progressfreie Überlebenswahrscheinlichkeit. So rezidierten vier von sieben Patienten, die mehr als 15% B7-1-positiv Blasten aufweisen, nach durchschnittlich 6,7 Monaten, während bei den fünf Patienten, die weniger als 15% B7-1-positiv Blasten aufwiesen, nur zwei Patienten bei einer Beobachtungsdauer von insgesamt 18 Monaten ein Rezidiv erlitten.

Tab. 4.6.2.2. Zusammensetzung des Patientenkollektivs in den Gruppen > oder = der Cut-off-Werte von B7-2 und B7-1.

Patientencharakteristik	B7-1 > 15%	B7-1 = 15%	B7-2 >65%	B7-2 = 65%
Prognose ¹	ungünstig	günstig	ungünstig	günstig
Alter (Median/ Schwankungsbereich) [y]	47(19-68)	52(37-59)	59(45-73)	49,5(19-68)
Fallzahl (n)	7 ²	7	2	12 ²
FAB M0/M1 (n/n)	0/1	0/2	0/0	0/3
FAB M2/M3 (n/n)	1/2	2/0	1/0	2/2
FAB M4/M5 (n/n)	2/0	3/0	1/0	4/0
iz-Blasten (m±s) [%]	87±9	89±11	70±0	91±8
morph.-Blasten (m±s) [%]	73±21	61±26	48	69±23
Günstig/intermediär/schlecht ³ (n/n/n) ⁴	2/2/3 (28,5/28,5/43%)	2/5/0 (28,5/71,5/0%)	1/1/0	3/6/3
Rezidivrate (Rez/ alle)(n/n) ⁴	4/7 (57%)	2/7 (28%)	2/2 (100%)	3/12 (25%)
Zeit bis Rezidiv ⁵ (Median/ Schwankungsbereich) [d]	292 (140-355)	226 (202-250)	203 (140-266)	319 (203-355)
Beobachtungszeit ⁶ (Median/ Schwankungsbereich) [d]	290 (140-355)	335 (202-523)	203 (140-266)	316 (202-523)

m±s= Mittelwert und Standardabweichung, d= Tage, y= Jahre; Rez = Rezidierte Patienten; n= Anzahl; iz= immunzytologisch bestimmt; morph.= morphologisch bestimmt; ¹ bezgl progressfreiem Überleben; ²Ein Patient war nicht FAB-klassifiziert; ³zytogenetische Risikogruppen; ⁴ Prozentwerte in Klammern; nur Patienten; ⁵nur Patienten analysiert, die rezidiert sind; ⁶endet mit KMT, Rezidiv, Versterben oder letztem Kontakt zum Patienten, wenn in CR.

Ebenso wurde bei Patienten mit >60,5% ICAM-1-positiven Blasten eine 75%ige Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben innerhalb von 3 Monaten nach Diagnosestellung beobachtet, während Patienten mit =60,5% ICAM-1 positiven Blasten eine 75%ige Wahrscheinlichkeit hatten, innerhalb von 10 Monaten nicht zu progredieren (p=0.007). Patienten mit >60,5% ICAM-1exprimierender Blasten waren mit einem Altersmedian von 66 Jahren deutlich älter als die Patienten mit =60,5% Blasten (Altersmedian: 57,5 Jahre). Diese Gruppe setzte sich zu 81% aus Fällen mit intermediären Karyotypen zusammen.

Patienten, die >8% NCAM-positiv Blasten aufwiesen, zeigten eine signifikant niedrigere progressfreie Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten, die bei Diagnosestellung =8% NCAM positive Blasten aufwiesen. Patienten mit >8% NCAM-positiven Blasten hatten eine Wahrscheinlichkeit von 50%, schon nach 6 Monaten zu rezidivieren, während Patienten mit =8% NCAM-positiver Blasten mit einer 50%igen Wahrscheinlichkeit erst nach 12 Monaten rezidierten.

Auch die Expression des UPA-R zeigte Einfluss auf die progressfreien Überlebenszeiten. Obwohl die Patienten, die keine Remission erreichten, eine deutlich höhere UPA-R –Expression aufwiesen, korrelierte eine Expression von >26,5% UPA-R-positiver Blasten mit einer längeren progressfreien Überlebenszeit. 66% der Patienten mit >8% NCAM-positiver Blasten rezidierten nach im Mittel 4,6 Monaten. Dagegen rezidierten nur 44% der Patienten mit =8% NCAM-positiver Blasten erst nach im Mittel 6,2 Monaten.

Tab. 4.6.2.3. Patientencharakteristik in den Gruppen > oder = der Cut-off-Werte von ICAM-1 und NCAM

Patientencharakteristik	ICAM-1 >60,5%	ICAM-1 = 60,5%	NCAM > 8%	NCAM = 8%
Prognose ¹	ungünstig	günstig	ungünstig	günstig
Alter (Median/ Schwankungsbereich) [y]	67 (39-73)	56 (19-77)	55 (19-79)	48,5 (19-77)
Fallzahl (n)	4	11	9	32
FAB M0/M1 (n/n)	0/0	1/3	0/1	2/7
FAB M2/M3 (n/n)	2/0	3/1	4/0	5/6
FAB M4/M5 (n/n)	2/0	3/0	4/0	10/0
iz-Blasten (m±s) [%]	82±9	87±10	79±11	85±12
morph.-Blasten (m±s) [%]	35	67±23	60±19	70±23
Günstig/intermediär/schlecht ³ (n/n/n) ⁴	2/0/2 (50/0/50%)	1/9/1 (10/80/10%)	2/6/1 (22/67/11%)	8/18/6 (25/56/19%)
Rezidivrate (Rez/ alle)(n/n) ⁴	3/ 4 (75%)	2/11 (18%)	6/9 (66%)	13/32 (41%)
Zeit bis Rezidiv ⁵ (Median/ Schwankungsbereich) [d]	140 (109-230)	191 (76-306)	140 (47-177)	186 (66-319)
Beobachtungszeit ⁶ (Median/ Schwankungsbereich) [d]	159 (109-230)	271 (76-324)	163,5 (47-335)	265 (66-700)

m±s= Mittelwert und Standardabweichung, d= Tage, y= Jahre; Rez = Rezidierte Patienten; n= Anzahl; iz= immunzytologisch bestimmt; morph.= morphologisch bestimmt; ¹bezgl progressfreien Überlebens; ²Ein Patient nicht FAB-klassifiziert; ³zytogenetische Risikogruppen; ⁴ Prozentwerte in Klammern; nur Patienten; ⁵nur Patienten analysiert, die rezidiert sind ; ⁶endet mit KMT, Rezidiv, Versterben oder letztem Kontakt zum Patienten, wenn in CR.

Tab. 4.6.2.4. Patientencharakteristik in den Gruppen > oder = 26% UPA-R-exprimierender Blasten

Patientencharakteristik	UPA-R > 26,5%	UPA-R = 26,5%
Prognose ¹	günstig	ungünstig
Alter (Median/ Schwankungsbereich) [y]	54 (21-59)	57(19-77)
Fallzahl (n)	9	31
FAB M0/M1 (n/n)	0/0	2/10
FAB M2/M3 (n/n)	1/2	10/4
FAB M4/M5 (n/n)	6/0	5/0
iz-Blasten (m±s) [%]	86±8	83±13
morph.-Blasten (m±s) [%]	69±11	69±24
Günstig/intermediär/schlecht ³ (n/n/n) ⁴	5/3/1 (55/33/12%)	7/18/6 (23/58/19%)
Rezidivrate (Rez/ alle)(n/n) ⁴	2/9 (22%)	16/31 (52%)
Zeit bis Rezidiv ⁵ (Median/ Schwankungsbereich) [d]	76 (47-105)	174 (66-319)
Beobachtungszeit ⁶ (Median/ Schwankungsbereich) [d]	316 (47-700)	243 (66-496)

m±s= Mittelwert und Standardabweichung, d= Tage, y= Jahre; Rez = Rezidierte Patienten; n= Anzahl; iz= immunzytologisch bestimmt; morph.= morphologisch bestimmt; ¹bezgl progressfreien Überlebens; ²Ein Patient nicht FAB-klassifiziert; ³zytogenetische Risikogruppen; ⁴ Prozentwerte in Klammern; nur Patienten; ⁵nur Patienten analysiert, die rezidiert sind ; ⁶endet mit KMT, Rezidiv, Versterben oder letztem Kontakt zum Patienten, wenn in CR.

Auch für die übrigen Marker konnten Cut-off-Werte für den Anteil Marker-positiver Blasten ermittelt werden, bei denen aus dem Vergleich der entstandenen Gruppen ein deutlicher Unterschied in der Dauer der progressfreien Überlebenszeit hervorging. Diese Unterschiede waren allerdings aufgrund der geringen Fallzahl nicht signifikant, so dass sich eine eindeutige prognostische Aussagen nicht treffen ließ (siehe Tab. 4.6.2.1). Patienten mit sehr hohem Anteil PRR-2- und mit bereits geringem Anteil PRR-1-positiven Blasten tendierten zu einer eher kürzeren progressfreien Überlebenszeit. Umgekehrt wies eine niedrige Expression von Endothel-Kontakt fördernden Adhäsionsmolekülen, wie z.B. L-Selektin, Mac-1 und UPA-R auf eine schlechte Prognose hinsichtlich der Dauer des progressfreien Überlebens hin.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Eine hohe Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, B7-1, B7-2, NCAM), die den Kontakt zu T- und/ oder NK-Zellen herstellen, korrelierte mit einer kürzeren progressfreien Überlebenszeit. Als einziger Vertreter der Endothel/ Stroma-Kontakt -Adhäsionsmolekülen korrelierte eine hohe Expression von UPA-R mit einer signifikant höheren progressfreien Überlebenswahrscheinlichkeit.

5. Diskussion

5.1. Systematische Unterschiede zwischen AML-KM-Proben und gesunden KM-Proben

Proliferation, Maturation und Migration von hämopoetischen Vorläuferzellen, sowie die Elimination dieser Zellen durch das Immunsystem werden sowohl durch Zytokine und deren Zytokinrezeptoren, als auch über Adhäsionsmoleküle und deren Bindungspartner reguliert. Da diese Regulationssysteme bei der AML grundlegend gestört sind, wurde die Expression von Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen innerhalb der Blastenpopulation im Vergleich zur Expression im gesunden Knochenmark durchflusszytometrisch bestimmt.

Zytokinrezeptoren werden in AML-KM-Proben häufiger exprimiert als in gesunden KM-Proben.

Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen werden über Zytokine und Zytokinrezeptoren gesteuert. In Abhängigkeit vom Reifegrad der hämopoetischen Vorstufen spielen unterschiedliche Zytokin-/Zytokinrezeptor-Paare eine Rolle. Schon auf Stammzell-Ebene gewinnen der FL und der FL-R an Bedeutung. Auch bei der AML konnte in vielen bisher vorausgegangenen Arbeiten (Birg F, 1992; Carow CE, 1996) mittels Northern- oder Western-Blot die mRNA des **FL-R bei der AML** in mehr als 90% der Fälle und damit im Vergleich zur Expression auf gesunden KM-Zellen in wesentlich höherem Maße nachgewiesen werden. Die bisher durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern, die spezifisch an Epitope des FL-R binden, stimmen mit dem Nachweis von mRNA weitgehendst überein (Meierhoff G, 1995). Auch in diesen Studien (Mc Kenna HJ, 1996; Stacchini A, 1996; Rosnet O, 1996) waren 61% bis 90% der AML-Fälle positiv für den FL-R. In der hier vorgelegten Arbeit waren 62% der AML-KM-Proben positiv. Bei den gesunden Probanden konnte dagegen keine der acht untersuchten KM-Proben als FL-R-positiv gewertet werden. Bei der im Vergleich zu anderen durchflusszytometrisch durchgeführten Studien bisher höchsten Fallzahl von insgesamt 89 Patienten stimmte unser Ergebnis mit den bereits publizierten Angaben in der Literatur (zusammengefasst von Drexler HG, 1996) gut überein.

Noch häufiger als der FL-R stand die Expression des **SCF-R** bei der AML im Mittelpunkt wissenschaftlicher Studien. In der größten Übersichtsarbeit der EGIL-Gruppe (Bene MC, 1998), die die Ergebnisse der SCF-R Expression von 1.103 AML-Fälle in Europa zusammenfasste, waren 67% der untersuchten Fälle SCF-R-positiv. Der SCF-R wurde als typisch myeloischer Marker in die Routinediagnostik mitaufgenommen. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten AML-KM-Proben (n=48) waren in 75% der Fälle für den SCF-R positiv und dieses Ergebnis steht damit weitgehend im Einklang mit den bereits veröffentlichten Daten. Die Ergebnisse des in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörpers (moAk) des Klons 95C3 (Fa. Beckman-Coulter) waren mit den Ergebnissen des in den meisten anderen Studien verwendeten moAks YB5B8 (Fa. Beckman-Coulter) vergleichbar (Bene MC, 1998). Der SCF-R wird normalerweise auf weniger als 5% der Progenitorzellen des normalen Knochenmarks gefunden (Ashman LK, 1991). In den in dieser Arbeit untersuchten acht gesunden KM-Proben exprimierten durchschnittlich 11% der Zellen den SCF-R, doch in der untersuchten Population befanden sich nicht nur Progenitorzellen, sondern auch Lymphozyten und Monozyten.

Die meisten Zellen (durchschnittlich 89%) in den in dieser Arbeit untersuchten KM-Proben exprimierten den **IL-3-R**. Dagegen exprimierten nur durchschnittlich 9% der untersuchten Zellen in den gesunden KM-Proben den IL-3-R. Diese häufige Expression in AML-KM-Proben wurde bereits in anderen Arbeiten gezeigt (Budel LM, 1989; Koubek K, 1998; Jordan CT, 2000; DeWaele M, 2001; Munoz L, 2001). Da er in noch höherem Maße (>90%) auf CD34⁺ leukämischen Zellen, auf gesunden CD34⁺-Zellen jedoch kaum exprimiert wird, stellt der IL-3-R einen spezifischen Marker für leukämische Stammzellen dar (Jordan, CT, 2000).

Obwohl GM-CSF in der Klinik mittlerweile routinemäßig zur Verkürzung der Neutropeniephase eingesetzt wird, wurde die Expression seines Rezeptors auf AML-Blasten bislang nur von wenigen Arbeitsgruppen untersucht (Budel LM, 1989; Park LS, 1989; Koubek K, 1998; Lanza F, 1997), wobei die Untersuchungen von Lanza F et al. (1997) an 72 AML-Patienten am umfassendsten waren. Lanza F et al. zeigten, dass abhängig von dem verwendeten moAk-Klon (M5D12, 4B5F5, HGM-CSFR) 33%, 78% und 90% der Zellen positiv für den **GM-CSF-R** waren. Die hier vorgestellten Ergebnisse mit dem moAK des Klons SC06 (Fa. Beckman-Coulter) waren daher mit obigen Ergebnissen schwer unmittelbar zu vergleichen, obwohl das Ergebnis von 63% GM-CSF-R positiver Fälle in dieser Arbeit durchaus mit den Ergebnissen des 4B5F5-Klons korrespondierte. Auch innerhalb des gesunden KM konnten GM-CSF-R positive Fälle nachgewiesen werden. Die GM-CSF-R exprimierenden Zellen in den

gesunden KM-Proben können den myeloiden und monozytären Progenitorzellen zugeordnet werden (Wognum AW, 1996; Lanza F, 1997).

Deutlich häufiger wurde die Expression des **G-CSF-R** auf AML-Blasten untersucht. Zum Nachweis wurde meist radioaktiv markierter G-CSF verwendet und quantitativ ausgewertet (Budell LM; 1989, Park LS; 1989, Piao YF; 1990, Motoji T; 1991). Alle Arbeiten stellten einheitlich hoch affine Rezeptoren in unterschiedlicher Expressionsdichte auf den einzelnen Blasten fest. Der durchflusszytometrische Nachweis des G-CSF-R mittels mAk wurde dagegen erst in den letzten Jahren intensiviert (Shimoda K, 1992; Shinjo K, 1997; Katayama N, 1998; Koubek K, 1998; De Waele M, 2001), doch da auch hier unterschiedliche Markierungsmethoden verwendet wurden (direkt und indirekt Fluorochrom-markierte Antikörper, markierter G-CSF) bzw. unterschiedliche Subpopulationen ausgewertet wurden (CD34⁺Blasten, gesamte Blastenpopulation) ist ein unmittelbarer Vergleich zwischen den verschiedenen Studien nicht möglich. In den meisten Arbeiten konnte G-CSF-R auf AML-Blasten nachgewiesen werden, während die Höhe bzw. die Häufigkeit der Expression stark variierte. Da der G-CSF-R auf lymphozytären Zellen nie exprimiert wird, gilt er als typisch myeloischer Marker. In der hier vorgelegten Arbeit konnten 41% der untersuchten AML-Fälle als positiv für den G-CSF-R gewertet werden, während keine der untersuchten Populationen im gesunden KM positiv für G-CSF-R war. Die durchschnittliche Häufigkeit G-CSF-R exprimierender Zellen lag bei 25% innerhalb der Blastenpopulation, bei 10% in der gesunden Zellpopulation, die Monozyten, Lymphozyten und Progenitorzellen umfasste.

Als letztes Oberflächenmolekül in der Reihe der Zytokinrezeptoren wurde schließlich die **gp130-Subunit** untersucht, die die gemeinsame signaltransduzierende Untereinheit von v.a. synergistisch wirksamen Zytokinrezeptoren für IL-6, IL-11, LIF, CNTF, OSM und CCT-1 darstellt. In vorausgegangenen Arbeiten konnte die gp130-Subunit durchflusszytometrisch auf AML-Blasten aller FAB-Typen nachgewiesen werden (Koubek K, 1998; Kimura T, 1999). Auch Inoue K (1994) konnte mittels der noch sensibleren quantitativen RT-PCR-Methode das Gen für die gp130-Subunit in allen AML-Blasten feststellen. In der hier vorgelegten Arbeit konnte die gp130-Subunit jedoch mittels des verwendeten PE-markierten mAk des Zellklons AM64 in keiner der 36 untersuchten KM-Proben als positiv gewertet werden. Durchschnittlich exprimierten nur 4% der Blasten im Auswertefenster die gp130-Subunit. Schon bei den Untersuchungen von Koubek K (1999) fiel auf, dass bei unterschiedlich verwendeten Antikörpern stark intraindividuell variierende Ergebnisse zu messen waren. Dies legt die Vermutung nahe, dass die von uns verwendete Methode und auch der verwendete Antikörper zu wenig sensitiv bzw. spezifisch für die Detektion der gp130-Subunit war. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die gp130-Subunit durchaus - wenn auch in geringer Expressionsdichte - auf AML-Blasten exprimiert wird. Innerhalb der gesunden Kontrollgruppe war immerhin eine von vier untersuchten KM-Proben positiv für die gp130-Subunit. Aufgrund des methodisch bedingten nur geringen Nachweises der gp130-Subunit auf AML-Blasten wurden keine weiteren Auswertungen und Interpretationen mehr für diesen Marker vorgenommen.

Zusammenfassend zeigte sich aus dem Vergleich der Zytokinrezeptorexpression mit gesunden KM-Zellen, dass grundsätzlich der Anteil Zytokinrezeptor-exprimierender Zellen im Blasten-Auswertefenster deutlich höher als innerhalb der entsprechenden gesunden Population war. All diese Ergebnisse ließen sich - soweit ein unmittelbarer Vergleich möglich war - gut in die bereits bestehende Literatur einordnen. Einzige Ausnahme bildete die gp130-Subunit, die in dieser Arbeit aufgrund methodischer Probleme auf AML-Blasten nur kaum nachgewiesen werden konnte.

Von den **Adhäsionsmolekülen** wurden Mitglieder der Selektine, Integrine und Immunglobulin-Superfamilie untersucht: .

Niedrige L-Selektin Expression auf AML-Blasten

Aus der Gruppe der Selektine wurde das **L-Selektin** untersucht. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits eine L-Selektin-Expression auf AML-Blasten nachgewiesen (Kortlepel K, 1992; Reuss-Borst MA, 1995; Liesveldt JL, 1997; De Waele M, 1999), wobei eine niedrigere Expressionshäufigkeit von L-Selektin auf CD34⁺ AML-Blasten im Vergleich zu gesunden CD34⁺ myeloiden Progenitorzellen beobachtet wurde (DeWaele M, 1999). In dieser Arbeit waren alle vier (=100%) der untersuchten gesunden KM-Proben L-Selektin positiv, während nur 39% der AML-Proben L-Selektin positiv waren. Die Ergebnisse unserer Arbeiten stimmen damit - soweit aufgrund der unterschiedlich untersuchten Blastenpopulationen vergleichbar - mit den in obigen Arbeiten publizierten Daten, überein.

Die Expression von Integrinen im leukämischen und gesunden KM ist vergleichbar

Von den **B1-Integrinen** war bekannt, dass sich die Expression von VLA-4 und VLA-5 im KM von AML-Patienten und gesunden Probanden nicht wesentlich unterschied (Liesveldt JL, 1997; De Waele M, 1999), so dass in dieser

Arbeit die Expression der bislang weniger oft untersuchten VLA-2- und VLA-3-Integrine analysiert wurde. Mittels indirekter Durchflusszytometrie konnten Reuss-Borst MA et al. (1995) bei akuten Leukämien (AML und ALL) eine mäßig hohe VLA-2- und VLA-3-Expression auf CD34⁺Leukämiezellen und keine Expression dieser β 1-Integrine auf gesunden CD34⁺Zellen feststellen. De Waele M et al. (1999) untersuchten dagegen gezielt CD34⁺ **AML**-Blasten und gesunde myeloide CD34⁺Zellen durchflusszytometrisch mit der Streptavidin-Biotin-Methode. Sie konnten auf den meisten gesunden myeloiden Progenitorzellen eine Expression von VLA-2 und VLA-3 nachweisen, während sie bei den zehn untersuchten AML-Fällen eine deutlich geringere Expression auf den Blasten feststellten. Vila L et al. (1995) untersuchten die VLA-2 Expression mittels indirekter Durchflusszytometrie bei insgesamt 60 AML-Patienten, wobei nur 20% der KM-Proben für VLA-2 positiv waren und eine gesunde Kontrollgruppe nicht mitgeführt wurde. Aufgrund der stark variierenden Untersuchungsergebnisse, die auf methodische Unterschiede, verschieden zusammengesetzten Patientenkollektiven bzw. verschieden ausgewerteten Blastenpopulationen zurückzuführen sind, lassen sich obige Ergebnisse nur schwer unmittelbar mit den hier vorgestellten Ergebnissen vergleichen: VLA-2 konnte in allen gesunden KM-Proben und in 64% der AML-Fälle positiv gewertet werden. Damit lagen unsere Ergebnisse deutlich höher als in den vorausgegangenen Untersuchungen, wobei dort allerdings nur die CD34⁺Population mit zudem noch anderen Methoden untersucht wurde. VLA-3-positive Fälle konnten dagegen weder in AML-KM-Proben noch in gesunden KM-Proben festgestellt werden. Da ein Nachweis von VLA-3 jedoch sowohl in der Arbeit von DeWaele M (1999), als auch in der Arbeit von Reuss-Borst MA (1995) - wenn auch nur auf einer geringen Teil der Zellen - möglich war, kann das zum einen an den in diesen Arbeiten unterschiedlich gesetzten Auswertefenster liegen oder aber der in dieser Arbeit verwendete FITC-markierten Antikörper war zu wenig sensitiv für das VLA-3-Molekül bzw. eine Kopplung des Antikörpers an das stärker fluoreszierende Fluorochrom PE einen Nachweis hätte einen Nachweis möglich machen können. Weitere Auswertungen und Interpretationen der VLA-3 Expression in dieser Arbeit schienen uns daher nicht sinnvoll zu sein.

Von der Familie der **B2-Integrine** wurde die Expression von LFA-1 und Mac-1 untersucht. 27 von 29 untersuchten AML-Proben, wie auch die KM-Proben aller gesunder Probanden waren LFA-1 positiv. LFA-1 wurde auf der Mehrzahl der Blasten exprimiert (durchschnittlich 77% vs. 53%). Dagegen waren nur 60% der AML-Proben für Mac-1 und mit 38% deutlich weniger gesunde KM-Proben für Mac-1 positiv. Ähnliche Ergebnisse konnte auch Reuss-Borst MA (1995), DeWaele M (1999) innerhalb der CD34⁺ Blastenpopulation und Brouwer RE (2000) für LFA-1 innerhalb der CD33⁺ Blastenpopulation feststellen.

Von den kostimulatorischen Molekülen, die alle Mitglieder der **Immunglobulin-Superfamilie** sind, wurde in dieser Arbeit die Expression von LFA-3, ICAM-1, B7-1, B7-2, NCAM untersucht.:

Keine wesentlichen Unterschiede in der LFA-3 und ICAM-1 Expression zwischen gesunden und AML-KM

Wie auch in anderen Studien (Brouwer RE, 2000; Maeda A, 1998) waren in dieser Arbeit die Mehrzahl der AML-Fälle und der gesunden KM-Proben **LFA-3**-positiv. Die Angaben in der Literatur über die ICAM-1 Expression bei der AML schwankten zwischen 27% - 85% positiver Fälle, wobei Analysen mit FITC-konjugierten mAk deutlich geringere Ergebnisse (20-27%) erbrachten (Hirano N, 1996; Brouwer RE, 2000) als Untersuchungen (75%-85%), die – wie auch in unseren Analysen – mit PE markierten mAk (Maeda A, 1998) oder indirekt markierten Ak (Reuss-Borst MA, 1995; De Waele M, 1999) durchgeführt worden sind. Während 70% der AML-Fälle und 75% der gesunden HPC positiv für ICAM-1 war, stimmte unser Ergebnis bei der AML zwar gut mit dem anderer Arbeiten mit vergleichbaren Methoden überein, doch konnten wir im Gegensatz zu anderen Arbeiten keine geringere Expression im gesunden KM im Vergleich zu AML-Blasten feststellen. In diesen Arbeiten wurden allerdings nur die CD34⁺Population untersucht.

Die kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 lassen sich auf AML-Blasten nachweisen

Während B7-1 in den meisten Arbeiten nicht bzw. kaum nachgewiesen werden konnte (Brouwer RE, 2000; Maeda A, 1998; Hirano N, 1996), zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass mittels PE/CY5-markierten mAk des Zellklons DAL-1 immerhin 46% der AML-Fälle als **B7-1**-positiv eingestuft werden konnten. Das Gen für B7-1 ist nahe dem B7-2-Gen auf Chromosom 3q13-q23 lokalisiert, allerdings wurde bisher bei der AML der Nachweis der Genexpression oder der mRNA von B7-1 nicht erbracht. Dieser Nachweis in Verbindung mit durchflusszytometrischen Paralleluntersuchungen mit mAk aus verschiedenen Klonen bzw. mit verschiedenen Fluorochrom-Konjugationen sind daher notwendig, um das in dieser Arbeit vorgestellte Ergebnis weiter zu evaluieren und vergleichbar zu machen, v.a. da Veränderungen am Chromosom 3q21 bei der AML häufig sind. Auch die Expression von **B7-2** war in unseren Analysen mit 66% positiver Fälle etwas höher als in denen anderer Arbeiten (33%-50%), wobei die Unterschiede mit unterschiedlicher FAB-Zusammensetzung des Patientenguts

(Maeda A, 1998) bzw. mit der Analyse nur der CD33+Population (Brouwer RE, 2000) gut zu erklären sind. Keine der untersuchten gesunden KM-Proben war dagegen für B7-1 und B7-2 positiv.

NCAM und der UPA-R werden im Durchschnitt auf 20% der Blasten exprimiert.

Der NK-Zell-Marker **NCAM** konnte in unserer Arbeit in 26% der untersuchten AML-Fälle für positiv gewertet werden. Auch in anderen Arbeiten (Seymour JF, 1994; Reuss-Borst MA, 1995; Thomas X, 1995) wurde die Expression von NCAM bei der AML in ähnlicher Häufigkeit nachgewiesen. Keine der gesunden KM-Proben war dagegen NCAM positiv und nur durchschnittlich 6% der Zellen im Auswertefenster exprimierten NCAM auf ihrer Oberfläche. Ebenso deutlich waren die Unterschiede zwischen AML-Blasten und der gesunden untersuchten KM-Population bei der Expression des UPA-R. 39% der AML-Fälle, aber kein Fall der gesunden KM-Proben waren positiv für den UPA-R. Die UPA-R-Expression wurde bei der AML bisher nur von Lanza F et al (1988) mittels indirekter Durchflusszytometrie untersucht, die meist etwas höhere Ergebnisse erbringt. Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass die UPA-R Expression in unserer Arbeit etwas weniger häufig als in dem von Lanza F (1988) untersuchten AML-Patientenkollektiv war.

PRR-1 und PRR-2 lassen sich auf AML-Blasten nachweisen

Die Expression von PRR-1 und PRR-2 wurde bei der AML bislang noch nicht untersucht. PRR1- und PRR-2 wurden lediglich auf 20-60% der gesunden CD34+ oder CD33+KM-Zellen nachgewiesen. In unserer Arbeit konnten innerhalb der gesunden KM-Zellpopulation durchschnittlich 88% PRR-1- und 15% PRR-2-exprimierende Blasten nachgewiesen werden. Innerhalb der Blastenpopulation war dagegen PRR-1 geringer (53%) und PRR-2 höher (75%) als im gesunden KM exprimiert.

5.2. Spezifische Unterschiede innerhalb von AML-Subtypen

Hohe FL-R-Expression bei monozytären Leukämien

80% der monozytären Leukämien (M4, M5) waren positiv für den **FL-R** (bei ebenfalls hohem Anteil FL-R exprimierender Blasten und hoher Rezeptordichte), während nur durchschnittlich 47% der Leukämien, die der granulozytären Zelllinie (M1, M2, M3) zugeordnet wurden, FL-R-positiv waren. Rappold I et al (1997) hatten bereits gezeigt, dass auch bei der normalen Hämopoese der FL-R v.a. auf den unreifen, hämopoetischen Progenitorzellen exprimiert wird. Im Laufe der weiteren Maturation wird er bevorzugt innerhalb der monozytären Zelllinie exprimiert, während die Expression innerhalb des granulozytären Reifungsprozesses abnimmt. Die vermehrte Expression des FL-R innerhalb der monozytären Leukämien kann daher entsprechend der höheren Expression des maligne transformierten, *monozytären* Zellklons gesehen werden. Innerhalb der granulozytären Leukämieformen nimmt die Expression des FL-R mit zunehmendem Reifegrad (M1>M2>M3) ab. Bei der sehr undifferenzierten M0-Leukämie war der FL-R der einzige der untersuchten Zytokinrezeptoren, für den die KM-Proben (schon) positiv waren. Da nur zwei KM-Proben des FAB-Typs M0 untersucht worden sind, lässt sich diese Aussage aufgrund der geringen Fallzahl nicht verallgemeinern. Die jeweils untersuchten Fälle einer Erythroleukämie und megakaryozytären Leukämie waren beide negativ für den FL-R. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten mit kleinerer Fallzahl (Stacchini A, 1996; Piacibello W, 1995) konnte anhand unserer Ergebnisse die Häufigkeit der Expression des FL-R sowohl als linienspezifisch (v.a. monozytäre Leukämien) als auch reifegradabhängig (innerhalb der granulozytären Leukämien) interpretiert werden, d.h. eine geringe FL-R Expression weist v.a. auf eine reifere, granulozytäre Leukämie hin (oder Erythroleukämie bzw. megakaryozytäre Leukämie).

Reifegradabhängige Expression des SCF-R

Umgekehrt zur FL-R-Expression waren 88% der AML-Blasten, die der granulozytären Zelllinie zugeordnet werden, für den **SCF-R** positiv, wogegen nur 58% der monozytären Leukämien SCF-R positiv waren. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war mit $p=0.02$ (Chi²-Test) signifikant. Diese Aussage wird von den Ergebnissen von Nomdedeu JF et al (1999) unterstützt, in dessen Untersuchungen alle SCF-R negativen AML-Fälle zur Gruppe der monozytären Leukämien gehörten. Auch Bene MC et al. (1998) konnten bei sehr großen Fallzahlen diese Unterschiede feststellen, allerdings waren diese nicht signifikant, so dass der SCF-R allein nicht als Marker zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Linien verwendet werden kann. In unserer Arbeit zeigten sich zudem Parallelen zum Reifegrad der Leukämie. Je unreifer die Leukämie, desto mehr SCF-R positive Fälle wurden beobachtet und desto höher war auch der mittlere Anteil SCF-R exprimierender Blasten. Dies konnte sowohl innerhalb der granulozytären Linie (M1>M2>M3), als auch auf niedrigerem Expressionsniveau innerhalb der monozytären Linie beobachtet werden (M4>M5). Mehrere Arbeiten stellten eine Koexpression des SCF-R und CD34 fest, das v.a. auf unreifen myeloiden Vorläuferzellen exprimiert wird (Muroi, K, 1995; Kubota A, 1994).

Demnach wird der SCF-R bevorzugt auf granulozytären und unreifen Leukämien exprimiert. Eine niedrige Expression von SCF-R weist damit v.a. auf eine reifere monozytäre Leukämie hin (M5).

Hohe Expression des IL-3-R in allen Subtypen der AML

Bis auf drei KM-Proben waren alle untersuchten AML-Proben für den **IL-3-R positiv**, somit ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede innerhalb der verschiedenen Subtypen der AML und auch keine Korrelationen zu Reifegrad und Linienzugehörigkeit. Während Koubek K et al (1998) feststellten, dass v.a. unreife Leukämien (M0 und M1) den IL-3-R exprimierten, ging anhand unserer Ergebnisse hervor, dass der Anteil IL-3-R-exprimierender Zellen durchschnittlich am häufigsten innerhalb der M1 und M3 exprimiert wird und damit nicht die unreifen Leukämien bevorzugt. Da unterschiedlich, sensitive Methoden und Antikörper die Ergebnisse zwischen den beiden Arbeiten schwer vergleichbar machen, werden zukünftige Arbeiten eine eventuell reifegradabhängige Expression des IL-3-R erst bestätigen müssen.

Hohe GM-CSF-R Expression bei monozytären Leukämien

Entsprechend der physiologischen Expression des GM-CSF-R, der die monozytäre Zelllinie bevorzugt (Lanza F, 1997; Wognum AW, 1996), waren 92% der monozytären Leukämien (M4/M5) GM-CSF-R-positiv, während nur 46% der granulozytären Zelllinien als GM-CSF-R positiv gewertet werden konnten. Auch Koubek K et al (1998) und Lanza F et al (1997) konnten eine bevorzugte Expression innerhalb der monozytären Zelllinie feststellen. Korreliert man den durchschnittlichen Anteil positiver Zellen mit dem Reifegrad der Leukämie, so nimmt die relative Anzahl GM-CSF-R exprimierender Blasten mit zunehmender Differenzierung sowohl innerhalb der monozytären Leukämien (M4<M5) als auch innerhalb der granulozytären Leukämien (M1<M2<M3) zu. Zusammenfassend kann man daher von einer linien- und reifegradabhängigen Expression des GM-CSF-R sprechen, d.h. eine hohe GM-CSF-R Expression spricht für die Zugehörigkeit zu einer reifen monozytären Leukämie (M5).

Höchste G-CSF-R Expression bei der Promyelozytenleukämie

Auch für den G-CSF-R konnte in den bereits publizierten Daten bereits eine reifegradabhängige Expression beobachtet werden (Shimoda K, 1992; Shinjo K, 1997). Bei dem am größten untersuchten Patientenkollektiv von 81 Patienten fand sich v.a. bei der Promyelozytenleukämie die signifikant höchste Expression des G-CSF-R (Katayama N, 1998), während die Untersuchungen von Motoji T (1991) an nur 20 AML-Patienten mittels Radiojod-Methode v.a. bei der AML-M2 eine hohe Expression ergaben. Auch bei unseren Untersuchungen zeigten sich die signifikantesten Unterschiede zwischen dem FAB-Typ M3 und den anderen AML-Subtypen in der relative G-CSF-R-Dichte auf den Blasten. Der durchschnittlich höchste Anteil G-CSF-R exprimierender Zellen wurde im FAB-Typ M2 beobachtet, wo auch die meisten Fälle als G-CSF-R positiv gewertet werden konnten. Damit zeigt sich deutlich, dass reifere Differenzierungsstufen der granulozytären Zelllinie den G-CSF-R häufiger und in höherer Expressionsdichte exprimierten, während der G-CSF-R auf monozytären Zellen kaum exprimiert wird.

Variable Expression von L-Selektin

Bisher wurde in noch keiner Arbeit untersucht, ob die Expression des L-Selektins innerhalb der Subtypen der AML Unterschiede aufweist. Wir konnten zeigen, dass die höchste Expression von L-Selektin innerhalb der Gruppe M4 und M2 zu beobachten war (44% bzw. 38% positive Fälle), die niedrigste Expression in M3, in der nur einer von vier untersuchten Fällen für L-Selektin positiv war. Eine Zuordnung zu Reifegrad und Linienzugehörigkeit konnte allerdings nicht gefunden werden.

Integrine werden häufig auf monozytären Leukämien exprimiert

In nur einer Arbeit von Vila L (1995) wurde die Expression von **VLA-2** innerhalb der verschiedenen Subtypen der AML untersucht. Vila L et al (1995) stellten dabei die häufigste Expression innerhalb des FAB-Typs M5 fest. Bei insgesamt drei untersuchten Promyelozytenleukämien konnten sie keinen VLA-2-positiven Fall finden. In unserer Arbeit wurde im Vergleich zu den Ergebnissen von Vila L (1995) generell ein höherer Anteil VLA-2 exprimierender Blasten festgestellt. Dies kann auf unterschiedliche Analysemethoden (Antikörper verschiedener Zellklone, direkt/indirekt Fluorochrom-markierte Antikörper) zurückgeführt werden. In dieser Arbeit waren die meisten Zellen positiv bei den reifen monozytären Leukämien (M5) und der geringste Anteil positiver Zellen konnte innerhalb der reifen granulozytären Leukämien (M3) festgestellt werden.

Das β 2-Integrin **LFA-1** wurde in dieser Arbeit auf den meisten AML-Blasten hoch exprimiert, lediglich innerhalb der Gruppe mit FAB-Typ M3 war der Anteil LFA-1 exprimierender Blasten geringer, wie es auch schon Brouwer

RE et al (2000) feststellen konnten. **Mac-1** wird dagegen bevorzugt nach den Arbeiten von Soligo D (1990) und Reuss-Borst MA (1995) auf monozytären Leukämien exprimiert. Dies wurde auch in der hier vorgelegten Arbeit beobachtet: Während Mac-1 in der Gruppe M1 und M2 noch mäßig häufig exprimiert wurde, war er innerhalb der Promyelozytenleukämie (M3) in keiner der sechs untersuchten KM-Proben positiv. Die von uns untersuchten Integrine wurden damit bevorzugt innerhalb der Gruppe der monozytären Leukämien exprimiert und zeigten die niedrigste Expression innerhalb der Promyelozytenleukämie, wobei Mac-1 dort mit Abstand am niedrigsten exprimiert wurde.

Stark differierende Ergebnisse bei der ICAM-1 Expression

Die **ICAM-1**-Expression wurde sowohl in der Arbeit von Hirano N et al (1996) als auch in der Arbeit von Maeda A et al (1998) untersucht. Insgesamt waren die Ergebnisse von Hirano N (1996), der FITC-markierte mAK verwendete deutlich niedriger als die von Maeda A (1998), dessen Untersuchungen mit PE-markierten mAK durchgeführt worden waren. Aber auch im internen Vergleich variierten die Ergebnisse erheblich: So waren z.B. in der Arbeit von Maeda A (1998) alle monozytären Leukämien ICAM-1 positiv, während in der Arbeit von Hirano N nur 30% der M4 und keine der neun untersuchten M5-Leukämien positiv waren. Beide konnten jedoch einen relativ hohen Anteil ICAM-1-exprimierender Blasten innerhalb der M2 feststellen. In der hier vorgelegten Arbeit zeigten sich insgesamt keine gravierenden Unterschiede innerhalb der verschiedenen FAB-Typen (zw. 50-67% der Fälle positiv), wobei gerade in der M2 die niedrigste Expression beobachtet wurde und nicht alle, sondern nur 65% der monozytären Leukämien ICAM-1 positiv waren. Da die Expression von ICAM-1 von vielen Zytokinen induziert werden kann, die Expression auch schon nach 24h-Kultur (ohne Zytokine) deutlich zunimmt (Brouwer RE, 2000), liegt die Vermutung nahe, dass möglicherweise die gemessenen ICAM-1-Expressionen nur Momentaufnahmen des jeweiligen KMs darstellen und die Expression abhängig vom Zytokinstatus des KM und von der Verarbeitungsdauer höchst variabel ist.

Höchster Anteil B7-1 exprimierender Zellen bei der Promyelozytenleukämie, höchster Anteil B7-2 exprimierender Zellen auf monozytären Leukämien

Da **B7-1** in den bisher durchgeführten Untersuchungen in fast allen AML-Fällen kaum nachgewiesen werden konnte, konnten bisher auch keine Aussagen zur Expression innerhalb der einzelnen FAB-Typen getroffen werden. In dieser Arbeit waren alle der drei untersuchten M3-Fälle B7-1-positiv. Die M1-, M2- und M4-FAB-Typen waren zwischen 30-40% der Fälle B7-1-positiv und die M5-Leukämie - bei der allerdings nur ein Fall untersucht worden war, war negativ für B7-1. Das kostimulatorische Molekül **B7-2** wurde dagegen bereits in zwei vorausgegangenen Arbeiten bzgl. seiner Verteilung innerhalb der FAB-Typen untersucht (Hirano N, 1996; Maeda A, 1998; Brouwer RE, 2000). In allen Arbeiten konnte – wie auch in dieser Arbeit - die häufigste Expression von B7-2 innerhalb der monozytären Leukämien (72% der Fälle positiv) festgestellt werden und eine verhältnismäßig geringer Anteil B7-2 positiver Zellen innerhalb der M3 (33%). In unserer Arbeit waren zudem alle sechs untersuchten M2-Fälle B7-2-positiv, doch dies wurde in anderen Arbeiten mit höheren M2-Fallzahlen nicht nachgewiesen, so dass möglicherweise aufgrund der geringen Fallzahl in dieser Arbeit das Ergebnis nicht verallgemeinerbar ist. Da v.a. professionell antigenpräsentierende Zellen, wie Monozyten und dendritische Zellen B7-2 konstitutiv exprimieren kann die vermehrte Expression von B7-2 innerhalb der monozytären Linie ebenfalls als konstitutives Merkmal der monozytären Linienzugehörigkeit der Leukämien gesehen werden.

Höchster Anteil NCAM exprimierender Zellen innerhalb der M5

Auch das Adhäsionsmolekül NCAM wird bevorzugt auf reiferen, monozytären Leukämien (v.a. M5) exprimiert (Seymour JF, 1994; Byrd JC, 1995). Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, bei der 91% der M5-Leukämien NCAM-positiv waren, während innerhalb der FAB-Typen M1, M2 und M4 nur 20-30% der Fälle und des FAB-Typs M3 kein einziger Fall NCAM-positiv war.

Hohe UPA-R Expression bei monozytären Leukämien

Auch der UPA-R bevorzugt die monozytären AML-Subtypen. 66% der monozytären Leukämien und nur 21 % der übrigen Leukämien M0-M3 waren positiv für den UPA-R. Lanza F (1998) konnte in seinen Untersuchungen ebenfalls eine bevorzugte Expression des UPA-R auf monozytären Leukämien feststellen.

Variable Expression von PRR-1 und PRR-2

Die erstmalig bei der AML untersuchte Expression von PRR-1 und PRR-2 war heterogen innerhalb der FAB-Typen, wobei *beide* die meiste Anzahl positiver Fälle bei der M3 aufwiesen und PRR-2 zusätzlich auch in 87%

der untersuchten M4-Fälle exprimiert worden war. Eine eindeutige linienspezifische- oder reifegradabhängige Expression ließ sich allerdings nicht feststellen.

Die monozytäre Leukämie –aggressiver Subtyp mit hoher Adhäsionsmolekül-Expression

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zeigten, dass sich die monozytäre Leukämien im Gegensatz zu den übrigen Subtypen der AML durch eine hohe Expression von Adhäsionsmolekülen an ihrer Oberfläche auszeichneten. Klinisch zeigen monozytäre Leukämien eine erhöhte Inzidenz extramedullärer Manifestationen, hohe initiale Blastenzahlen und insgesamt einen eher ungünstigen klinischen Verlauf. Dies mag an der höheren Expression von Adhäsionsmolekülen liegen, die die monozytären Leukämien zu einem aggressiveren Subtyp als die übrigen machen, da sie via Adhäsionsmolekülen häufiger in den Kontakt mit Endothel und Stroma treten (Brouwer RE, 2001).

Sekundäre Leukämien weisen einen signifikant höheren Anteil Mac-1-positiver Zellen auf.

In dieser Arbeit wurde auch die Expression von Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen bei primärer und sekundärer AML untersucht. Sekundäre Leukämien umfassen zum einen die Gruppe der Zweitneoplasien, bei denen die Patienten schon einmal eine Chemo- und/oder Radiotherapie erhalten haben und zum anderen die Gruppe der AML-Patienten, denen ein MDS vorrausgegangen ist. Ein gehäuftes Auftreten typischer chromosomaler Aberrationen (z.B. del 5/ del 7) konnte diesem Subtyp der AML schon zugeordnet werden. Ziel dieser Arbeit war es daher festzustellen, ob sich auch spezifische Unterschiede zwischen den beiden Gruppen im Immunphänotyp nachweisen lassen. In der Expression von Zytokinrezeptoren bei primärer und sekundärer AML zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Bei den Adhäsionsmolekülen konnte lediglich eine signifikant ($p=0.034$, Qui²-Test) höhere Expression von Mac-1 bei der sekundären AML, als bei der primären AML festgestellt werden. Auch in der Arbeit von Rosenfeld C et al (2001) wurde eine höhere Expression von Mac-1 bei Leukämien, die aus einem MDS hervorgegangen sind, beobachtet. Betrachtet man jedoch die Zusammensetzung der Patientenkollektive in den beiden Gruppen, so fiel auf, dass in der sAML-Gruppe deutlich mehr monozytäre Leukämien (50%) als in der pAML-Gruppe (36%) vertreten waren. In dieser und in anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Mac-1 v.a. auf monozytären Leukämien exprimiert wird. So lässt sich die höhere Expression von Mac-1 bei der sAML eher auf den höheren Anteil monozytärer Leukämien zurückführen, als dass eine hohe Mac-1 Expression ein spezifisches Merkmal für sekundäre Leukämien darstellen könnte. Zusammenfassend lassen sich also keine spezifischen Unterschiede in der Expression der von uns untersuchten Oberflächenmolekülen zwischen primärer und sekundärer AML herausarbeiten.

5.3. Prognostische Bedeutung

5.3.1. Niedrige Remissionswahrscheinlichkeit bei VLA-2-, UPA-R- und NCAM-positiven AML-Fällen

Weiteres Ziel unserer Arbeit war es, anhand der immunphänotypischen Eigenschaften der Blasten Prognosekriterien für das Erreichen einer Remission herauszuarbeiten. Von allen untersuchten Markern korrelierte lediglich die Expression von VLA-2, UPA-R und NCAM signifikant mit einer verminderten Remissionswahrscheinlichkeit.

Alle fünf KM-Proben (100%) von Patienten, die nach Doppelinduktion mit TAD/TAD oder TAD/HAM **keine** Remission erreichten, waren **VLA-2**-positiv, während nur 56% der Patienten, die auf die Therapie ansprachen, VLA-2-positiv waren. Der Unterschied war mit einem p-Wert von 0.049 (Chi²-Test) gerade signifikant. Aus dem Vergleich anderer Parameter (Alter; FAB-Zusammensetzung), die das Erreichen einer Remission beeinflussen könnten, ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede. Bei den Therapieansprechern befanden sich 60% der Patienten mit prognostisch intermediären Karyotypen und jeweils 20% mit prognostisch günstigen und ungünstigen Karyotypen. Bei den Therapieversagern überwog der intermediäre Karyotyp mit 80% und eine KM-Probe (20%) wies sogar einen prognostisch günstigen Karyotyp auf. Eine Prognoseabschätzung anhand zytogenetischer Risikogruppen hätte damit schlechter mit dem klinischen Verlauf der Patienten korreliert, als die Expression von VLA-2. So handelt es sich bei der VLA-2-Expression um einen vom Karyotypen unabhängigen Prognosefaktor für das Erreichen einer Remission. Bisher wurden in der Literatur keine Arbeiten über die prognostische Bedeutung der VLA-2 Expression bei der AML veröffentlicht.

Weiterhin korrelierte auch die Expression des UPA-Rs mit der Remissionsrate, wobei 47% der UPA-R-positiven Patienten keine Remission erreichten, während nur 22% der UPA-R-negativen Patienten keine Remission

erreichten ($p=0.03$, Chi²-Test). Die Expression des UPA-Rs korrelierte zudem signifikant mit einer höheren Frühodeswahrscheinlichkeit - unabhängig von der verabreichten Therapie (Ergebnisse nicht dargestellt). Lijnen HR et al (1996) konnten zeigen, dass der UPA-R Gerinnungsfaktoren binden und damit auch „verbrauchen“ kann. Durch eine erhöhte Expression des UPA-R auf den Blasten kann dadurch die bei Diagnosestellung der AML ohnehin erhöhte Blutungsneigung verstärkt werden und Blutungskomplikationen können die erhöhte Frühodeswahrscheinlichkeit bzw. die verminderte Remissionsrate erklären. Bei der AML wurde die prognostische Relevanz des UPA-Rs bisher nicht untersucht, es wurde lediglich das gehäufte Auftreten von extramedullären Manifestationen beobachtet (Lanza F, 1998).

Die NCAM-Expression korrelierte am signifikantesten mit einer schlechten Remissionsrate ($p=0.028$, Chi²-Test). Vergleicht man die prognostische Relevanz eines günstigen Karyotyps ($p=0.07$, Chi²-Test) bzw. die eines prognostisch ungünstigen Karyotyps ($p=4.6$, Chi²-Test) in den untersuchten Patientenkollektiven, so korreliert die NCAM-Expression (positiver oder negativer Fall) deutlicher mit dem Therapieansprechen, als die Einteilung in prognostische ungünstige Karyotypen. Baer MR et al (1997) konnten keine Korrelation zwischen NCAM-Korrelation und Remissionsrate feststellen. Allerdings untersuchte er nur die klinische Relevanz der NCAM – Expression bei der prognostisch günstigen AML-ETO. Scott AA et al (1994) konnten dagegen einen NCAM-positiven AML-Subtyp herausarbeiten, der schlechter auf Therapie ansprach.

L-Selektin, PRR-1 und Mac-1 korrelierten mit zytogenetischen Risikogruppen, aber nicht mit der Remissionsrate.

Obwohl aus dem Vergleich mit den zytogenetischen Risikogruppen hervorging, dass eine hohe Expression von L-Selektin, PRR-1 und eine niedrige Expression von Mac-1 mit der Zugehörigkeit zur zytogenetisch günstigen Prognosegruppe korrelierte, waren die entsprechend erwarteten Unterschiede im Therapieansprechen bei diesen Markern **nicht** signifikant. Die Patientengruppe, deren KM-Proben auf die Expression von L-Selektin untersucht wurden, setzte sich aus fünf Patienten, die nicht auf die Therapie ansprachen, und 16 Patienten, die auf die Therapie ansprachen, zusammen. In der Gruppe der fünf Therapieversager befanden sich überwiegend Patienten mit prognostisch intermediärem Karyotyp und ein Patient wies sogar einen prognostisch günstigen Karyotyp auf. Kein Patient war mit einem prognostisch schlechten Karyotyp darunter. Umgekehrt präsentierten die Therapieansprecher genauso viele prognostisch günstige wie ungünstige Karyotypen (jeweils 18%) auf. Damit korrelierte auch die Zuordnung der Patienten zu zytogenetischen Risikogruppen nicht mit der Remissionsrate. Ähnlich verhielt es sich bei der Expression des Adhäsionsmoleküls PRR-1, bei dem in der Respondergruppe deutlich weniger Fälle positiv waren, als bei den Therapieversagern, obwohl im Vergleich mit dem zytogenetischen Risikogruppen deutlich mehr PRR-1-positive Fälle der günstigen Prognosegruppe zugeordnet werden konnten. Die auf PRR-1 hin untersuchten Therapieversager setzten sich aus 40% prognostisch ungünstigen, 10% günstigen und 50% intermediären Patienten zusammen, während die Gruppe der Therapieansprecher 20% prognostisch ungünstige, 28% günstige und 52% intermediäre Karyotypen aufwies.

Obwohl in vielen Studien die Expression des Mac-1 mit einem unerfreulichen klinischen Verlauf korrelierte (Tien HF, 1995; Bradstock K, 1994; Paietta E, 1998), konnte dies in unserer Arbeit nicht bestätigt werden. Auch andere Arbeiten konnten keine Korrelation mit dem klinischen Verlauf feststellen (Tucker J, 1990; Callea V, 1991). In der hier vorgelegten Arbeit erreichten von insgesamt 18 Mac-1-positiven Patienten immerhin 13 Patienten eine Remission und nur bei fünf Mac-1-positiven Patienten persistierte die Erkrankung. Aus dem Vergleich der Remissionsrate der Mac-1-positiven Patienten (63%) mit der der Mac-1-negativen Patienten (61%) ergaben sich keine Unterschiede. Das verwundert umso mehr, da in der Mac-1 negativen Gruppe der Anteil prognostisch günstiger Karyotypen bei 58%, in der Mac-1 positiven Gruppe bei 8% lag. Daher korrelierte in dem von uns auf Mac-1 untersuchten Patientenkollektiv die Remissionsrate ebensowenig mit der Prognoseeinschätzung anhand des Karyotyps wie mit der Mac-1 Expression. Betrachtet man nur den Verlauf der Patienten mit prognostisch intermediärem Karyotyp, so zeigten sich bzgl. der Expression des Mac-1 und dem klinischen Verlauf ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Es wird daher deutlich, dass Mac-1, CD62L und PRR-1 nicht als Karyotyp unabhängige Prognosemarker verwendet werden können bzw. die Bestimmung dieser Marker keine Vorteile gegenüber der Prognoseabschätzung anhand zytogenetischer Karyotypen aufweist.

Da die Einteilung in zytogenetische Karyotypen derzeit zu den evaluiertesten Prognosekriterien gehört, stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, warum die Remissionswahrscheinlichkeit in unserem Patientenkollektiv nicht mit den zytogenetischen Prognosekriterien korreliert. Zunächst war die Fallzahl in den beiden Gruppen relativ gering (43 Therapieansprecher vs. 18 Therapieversager), so dass die Patientenzusammensetzung in diesem Patientenkollektiv möglicherweise nicht repräsentativ ist. Weiterhin ist die Prognoseabschätzung immer im Zusammenhang mit der verwendeten Therapieform zu sehen, z.B. hat die Promyelozytenleukämie erst nach Einführung der ATRA-Therapie eine derart gute Prognose. In das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv

gingen lediglich Patienten ein, die nach dem AML-CG-Protokoll mit Doppelinduktionstherapie behandelt worden sind. Für diese Therapieform wurde die Gültigkeit der zytogenetischen Prognosekriterien noch nicht erhärtet. Wir stellten fest, dass unter der AML-CG-Therapie die Remissionsrate höher als innerhalb des gesamten, nach standardisierten Protokollen behandelten Patientenkollektivs war. Es fiel auch auf, dass die prognostisch günstigen Karyotypen höher als erwartet (91% Remissionsrate) mit der tatsächlichen Remissionsrate übereinstimmen und die prognostisch ungünstigen Karyotypanomalien ebenfalls einen etwas günstigeren Verlauf aufwiesen. Immerhin 57% sprachen auf die Doppelinduktionstherapie an und nur in 43% der prognostisch ungünstigen Karyotypanomalien persistierte die AML. Dies weist darauf hin, dass die Doppelinduktionstherapie nach dem AML-CG-Protokoll die Remissionsrate günstig beeinflusst und so Patienten mit prognostisch schlechtem Karyotyp eine höhere Remissionswahrscheinlichkeit haben. Die relativ geringe Fallzahl, als auch die in Bezug auf die Remissionswahrscheinlichkeit günstigere Doppelinduktionstherapie können daher die schwache Korrelation der zytogenetischen Risikogruppen mit der Remissionsrate erklären.

5.3.2. Progressfreie Überlebenswahrscheinlichkeit

5.3.2.1. Hohe Expression von FL-R und SCF-R korreliert mit kurzem progressfreiem Überleben

Cut-off-Werte bezüglich des Anteils positiver Zellen für das jeweilige Oberflächenmolekül wurden ermittelt, um festzustellen, ob es eine signifikante und damit prognostisch relevante Trennung zwischen der Dauer der progressfreien Überlebenszeit und dem Anteil positiver Zellen gibt. Dabei wurden auch Cut-off-Werte zugelassen, die unterhalb eines Anteils von 20% Antigen-positiven Blasten fielen, da diese per definitionem festgelegte Grenze für Positivität nicht unbedingt mit der biologischen Wirksamkeit der Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle zusammenhängen muss. Da sich die durchschnittliche Beobachtungszeit nur auf im Mittel 8.5 Monate belief, war bei einigen Markern eine signifikante Trennung noch nicht möglich, auch wenn der Unterschied deutlich war.

Patienten, bei denen eine FL-R-Tandemduplikation nachgewiesen wurde, bei der ligandunabhängig Tyrosinkinasen phosphoryliert werden, zeigen eine deutlich kürzere progressfreie Überlebenszeit (Kottaridis PD, 2001; Kiyoi H, 1999). Ob jedoch eine erhöhte **FL-R** Expression, die ebenfalls zu einer erhöhten Phosphorylierung von Tyrosinkinasen führen kann, auch mit einer verkürzten, progressfreien Überlebenszeit einhergeht, wurde bisher nicht untersucht. In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patienten, die bei Diagnosestellung mehr als 85,5% FL-R-positiv Blasten aufwiesen, ein signifikant ($p=0.001$) kürzeres progressfreies Überleben aufwiesen. Da nur zwei (5%) von insgesamt 40 Patienten einen so hohen Anteil FL-R positiver Blasten präsentierten und diese Patienten auch deutlich älter als die übrigen Patienten waren, bedarf es weiterer prospektiver Untersuchungen, um die prognostische Signifikanz einer hohen FL-R Expression weiter zu objektivieren.

Widersprüchliche Angaben werden in der Literatur zur prognostischen Relevanz der SCF-R-Expression bei der AML gefunden (*schlechte Prognose*: Ashman LK, 1988; *kein Einfluss auf Prognose*: Lauria F, 1995; Reuss-Borst MA, 1994; Schwartz S, 1999; *gute Prognose zusammen mit anderen myeloiden Markern*: Legrand O, 2000). In diesen Arbeiten wurde lediglich das Kriterium der „Positivität“ ($> 20\%$ positive Blasten im Auswertefenster) mit dem klinischen Verlauf der AML korreliert. Ob aber die Häufigkeit der SCF-R-positiven Zellen einen Einfluss auf das progressfreie Überleben hat, wurde bisher nicht untersucht. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass Patienten, die mehr als 45,5% SCF-R positive Blasten aufwiesen, ein signifikant ($p=0.02$) kürzeres progressfreies Überleben hatten. In den beiden Gruppen war der Anteil günstiger bzw. ungünstiger Karyotypen vergleichbar und Patienten mit prognostisch intermediären Karyotypen überwogen. Da die SCF-R-Expression auch keine Korrelation mit den zytogenetischen Risikogruppen zeigte, läßt sich die Häufigkeit der SCF-R positiven Zellen als ein vom Karyotyp unabhängiges Prognosekriterium für progressfreies Überleben interpretieren. Scheinbar widersprüchlich steht hierzu die geringe SCF-R-Expression innerhalb der AML-M5, die den unerfreulichsten klinischen Verlauf aufwies. Doch leider erreichten nur zwei von den sechs untersuchten M5-Fällen eine Remission und diese konnten wegen differierender Therapieprotokolle oder unvollständiger klinischer Angaben nicht in die Cut-off-Analysen miteingehen. Daher ist ein Anteil SCF-R exprimierender Zellen von mehr als 45,5% bei Diagnosestellung lediglich innerhalb der AML-Subtypen M0-M4 als prognostisch signifikant für den Progress der Erkrankung nach Erreichen einer Remission zu werten.

Auch bei den übrigen Zytokinrezeptoren konnten Cut-off-Werte, die eine Trennung in Gruppen mit einer kürzeren und längeren progressfreien Überlebenszeit zuließen, ermittelt werden. Die Unterschiede waren aber aufgrund der relativ kurzen Beobachtungszeit oder der zum Teil kleinen Fallzahlen jedoch (noch) nicht signifikant. Der Unterschied zwischen den Gruppen, die > und = 33% GM-CSF-R – positive Blasten aufwiesen, war mit einem p-Wert von 0.06 jedoch fast signifikant. Dabei hatten Patienten, deren Anteil GM-CSF-R exprimierender Blasten > 33% war eine höhere Wahrscheinlichkeit für progressfreie Überlebensdauer als Patienten, die = 33% GM-CSF-R-positive Blasten aufwiesen. Dies verwundert, da eine hohe GM-CSF-R –Expression – wenn auch (gerade) nicht signifikant - mit zytogenetisch ungünstigen Karyotyp und auch mit einem schlechteren Remissionsrate korrelierte. Auch der FAB-Typ M5, der innerhalb der FAB-Typen die schlechteste Prognose aufweist, zeigte den höchsten Anteil GM-CSF-R-positiver Blasten. Die theoretische Erklärung für diese Zusammenhänge, nämlich dass gerade die GM-CSF-R positiven Blasten bei autokriner GM-CSF-Stimulation proliferieren, scheint ebenfalls plausibel zu sein. Es gilt allerdings zu beachten, dass in dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv auf GM-CSF-R hin untersuchten Patientenkollektiv kein Patient mit einem FAB-Typ M5 eingeschlossen war. Es ist daher durchaus möglich, dass sich der Zusammenhang zwischen GM-CSF-R positiven Blasten und der progressfreien Überlebenszeit bei einem Patientenkollektiv, das auch Patienten des FAB-Typs M5 beinhaltet, verschiebt bzw. sogar umkehrt.

Patienten, die mehr als 52% G-CSF-R positive Blasten aufwiesen, zeigten ebenfalls eine etwas höhere Wahrscheinlichkeit für eine längere progressfreie Überlebenszeit als diejenigen Patienten, die weniger als 52% G-CSF-R positive Blasten aufwiesen. Weil insgesamt nur bei 18 Patienten, die eine Remission erreichten, die G-CSF-R Expression untersucht wurde, ist das Ergebnis nicht signifikant. Da ein hoher Anteil G-CSF-R positiver Blasten signifikant mit der zytogenetisch günstigen Prognosegruppe und fast signifikant mit dem Therapieansprechen korrelierte, liegt die Vermutung nahe, dass bei längerer Beobachtungsdauer und höherer Fallzahl ein hoher Anteil G-CSF-R-exprimierender Blasten auch mit einer günstigen Prognose für progressfreies Überleben korreliert. Die geringste Trennung bezüglich einer höheren oder geringeren Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben ließ die Menge IL-3-R-exprimierender Blasten zu. Da der IL-3-R auch bei den übrigen Vergleichen weder eine Korrelation zu den prognostischen Risikogruppen noch zu den Therapieansprechern hatte, scheint es eher unwahrscheinlich, dass auch bei höherer Fallzahl signifikante Trennungen festgestellt werden könnten.

Da insgesamt die Fallzahl sowohl bei den Cut-off-Analysen klein waren, müssen weitere prospektive Verlaufsbeobachtungen mit größeren Fallzahlen durchgeführt werden, um die prognostische Signifikanz dieser Ergebnisse zu bestätigen oder weiter aufzuzeigen.

5.3.2.2. Hohe Expression kostimulatorischer Moleküle korreliert mit kurzem progressfreiem Überleben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der kostimulatorischen Moleküle ICAM-1, B7-1, B7-2 und NCAM Einfluss auf die progressfreie Überlebenszeit hat. Obwohl die Expression dieser Moleküle eigentlich die zelluläre Immunantwort gegen AML-Zellen begünstigen müsste, hat sie offensichtlich auf den klinischen Verlauf der Patienten negative Auswirkungen. Maeda A et al (1998) konnten bereits für B7-2 zeigen, dass dessen Expression mit einer signifikant kürzeren Remissionsdauer und einem signifikant kürzeren Überleben bei der AML einherging. Da B7-1 in den bisher publizierten Arbeiten nicht nachgewiesen werden konnte, wurde ein Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf bislang auch nicht untersucht. Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass eine B7-1 Expression auf mehr als 15% der Blasten und eine B7-2 Expression auf mehr als 65% der Blasten mit einer signifikant kürzeren progressfreien Überlebenszeit einhergeht. Da B7-2 konstitutiv auf professionellen APZ, B7-1 dagegen nur nach Aktivierung exprimiert wird, verwundert es nicht, dass schon eine niedrigere Konzentration von B7-1 Einfluss auf den klinischen Verlauf hat. Aus dem Vergleich der anderen, den klinischen Verlauf beeinflussenden Daten, zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Altersstruktur (der Altersmedian lag in allen Gruppen unter 60 Jahren) und in der Anzahl der immunzytologisch bestimmten Blasten des KM. Von den zwei Patienten, die eine B7-2 Expression auf >65% der Blasten aufwiesen, rezidierte ein Patient bereits nach 8,5 Monaten. Beide Patienten wiesen einen prognostisch intermediären Karyotyp auf, so dass das frühe Rezidiv des einen Patienten eigentlich nicht zu erwarten gewesen wäre. Bei den drei rezidierten Patienten mit mehr als >15% B7-1 positiven Blasten wiesen zwei Patienten bereits einen prognostisch schlechten Karyotyp, ein Patient einen prognostisch intermediären Karyotyp auf. Außerdem konnte die höchste B7-1 Expression bei der M3 nachgewiesen werden, die bekanntermaßen den günstigsten klinischen Verlauf aufweist. Ob die Messung von B7-1 damit auch karyotypunabhängig eine Aussage über den Verlauf der Patienten zulässt, bleibt daher noch zu prüfen. Insgesamt ist die in dieser Arbeit untersuchte Fallzahl klein, so dass weitere prospektive Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden müssen.

Auch die hohe Expression der Adhäsionsmoleküle NCAM und ICAM-1, die u.a. den Kontakt zu NK-Zellen und T-Zellen regulieren, korrelierte mit einer kürzeren progressfreien Überlebenszeit. Während Thomas X et al (1995) bei der AML keine Korrelation des klinischen Verlaufs mit der ICAM-1-Positivität (>20%) der KM-Proben feststellen konnten, konnte mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Analysen ein prognostisch relevanter Cut-off-Wert bei 60,5% ICAM-1-exprimierender Blasten ermittelt werden. Zwei von vier Patienten, bei denen >60,5% der Blasten ICAM-1 exprimierten, rezidierten bereits nach durchschnittlich 5,5 Monaten. Doch bei diesen beiden Patienten konnte auch ein prognostisch schlechter Karyotyp nachgewiesen werden, so dass das frühe Rezidiv nicht verwundert und durch ICAM-1 zunächst keine zusätzliche prognostische Aussage getroffen werden konnte. Ausserdem waren die >60% ICAM-1 exprimierenden Patienten deutlich älter (66 vs 57Jahre), was bei der Beurteilung dieser Daten berücksichtigt werden muss.

NCAM ist der einzige der in dieser Arbeit untersuchten Marker, dessen Expression sowohl mit dem Therapieansprechen, als auch mit der progressfreien Überlebenszeit korrelierte. Über die prognostische Relevanz der NCAM-Expression finden sich widersprüchliche Angaben in der Literatur. Einige Autoren stellten einen Zusammenhang mit dem gehäuften Auftreten von extramedullären Manifestationen und einer insgesamt schlechteren Prognose fest (Byrd JC, 1995; Iizuka Y, 1993; Baer MR, 1997), andere konnten keinen klinisch relevanten Zusammenhang mit der NCAM-Expression beobachten (Thomas X, 1995; Seymour JF, 1994). Bisher wurde aber nicht untersucht, ob die Menge NCAM-positiver Zellen in AML-KM-Proben Einfluss auf die progressfreie Überlebenszeit hat. In dieser Arbeit konnte der größte Unterschied in der Dauer der progressfreien Überlebenszeit und der Rezidivhäufigkeit schon bei einem Anteil von 8% NCAM-exprimierender Blasten im Auswertefenster festgestellt werden. Eine Expressionshäufigkeit von 8% stellt allerdings einen Wert dar, der entsprechend der EGIL-Empfehlungen noch als negativ gewertet werden würde, doch offensichtlich hat schon ein geringer Anteil NCAM exprimierender Zellen im Auswertefenster Einfluss auf den klinischen Verlauf der Patienten. Da sich anhand der Dot-Blot-Bilder die NCAM-positiven Zellen innerhalb der Blastenpopulation verteilen, ließ sich dieser geringe Anteil NCAM-positiver Zellen nicht nur der Lymphozyten- bzw. der NK-Zell-Population zuordnen. Der Altersmedian lag in beiden Gruppen (< und > 8% NCAM) unter 60 Jahren, die Blastenzahlen waren ebenfalls vergleichbar. Auch die Verteilung der Mitglieder der verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen war weitestgehend vergleichbar, so dass man anhand der Bestimmung des Karyotyps allein nicht auf die geringere progressfreie Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten, deren Anteil NCAM-exprimierender Blasten >8% im Auswertefenster war, hätte schließen können.

Obwohl der UPA-R bei soliden Tumoren mit einer kurzen progressfreien Überlebensdauer korrelierte (Schmitt M, 1997), konnten wir bei der AML diese Relation nicht feststellen. Im Gegenteil hierzu zeigte es sich – wenn auch nur fast signifikant – dass Patienten, bei denen sich >26% UPA-R-positiv Zellen messen ließen, eine höhere Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben hatten. Da auch der UPA-R v.a. innerhalb des FAB-Typs M5 exprimiert wird, müssen die Ergebnisse sicherlich mit Rücksicht darauf beurteilt werden, dass sich nur ein Patient des FAB-Typs M5 im untersuchten Patientenkollektiv befand. Zudem zeigte sich in der Gruppe, die den günstigeren Verlauf und >26,5% UPA-R-positiver Blasten aufwies, deutlich weniger ungünstige Karyotypanomalien als in der Vergleichsgruppe. Der Altersmedian (beide < 60 Jahre) war in beiden Gruppen vergleichbar.

Zusammenfassend konnte v.a. das Adhäsionsmolekül NCAM als ein karyotypunabhängiger Prognosemarker für kurzes, progressfreies Überleben gefunden werden. Bei den anderen kostimulatorischen Molekülen zeigte sich, dass eine hohe Expression mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für die Dauer des progressfreien Überlebens einhergeht. Doch meist waren die Fallzahlen in diesen Gruppen sehr klein oder anhand anderer prognostisch relevanter Parameter (Alter, Karyotyp) konnte der ungünstigere klinische Verlauf der Patienten bereits erwartet werden, so dass sich durch die Bestimmung dieser Marker keine zusätzliche Aussage über die Prognose des einzelnen Patienten treffen ließ. So sollten auch bei den Adhäsionsmolekülen weitere prospektive, klinische Studien mit höherer Fallzahl durchgeführt werden, um die prognostische Relevanz dieser Ergebnisse nochmals zu evaluieren.

5.3.2.3. Trotz Korrelation von Mac-1, L-Selektin und PRR-1 mit den zytogenetischen Risikogruppen besteht kein Einfluss auf die Dauer des progressfreien Überlebens.

Obwohl die Expression von L-Selektin, Mac-1 und PRR-1 signifikant mit den zytogenetischen Risikogruppen korrelierte, konnten bezüglich ihrer Expression keine signifikanten Unterschiede im progressfreien Überleben festgestellt werden. Es zeigte sich beim L-Selektin zwar, dass eine niedrigere Expression (<30%) tendentiell mit einer schlechteren Prognose einhergeht, allerdings waren die Ergebnisse –wahrscheinlich wegen kleiner

Fallzahlen - nicht signifikant ($p=0.43$, Log-Rank-Test). Weiterhin fiel auf, dass nur einer von sechs Patienten (16%) mit $> 30\%$ Selektin-exprimierender Blasten verstorben ist, während sieben von 15 Patienten (43%) mit $= 30\%$ positiven Blasten nach 3,5 Monaten verstorben sind. Extermann M et al. (1998) berichteten, dass erhöhte Serumspiegel von L-Selektin bei AML mit einer kürzeren Remissionsdauer und einem kürzeren Gesamtüberleben einhergingen. Um die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen von Extermann M et al. zu vergleichen, wäre es daher interessant, herauszufinden, ob AML-Blasten, die eine niedrige L-Selektin-Expression aufwiesen, bereits verstärkt L-Selektin abgespalten (Shedding) haben und man dadurch die schlechte Prognose bei erhöhten Serumspiegel von löslichen L-Selektin sowie bei niedriger L-Selektin-Expression erklären könnte.

Aus dem Vergleich der in unserer Arbeit auf Mac-1 Expression untersuchten 45 AML-Fälle rezidierten in der Mac-1+ Gruppe 25% der Patienten nach durchschnittlich 4,7 Monaten, 43% der Mac-1- Patienten nach durchschnittlich 6,5 Monaten. Die Todesrate lag in beiden Gruppen bei 42%, wobei Mac-1+ Patienten deutlich früher verstarben (44d vs 88d). Anhand der Cut-off Analysen wurde zudem untersucht, ob die Menge der Mac-1 exprimierenden Blasten in der Blastenpopulation Einfluss auf die progressfreie Überlebenszeit habe und auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Der Einfluss der Expression des Mac-1 (CD11b) auf Blasten wurden bereits von mehreren Arbeiten untersucht und die Ergebnisse sind widersprüchlich. In multizentrischen Studien mit großen Fallzahlen (Bradstock K, 1994, $n=168$; Paietta E, 1998, $n= 382$) wurde der positiven Expression von Mac-1 eine ungünstige prognostische Bedeutung in Hinblick auf Remission, progressfreie Überlebenszeit und Gesamtüberleben zugeordnet, andere Arbeiten zeigte dass v.a. auch bei der klinisch ungünstiger verlaufenden sekundären AML eine höhere Mac-1 Expression beobachtet werden konnte (Rosenfeld C, 2001) und umgekehrt die prognostisch günstige PML durchwegs negativ für Mac-1 war (Thien HF, 1995). Tucker J (1990) , Callea V (1991) zeigten dagegen keine Korrelation mit dem klinischen Verlauf, während Amirghofran Z, 2001 sogar eine signifikante Korrelation zwischen einer Mac-1 Expression und einem *günstigen* klinischen Verlauf (Remissionsrate, Überlebenszeit) aufzeigen konnte. Auch in unserer Arbeit beobachteten wir eine signifikante Korrelation der Mac-1-Expression mit den zytogenetischen Risikogruppen, wobei der Mac-1 innerhalb der $t(15;17)$ nicht und nur selten innerhalb der $inv(16)$ -Leukämien exprimiert wurde. Aus dem Vergleich mit dem tatsächlichen klinischen Verlauf der Patienten zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede bzgl Remissionsrate oder Todesrate, wobei die Mac-1 positiven Patienten , wenn auch nicht häufiger, aber durchwegs nach kürzerer Zeit rezidierten bzw verstarben. Bezüglich der Rezidivrate zeigten sich auch keine direkten Korrelationen mit den prognostischen Risikogruppen, was zum einen erklärt, warum auch keine wesentlichen Unterschiede in der Mac-1 Expresssion bestanden, zum anderen aber auch zeigt, dass Mac-1 keinen vom Karyotyp unabhängigen Prognosefaktor darstellt und demnach gerade in der Gruppe mit zytogenetisch intermediären Risiko keine signifikante prognostische Aussage getroffen werden kann. Damit lässt sich durch die Bestimmung von Mac-1 auf AML-Blasten keine zusätzliche Aussage über Prognose und Verlauf der Patienten treffen, als sie nicht auch durch die mittlerweile routinemäßige Bestimmung des Karyotyps getroffen werden könnte.

5.3.2.4. SCF und FL erhöhen die Expression kostimulatorischer Moleküle auf AML-Blasten in vitro – Einfluss auf progressfreie Überlebenszeit in vivo?

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass die hohe Expression von schon auf Stammzellebene wirksamen Zytokinrezeptoren (FL-R, SCF-R) und die hohe Expression von kostimulatorischen Molekülen (B7-1, B7-2, ICAM, NCAM) einen ungünstigen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben hat. Die Expression von Adhäsionsmolekülen wird über Zytokine und deren Rezeptoren reguliert. Mit Hilfe von SCF, FL und GM-CSF können in vitro aus AML-Blasten dendritische Zellen gezüchtet werden. Diese Zytokinkombinationen bewirken unter anderem eine Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle B7-1, B7-2 und ICAM-1 (Bruserud O, 1999). Es liegt nahe, dass die Expression der Rezeptoren für FL und SCF erforderlich ist, damit FL und SCF überhaupt an den AML-Blasten wirken können. Daher könnte nicht nur die Expression kostimulatorischer Moleküle sondern auch die Expression derjenigen Zytokinrezeptoren, deren Stimulation die Expression dieser kostimulatorischen Moleküle erhöht bzw induziert mit einer schlechteren Prognose bezüglich der progressfreien Überlebenswahrscheinlichkeit einhergehen. Dies kann bei der Konzeption neuer Therapieansätze eine Rolle spielen.

5.4. Diagnostische Bedeutung

5.4.1. Die NCAM⁺ Leukämie - eine eigene Entität mit prognostisch schlechtem Verlauf

Da die AML eine sehr heterogene Gruppe bzgl. Klinik und Verlauf darstellt, ist das Ziel jeder Klassifikation, biologische Subtypen herauszuarbeiten, die aufgrund prognostischer oder biologischer Eigenschaften unterschiedlich therapeutisch beeinflusst werden können bzw. müssen. Die mittlerweile schon in die Routinediagnostik mitaufgenommenen zytogenetischen Untersuchungen leisten dazu einen wertvollen Beitrag. Da aber nur 1/3 aller Leukämien chromosomale Veränderungen aufweisen, besteht ein Bedarf an zytogenetisch unabhängigen Prognosekriterien, die eine therapeutische Entscheidung über Art und Intensität der Therapie unterstützen können. Von den 18 Markern, die in dieser Arbeit untersucht wurden, korrelierte die Expression des sogenannten NK-Zell-Markers NCAM als einzige sowohl mit einer schlechten Remissionsrate, als auch mit einem kurzen progressfreien Überleben. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass der Nachweis einer NCAM-Expression auf AML-Zellen gehäuft mit dem Auftreten von extramedullären Manifestationen wie z.B. Myeloblastom (Iizuka Y, 1992) und Hautmanifestationen (Kuwabara H, 1999) einhergeht. Seymour JF et al (1994), die immerhin 314 AML-Patienten bzgl. NCAM Expression untersuchten, stellten die höchste NCAM-Expression innerhalb des FAB-Typs M5 fest, allerdings konnten sie keine Korrelation mit extramedullären Manifestationen beobachten. Baer MR et al (1997) konnten bei der AML-ETO und Scott AA et al (1994) bei der M3 einen NCAM-positiven Subtyp herausarbeiten, der schlecht auf die Therapie ansprach und mit einem kurzem progressfreien Überleben einherging. Unsere Arbeit zeigte, dass bei 93 untersuchten Fällen NCAM auf durchschnittlich 20% der Blasten exprimiert wird, wobei die höchste Expression bei der M5 und die niedrigste Expression bei der M3 beobachtet wurde. Die von uns durchgeführten Cut-off-Analysen zeigten, dass die Expression von NCAM schon auf nur 8% der KM-Zellen innerhalb des Auswertefensters prognostisch signifikanten Einfluss auf das progressfreie Überleben der Patienten hatte.

Im folgenden soll kurz der Verlauf der hier untersuchten „NCAM⁺ AML“ skizziert werden. Zehn Patienten, die nach dem AML-CG-Protokoll behandelt worden waren, waren NCAM positiv. Von diesen zehn Patienten erreichten aber nur vier (40%) eine Remission. Neun Patienten wiesen >8% NCAM-positive Zellen auf und von diesen Patienten rezidierten sechs (63%) nach durchschnittlich 6 Monaten. Die NCAM-positive-AML zeigt damit einen ähnlich schlechten Verlauf wie prognostisch ungünstige Karyotypen. Gestützt durch die Ergebnisse anderer Arbeiten, empfehlen wir NCAM in die Routinediagnostik als Karyotyp unabhängigen Prognosemarker mitaufzunehmen, da bei diesen Patienten - unabhängig vom Karyotyp - eine intensivere Therapie angezeigt ist.

5.4.2. Diagnostik der minimalen Residualleukämie

Durch die Doppelinduktionstherapie konnte in den letzten Jahren nicht nur die Remissionsrate, sondern auch die Dauer der progressfreien Überlebenszeit verbessert werden. Dennoch rezidivieren immer noch 40-60% der AML-Patienten innerhalb von drei Jahren. Dies wird auf die Anwesenheit residueller Leukämiezellen zurückgeführt, die mit den üblichen zytomorphologischen Methoden nicht nachgewiesen werden können. Für die immunzytologische Diagnostik der minimalen Residualleukämie ist es entscheidend, Oberflächenantigene zu finden, die für den malignen Blastenklon spezifisch sind und auf normalen Progenitorzellen nicht oder nur kaum nachweisbar sind. Dabei gibt es nur wenig singuläre leukämiespezifische Oberflächenmoleküle, so dass in der Regel mittels Drei-Farben-Durchflusszytometrie Antigen-Koexpressionen nachgewiesen werden müssen, die normalerweise nicht auf gesunden hämopoetischen Vorläuferzellen vorkommen. In 25% der Fälle ist die Messung von Antigenkoexpressionen mangels molekulargenetischer Marker die einzige Nachweismöglichkeit für ein MRD (Danhauser-Riedl S, 1999). Da in dieser Arbeit keine Antikörperkoexpressionen ausgewertet wurden, können nur Marker identifiziert werden, die sich als Kombinationspartner mit anderen Antigenen eignen könnten. Aus unseren Ergebnissen, geht hervor, dass mögliche Kombinationspartner zur Diagnostik der minimalen Residualleukämie der FL-R, SCF-R, IL-3-R, G-CSF-R, UPA-R, NCAM, B7-1 und B7-2 darstellen könnten. All diese Marker wurden im gesunden KM nur sehr gering exprimiert, während sie auf AML-Blasten in variabler Häufigkeit gefunden wurden. Die deutlichsten Unterschiede zeigten sich dabei beim SCF-R und IL-3-R. Jordan CT et al (2000) stellten fest, dass der IL-3-R nicht auf gesunden hämopoetischen CD34⁺Stammzellen gefunden wird, und dass sich der Nachweis von IL-3-R als Marker für Stammzellen des malignen Zellklons eignet. Auch NCAM eignet sich in Kombination mit CD34/ CD33 zur MRD-Diagnostik (Coustan-Smith E, 1993; Danhauser-Riedl S, 1999). Da die Expression von Zytokinrezeptoren, als auch von Adhäsionsmolekülen stark reguliert ist, bleibt es fraglich ob diese Oberflächenantigene auch stabil den Immunphänotyp eines Blastenklons charakterisieren, oder ob sie nur Ausdruck des momentanen Zytokinmilieus sind, in dem sich die Blasten im KM

befinden. Daher ist es wichtig festzustellen, wie sich die oben aufgeführten Rezeptoren nach Chemotherapie oder Zytokintherapie hinsichtlich ihrer Expressionsdichte verändern. Ebenso muss untersucht werden, wie sich die Expression der Oberflächenmoleküle in gesunden KM-Proben nach der Gabe von Zytokinen oder im Rahmen regenerativer Prozesse (z.B. nach Anämie) verhält.

5.5. Therapeutische Relevanz

5.5.1. Therapeutische Beeinflussbarkeit von Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit und die anderer Untersuchungen zeigen, dass ein hoher Anteil **FL-R exprimierender Blasten** und möglicherweise auch die damit verbundenen intrazellulären Phosphorylierungen eine Rolle bei der Progression der AML zu spielen scheinen. Daher könnte es therapeutisch relevant sein, die Expression des FL-R auf AML-Blasten zu reduzieren bzw. die Wirkung von FL auf AML-Blasten zu antagonisieren. Interessant sind hierzu die erst kürzlich publizierten in vitro Untersuchungen von Xu ZX et al (2001): Sie beobachteten, dass durch die Gabe von Dexamethason die Expression von FL-R auf AML-Blasten herunterreguliert wurde und konsekutiv die Proliferation der Blasten unter FL-Stimulation abnahm. Auf der Basis dieser Arbeit wäre ein Studienansatz in vivo mit Dexamethason interessant, der zum einen die FL-R Expression auf AML-Blasten vor und nach der Gabe von **Dexamethason** untersucht. Werden diese auch in vivo herunterreguliert, so könnte ein erfolgversprechender Therapieansatz sein, durch eine Nachbehandlung mit Dexamethason (zusätzlich zur standardisierten Konsolidierungstherapie) die Dauer des progressfreien Überlebens zu verlängern. Dieser Ansatz müsste allerdings im Rahmen einer Studie erst untersucht werden. Eine weitere bisher v.a. für die Regulation des **SCF-R** (und bcr-abl) interessante therapeutische Einflussmöglichkeit stellen Medikamente dar, die selektiv Tyrosinkinasen hemmen (2-Phenylpyrimidinderivat STI571). Diese werden bereits bei der CML, bei gastrointestinalen Stromatumoren, die eine hohe SCF-R Expression aufweisen, und dem SCF-R positiven kleinzelligen Lungenkarzinom in klinischen Studien (Phase II) mit Erfolg eingesetzt (Hochhaus A, 2001). (siehe auch Tabelle 5.5.1)

Auch bereits in der (Standard-)Therapie verwendete Medikamente haben Einfluss auf die Expression von Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle: Durch ein Überangebot von **ATRA** in der Zelle wird die Repression von Differenzierungsantigenen aufgehoben und Promyelozyten können ausreifen. In vitro Untersuchungen zeigten auch einen Einfluss der ATRA-Therapie auf die Expression von Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen. DeGentile A et al (1994) zeigten, dass nach Behandlung mit ATRA hoch affine GM-CSF-R auf den Promyelozyten-Blasten exprimiert werden. DiNoto R et al. (1996) beobachteten, dass ATRA die Adhäsionsmoleküle CD11b und CD54, beide normalerweise kaum bei der APL exprimiert, hochreguliert. Dieser Aspekt trägt dazu bei, dass die Hochregulation dieser Moleküle unter ATRA-Therapie auch als Ausdruck der Reifung und des Heilungsprozesses gesehen werden kann.

5.5.2. Gezieltes Priming

Die Zytokine **G-CSF** und **GM-CSF** werden mittlerweile routinemäßig in der Klinik eingesetzt. Dabei unterscheidet man den Einsatz vor bzw während vom Einsatz nach der Induktionstherapie. Ersteres wird „Priming“ genannt. Ruhende, nicht proliferierende Blasten sollen in die Chemotherapeutika-sensible S-Phase gebracht werden, um die Toxizität von in der S-Phase wirksamen Medikamenten wie z.B. AraC auf die AML-Blasten zu steigern. Allerdings wurde befürchtet, dass auch gesunde, hämopoetische Vorläuferzellen gegen Chemotherapeutika sensibilisiert und dadurch die für den Patienten gefährliche Aplasiaphase bis zur hämatologischen Rekonstitution verlängert werden könnte. In den bisher durchgeführten klinischen Studien wurde dieses Problem kaum beobachtet, allerdings konnte sich ein eindeutiger Benefit auf die Remissionsrate und auf das Gesamtüberleben nicht abzeichnen und in einigen Studien wurde sogar ein negativer Effekt auf das Gesamtüberleben beobachtet (Übersichtsarbeiten von Rowe JM, 1999; Johnson RE, 1997). Insgesamt sind die Ergebnisse zum Teil sehr kontrovers und schwer vergleichbar, was auch an dem sehr unterschiedlichen Patientenkollektiven (Alter, zytogenetische Risikogruppe, Krankheitsstadien) liegen mag. In keiner Studie wurde bisher vor der Wachstumsfaktor-Applikation untersucht, ob und wie häufig die Leukämiezellen überhaupt Rezeptoren für die jeweiligen Wachstumsfaktoren (G-CSF-R oder GM-CSF-R) exprimierten. Ebensowenig wurde deren Funktionalität im Vorfeld der Therapie untersucht. In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass

Leukämien, die der granulozytären Zellreihe zugeordnet werden, v.a. G-CSF-R, während monozytäre Leukämien v.a. GM-CSF-R exprimierten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Rezeptoren v.a. auf denjenigen Leukämie-Subtypen exprimiert werden, deren maligner Zellklon bis zu einer höheren Differenzierungsstufe ausgereift war. Gesunde Stammzellen exprimieren G- und GM-CSF-R in der Regel nicht, so dass ein Priming-Effekt auf diese Zellen relativ unwahrscheinlich ist, womit die bisher nicht beobachtete, verlängerte hämatologische Rekonstitutionszeit nach Priming erklärt werden könnte. Entsprechend der Rezeptorverteilung von G- und GM-CSF innerhalb der verschiedenen Subtypen der AML, kann vermutet werden, dass Leukämien, die v.a. den G-CSF-R exprimieren (v.a. FAB-Typ M2 und M3) ein Priming mit G-CSF, während monozytäre Leukämien (FAB-Typ M4 und M5) ein Priming mit GM-CSF erhalten sollten (Motoji T, 1991) (siehe Tabelle 5.5.1). Da GM-CSF in vitro die selektive Aufnahme von AraC in die Blasten fördert (Hiddemann W, 1992; Reuter C, 1994), können diese Patienten nicht nur von einem gezielten Priming, sondern möglicherweise auch von einer gezielteren Aufnahme des AraC in die Blasten profitieren. Zudem können autokrine Stimulationsmechanismen durch externe GM-CSF-Applikation unterbrochen werden (Rowe JM, 1999). Nicht unkritisch ist jedoch der Einfluss von GM-CSF, G-CSF und IL-3 auf die Apoptose der AML-Blasten zu betrachten. Lotem I et al (1989) berichteten, dass in vitro durch die Zugabe von oben aufgeführten Zytokinen die TGF β 1-induzierte Apoptose von AML-Blasten verhindert wurde. Der Wirkmechanismus vieler in Standardtherapien eingesetzter Chemotherapeutika, wie z.B. Vincristin, Adriamycin, Daunorubizin und AraC beruht auch auf einer Apoptoseinduktion der AML-Blasten. Dadurch könnte die Wirkung von Chemotherapeutika durch ein Zytokin-Priming nicht nur verstärkt, sondern z.T. auch antagonisiert werden. Doch auch in diesem Zusammenhang wurde bisher nicht untersucht, ob diese Effekte mit der Expression der entsprechenden ZKR auf der Oberfläche zusammenhängen.

In diesem Zusammenhang sei auch der Einsatz von **IL-3** zum Priming bei AML-Patienten erwähnt. Der IL-3-R wird auf den meisten AML-Blasten unabhängig vom FAB-Typ exprimiert, aber nur kaum auf gesunden Stamm- und Progenitorzellen. Durch ein IL-3-Priming wäre ein gezieltes, v.a. die AML-Blasten stimulierendes Priming möglich, während die gesunden Progenitorzellen nur wenig gegen die Chemotherapie sensibilisiert werden würden. Allerdings proliferierten in vitro unter IL-3 nur ca. 65% der AML-Zellen (Budell LM, 1989; Nowak R, 1999). Zudem exprimieren die meisten AML-Blasten die β -Kette (CD131) des IL-3-R nicht, so dass von einer vollen Funktionalität des Rezeptors nicht ausgegangen werden kann (Jordan CT, 2000). In ersten klinischen Studien wurde IL-3 bereits zum Priming von AML-Blasten eingesetzt (Tafari A, 1995; Wielenga JJ, 1996). Die Ergebnisse zeigten zwar zufriedenstellende, aber dennoch im Vergleich zu GM-CSF und G-CSF nicht überzeugende Ergebnisse für das Erreichen einer Remission, die Remissionsdauer und das Gesamtüberleben.

Auch der Einsatz von **FL** und **SCF** als Primingmedikamente muss kritisch diskutiert werden. Dafür spricht, dass v.a. der SCF-R, aber auch der FL-R – wie in dieser und anderen Arbeiten (Bene MC, 1995) gezeigt - auf dem Großteil der AML-Blasten vertreten ist. Da FL und SCF aber v.a. auf Stammzellebene wirksam sind, scheint ihr Einsatz als Primingmedikamente insofern bedenklich, als dass auch gesunde Stammzellen stimuliert und damit gegen Chemotherapeutika sensibilisiert werden. Grundsätzlich scheint daher der Einsatz von schon auf Stammzellebene wirksamen Wachstumsfaktoren wie FL und SCF und auch der Einsatz in Kombination mit G- oder GM-CSF als Primingmedikamente eher bedenklich zu sein, da eine längere hämopoetische Rekonstitutionszeit zu erwarten ist.

Zusammenfassend liegt es daher nahe, vor einem Priming die Expression der verwendeten ZKR durchflusszytometrisch zu bestimmen und in doppelblinden, placebokontrollierten, entsprechend der Rezeptorverteilung randomisierten Studien die Präinduktionseffekte der entsprechenden Wachstumsfaktoren zu vergleichen. Trotz allem lassen sich aus den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen, keine eindeutigen Schlüsse auf die Funktionalität der Rezeptoren ziehen (Smith MA, 1999). Es sollte daher im Vorfeld oder im Rahmen dieser Studien zudem abgeklärt werden, welchen Einfluss die Wachstumsfaktorstimulation auf die Rezeptorexpression hat (Veränderung des Affinitätsstatus und der Rezeptordichte) bzw. ob ab einer bestimmten Rezeptordichte bzw. Häufigkeit der rezeptortragenden Zellen regelmäßig eine Aussage über deren Funktionalität getroffen werden kann und schließlich auch, ob unterschiedliche Mengen von Wachstumsfaktoren bei vergleichbarer Rezeptorexpression der Blasten unterschiedliche Effekte induzieren. Ebenso sollten die Effekte der Zytokinwirkung im Zusammenhang mit der Expression der zugehörigen Rezeptoren sowohl hinsichtlich einer unterstützenden (mehr Blasten in chemotherapeutikasensibler S-Phase, selektive AraC-Aufnahme), als auch hinsichtlich einer antagonisierenden (Apoptosehemmung) Wirkung untersucht werden.

5.5.3. Verkürzung der Neutropeniephase

Am häufigsten werden Zytokine derzeit *nach* der Verabreichung einer Chemotherapie eingesetzt, um die gefährliche medulläre Aplasiephase zu verkürzen und gesunde hämopoetische Vorläuferzellen zur Proliferation und Ausreifung anzuregen. Da viele Leukämiezellen ebenfalls funktionale Rezeptoren für CSFs tragen, wurde befürchtet, nicht nur die normalen hämopoetischen Stammzellen, sondern auch Leukämiezellen in ihrem Wachstum zu stimulieren. Dieser Effekt hätte sich in einer verkürzten progressfreien Überlebensdauer niederschlagen müssen, die bisher in den meisten klinischen Studien nicht bestätigt werden konnte (Übersichtsarbeit von Jacob M, 1996). Da in der hier vorgelegten Arbeit gezeigt wurde, dass die Expression von Zytokinrezeptoren linien- und reifegradabhängig ist, könnte durch ein gezieltes Auswählen der entsprechenden Zytokine obige Gefahr im Einsatz in der Supportivtherapie weiter vermindert werden. Idealerweise sollte daher die Zytokinrezeptorexpression auf AML-Blasten nicht nur für das Priming, sondern auch für den Einsatz zur Verkürzung der Neutropeniephase bestimmt werden. Es liegt nahe, dasjenige Zytokin zur Verkürzung der Neutropeniephase einzusetzen, dessen Rezeptor nur gering auf den Leukämiezellen exprimiert wird. Basierend auf dieser Grundlage sollten monozytäre Leukämien (FAB-Typ M4 und M5) eher mit G-CSF und granulozytäre Leukämien (FAB-Typ M1-M3) eher mit GM-CSF behandelt werden (Tab. 5.5.1.) V.a. bei Patienten, bei denen eine noch schnellere hämopoetische Rekonstitution erwünscht ist, werden G-CSF bzw. GM-CSF auch mit IL-3 oder SCF kombiniert, da durch die Stimulation auf verschiedenen Reifestufen der Hämopoese ein additiver Effekt erzielt wird (Hunt P, 1992; Yan XQ, 1994; Eder M; 1997). Gegen den Einsatz von IL-3 ist auf der Basis der bisher publizierten Daten nichts einzuwenden, auch wenn die bisher erzielten Verbesserungen durch Kombination von IL-3 und G-/GM-CSF nicht überzeugend sind (Eder M, 1997). Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sollte der Einsatz von FL oder SCF zur Verkürzung der Neutropeniephase nur vorsichtig oder nur bei bestimmten Patienten erfolgen, da die hohe Expression von deren Rezeptoren mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben korrelierte. Doch ob tatsächlich eine schlechtere Prognose für die Remissionsdauer bei AML-Patienten, die mit FL oder SCF behandelt werden, besteht, müssen zukünftige prospektive, klinische Studien erst noch zeigen.

5.5.4. Differenzierungstherapie mit G-CSF

Ziel der Differenzierungstherapie ist es, den bei der AML bestehenden Reifungsblock zu überwinden. Für die Differenzierung normaler HPZs sind neben anderen Wachstumsfaktoren v.a. G-CSF und GM-CSF verantwortlich, deren Wirkung wiederum von der An- bzw. Abwesenheit bestimmter Rezeptoren abhängt. Weiterhin ist bekannt, dass die Blockade von Transkriptionsfaktoren für Differenzierungsgene ein wesentlicher Pathomechanismus (PML, AML1-ETO) für die Reifungsblockade bei der AML darstellt (Serve H, 2000). Wichtigster Vertreter der Differenzierungstherapie ist die *all-trans*-Retinsäure (ATRA), die bei der Promyelozytenleukämie die APL-Blasten zur Ausreifung bringt. Auch unter G-CSF Stimulation konnte bereits beobachtet werden, dass leukämische Blasten zur Ausreifung gelangen.

Dies wurde bei AML-Rezidiv-Patienten nach KM-Transplantation beobachtet (Giralt S, 1993), wobei allerdings nicht die G-CSF-R-Expression auf den AML-Blasten bestimmt wurde. In der Arbeit von Katayama N et al (1998) wurde unter G-CSF-Therapie die Ausreifung einer ATRA refraktären Promyelozytenleukämie beobachtet (siehe Tabelle 5.5.1.) Katayama stellte - wie es auch die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zeigten - die höchste Expression von G-CSF-R bei der APL fest. Da eine hohe Expressionsdichte des G-CSF-R eine Funktionalität des Rezeptors wahrscheinlich macht (Motoji T, 1991), kann auch anhand unserer Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass gerade Patienten mit dem FAB-Typ M3 oder auch andere Patienten, die eine hohe G-CSF-R Expression auf den Blasten aufweisen, von einer G-CSF Behandlung im Sinne einer Differenzierungsinduktion neben einer potenten Chemotherapie profitieren könnten. Es scheint also nicht nur wegen des Primingeffekts, sondern auch wegen einer möglichen Differenzierung der Blasten sinnvoll zu sein, für einen gezielten Einsatz von G-CSF in der AML-Therapie vor Therapiebeginn die Expression des G-CSF-R im KM zu bestimmen. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass placebokontrollierte, klinische Studien, die den Blastenphänotyp berücksichtigen, eher Benefit-bringende Ergebnisse hervorbringen könnten, als es die vergangenen Studien konnten (Estey EH, 1999).

Tabelle 5.5.1. Mögliche therapeutische Vorgehensweisen bei der AML

FAB-Typ	Bevorzugt exprimierte Oberflächenmarker	Prognose		Mögliche therapeutische Beeinflussung ³			Mögliche Komplikationen
		für Remission	für progressfreies Überleben	Priming ⁴	Verkürzung der Aplasiephase ⁵	andere	
M1	SCF-R G-CSF-R VLA-2	Ungünstig, wenn VLA-2 positiv ¹	Ungünstig, wenn SCF>45,5% ²	G-CSF	GM-CSF	Tyrosinkinasehemmer (zur selektiven Hemmung der Signaltransduktion des SCF-R)	Stimulation des leukämischen Klons
M2	SCF-R G-CSF-R VLA-2	Ungünstig, wenn VLA-2 positiv ¹	Ungünstig, wenn SCF>45,5% ²	G-CSF	GM-CSF	Tyrosinkinasehemmer (s.o.)	Stimulation des leukämischen Klons
M3	G-CSF-R	Günstig	Günstig	G-CSF	GM-CSF	G-CSF für Differenzierung	Stimulation des leukämischen Klons
M4	FL-R GM-CSF-R UPA-R VLA-2 B7-1 B7-2	Ungünstig, wenn UPA-R positiv ¹ Ungünstig, wenn VLA-2 positiv ¹	Ungünstig, wenn FL-R>85,5% ² Ungünstig, wenn B7-1>15% ² Ungünstig, wenn B7-2>65% ²	GM-CSF	G-CSF	Dexamethason (zur Downregulation von FL-R auf den Blasten) CTLA-4-Bockade, rIL-2	Stimulation des leukämischen Klons Blutungsrisiko bei hoher UPA-R-Expression wegen Verbrauch von gerinnungshemmenden Substanzen
M5	FL-R GM-CSF-R UPA-R VLA-2 NCAM B7-2	Ungünstig, wenn UPA-R positiv ¹ Ungünstig, wenn VLA-2 positiv ¹ Ungünstig, wenn NCAM positiv ¹	Ungünstig, wenn FL-R>85,5% ² Ungünstig, wenn NCAM >8% ² Ungünstig, wenn B7-2>65% ²	GM-CSF	G-CSF	Dexamethason CTLA-4-Bockade, rIL-2 zur T-Zell-Stimulation bzw Aufrechterhaltung der T-Zell-Antwort.	Stimulation des leukämischen Klons Blutungsrisiko bei hoher UPA-R-Expression wegen Verbrauch von gerinnungshemmenden Substanzen Extramedulläre Manifestationen gehäuft bei NCAM-Expression

¹ Eine KM-Probe wird als positiv gewertet, wenn mehr als 20% der Zellen im Auswertefenster, den entsprechenden Marker exprimieren

² Mehr als x% der Zellen im Auswertefenster exprimieren den entsprechenden Rezeptor

³ zusätzlich zur Standardchemotherapie der Münsteraner Gruppe (AML-CG-Protokoll)

⁴ Applikation vor oder während Chemotherapie

⁵ Applikation nach Chemotherapie

5.5.5. Immuntherapie

Leukämiezellen können nur dann proliferieren, wenn sie durch das Immunsystem nicht erkannt und eliminiert werden. Bei der Tumorabwehr spielt v.a. die zelluläre Immunantwort eine Rolle. Ziel der Immuntherapie ist es, eine spezifische Immunantwort gegen Leukämiezellen hervorzurufen. Aus AML-Blasten konnten in vitro unter Stimulation mit SCF, FL und TNF α / GM-CSF (u.a.) dendritische Zellen gezüchtet werden, die dann sowohl das Tumorantigen als auch kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Sie stellen geeignetere Stimulatoren der T-Zell-Antwort dar, als die AML Blasten selbst. In vitro konnte bereits gezeigt werden, dass T-Zellen nach Inkubation mit AML-DC sowohl proliferieren, als auch die AML-Blasten zerstören (Harrison BD, 2001). Andere Therapieansätze (z.B. Transfektion von B7-1 Genen) haben das Ziel, durch die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen auf AML-Blasten die körpereigene Immunantwort gegen Leukämiezellen zu steigern. Wie auch in vorausgegangenen Studien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden (Maeda A, 1998; Brouwer RE, 2000), dass B7-2 auf AML-Blasten exprimiert wird und zwar v.a. auf den monozytären Subtypen. Bisher war vermutet worden, dass B7-1 nur kaum auf AML-Blasten exprimiert wird (Brouwer RE, 2000, Maeda A, 1998, Hirano N, 1996), doch mit dem von uns verwendeten mAk konnte auch B7-1 auf einem Teil der AML-Fälle nachgewiesen werden. Die für eine Immunantwort zunächst günstig erscheinende hohe Expression von kostimulatorischen Molekülen bei der AML korrelierte mit einer schlechteren Prognose. Dass in vivo durch die dauerhafte Hochregulation dieser kostimulatorischen Moleküle möglicherweise durch Hochregulation von das Immunsystem inhibierenden Faktoren (z.B. CTLA-4) eine – nicht erwünschte – Toleranz des Immunsystems gegen AML-Blasten eintritt, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Möglicherweise kann die Kombination mit immunstimulatorischen Zytokinen wie IL-2 oder CTLA-4-blockierenden Antikörpern diese Entwicklungen verhindern. So konnte doch bei einigen rezidierten AML-Fällen eine Therapie mit rekombinantem IL-2 zur Remission der Patienten führen (Maraninchi D, 1998) oder eine verlängerte progressfreie Überlebenszeit beobachtet werden (Cortes JE, 1999) (siehe Tabelle 5.5.1.)

5.6. Bedeutung veränderter Zytokinrezeptor und Adhäsionsmolekülen - Expression für die Biologie der AML

5.6.1. Unkontrollierte Proliferation aufgrund erhöhter Zytokinrezeptor-Expression?

Leukämische Blasten sind charakterisiert durch unkontrollierte Proliferation und Reifungsblockade. Proliferation wird vor allem über Wachstumsfaktoren gesteuert, deren Wirkung von der Anwesenheit von Rezeptoren auf der Oberfläche der Blasten, aber auch von der Funktionalität (Affinitätsstatus, Signaltransduktion) und von den Fähigkeiten der Zellen, die Information auf DNA-Ebene umzusetzen (Transskriptionsfaktoren, ras-Onkogene), abhängt. In unserer Arbeit wurde lediglich die erste Bedingung für die Wirksamkeit von Zytokinrezeptoren untersucht, nämlich, ob die entsprechenden Wachstumsfaktoren auf der Oberfläche der Zellen exprimiert werden. Da allein aus der Expression von Rezeptoren nicht auf deren Funktionalität geschlossen werden kann und damit eine Einordnung in die Biologie der AML schwierig ist, sollen in den nachfolgenden Abschnitten, die hier vorgestellten Ergebnisse zusammen mit den bereits publizierten Daten über die Funktionalität der Rezeptoren und der ebenfalls in dieser Arbeit ausgewerteten klinischen Relevanz – soweit möglich - in die Biologie der AML eingeordnet werden.

In mehreren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass viele AML-Zellen nicht nur den FL-Rezeptor exprimieren, sondern dass auch durchschnittlich 57% aller AML-Proben in vitro unter Stimulation mit FL proliferieren (Piacibello W, 1995; Dehmel U, 1996; Drexler HG, 1996). Außerdem zeigten sich synergistische Effekte mit G-CSF, GM-CSF, IL-3, SCF (Piacibello W, 1995; Lisovsky M, 1995). Bei ca. 20% der AML-Fälle fand man eine internale Tandemduplikation der juxtamedullären Domäne des FL-R, wodurch die rezeptortragenden Zellen ligandunabhängig stimuliert werden. AML-Patienten mit dieser Veränderung wiesen einen schlechteren klinischen Verlauf auf (Kiyoi H, 1999; Kottaridis PD, 2001; Iwai T, 1999). In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die höchste FL-R-Expression in der Gruppe der AML-M5 zu beobachten war. Dies korreliert mit den Befunden von McKenna HJ et al (1996), die feststellten, dass Leukämiezellen des FAB-Typs M5 von Kindern am häufigsten auf FL-Stimulation proliferieren. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass AML-Blasten in Abhängigkeit von der Häufigkeit der FL-R-Expression auf FL-Stimulation reagieren. Weiterhin ist bekannt, dass Patienten des FAB-Typs M5 den unerfreulichsten klinischen Verlauf aufweisen und es stellt sich daher die Frage,

ob dieser unerfreuliche klinische Verlauf durch die erhöhte FL-R-Expression bei der M5 bedingt sein könnte. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit ergaben keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der FL-R-Expression und dem Therapieansprechen, allerdings wiesen diejenigen Patienten, bei denen mehr als 85,5% der KM-Blasten den FL-R exprimierten, ein deutlich kürzeres, progressfreies Überleben auf. Folglich scheint nicht nur die Expression, sondern die Häufigkeit der FL-R Expression und die damit verbundene, gesteigerte Phosphorylierung von Tyrosinkinasen, wie bei der internalen Tandemduplikation auch, die Progression der Erkrankung negativ zu beeinflussen - sei es durch direkte Stimulation der AML-Blasten selbst oder durch synergistische Effekte zusammen mit anderen Zytokinen.

Auch beim SCF-R wurde von einigen Arbeiten das Konzept vertreten, dass die Expression des SCF-R durch Proliferationssteigerung (Broudy VC, 1992; Ikeda H, 1991; Pietsch T, 1992) und der damit verbundenen längeren Überlebensdauer von AML-Blasten (Caceres-Cortes J, 1994) einen Einfluss auf die Pathogenese der AML und damit auch auf den Verlauf der Erkrankung im Sinne einer schlechteren Prognose (Ashman LK, 1988) habe. In den meisten Arbeiten mit größeren Fallzahlen konnte aber keine Korrelation zwischen der Expression des SCF und dem klinischen Verlauf festgestellt werden (Schwarz S, 1999; Lauria F, 1995; Reuss-Borst MA, 1994). Alle diese Arbeiten untersuchten den klinischen Verlauf lediglich in Bezug auf das Kriterium der Positivität (>20% SCF-R-positive Blasten). Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zeigten, dass ein höherer Anteil SCF-R-exprimierender Zellen innerhalb der Blastenpopulation mit einem schlechteren klinischen Verlauf einhergeht. Allerdings verhält sich die relative Rezeptordichte auf den einzelnen AML-KM-Zellen genau umgekehrt wie der Anteil der SCF-R exprimierenden Zellen innerhalb der untersuchten Zellpopulation. Eine hohe SCF-R-Dichte auf den einzelnen Zellen korrelierte mit einem günstigen, zytogenetisch ermittelten Prognose (höchste SCF-R-Dichte im FAB-Typ M3). Dies deutet darauf hin, dass zwar der Anteil SCF-R-exprimierender Zellen einen negativen Einfluss, die Rezeptordichte auf den einzelnen (wenigen) Zellen allerdings einen eher günstigen Einfluss auf Prognose hat. Möglicherweise handelt es sich bei diesen wenigen Zellen nicht um Blasten, sondern um gesunde Stammzellen, doch dies müssen zukünftige Untersuchungen hinsichtlich einer Koexpression weiterer Stammzellmarker erst noch bestätigen. Einige Arbeiten haben gezeigt, dass durchschnittlich ca. 60% der AML-Blasten auf in vitro-Stimulation mit SCF proliferieren (Kubota A, 1994; Broudy VC, 1992; Stacchini A, 1996). Zur Beurteilung der Funktionalität des SCF-Rs in Bezug auf die Biologie der AML sind daher weitere funktionale Analysen erforderlich, die die Funktionalität der Rezeptoren mit dem Verlauf der Erkrankung korrelieren.

Aus dem Ergebnis dieser Arbeit, sowie auch aus Ergebnissen anderer Arbeiten (Budel LM, 1989; Koubek K, 1998; Jordan CT, 2000; DeWaele M, 2001; Munoz L, 2001) zeigte sich, dass fast alle AML-Blasten im Gegensatz zu den gesunden KM-Zellen häufig die α -Kette des IL-3-R exprimieren. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Stimulation des IL-3-R eine Rolle in der Biologie der AML spielen könnte. Zunächst fiel auf, dass die meisten AML-Blasten negativ für die β -Kette (CD131) des IL-3-Rezeptors waren, ohne die der IL-3-R nur mit niedriger Affinität an IL-3 bindet (Jordan CT, 2000). Die normale intrazelluläre Signaltransduktion des IL-3-R führt zu einer Phosphorylierung von Mek-1-, Akt-, Stat-5-Proteinen. Nach Stimulation der AML-Blasten mit IL-3 ließ sich allerdings mittels Immunoblot kein Anstieg dieser Proteine feststellen (Jordan CT, 2000). Andere Arbeiten beobachteten dagegen nach Stimulation der AML-Blasten mittels IL-3 in vitro ein verstärktes Koloniewachstum (Budel LM, 1989; Tsuzuki M, 1997; Nowak R, 1999). Dies könnte allerdings auch mit alterierten in vitro-Bedingungen zusammenhängen oder aber andere Proteine, die ebenfalls einen wachstumssteigernden Effekt haben, werden durch die Signaltransduktion der α -Kette des IL-3-R phosphoryliert. Zusammenfassend bleibt es daher unklar, warum die α -Kette des IL-3-R auf AML-Blasten exprimiert wird. Ein möglicher Mechanismus könnte die aberrante Expression von Transkriptionsfaktoren sein, die zu einer gesteigerten Synthese des CD123 führt, ohne dass diesem pathologische Bedeutung beigemessen werden muß. Im Einklang mit dieser These stehen die in der hier vorgelegten Arbeit vorgestellten Ergebnisse, in denen gezeigt werden konnte, dass die Häufigkeit der IL-3-R-Expression auf AML-Blasten keine klinische Relevanz zu haben scheint.

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass in vitro unter GM-CSF-Stimulation AML-Blasten proliferieren (Schmetzer HM, 1999; Budel LM, 1992; Faussat-Suberville AM, 1993). In einigen Arbeiten wurde auch eine Ausreifung der AML-Zellen beobachtet (Schmetzer HM, 1999; Schmetzer HM, 1996; Faussat-Suberville AM, 1993). Lediglich in der Arbeit von Budel LM et al (1992) wurden nicht nur der Effekt von GM-CSF auf AML-Blasten untersucht, sondern die Effekte auch mit der Expression des GM-CSF-R auf AML-Blasten verglichen und es wurde festgestellt, dass alle Blasten (3/5 der untersuchten Fälle), die unter GM-CSF proliferierten, auch den GM-CSF-R exprimierten. Trotz vergleichbarer GM-CSF-R-Expression proliferierten einige Blasten dagegen unter GM-CSF-Stimulation nicht. Von Cannistra SA et al. (1990) wurden bereits zwei Arten von GM-CSF-R mit unterschiedlicher Affinität und Funktionalität (Klasse I und Klasse II) beschrieben, die abhängig vom Reifegrad in unterschiedlicher Anzahl auf den normalen hämopoetischen Zellen vorkommen. Diese beiden Rezeptoren reagieren unterschiedlich (Herauf- bzw Herunterregulierung der Rezeptordichte) auf GM-CSF-Stimulation. Diesen

Effekt konnten Lanza F et al (1997) auch auf AML-Blasten nachweisen, ohne diesen jedoch auf unterschiedliche Expression von Rezeptorsubtypen zu beziehen. In 70% der untersuchten AML-Fälle wurde auch eine autokrine Stimulation der Blasten durch eigen-sezernierte Zytokine, v.a. GM-CSF beschrieben (Rogers SY, 1994) und diesem Effekt eine pathologische Bedeutung bei der AML beigemessen, da Patienten mit autonomen Blastenwachstum eine schlechtere Prognose aufwiesen. Es ist daher schwierig die Bedeutung einer hohen bzw. niedrigen Expression des GM-CSF-R für die Biologie der AML abzuschätzen, da sich anhand der in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen weder eine Aussage über die Funktionalität der Rezeptoren noch über die autokrine GM-CSF-Sezernation der AML-Blasten selbst treffen läßt. Auch aus den bisher veröffentlichten Arbeiten geht nicht hervor, welcher Rezeptortyp auf AML-Blasten einen Proliferations-, welcher einen Differenzierungseffekt hat, wie die Verteilung auf den verschiedenen Subtypen der AML ist, ob die autokrine GM-CSF-Stimulation bei unterschiedlicher Häufigkeit der entsprechenden Rezeptortypen unterschiedliche Effekte haben. Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse konnte lediglich die Expression des GM-CSF-Rs dem Reifegrad und Linienzugehörigkeit der AML-Blasten in Analogie zur normalen Hämopoese zugeordnet werden. Signifikante Unterschiede in Bezug auf Therapieansprechen und progressfreies Überleben wurden nicht gefunden. Es liegt damit die Vermutung nahe, dass die Expression des GM-CSF-R auf AML-Blasten mehr die verschiedenen Differenzierungsstadien bei der AML widerspiegelt, als dass ihr eine pathologische Bedeutung in der Biologie der AML beigemessen werden könnte. Dennoch werden weitere funktionale Analysen erforderlich sein, um die Funktionalität der GM-CSF-R-Expression endgültig zu beleuchten, umso mehr da GM-CSF bereits routinemäßig zur Verkürzung der Neutropeniephase bei der Behandlung der AML eingesetzt wird.

5.6.2 Verminderte Maturation aufgrund verminderter Expression von GM-CSF-R und G-CSF-R?

Ein wesentlicher Pathomechanismus bei der AML ist die Proliferation **unreifer** myeloider Vorläuferzellen. Es stellt sich daher die Frage, warum diese Zellen nicht ausreifen. Bislang ist nicht geklärt, ob der direkte Zellkontakt mit Stromazellen und KM-Matrix selbst wachstums- und differenzierungsregulierende Signale an die adhärenenden Zellen weitergibt oder ob die Zelladhäsion die Vorläuferzellen in einer geeigneten Knochenmarksnische hält, in der entsprechende Wachstumsfaktoren und Nährstoffe bereitgestellt werden. Weiterhin ist unklar, ob es im Knochenmark zu einer verminderten Produktion von differenzierungsfördernden Wachstumsfaktoren kommt, oder ob die Blasten selbst eine verminderte Anzahl von Rezeptoren für diese Wachstumsfaktoren exprimieren. Mittlerweile ist bekannt, dass die Blockade von Transkriptionsfaktoren für Differenzierungsgene einen wesentlichen Pathomechanismus (PML, AML1-ETO) für die Reifungsblockade darstellt (Serve H, 2000). Für die Differenzierung der Vorläuferzellen verantwortlich sind in der granulozytären Differenzierungslinie v.a. der G-CSF, in der monozytären und - wenn auch weniger - in der granulozytären Differenzierungslinie der GM-CSF. In dieser Arbeit - wie auch in bereits vorausgegangenen Arbeiten - konnte gezeigt werden, dass der G-CSF-R (Shimoda K, 1992; Shinjo K, 1997) wie auch der GM-CSF-R (Koubek K, 1998; Lanza F, 1997) in Abhängigkeit von der Reifungsstufe und Linienzugehörigkeit in Analogie zur normalen Hämopoese exprimiert wird. Da aus der Expression des jeweiligen Rezeptors nicht auf dessen Funktionalität geschlossen werden kann (Budell LM, 1989; Lanza F, 1997), zeigte sich anhand funktioneller Untersuchungen in vitro, dass unter GM-CSF-Stimulation ca. 2/3 der GM-CSF-R tragenden Blasten proliferieren (Budell LM, 1989) und auch differenzieren (**Schmetzer H, 1999**). Beim G-CSF-R konnten Motoji T et al (1991) feststellen, dass eine hohe Expressionrate mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zur Stimulierbarkeit der Zellen einherging und schließlich konnten Katayama N et al (1998) zeigen, dass Promyelozyten des FAB-Typ M3 die höchste G-CSF-R Expression aufwiesen, die höchste Proliferationsrate unter G-CSF-Stimulation zeigten und in vivo die Promyelozyten eines FAB-M3-Patienten, der auf ATRA-Therapie nicht ansprach, unter G-CSF-Applikation zur Ausreifung gebracht werden konnten. Dieser direkt antileukämische Effekt von G-CSF konnte auch schon bei AML-Rezidiv-Patienten nach KM-Transplantation beobachtet werden (Giralt S, 1993). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die relative G-CSF-R-Dichte auf den FAB-M3-Blasten von allen FAB-Typen mit Abstand am höchsten war, deutlich höher auch als die relative Rezeptordichte für G-CSF innerhalb der gesunden KM-Zellen, während bei den anderen FAB-Typen, die Expressionsdichte des G-CSF-R eher geringer war. Daher spielt bekanntermaßen bei der Promyelozytenleukämie weder die verminderte Expression, noch die verminderte Funktionalität des G-CSF-R eine Rolle für die verminderte Ausreifung der Promyelozyten, sondern eine verminderte Transkription von Differenzierungsgenen, die durch ein Überangebot an ATRA aufgehoben werden kann. Möglicherweise kann auch ein Überangebot von G-CSF und dessen Rezeptor auf den AML-Blasten diesen Reifungsblock aufheben. Zusammenfassend scheint die Expression des G-CSF-R auf AML-Blasten den klinischen Verlauf der AML –

Patienten positiv zu beeinflussen und umgekehrt das Fehlen des G-CSF-R mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einherzugehen, unabhängig von der Therapieform innerhalb von 30 Tagen zu versterben (Daten nicht dargestellt).

5.6.3 Verminderte Immunantwort trotz Expression kostimulatorischer Moleküle?

Bei der Abwehr von Tumorzellen spielt die zelluläre Immunantwort via T-Zellen, NK-Zellen und LAK-Zellen eine entscheidende Rolle.

Für die Tatsache, warum das Immunsystem Tumorzellen nicht erkennt und eliminiert gibt es mehrere Gründe. Mangelndes Erkennen kann an einem defekten Antigen-Prozessing, an einer fehlenden Expression antigenpräsentierender MHC-Komplexe oder an einem nicht geeigneten Tumorantigen liegen. Mangelnde T-Zellantwort kann auf eine Dysfunktion der T-Zellen, auf eine Produktion von das Immunsystem inhibierender Faktoren durch die AML-Blasten selbst oder auf eine verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle zurückzuführen sein (Hirano N, 1996). In dieser Arbeit wurden die für die Aktivierung von T-Zellen notwendigen Moleküle ICAM-1, LFA-3, B7-1, B7-2 und die für die Aktivierung von NK- bzw LAK-Zellen notwendigen Moleküle ICAM 1, LFA-3 und NCAM untersucht. ICAM-1 und LFA-3 wurden dabei ähnlich häufig in gesunden KM-Proben als auf AML-Blasten exprimiert. Dagegen wurden B7-1 und B7-2, als auch NCAM deutlich höher bei der AML exprimiert. Patienten, deren KM-Proben NCAM positiv waren, hatten eine signifikant schlechtere Prognose, und zwar sowohl bzgl. Remissionsrate als auch bzgl. progressfreier Überlebenszeit. Bei - bis auf LFA-3 - allen in dieser Arbeit untersuchten kostimulatorischen Molekülen korrelierte eine hohe Expression zwar nicht mit der Remissionsrate, aber mit kürzeren progressfreien Überlebenszeiten. So kann die These, dass bei der AML die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen Ursache für eine verminderte T-Zell-Antwort ist, zumindest bei den in dieser Arbeit untersuchten Molekülen nicht aufrecht erhalten werden (Bruserud O, 2000; Maeda A, 1998). Die Expression dieser Moleküle scheint dagegen einen fast gegensätzlichen, negativen Effekt auf den Verlauf der AML zu haben. Dies wurde bereits von Maeda A (1998) für B7-2 festgestellt. Für die T-Zell-Antwort ist zunächst die Präsentation eines geeigneten Tumorantigens auf MHC-Molekülen notwendig. Fast alle AML-Blasten exprimieren in der Regel MHC I und MHC II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche (Brouwer RE, 2000; Bruserud O, 2001), über die Tumorantigene den T-Zellen präsentiert werden können. Chen L et al. (1994) konnten zeigen, dass bei fehlender Tumorantigenität trotz Expression kostimulatorischer Moleküle keine T-Zell-Antwort erfolgt. Bisher konnte aber nur die durch chromosomale Translokationen entstandenen Fusionsproteine pml/RAR α bei der Translokation t(15;17) (Gambacorti-Passerini C, 1993) und das bcr/abl Fusionsprotein bei der Translokation t(9;22) (und CML) (tenBosch GJA, 1995) als leukämiespezifische Tumorantigene identifiziert werden. Doch auch obwohl Tumorantigenität bei diesen Subtypen bestand, konnten deutlich weniger Leukämie-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (Gambacorti-Passerini C, 1993; Bruserud O, 2001). Verminderte Tumorantigenität würde zwar erklären, warum der Einfluss der Expression costimulatorischer Moleküle keinen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung haben könnte, es erklärt aber nicht, warum die Expression sogar einen negativen Einfluss auf die Remissionsdauer bewirkt.

In einigen Arbeiten wurde auch festgestellt, dass die von aktivierten T-Zellen produzierten Zytokine, wie z.B. GM-CSF, IL-3 das Wachstum der AML-Blasten anregen und dieser Effekt dem antileukämischen, zytotoxischen Effekt der T-Zellen überwiegen würde (Bruserud O, 1996). Die Art der T-Zellantwort (Zytokinsekretion, Zytotoxizität) hängt wiederum von der Länge des präsentierten Antigens ab. Dies wurde bislang bei AML-Blasten noch nicht untersucht. Eine andere Möglichkeit ist, dass die AML-Blasten selbst Mediatoren sezernieren, die die Immunantwort ineffektiv macht, und dies möglicherweise umso mehr, je mehr diese Zellen an die AML-Blasten via kostimulatorischer Adhäsionsmoleküle adhären. So wurde z.B. nachgewiesen, dass AML-Blasten IL-2-R, IL-1-R, die die stimulierenden Effekte von IL-2/IL-1 auf Tumorzellen neutralisieren können, als auch TGF β , der die T-Zell Aktivierung *in vitro* hemmt, sezernieren können. AML-Blasten können aber auch T-Zell-Antworten stimulierende Zytokine (z.B. IL-1, IL-6, TNF α) sezernieren (Übersichtsartikel von Bruserud O, 2001). Weiterhin konnte, wie bei anderen Malignomen auch, nachgewiesen werden, dass auch AML-Blasten FAS-Ligand produzieren können (Lickliter JD, 1998), der bei adhärenenden T-Zellen, die FAS exprimieren, den programmierten Zelltod auslösen kann. Umgekehrt wird aber auch von T-Zellen Fas-Ligand produziert, der wiederum den programmierten Zelltod der AML-Blasten auslöst (Zeytun A, 1997). Dabei scheinen bei diesem bidirektionalem Abtöten in der Regel die Tumorzellen favorisiert zu sein (Whiteside TL, 1998). Für die T-Zell-Aktivierung via AML-Blasten ist die Präsenz der kostimulatorischen Moleküle B7-1, das meist nur nach Aktivierung der Zellen exprimiert wird, und/oder des konstitutiv exprimierten B7-2 notwendig. Die B7-Moleküle binden zum einen an CD28 der T-Zellen, das die IL-2 -Sekretion und damit auch die Proliferation der T-Zellen

induziert, zum anderen binden sie auch an CTLA-4, das erst 2-3 Tage nach der CD28 Stimulation aktiviert wird und eine 20-fach höhere Affinität zu B7-2 aufweist als CD28. CTLA-4 spielt eine wichtige, negativ regulatorische Rolle bei der T-Zell-Antwort (Allison JP, 1995). Durch Blockade von CTLA-4 kann eine verstärkte T-Zellantwort gegen Tumorzellen erreicht werden (Leach DR, 1996). Die erhöhte Expression von kostimulatorischen Molekülen auf Tumorzellen kann also möglicherweise über Aktivierung von CTLA-4 die Immunantwort der T-Zellen herunterregulieren und daher zu einem frühen Rezidiv der AML-Blasten führen.

NCAM spielt zum einen eine Rolle bei der Aktivierung immunkompetenter Zellen zum anderen ist es an der Extravasation von AML-Blasten beteiligt (Pancook JD, 1997). Bei der NCAM-positiven AML wurde eine erhöhte Inzidenz extramedullärer Manifestationen beobachtet (Byrd JC, 1995) und dies erklärt möglicherweise die in unserer Arbeit herausgefundene verminderte Remissionsrate und verkürzte Remissionsdauer, da residuelle Leukämiezellen durch Adhäsion im extramedullärem Raum weniger von der Chemotherapie erreicht werden und damit die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs steigt.

5.6.4 Blastenschub aufgrund verminderter Adhäsion an das Stroma und verstärkter Migration durch das Endothel?

Die einzige kontinuierliche Barriere zwischen den AML-Blasten im Knochenmark und dem peripheren Blut bildet das Sinusendothel. Damit die Blasten vom Knochenmark ins Blut gelangen können, müssen zum einen die bestehenden Bindungen der Blasten an das Knochenmarksstroma gelöst, zum anderen Bindungen mit der abluminalen Seite des Endothels aufgenommen werden, um durch diese Barriere zu migrieren und ins periphere Blut zu disseminieren. Sowohl auf dem Endothel und Stromazellen, als auch auf den Matrixproteinen befinden sich Adhäsionsmoleküle bzw. Bindungsregionen, die von Adhäsionsmolekülen auf AML-Blasten erkannt werden. Die Regulation der Expressionsdichte, des Affinitätsstatus dieser Adhäsionsmoleküle erfolgt über Zytokine, die von AML-Blasten selbst oder von Stromazellen produziert werden. In der Regel sind mehrere, verschiedene Bindungspaare für den Stromakontakt und auch für die Transmigration durch das Endothel verantwortlich. Da in dieser Arbeit nur die Expression von Adhäsionsmolekülen auf AML-Blasten bestimmt wurde, soll zunächst betrachtet werden, ob bei der AML eine veränderte Adhäsionsmolekülexpression vorliegt.

Den **β 1-Integrinen wird eine wichtige Bedeutung bei der Erhaltung des Zell-Stroma-Kontakts** zugeordnet (Bendall LJ, 1993). Die β 1-Integrine VLA-4 und VLA-5, die an Fibronectin binden, werden auf den meisten Blasten exprimiert. SCF, GM-CSF oder IL-3 können die Bindung CD34-Zellen an das KM über die Aktivierung von VLA-4- und VLA-5-Integrinen verstärken (Kovach NL, 1995). AML-Blasten können auch direkt an membrangebundenem SCF-R binden (Long WM, 1992). In Übersichtsarbeiten wurde gezeigt (Bradstock KF, 1995; Liesveldt JL, 1997; Denkers IA, 1992; Asosingh K, 1998) dass sowohl bei gesunden, als auch bei AML-Blasten durch Herunterregulation von β 2-Integrinen das Verlassen des KMs initiiert wird. Auch der SCF-R wird auf mobilisierten Zellen vermindert exprimiert (Link, DC, 2001). Umgekehrt scheint ein erhöhter Kontakt zum KM-Stroma (z.B. via VLA und SCF-R u.a.) die Proliferation und Differenzierung von AML-Zellen zu gewährleisten (Schofield KP, 1998) und den programmierten Zelltod zu vermindern (Bendall LJ, 1994).

Während VLA-3 weder auf normalen Progenitorzellen noch auf AML-Blasten mit unserer Methode nachweisbar war, konnten weniger VLA-2-positive Fälle bei der AML im Vergleich zu gesunden KM-Proben nachgewiesen werden. Dies kann im Sinne einer erhöhten Bereitschaft, das KM zu verlassen – wie sie bei der AML vorliegt – gedeutet werden. Weiterhin haben wir festgestellt, dass bei den Therapieansprechern initial signifikant weniger Zellen positiv für VLA-2 waren, während *alle* KM-Proben der Therieversager VLA-2-positiv waren. Da vor allem Integrine hochregulierte Adhäsionsmoleküle darstellen, kann man anhand der Expression nicht auf die Funktionalität des Rezeptors schließen, so dass funktionale Analysen notwendig sind, um über die Bedeutung der VLA-2 Expression im Krankheitsverlauf der AML eine Aussage treffen zu können.

Während den β -1 Integrinen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des Zell-Stroma-Kontakts zugeordnet werden kann, ist die Rolle der β -2 Integrine im KM noch nicht klar definiert. Da blockierende Antikörper gegen β 2-Integrine allein die Adhäsion der Blasten nur wenig beeinträchtigt, scheinen sie maximal eine unterstützende, aber keine erhaltende Rolle beim Zellstromakontakt zu spielen (Bendall LJ, 1993). Unreife Progenitorzellen exprimieren nur wenig aktive LFA-1-Rezeptoren, in vitro-Kulturen aber wird die Expression von LFA-1 rasch hochreguliert, so dass die Hypothese aufgestellt wurde, dass solange sich die Progenitorzellen via β -1-Integrine in festen Kontakt mit dem KM-Stroma befinden, die LFA-1-Expression niedrig und wenig aktiv ist. Lockert sich - z.B. bei verstärkter Proliferation der Zellen - diese Bindung zu den Stromazellen, werden die Zellen als Vorbereitung für die Transmigration in das Blut LFA-1 positiv (Torensma R, 1996). Entsprechend dieser

Hypothese könnte auch die in unserer Arbeit festgestellte **hohe LFA-1-Expression der AML-Blasten als Ausdruck des hyperzellulären KM und der dadurch verminderten Adhäsion an die Stromazellen** gesehen werden. Nur bei sieben Patienten wurde sowohl die VLA-2 und LFA-1 Expression gleichzeitig bestimmt: Zwei der sieben Patienten exprimierten VLA-2 auf mehr als 94% der Blasten und in diesen beiden Fällen wurde beobachtet, dass die LFA-1 Expression deutlich unter dem ermittelten Durchschnittswert bei der AML lag. Dieser Zusammenhang muss allerdings anhand größerer Fallzahlen erst noch evaluiert werden, um statistische Signifikanz zu erreichen.

Im Gegensatz zu LFA-1 wird das β -2 Integrin Mac-1 v.a. innerhalb der myeloiden Zelllinie und dort v.a. auf reiferen Monozyten/Makrophagen exprimiert. Auch die Mac-1/LFA-1 Bindung scheint eine Rolle bei der Transmigration von myeloiden Zellen in die Peripherie zu spielen, so konnten murine HPZ unter IL-8 **mobilisiert** werden, und dies wurde auf die durch IL-8 hervorgerufene **Hochregulation von Mac-1** auf der Oberfläche der HPZ zurückgeführt (Link DC, 2001). Weiterhin bindet Mac-1 auch an eine Reihe bedeutender Liganden, wie Fibrinogen, Faktor X, Heparansulfat und iC3b (Di Noto R, 1996). In dieser Arbeit, wie auch in anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass Mac-1 v.a. auf den monozytären Leukämiesubtypen exprimiert wurde. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass signifikant mehr Mac-1-positive Fälle in der schlechten zytogenetischen Risikogruppe gefunden werden konnten, aber die Mac-1-Expression nicht als ein vom Karyotyp unabhängiges Prognosemerkmal gesehen werden kann. Auch in vielen anderen Studien wurde Mac-1 als prognostisch ungünstig eingeschätzt (Bradstock K, 1994; Paietta E, 1998). Weitere funktionale Analysen sind daher erforderlich, um zu zeigen, welche genaue Rolle Mac-1 bei der AML spielt (Adhäsion an das Endothel / Adhäsion an Stroma) und ob Mac-1 wirklich eine Bedeutung in der Pathobiologie der AML besitzt.

Über die Familie der Selektine wird zwischen Progenitorzellen und Sinusendothel der erste niedrig-affine Kontakt hergestellt. Dabei werden E- und P-Selektin v.a. auf dem Endothel exprimiert, L-Selektin auf den hämopoetischen Vorläuferzellen. L-Selektin spielt eine Rolle bei der Extravasation peripherer Granulozyten und beim Homing der Lymphozyten in die Lymphknoten. Die Rolle des L-Selektins bei der Hämopoese oder Transmigration ist noch unklar, da in vitro und in vivo Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse lieferten (Übersichtsarbeit von Chang JH & Watt SM, 2001). Während blockierende Antikörper gegen L-Selektin in vitro die Granulopoese hemmten, zeigten L-Selektin negative Mäuse keine Veränderung in der Zellzusammensetzung des Knochenmarks. Intravitale Mikroskopie an murinen KM zeigte, dass **L-Selektin nicht am Rolling der Progenitorzellen an den KM-Sinusendothelien beteiligt** ist, sondern v.a. P- und E-Selektin, die im Gegensatz zum peripheren Endothel konstitutionell auf den KM-Venolen und Sinusendothelien exprimiert werden. Via Signaltransduktion beeinflusst die Ligandation von L-Selektin auch die Expressionsdichte und den Affinitätsstatus von β -1 und β -2 Integrinen. In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hohe L-Selektin-Expression mit den zytogenetisch günstigen Karyotypanomalien inv(16) und t(8;21) korreliert bzw. Patienten mit weniger als 30% CD62L positiven Zellen eine höhere Todesrate (42% vs 16%) aufwiesen. Da die Rolle des L-Selektins bislang auch bei der normalen Hämopoese nicht vollständig aufgeklärt ist, sollten die Funktionen des L-Selektins bei Gesunden und auch bei der AML in funktionellen Analysen weiter untersucht werden.

Durch die Bindung von Urokinase-Plasminogen-Aktivator an den UPA-R entsteht aus Plasminogen die Protease Plasmin, die an der Extravasation von Zellen durch proteolytische Spaltung der die Endothelzellen verankernden Adhäsionsproteine beteiligt sein soll (Lijnen HR, 1996). Der UPA-R soll v.a. zusammen mit Mac-1 zyttoplasmatische Signale an das Zytoskelett weiterleiten (Simon D, 1996), und dadurch die Migrationsfähigkeit v.a. von Granulozyten erhöhen. Weiterhin soll eine **Überexpression von UPA-R bei Leukämien Plasmainhibitoren konsumieren** und dadurch zu einer erhöhten Blutungsneigung bei Leukämiepatienten führen (Lijnen, 1996). In unserer Arbeit wurde festgestellt, dass die hohe Expression von UPA-R mit der Remissionsrate ($p=0.03$) signifikant korrelierte. Da in der Gruppe der UPA-R positiven Therapieversager auch eine hohe Frühmortalität beobachtet wurde, die durch Blutungskomplikationen verursacht sein mag, das verminderte Therapieansprechen der UPA-R-positiven Fällen bewirkte. Im weiteren Krankheitsverlauf zeigten sich keine signifikanten Korrelationen mit der Dauer der progressfreien Überlebenszeit oder der Gesamtmortalität. Ja fast scheint eine Expression des UPA-R $> 26,5\%$ mit einer zwar nicht signifikant, aber doch längeren progressfreien Überlebenszeit einherzugehen. So scheint die initiale Expression des UPA-R lediglich aufgrund des hohen Anteils UPA-R exprimierender Zellen und des damit verbundenen erhöhten Abfangens von Gerinnungsfaktoren Komplikationen zu bereiten, im weiteren Verlauf der Erkrankung, d.h. wenn die Blastenzahl deutlich reduziert ist, hat die Expression des UPA-R keinen pathologischen Einfluss mehr auf den Progress der Erkrankung.

Sehr wenig kann über die funktionelle Bedeutung der Adhäsionsmoleküle von PRR-1 und PRR-2 ausgesagt werden, da sie bei der AML bisher nicht untersucht worden sind. PRR-2 spielt eine Rolle bei dem homophilen Zell-zu-Zellkontakt der HPC untereinander und zum Endothel (Lopez M, 1997). Über die Funktion von PRR-1 ist bisher nichts publiziert. Interessant ist sicherlich die signifikante Korrelation der PRR-1 Expression mit den zytogenetischen Risikogruppen (t(15;17); inv (16)). Wenn auch im weiteren klinischen Verlauf keine signifikanten Unterschiede mehr aufgefallen sind.

Zusammenfassend können wir bei der AML unabhängig vom FAB-Typ feststellen, dass eine verminderte Expression von β 1-Integrinen vorliegt, die die Blasten an das Stroma binden würde. Zudem konnten wir eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen finden, die die Transmigration und Disseminierung der AML-Blasten in die Peripherie fördert (LFA-1, Mac-1, UPA-R) Einzige Ausnahme bildet L-Selektin, doch in neueren Arbeiten wurde festgestellt, dass L-Selektin am Rolling der Prognitorzellen im KM nicht beteiligt ist, sondern andere bisher noch nicht genau definierte Aufgaben im KM zu haben scheint. Da unsere Untersuchungen keine funktionellen Analysen beinhalteten, die die den jeweiligen Adhäsionsmolekülen zugeschriebenen Eigenschaften *in vitro*/ oder *in vivo* bestätigen, hoffen wir, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zu weiteren gezielten, funktionellen Untersuchungen Anlass geben werden.

6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Expression von sechs Zytokinrezeptoren und 13 Adhäsionsmolekülen in insgesamt 103 KM-Proben von AML-Patienten bei Erstdiagnose und acht gesunden KM-Proben mittels direkter durchflusszytometrischer Immunphänotypisierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die Zytokinrezeptoren ein linienspezifisches und reifegradabhängiges Expressionsmuster innerhalb der verschiedenen Subtypen der AML aufweisen. Auch bei den Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen ließen sich Unterschiede herausarbeiten. Die Ergebnisse dieser Arbeit können damit die FAB-Klassifizierung unterstützen und diejenigen Marker, die die deutlichsten Unterschiede zwischen den untersuchten AML und gesunden KM-Proben aufwiesen, können bei der Diagnose der minimalen Residualleukämie Einsatz finden.

AML-Patienten mit einem hohen Anteil VLA-2-, UPA-R- und NCAM-positiver Blasten bei Diagnosestellung wiesen eine geringere Wahrscheinlichkeit auf, eine Remission zu erreichen. Ebenso konnten retrospektiv Zusammenhänge zwischen einem hohen Anteil FL-R-, SCF-R-, B7-1-, B7-2-, ICAM-1-, NCAM-exprimierender Blasten bei Diagnosestellung und einer geringeren progressfreien Überlebenswahrscheinlichkeit beobachtet werden. All diese retrospektiv ermittelten Ergebnisse geben wertvolle Hinweise auf mögliche pathophysiologische Bedeutungen dieser Marker. Sie sollten jedoch prospektiv mit großer Fallzahl noch einmal bezüglich ihrer prognostischen Signifikanz evaluiert werden. Die NCAM-positive Leukämie zeigte unabhängig von der zytogenetischen Prognoseeinschätzung sowohl bezüglich der Remissionswahrscheinlichkeit als auch bezüglich der progressfreien Überlebenszeit eine schlechte Prognose. Die routinemäßige Messung der NCAM-Expression in AML-KM-Proben kann damit zusätzlich zur Zytogenetik wertvolle Hinweise auf die Prognose der AML-Patienten geben. Patienten, die einen hohen Anteil NCAM-exprimierender Blasten aufweisen, könnten von einem intensiveren Therapieregime und engmaschigeren Kontrollen profitieren. Die Korrelation einer hohen Expression kostimulatorischer Moleküle und Zytokinrezeptoren, die nach Stimulation die Expression dieser kostimulatorischen Moleküle fördern, mit einer kurzen progressfreien Überlebenszeit, sollten Grund sein, die gesteigerte T-Zell-Antwort *in vitro* in Bezug auf die Hochregulation möglicher, das Immunsystem inhibierender Moleküle oder anderer Escape-Mechanismen *in vivo* kritisch zu beurteilen. Möglicherweise können Medikamente wie Dexamethason oder Tyrosinkinasehemmer, die die Expression des FL-R vermindern bzw. die Signaltransduktion dieser Zytokinrezeptoren vermindern, neue therapeutische Strategien darstellen, die die immer noch hohe Rezidivrate bei der AML senken können. Auch rIL-2 oder CTLA-4-Inhibitoren können die T-Zellantwort gegen Blasten, die bereits eine hohe Expression kostimulatorischer Moleküle aufweisen, unterstützen bzw. Escape-Mechanismen entgegenwirken.

G-CSF und GM-CSF werden in der Klinik regelmäßig in der Supportivtherapie eingesetzt. Als Priming-Medikamente erbrachten sie allerdings bisher keinen gesteigerten therapeutischen Nutzen. Die in dieser Arbeit gezeigte linienspezifische G- bzw. GM-CSF-R-Expression auf AML-Blasten gibt die therapeutische Rationale dafür, dass ein gezielter Einsatz von G- bzw. GM-CSF entsprechend ihrer Rezeptorverteilung innerhalb der verschiedenen FAB-Subtypen eine neue, Benefit-bringende Primingstrategie für die Zukunft darstellen könnte.

Die Grenzen dieser Arbeit sind sicherlich in der starken Regulation und den komplexen Wechselwirkungen der Expression von Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen untereinander zu sehen. So kann man anhand der Immunphänotypisierung allein noch nichts über die Funktionalität der Rezeptoren bzw. deren Affinität zu ihrem

Liganden aussagen. Daher ließ sich der Einfluss einer veränderten Zytokinrezeptor- oder Adhäsionsmolekül-Expression auf die Biologie der AML oft nur anhand in anderen Studien durchgeführten funktionalen Analysen *in vitro* abschätzen. Weitere funktionale Analysen, die auch im Zusammenhang mit dem tatsächlichen klinischen Verlauf der Patienten ausgewertet werden sollten, sind daher notwendig sein, um die pathobiologischen Vorgänge im Knochenmark bei der akuten myeloischen Leukämie vollkommen verstehen zu können.

7. Literaturverzeichnis

(Arbeiten der AG Schmetzer sind fett gedruckt)

- Abboud SL, Gerson SL, Berger NA: The effect of tumor necrosis factor on normal human hematopoietic progenitors. *Cancer* 1987, 60: 2965-2970.
- Ackerstein A, Kedar E, Slavin S: Use of recombinant human interleukin-2 in conjunction with syngeneic bone marrow transplantation in mice as a model for control of minimal residual disease in malignant hematologic disorders. *Blood* 1991, 78: 1212-1215.
- Ahmadzadeh M, Hussain SF, Farber DL: Heterogeneity of the memory CD4 T-cell response: persisting effectors and resting memory T cells. *J Immunol* 2001, 166 (2): 926-935.
- Alcalay M, Zangrilli D, Pandolfi PP, Longo L, Mencarelli A, Giacomucci A, Rocchi M, Biondi A, Rambaldi A, Lo Coco F, et al: Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus. *Proc nat Acad Sci* 1991; 88: 1977-1981.
- Allison JP, Krummel MF: The Yin and Yang of T Cell Costimulation. *Science*, 1995, 270: 932-933.
- Amirghofran Z, Zakerinia M, Shamseddin A: Significant association between expression of the CD11b surface molecule and favorable outcome for patients with acute myeloblastic leukemia. *Int J Hematol* 2001, 73: 502-506.
- Aoyagi M, Furusawa S, Waga K, Tsunogake S, Shishido H: Suppression of normal hematopoiesis in acute leukemia: Effect of leukemic cells on bone marrow stroma cells and hematopoietic progenitor cells. *Intern Med* 1994; 88: 288-295.
- Arai KJ, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T: Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann Rev Biochem* 1990, 59: 783-836.
- Archimbaud E, Thomas X, Campos L, Magaud JP, Dore JF, Fiere D: Expression of surface adhesion molecules CD54 (ICAM-1) and CD58 (LFA-3) in adult acute leukemia: Relationship within initial characteristics and prognosis. *Leukemia* 1992; 6: 265-271.
- Archimbaud E, Thomas X, Campos L, Magaud JP, Fiere D, Dore JF: Susceptibility of acute myelogenous leukemia blasts to lysis by lymphokine activated killer (LAK-cells and its clinical relevance). *Leuk Res* 1992, 16: 673-680.
- Arkin S, Naprstek B, Guarini L, Ferrone S, Lipton JM: Expression of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) on hematopoietic progenitors. *Blood*, 1991, 77: 948-953.
- Asano Y, Shibata S, Kobayashi S, Okamura S, Niho Y: Interleukin-10 inhibits the autocrine growth of leukemic blasts from patients with acute myeloblastic leukemia. *Int J Hematol* 1997, 66: 445-50.
- Ashman LK, Roberts MM, Gadd SJ, Cooper SJ, Juttner CA: Expression of a 150-kD cell surface antigen identified by monoclonal antibody YB5.B8 is associated with poor prognosis in acute non-lymphoblastic leukemia. *Leuk Research* 1988, 12: 923-928.
- Asosingh K, Remnans W, Van der Gucht K, Foulon W, Schots R, Van Riet I, De Waele M: Circulating CD34+ cells in cord blood and mobilized blood have a different profile of adhesion molecules than bone marrow CD34+ cells. *Eur J Haematol* 1998, 60: 153-160.
- Audet J, Miller CL, Rose-John S, Piret JM, Eaves J: Distinct role of gp130 activation in promoting selfrenewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 1757-62.
- Auerbach AD: Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes. *Leukemia* 1992, 6 Suppl. 1: 1-4.
- Austin H, Delzell E, Cole P: Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. *Amer J Epidem* 1988, 127: 419-439.
- Avalos BR: The granulocyte colony stimulating factor receptor and its role in disorders of granulopoiesis. *Leuk Lymph* 1998, 28: 265-73.
- Avraham H, Scadden DT, Chi S, Broudy VC, Zsebo KM, Groopman JE: Interaction of human bone marrow fibroblasts with megakaryocytes: role of c-kit ligand. *Blood* 1992, 80: 1679-1684.
- Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur CD, Byrd CJ, Davey FR, Schiffer CA, Bloomfield CD: Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8:21)(q22;q22). *Blood* 1997, 4: 1643-1648.
- Begemann M (Hrsg.): Akute Leukämien. In: *Praktische Hämatologie*. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart-New York, 11. Aufl.: 183-218.
- Bendall LJ, Daniel A, Kortlepel K, Gottlieb DJ: Bone marrow adherent layers inhibit apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Exp Hematol* 1994, 22: 1252-1260.
- Bendall LJ, Kortlepel K, Gottlieb DJ: GM-CSF enhances IL-2-activated natural killer cell lysis of clonogenic AML cells by upregulating target cell expression of ICAM-1. *Leukemia* 1995, 9: 677-684.
- Bendall LJ, Kortlepel K, Gottlieb DJ: Human acute myeloid leukemia cells bind to bone marrow stroma via a combination of beta-1 and beta-2 integrin mechanisms. *Blood* 1993, 82: 3125-3132.
- Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Knapp W, Lanza F, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Sperling C, van't Veer MB for the European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL): The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. *Blood*, 1998, 92: 596-599.
- Bene MC, Bernier M, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB for the European Group for the Immunological Classification of

- Leukemias (EGIL): Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995, 9: 1783-1788.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al: Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative Group. *Brit J Haematol* 1976, 33: 451-458.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann intern Med* 1985, 103: 626-629.
- Bianco P, Robey PG: Marrow stromal cells. *J Clin Invest* 2000, 105: 1663-1668.
- Birg F, Courcou M, Rosnet O, Bardin F, Pebusque MJ, Marchetto S, Tabilio A, Mannoni P, Birnbaum D: Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* 1992, 80: 2584-2593.
- Borrow J, Goddard AD, Sheer D, Solomon E: Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science* 1990, 249: 1577-1580.
- Boyer MW, Waller EK, Bray RA, Unangst T, Johnson TS, Phillips C, Jurickowa I, Winton EF, Yeager AM: Cytokine upregulation of the antigen presenting function of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2000, 14: 412-418.
- Bøyum A: Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens* 1984, 4: 269-274.
- Bracho F, Krailo MD, Shen V, Bergeron S, Davenport V, Liu-Mares W, Blazar BR, Panoskaltis-Mortari A, van de Ven C, Secola R, Ames MM, Reid JM, Reaman GH, Cairo MS: A phase I clinical, pharmacological and biological trial of interleukin 6 plus granulocyte colony stimulating factor after ifosfamide, carboplatin and etoposide in children with recurrent/ refractory solid tumors: enhanced hematological responses but a high incidence of grade III/IV constitutional toxicities. *Clin Cancer Res* 2001, 7: 58-67.
- Bradstock K, Matthews J, Benson E, Page F, Bishop J: Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. Australian Leukemia Study Group. *Blood* 1994, 84: 1220-1205.
- Bradstock KF, Gottlieb DJ: Interactions of acute leukemia cells with the bone marrow microenvironment: Implications for control of minimal residual disease. *Leukemia and Lymphoma* 1995, 18: 1-16.
- Brasel K, Escobar S, Anderberg R, de Vries P, Gruss HJ, Lyman SD: Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cell lines. *Leukemia* 1995, 9: 1212-18.
- Brasel K, McKenna HJ, Charrier K, Morris DE, Lyman SD: Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood* 1996, 88: 2004-2012.
- Braun S, Gerhartz W, Schmetzer H: Influence of cytokines and autologous Lymphokine-activated-killer (LAK)-cells on leukemic bone marrow cells and colonies in AML. *Acta Haematol* 2000b, 105, 209-221.**
- Braun S, Gerhartz W, Wilmanns W, Schmetzer H: Lymphokine-activated-killer (LAK) cells and cytokines synergize to kill clonal cells in acute myeloid leukemia (AML) in vitro. *Haematologia* 2000a, 30: 271-288.**
- Broudy VC, Lin NL, Priestley GV, Nocka K, Wolf NS: Interaction of stem cell factor and its receptor mediates lodgement and acute expansion of hematopoietic cells in the murine spleen. *Blood* 1996, 88: 75-81.
- Broudy VC, Smith FO, Lin N, Zsebo KN, Egrie J, Bernstein ID: Blasts from patients with acute myelogenous leukemia express functional receptors for stem cell factor. *Blood* 1992, 80: 60-67.
- Brouwer RE, Hoefnagel J, van der Burg BB, Jedema I, Zwiderman KH, Starrenburg IC, Kluin-Nelemans HC, Barge RM, Willemze R, Falkenburg JH: Expression of co-stimulatory and adhesion molecules and chemokine or apoptosis receptors in acute myeloid leukemia: High CD40 and CD11a expression correlates with poor prognosis. *Br J Haematol* 2001, 115: 298-308.
- Brouwer RE, van der Hoorn M, Kluin-Nelemans HC, van Zelderen-Bhola S, Willemze R, Falkenburg JH: The generation of dendritic-like cells with increased allostimulatory function from acute myeloid leukemia cells of various FAB-subclasses. *Hum Immunol* 2000, 6: 565-574.
- Brouwer RE, Zwiderman KH, Kluin-Nelemans HC, van Luxemburg-Heijns SAP, Willemze R, Falkenburg JHF: Expression and induction of costimulatory and adhesion molecules on acute myeloid leukemic cells: Implications for adoptive immunotherapy. *Exp Haematol* 2000, 28: 161-168.
- Bruserud O, Halstensen A, Peen E, Solberg CO: Serum levels of adhesion molecules and cytokines in acute leukemia. *Leuk Lymph* 1996, 23: 423-430.
- Bruserud O, Pawelec G: Human T-lymphocyte activation in the presence of acute myelogenous leukemia blasts; studies of normal polyclonal T cells and Tlymphocytes clones derived early after allogeneic bone marrow transplantation. *Cancer Immunol Immunother* 1996, 42: 133-140.
- Bruserud O, Ulvestad E: Expression and release of adhesion molecules by human acute myelogenous leukemia blasts. *Leuk Res* 1999, 23: 149-157.
- Bruserud O: Acute myelogenous leukemia blasts as accessory cells during T lymphocyte activation: possible implications for future therapeutic strategies. *Leukemia* 1999, 13: 1175-1187.
- Büchner T, Hiddemann W, Wormann B, Rottmann R, Zuhlsdorf M, Maschmeyer G, Ludwig WD, Sauerland MC, Frisch J, Schulz G: GM-CSF multiple course priming and long term administration in newly diagnosed AML: hematologic and therapeutic effects. *Blood* 1994, 84 Suppl. 1 (Abstract): 96.
- Büchner T, Urbanitz D, Hiddemann W, Rühl H, Ludwig W, Fischer J, Aul HC, Vaupel HA, Kuse R, Zeile G: Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML): two multicenter studies of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1985, 3: 1583-1589.
- Büchner T: Akute myeloische Leukämie (AML) in Hämatologie-Onkologie; Hrsg: von Ostendorf PC, Seeber S: Urban und Schwarzenberg, München, 1997: 463- 474.

- Budel LM, Touw IP, Delwel R, Clark SC, Lowenberg B: Interleukin-3 and granulocyte-monocyte-colony-stimulating factor receptors on human acute myelocytic leukemia cells and relationship to the proliferative response. *Blood* 1989; 74: 565-571.
- Budel LM, Touw IP, Delwel T, Lowenberg B: Granulocyte-colony-stimulating-factor-receptors in human acute myelocytic leukemia. *Blood* 1989, 74: 2668-2673.
- Burn P, Kupfer A, Singer SJ: Dynamic membrane-cytoskeletal interactions: specific association of integrin and talin arises in vivo after phorbol ester treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85: 497-501.
- Byrd JC, Edenfield WJ, Shields DS, Dawson NA: Extramedullary myeloid cell tumors in acute nonlymphocytic leukemia: A clinical review. *J Clin Oncol* 1995, 13: 1800-1816.
- Byrd, JC, Dodge RK, Carrol A, Baer MR, Edwards C, Stamberg J, Qumisyeh M, Moore JO, Mayer RJ, Davey F, Schiffer CA, Bloomfield CD: Patients with t(8:21) (q22;q22) and acute myeloid leukemia have a superior failure-free and overall survival when repetitive cycles of high dose cytarabine are administered. *J Clin Oncol* 1999, 17: 3767-3775.
- Caceres-Cortes J, Rajotte D, Dumouchel J, Haddad P, Hoang J: Produkt of the steel locus suppresses apoptosis in hematopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony stimulating factor. *J Biol Chem* 1994, 269: 12084-12091.
- Cairo MS, Suen Y, Sender L, Gillan ER, Ho W, Plunkett JM, van de Ven C: Circulating granulocyte colony stimulation factor (G-CSF) levels after allogeneic and autologous bone marrow transplantation: endogenous G-CSF production correlates with myeloid engraftment *Blood* 1992, 79: 1869-1873.
- Callea V, Morabito F, Martino B, Stelitano C, Oliva B, Nobile F: Diagnostic and prognostic relevance of the immunophenotype in acute myelocytic leukemia. *Tumori* 1991, 77: 28-31.
- Campana D, Ching Hon P: Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995, 85: 1416-1434.
- Campana D, Coustan-Smith E: Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999, 38: 139-52.
- Campbell AD, Long MW, Wicha MS: Haemonectin, a bone marrow adhesion protein specific for cells of granulocytic lineage. *Nature* 1987; 329: 744-746.
- Cannistra SA, Groshek P, Griffin JD: Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances the cytotoxic effects of cytosine arabinoside in the myeloid blast crisis phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1989, 3: 328-334.
- Cannistra SA, Koenigsmann M, DiCarlo J, Groshek P, Griffin JD: Differentiation-associated expression of two functionally distinct classes of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptors by human myeloid cells. *J Biol Chem* 1990, 265: 12656-12663.
- Carow CE, Levenstein M, Kauffmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P, Witte L, Borowitz MJ, Civin CI, Small D: Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* 1996, 87: 1089-1096.
- Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, Paietta E, Willman C, Hurd DD, Bennet JM, Blume KG, Head DR, Wiernik PH: Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med* 1998, 339: 1649-56.
- Cavenaugh JD, Gordon-Smith EC, Gibson FM, Gordon MY: Acute myeloid leukemia blast cells bind to human endothelium in vitro utilizing E-Selectin and vascular cell adhesion molecule -1 (VCAM-1). *Br J Haematol* 1993, 85: 285-291.
- Cham JY, Watt SM: Adhesion receptors on hematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* 2001, 112: 541-557.
- Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD, Brunning R, Gale RP, Grever MR, Keating MJ, et al: Report of the National Cancer Institute - sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 1990, 8: 813-819.
- Choudhury AA, Sutaría S, Charron D, Champlin RJ, Claxton DF: Human leukemia derived dendritic cells: ex vivo development of specific antileukemic cytotoxicity. *Crit Rev Immunol* 1998, 18: 121-131.
- Clark B, Gallagher R, John T, Dexter MT: Cell adhesion in the stromal regulation of haemopoiesis. *Balliere's Clin. Haematol.* 1992, 5: 619-652.
- Claxton DF, Lie P, Hsu HB: Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994, 83: 1750-1756.
- Cohen HJ, Huang ATF: A marker chromosome abnormality: Occurrence in chloramphenicol-associated acute leukemia. *Arch Intern Med* 1973, 132: 440-443.
- Cooper MA, Fehninger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood* 2001, 97: 3146-3151.
- Cortes JE, Kantarjian HM, O'Brian S, Giles F, Keating MJ, Freireich EJ, Estey EH: A pilot study of interleukin-2 for adult with acute myelogenous leukemia in first complete remission. *Cancer* 1999, 85: 1506-13.
- Coulombel L, Auffrey I, Gaugler MH, Roseblatt M: Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematol* 1997, 97: 13-21.
- Coustan-Smith E, Behm FG, Hurwitz CA, Rivera GK, Campana D: N-CAM (CD56) expression by CD34+ malignant myeloblasts has implications for minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1993, 7: 853-858.
- Cuzick J, Erskine S, Edelman D, Galton DA: A comparison of the incidence of the myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia following

- melphalan and cyclophosphamide treatment for myelomatosis. A report of Medical Research Council's working party on leukemia in adults. *Br J Cancer* 1987, 55: 523-529.
- D'Souza SE, Ginsberg MH, Plow EF: Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends in Biological Science* 1991, 16: 246-250.
- Danhauser-Riedl S, Ratei R, Hecht K, Schnittger S, Schoch C, Haferlach T, Kolb HJ, Ludwig WD, Hiddemann W: Multiparametric flow cytometry: a promising tool for the detection of minimal residual disease (MRD) in AML? *Kongressbeitrag*, 1999
- Darby SC, Doll R, Smith PG: Long term mortality after a single treatment course with x-ray in patients treated for ankylosing spondylitis. *Brit J Cancer* 1987, 55: 179-190.
- De Gentile A, Toubert ME, Dubois C, Krawice I, Schlageter MH, Balitrand N, Cataigne S, Degos L, Rain JD, Najean Y: Induction of high-affinity GM-CSF receptors during all-trans retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 1994, 8: 1758-1762.
- De Waele M, Renmans W, Jochmans K, Schots R, Lacor P, Trulleman F, Otten J, Balduck N, van der Gucht K, van Camp B, van Riet I: Different expression of adhesion molecules on CD34+ cells in AML and B-lineage ALL and their normal bone marrow counterparts. *Eur J Haematol* 1999, 63: 192-201.
- De Waele M, Renmans W, Van der Gucht K, Jochmans K, Schots R, Otten J, Trulleman F, Lacor P, van Riet I: Growth factor receptor profile of CD34+ cells in AML and B-lineage ALL and in their normal bone marrow counterparts. *Eur J Haematol* 2001, 66: 178-87.
- Dehmel U, Zaborski M, Meierhoff G, Rosnet O, Birnbaum D, Ludwig WD, Quentmeier H, Drexler HG: Effects of FLT3 ligand on human leukemia cells. I. Proliferative response of myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1996, 10: 261-270.
- Dekker AW, Elderson A, Punt K, Sixma JJ: Meningeal involvement in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer* 1985, 56: 2078-2082.
- Demetri G, Griffin JD: Granulocyte colony stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991, 78: 2791-2708.
- Denkers IAM, De Jong-De Boer TJ, Beelen RHJ, Ossenkuppe GJ, Nauta JJP, Langenhuijsen MMAC: Adhesive capacity of human long term bone marrow cultures from normals and patients with acute myeloid leukemia: The influence of adhesion molecules. *Leuk Res* 1993, 17: 255-261.
- Denkers IAM, De Jong-De Boer TJM, Beeline RHJ, Ossenkuppe GJ, Langenhuijsen MMAC: VLA molecule expression may be involved in the release of acute myeloid leukemic cells from the bone marrow. *Leuk Res* 1992; 16: 469-474.
- Dercksen MW, Gerritsen WR, Rodenhuis S, Dirkson MKA, Slaper-Cortenbach ICM, Schaasberg WP, Pinedo HM, von dem Borne AEG, van der Schoot CE: Expression of adhesion molecules: CD34+ L-Selectin +cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 1995, 85: 3313-3319.
- Dercksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MK, Schaasberg WP, Baars JW, van der Wall E, Slaper-Cortenbach IC, Pinedo HM, Von dem Borne AE, van der Schoot CE, et al: Subsets of CD34+ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Oncol* 1995, 13: 1922-1932.
- Di Noto R, Lo Pardo C, Schiavone EM, Ferrara F, Manzo C, Vacca C, Del Vecchio L: All-trans retinoic acid (ATRA) and the regulation of adhesion molecules in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 1996, 21: 201-209.
- Di Noto R, Schiavone EM, Ferrara F, Manzo C, Lo Pardo C, Del Vecchio L: Expression and ATRA-driven modulation of adhesion molecules in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 1994, 8: 1900-1905.
- Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia AJ, Hibbs ML, Springer TA: ICAM-1 (CD54): A counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 1990, 111: 3129-3139.
- Dowding C, Guo AP, Osterholz J, Siczkowski M, Goldmann J, Gordon M: Interferon-alpha overrides the deficient adhesion of chronic myeloid leukemia primitive progenitor cells to bone marrow stromal cells. *Blood* 1991, 78: 499-505.
- Drexler HG: Expression of FLT3 receptor and response to FLT3-ligand by leukemic cells. *Leukemia* 1996, 10: 588-599.
- Dustin ML, Springer TA: T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesive-ness through LFA-1. *Nature* 1989, 341: 619-624.
- Eder M, Geissler G, Ganser A: IL-3 in the clinic. *Stem Cells* 1997, 15: 327-333.
- El-Deiry WS: Role of oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents in: *Cancer biology Hrsg: S. Markowitz, Current opinion in Oncology* 1997, 9: 79-87.
- Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR: VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA4/fibronectin binding site. *Cel* 1990, 60: 577-584.
- Erickson P, Gao J, Chang KS, Look T, Whisenant E, Raimondi S, Lasher R, Trujillo J, Rowley J, Drabkin H: Identification of breakpoints in t(8:21) AML and isolation of a fusion transcript with similarity to *Drosophila* segmentation gene runt. *Blood* 1992, 80: 1825-1831.
- Escrignano L, Oqueteau M, Almeida J, Orfao A, San Miguel JF: Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk Lymph* 1998, 30: 459-466.
- Estey EH, Thall PF, Pierce S, Cortes J, Beran M, Kantarjian H, Keating M, Andreeff M, Freireich E: Randomized phase II study of flududarabine + cytosine arabinoside + idarubicin +/- all-trans retinoic acid +/- granulocyte colony stimulating factor in poor prognosis newly diagnosed acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 1999, 93: 2478-2484.
- Exterman M, Bacchi M, Monai N, Fopp M, Fey M, Tichelli A, Schapira M, Spertini O: Relationship between cleaved L-Selectin levels and the outcome of

Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 1998, 92: 3115-3112.

Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, McCormick F, Marshall CJ: Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85: 1629-1633.

Faussat-Suberville AM, Marie JP, Delmer A, Cadiou M, Zittoun R: In vitro effect of rGM-CSF on proliferation and maturation of leukemic cells from patients with acute myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 1993, 11: 99-104.

Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A: Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967, 58: 1468-1471.

Fialkow PJ, Singer JW, Adamson JW, Vaidya K, Dow LW, Ochs J, Moehr JW: Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin. *Blood* 1981, 57: 1068-1073.

Fialkow PJ, Singer JW, Raskind WH, Adamson JW, Jacobson RJ, Bernstein ID, Dow LW, Najfeld V, Veith R: Clonal development, stem cell differentiation and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1987, 317: 1468-1473.

Fliedner TM, Körbling M, Calvow W, Bruch C, Herbst E: Cryopreservation of blood mononuclear leucocytes and stem cells suspended in a large fluid volume. *Blood*, 1977, 35: 195-202.

Foa R et al: Defective lymphokine-activated killer cell generation and activity in acute leukemia patients with active disease. *Blood* 1991; 78: 1041-1046.

Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG: Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 8809-8814.

Freedman MH: Diamond-Blackfan anaemia. *Bailliere's Best Pract Res Clin Haematol* 2000, 13: 391-409.

Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, Stewart CC, Caligiuri MA, Evans SS: Differential expression and function of L-Selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* 1998, 161: 400-408.

Friedman GD: Penylbutazone, musculoskeletal disease and leukemia. *J Chronic Dis* 1982, 35: 233-243.

Gambacorti-Passerini C, Grignani F, Arienti F, Pandolfi PP, Pelicci PG, Parmiani G: Human CD4 T lymphocytes specifically recognize a peptide representing the fusion region of the hybrid protein pml/RAR α present in acute promyelocytic leukemic cells. *Blood* 1993, 81: 1369-1375.

Gasson JC: Molecular physiology of granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor. *Blood* 1991, 77: 1131-1145.

Gerathy RJ, Fridberg A, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG: Use of chimeric-nectin-1 (HveC)-related receptors to demonstrate that ability to bind alpha-herpes-virus gD is not necessarily sufficient for viral entry. *Virology* 2001, 285: 366-375.

Giralt S, Escudier S, Kantarjian H, Deisseroth A, Freireich EJ, Andersson BS, O'Brien S, Andreef M, Fisher H, Cork A: Preliminary results of treatment with filgrastim for relapse of leukemia and myelodysplasia after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1993, 329: 757-761.

Gluckman JC, Canque B, Chapuis F, Rosenzweig M: In vitro generation of human dendritic cells and cell therapy. *Cytokines Cell Mol Ther* 1997, 3: 187-196.

Gollob JA, Ritz J: CD2-CD58 interaction and the control of T-cell interleukin-12 responsiveness: Adhesion molecules link innate and acquired immunity. *Ann N Y Acad Sci* 1996, 795: 71-81.

Gordon MY, Clarke D, Atkinson J, Greaves MF: Hematopoietic progenitor cell binding to stroma microenvironment in vitro. *Exp Hematol* 1990, 18: 837-842.

Gordon MY, Riley GP, Clarke D: Heparan sulfate is necessary for adhesive interactions between human early hemopoietic progenitor cells and the extracellular matrix of the marrow microenvironment. *Leukemia* 1988, 2: 804-809.

Graf N: Maligne Erkrankungen im Kindesalter In: Pädiatrie - Duale Reihe, Hrsg.: Carl Friedrich Sitzmann, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1995: 540.

Gunji Y, Nakamura M, Hagiwara T, Hayakawa K, Matsushita H, Osawa H, Nagayoshi K, Nakauchi H, Yanagisawa M, Miura Y, Suda T: Expression and function of adhesion molecules on human hematopoietic stem cells: CD34+LFA-1- cells are more primitive than CD34+LFA-1+ cells. *Blood* 1992, 80: 429-436.

Haas R, Gericke G, Witt B, Cayeux S, Hunstein W: Increased serum levels of granulocyte colony stimulating factor after autologous bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 1993, 21: 109-113.

Haas R, Mohle R, Pforsich M, Fruehauf S, Witt B, Goldschmidt H, Hunstein W: Blood-derived autografts collected during granulocyte colony stimulation factor enhanced recovery are enriched with early Thy-1 hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995, 85: 1936-1943.

Hagemeyer A, Hahlen K, Sizoo W, Abels J: Translocation(9;11) (p21;q23) in three cases of acute monoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1982, 5: 95-105.

Hahn WC, Rosenstein Y, Calvo V, Burakoff SJ, Bierer BE: A distinct cytoplasmic domain of CD11 regulates avidity and T-cell responsiveness to antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 7179-7183.

Haimovich B, Lipfert L, Brugge JS, Shattil SJ: Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal reorganization in platelets are triggered by interaction of integrin receptors with their immobilized ligands. *J Biol Chem* 1993, 268: 15868-15877.

Harrison BD, Adams JA, Briggs M, Brereton ML, Yin JA: Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001, 97: 2764-2771.

- Heil G, Hoetzer D, Sanz MA, Lechner K, Liu Yin JA, Papa G, Noens I, Ho J, O'Brien C, Matcham J, Barge A: Results of randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study of filgrastim in remission induction and early consolidation therapy for adults with de novo acute myeloid leukemia. (Abstract) *Blood*, 86 (Suppl 1): 1053.
- Henschler R, Mertelsmann R: Das pleiotrope Netzwerk der Zytokine. 22. Symposium der Gesellschaft der Inneren Medizin, Hrsg: Wilmanns W., Georg Thieme Verlag Stuttgart 1993: 3-9.
- Hentrich M, Rockstroh J, Sandner R, Brack N, Hartenstein R: Acute myelogenous leukemia and myelomonocytic blast crisis following polycythemia vera in HIV positive patients: report of cases and review of literature. *Ann Oncol* 2000, 11: 195-200.
- Herold G. (Hrsg): *Innere Medizin* 1998: 70.
- Hiddemann W, Kiehl M, Zuhlsdorf M, Busemann C, Schleyer E, Wormann B, Buchner T: Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin 3 enhance the incorporation of cytosine arabinoside into the DNA of leukemic blasts and the cytotoxic effect on clonogenic cells from patients with acute myeloid leukemia. *Sem Oncol* 1992, 19: 31-37.
- Hirano N, Takahashi T, Takahashi T, Ohtake S, Hirashima K, Emi N, Saito K, Mirano M, Shinohara K, Takeuchi M, Taketazu F, Tsunoda S, Ogura M, Omine M, Saito T, Yazaki Y, Ueda R, Hirai H: Expression of costimulatory molecules in human leukemias. *Leukemia* 1996, 10: 1168-1176.
- Hochhaus A, Lahaye T, Kreil S, Berger U, Metzgeroth G, Hehlmann R: Selective inhibition of tyrosine kinases - a new therapeutic principle in oncology. *Onkologie* 2001, 24, Suppl 5: 65-71.
- Hohaus S, Martin H, Wassmann B, Egerer G, Haus U, Farber L, Burger KJ, Goldschmidt H, Hoelzer D, Haas R: Recombinant human granulocyte and granulocyte macrophage colony stimulating factor (G-CSF and GM-CSF) administered following cytotoxic chemotherapy have a similar ability to mobilize peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1998, 22: 625-630.
- Holmes R, Keating MJ, Cork A: A unique pattern of central nervous system leukemia in acute myelomonocytic leukemia associated with inv(16) (p13q22). *Blood* 1985, 65: 1071-1078.
- Hoyle CF, de Bastos M, Wheatley K, Sherrington PD, Fischer PJ, Rees JK, Gray R, Hayhoe FG: AML associated with previous cytotoxic therapy, MDS or myeloproliferative disorders: Results from the MRC's 9th AML trial. *Br J Haematol* 1989, 72: 45-53.
- Hu ZB, Minden MD, McCulloch EA: Regulation of the synthesis of bcl-2 by growth factors. *Leukemia* 1996, 10: 1925.
- Hudnall SD, Molina CP: Marked increase in L-Selectin-negative T-cells in neonatal pertussis. The lymphocytosis explained? *Am J Clin Pathol* 2000, 114: 35-40.
- Hunt P, Zsebo KM, Hokom MM, Hormkohl A, Birkett NC, Del Castillo JC, Martin F: Evidence that stem cell factor is involved in the rebound thrombocytosis that follows 5-fluorouracil treatment. *Blood* 1992, 80: 904-911.
- Ichimaru M, Ishimaru T, Belsky JL: Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki. *J Radiat. Res* 1978, 1: 262-282.
- Iizuka Y, Aiso M, Oshimi K, Kanemaru M, Kawamura M, Takeuchi J, Horikoshi A, Oshima T, Mizoguchi H, Horie T: Myeloblastoma formation in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 1993, 16: 665-671.
- Ikedo H, Kanakura Y, Tamaki T, Kurui A, Kitayama H, Ishikawa J, Kanayama Y, Yonezawa T, Tarui S, Griffin JD: Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood*, 1991, 78, 2962-2968.
- Imaoka S, Ueda T, Shibata H, Masaoka T, Ogawa M, Sasaki Y, Iwanaga T, Terasawa T: Fibrinolysis in patients with acute promyelocytic leukemia and disseminated intravascular coagulation during heparin therapy. *Cancer* 1986, 58: 1736-1738.
- Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Yamagami T, Azuma T, Oka Y, Miwa H, Kita K, Hiraoka A, Masaoka T: Expression of the interleukin-6 (IL-6), IL-6 receptor and gp130 genes in acute leukemia. *Blood* 1994, 84: 2672-80.
- Jackson N, Menon BS, Zarina W, Zawani N, Naing NN: Why is acute leukemia more common in males? A possible sex-determined risk linked to the ABO blood group genes. *Ann Hematol* 1999, 78: 233-236.
- Jacob M, Rowe MD: Use of growth factors during induction therapy for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996, 10, Suppl.1: 40-43.
- Jahns-Streubel G, Reuter C, Unterhalt M, Schleyer F, Wormann B, Buchner T, Hiddemann W: Blast cell proliferative sensitivity to GM-CSF in vitro are associated with early response to TAD-9 induction therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1995, 9: 1857-1863.
- Janower ML: Effects of long-term thorotrast exposure. *Radiology* 1972, 103: 13-20.
- Johnson PR, Lan Yin JA: The role of granulocyte- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in the treatment of acute myeloid leukemia. (Annotation) *Br J Haematol* 1997, 97: 1-8.
- Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, Meyerrose T, Rossi R, Grimes B, Rizzieri DA, Luger SM, Phillips GL: The interleukin-3-receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous stem cells. *Leukemia* 2000, 14: 1777-1784.
- Kansas GS, Muirhead MJ, Dailey MO: Expression of CD11a/CD18, leukocyte adhesion molecule 1 and CD44 adhesion molecules during normal and erythroid differentiation in humans. *Blood* 1990, 76: 2483-2492.
- Kaplinisky C, Lotem J, Sachs L: Protection of human myeloid leukemia cells against doxorubicin induced apoptosis by granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor and interleukin 3. *Leukemia* 1996, 10: 460-457.

- Karp JE, Smith MA: The molecular pathogenesis of treatment-induced (secondary) leukemias: foundations for treatment and prevention. *Semin Oncol* 1997, 24: 103-113.
- Katayama N, Kita K, Kawasaki K, Mitani H, Sugawara T, Mizuno S, Yonezawa A, Nishii K, Miwa H, Wada H, Minami N, Shiku H: Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in acute promyelocytic leukemia. *Am J Hematol* 1998, 58: 31-35.
- Kaufman DC, Baer MR, Gao XZ, Wang Z, Preisler HD: Enhanced expression of the granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor gene in acute myelocytic leukemia cells following in vitro blast cell enrichment. *Blood* 1988, 72: 1329-1332.
- Kerst JM, Sanders JB, Slaper-Cortenbach IC, Doorakkers MC, Hooibrink B, van Oers RH, van dem Borne AE, van der Schoot CE: Alpha-4 and alpha-5 beta-1 are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of CD34+ progenitor cells to fibronectin in an activation-dependent way. *Blood* 1993, 81: 244-351.
- Kimura T, Sakabe H, Minamiguchi H, Fujiki H, Abe T, Kaneko H, Yokota S, Nakagawa Hm, Fujii H, Tamaki H, Ogawa H, Sugiyama H, Sonoda Y: Interleukin 11 (IL-11) enhances clonal proliferation of acute myelogenous leukemia cells with strong expression of the IL-11 receptor alpha chain and signal transducing gp130. *Leukemia* 1999, 13: 1018-27.
- Kimura T, Wang J, Miniguchi H, Fujiki H, Harada S, Okuda K, Kaneko H, Shouhei Y, Yasukawa K, Abe T, Sonoda Y: Signal through gp130 activated soluble interleukin (IL)-6 receptor and IL-6 or IL-6R/IL-6 fusion protein enhances ex vivo expansion of human peripheral blood derived hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 2000, 18: 444-452.
- Kishimoto T, Taga T, Akira S: Cytokine signal transduction. *Cell* 1994, 76: 253-262.
- Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R: Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999, 93: 3074-3080.
- Klein G, Müller CA, Tillet E, Chu ML, Timpl R: Collagen type IV in the human bone marrow microenvironment: A strong cytoadhesive component. *Blood* 1995, 86: 1740-1748.
- Kodama H, Nose M, Niida S, Nishikawa S, Nishikawa S: Involvement of the c-Kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol* 1994, 22: 979-984.
- Koeffler HP, Golde DW: Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood* 1980, 56: 344-350.
- Kondo S, Okamura S, Asano Y, Harada M, Niho Y: Human granulocyte-colony-stimulating-factors in acute myelogenous leukemia. *Eur J Haematol* 1991, 46: 223-230.
- Königsman M, Griffin JD, Di Carlo J, Cannistra SA: Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagen type I. *Blood* 1992, 79: 657-665.
- Kortlepel K, Bendall LJ, Gottlieb DJ: Human acute myeloid leukemia cells express adhesion proteins and bind to bone marrow fibroblast monolayers and extracellular matrix proteins. *Leukemia* 1993, 7: 1174-1179.
- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC: The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to first cycle of chemotherapy: Analysis of 854 patients from United Kingdom Medical Research Council AML10 and 12 trials. *Blood* 2001, 98: 1752-1759.
- Koubek K, Kuberova A, Stary J, Babusikova O, Klamova H, Filipc M: Expression of cytokine receptors on different myeloid leukemic cells. *Neoplasma* 1998, 45: 198-203.
- Kovach NL, Lin N, Yednock T, Harlan JM, Broudy VC: Stem cell factor modulates avidity of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 2$ integrins expressed on hematopoietic stem cell lines. *Blood* 1995, 85: 159-167.
- Kronenwett R, Lichterfeld M, Haas R: Functional analysis of antisense oligonucleotide-mediated downregulation of VLA-4 in normal and leukemic hematopoietic cells. (Abstract) *Blood* 1998, 92 (Suppl.1): 585a.
- Kronenwett R, Simona M, Haas R: The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells* 2000, 18: 320-330.
- Kubota A, Okamura S, Shimoda K, Niho Y: Augmented production of interleukin 6 by coculture of human bone marrow adherent cells and human leukemic cells. *Biomed Pharmacother* 1993, 47: 379-384.
- Kubota A, Okamura S, Shimoda K, Harada M, Niho Y: The c-kit-molecule and the surface immunophenotype of human acute leukemia. *Leuk Lymph* 1994, 14: 421-428.
- Kwong YL: Leukemic risk in polycythaemia vera and essential thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 1996, 56: 90-92.
- Lanza F, Castagnari B, Rigolin G, Moretti S, Latorraca A, Ferrari L, Bardi A, Castoldi G: Flow cytometry measurement of GM-CSF receptors in acute leukemic blasts and normal hemopoietic cells. *Leukemia* 1997, 11: 1700-1710.
- Lanza F, Castoldi GL, Castagnari B, Todd RF, Moretti S, Spisani S, Latorraca A, Focarile E, Roberti MG, Traniello S: Expression and functional role of urokinase-type plasminogen activator receptor in normal and acute leukemic cells. *Br J Haematol* 1998, 103: 110-123.
- Largaespada DA: Genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia: maximizing information flow from MuLV mutagenesis studies. *Leukemia* 2000, 14: 1174-84.

- Larsen A, Davis T, Curtis BM, Gimpel S, Sims JE, Cosman D, Park L, Sorensen E, March CJ, Smith CA: Expression cloning of a human granulocyte colony stimulating factor receptor: A structural mosaic of hematopoietin receptor, immunoglobulin and fibronectin-domains. *J Exp Med* 1990, 172: 1559-1570.
- Lauria F, Bagnara GP, Rondelli D, Raspadori D, Strippoli P, Bonsi L, Ventura MA, Montanaro LL, Bubola G, Tura S, Broudy VC: Cytofluorimetric and functional analysis of c-kit receptor in acute leukemia. *Leuk. Lymphoma* 1995, 18: 451-455.
- Le Beau MM, Ejpstein ND, O'Brien SJ: The interleukin 3 gene is located on human chromosome 5 and is deleted in myeloid leukemias with a deletion of 5q. *Proc Natl Acad Sci* 1987, 196: 5913-5917.
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP: Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4-blockade. *Science*, 1996, 271: 1734-1736.
- Legrand O, Perrot JY, Baudard M, Cordier A, Lautier R, Simonin G, Zittoun R, Casadevall N, Marie JP: The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood* 2000, 96: 870-877.
- Lengfelder E, Hehlmann R, Büchner T: Aktuelle Therapiekonzepte bei akuter Promyelozytenleukämie. *Dtsch Med Wochenschr* 2001, 126: 1073-1079.
- Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L: The incidence of secondary leukemias. *Haematologica* 1999, 84: 937-945.
- Leonhardt, Helmut (Hrsg.): *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, Thieme-Verlag, 1990, 8. Auflage.
- Levesque JP, Leavesley DI, Niutta S, Vadas M, Simmons PJ: Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen VLA-4 and VLA-5 integrins. *J Exp Med* 1995, 181: 1805-1815.
- Lichterfeld M, Martin S, Burkly L, Haas R, Kronenwett R: Modulation of CD34+ haematopoietic stem cells is associated with functional inactivation of the integrin very late antigen 4. *Br J Haematol* 2000, 110: 71-81.
- Lickliter JD, Kratzke RA, Nguyen P, Niehans GA, Miller JS: Fas ligand is highly expressed by both normal hematopoietic progenitor cells and acute leukemic blasts. *Blood* 1998, 92 (Suppl.1): 227a (Abstract)
- Lieschke GJ, Burgess AW: Granulocyte colony stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *New Engl J Med* 1992, 327: 28-35; 99-106.
- Liesveld JL, Winslow JM, Kempinski MC, Ryan DH, Brennan JK, Abboud CN: Adhesive interactions of normal and leukemic human CD34+ myeloid progenitors: role of marrow stroma, fibroblast and cytomatrix components. *Exp Hematol* 1991, 19: 63-70.
- Liesveld JL, Di Persio JF, Abboud CN: Integrins and adhesive receptors in normal and leukemic CD34+ progenitor cells: Potential regulatory checkpoints for cellular traffic. *Leuk Lymphoma* 1994, 14: 19-28.
- Liesveld JL, Frediani KE, Harbol AW, Di Persio JF, Abboud CN: Characterization of the adherence of normal and leukemic CD34+ cells to endothelial monolayers. *Leukemia* 1994, 8: 2111-2117.
- Liesveld JL, Winslow JM, Frediani KE, Ryan DH, Abboud CN: Expression of integrins and examination of their adhesive function in normal and leukemic hematopoietic cells. *Blood* 1993, 81: 112-121.
- Liesveld JL: Expression and function of adhesion receptors in acute myelogenous leukemia: Parallels with normal erythroid and myeloid progenitors. *Acta Haematol* 1997, 97: 53-62.
- Lijnen HR: Pathophysiology of the plasminogen-plasmin system. *Int J Clinical and Laboratory Res* 1996, 26: 1-6.
- Link DC: Mechanisms of granulocyte colony stimulating factor induced hematopoietic progenitor-cell mobilization. *Semin Hematol* 2000, 37 (Suppl. 2): 25-32.
- Lisovsky M, Estrov Z, Consoli U, Munker R, Andreeff M: FLT3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia blasts. *Blood* 1995, 86: 22a.
- Liu F, Poursine-Laurent J, Link DC: Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF. *Blood* 2000, 95: 3025-3031.
- Liu PP, Hajra A, Wijmenga C, Collins FS: Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood* 1995, 85: 2289-2302.
- Lloyd KO, Old LJ: Human monoclonal antibodies to glycolipids and other carbohydrate antigens: Dissection of the humoral immun response in cancer patients. *Cancer Res* 1989, 49: 3445-3451.
- Long WM, Briddell R, Walter AW, Bruno E, Hoffmann R: Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules. *J Clin Invest* 1992, 90: 251-255.
- Lopez M, Aoubala M, Jordier F, Isnardon D, Gomez S, Dubreuil P: The human poliovirus receptor related 2 protein is a new hematopoietic/endothelial homophilic adhesion molecule. *Blood*, 1998, 92: 4602-4611.
- Lotem I, Sachs L: Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor beta-1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood* 1989, 80: 1750-1757.
- Lotzova E, Savary CA, Herberman RB: Inhibition of clonogenic growth of fresh leukemia cells by unstimulated and IL-2 stimulated NK-cells of normal donors. *Leuk Res* 1987, 11: 1059-1066.
- Ludwig WD, Thews A: *Kompandium akuter Leukämien*, 2000, Beckman-Coulter (Hrsg).

- Ludwig WD, Thiel E: Diagnostik der akuten Leukämien mit morphologischen, immunologischen und zytologischen Verfahren. *Internist* 1993, 54: 498-510.
- Luikart SD, Maniglia CA, Furcht LT, Mc Carthy JB, Oegma TR: A heparan sulfate containing fraction of bone marrow stroma induces maturation of HL 60 cells in vitro. *Cancer Res* 1990, 50: 3781-3785.
- Lund-Johansen F, Houck D, Hoffman R, Davis K, Olweus J: Primitive human hematopoietic progenitor cells express receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulation factor. *Exp Hematol* 1999, 27: 762-772.
- Lyman SD, Jacobsen SEW: C-kit Ligand and Flt3 Ligand: Stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998, 91: 1101-1134.
- Macedo A, Orfao A, Martinez A, Vidrales MB, Valverde B, Lopez-Berges MC, San Miguel JF: Immunophenotype of c-kit in normal human bone marrow: Implications for the detection of minimal residual disease in AML. *Br J Haematol* 1995, 89: 338-341.
- Maeda A, Yamamoto K, Yamashita K, Asagoe K, Nohgawa M, Kita K, Iwasaki K, Ueda T, Takahashi A, Sasada M: The expression of costimulatory molecules and their relationship to the prognosis of human acute myeloid leukemia: Poor prognosis of BF.2-positive leukemia. *Br J Haematol* 1998, 102: 1257-1262.
- Makrynikola V, Bianchi A, Bradstock K, Gottlieb D, Hewson J: Migration of acute lymphoblastic leukemia cells into human bone marrow stroma. *Leukemia* 1994, 8: 1734-1743.
- Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D: Bone Marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992, 79: 2370-2377.
- Maraninchi D, Vey N, Viens P, Stoppa AM, Archimbaud E, Attal M, Baume D, Bouabdallah R, Demeoq F, Fleury J, Michallet M, Olive D, Reiffers J, Sainty D, Tabilio A, Tiberghien P, Brandeley M, Hercend T, Blaise D: A phase II study of interleukin-2 in 49 patients with relapsed or refractory acute leukemia. *Leuk Lymph* 1998, 31: 343-349.
- Maraskovsky E, Roux E, Tepee M, McKenna HJ, Brasel K, Lyman SD, Williams DE: The effect of Flt3 ligand and/or c-kit ligand on the generation of dendritic cells from human CD34+ bone marrow. (Abstract) *Blood* 1995, 86 (Suppl. 1): 420a.
- Martin-Henao GA, Quiroga R, Sureda A, Gonzalez JR, Moreno V, Garcia J: L-Selectin expression is low on CD34+ cells from patients with chronic myeloid leukemia and interferon- α up-regulates this expression. *Haematologica* 2000, 85: 139-146.
- Matulonis UA, Dosiou C, Lamont C, Freeman GI, Mauch P, Nadler LM, Griffin JD: Role of B7-1 in mediating an immune response to myeloid leukemia cells. *Blood* 1995, 85: 2507-2515.
- McCulloch EA, Curtis IJ, Messner HA, Senn JS, Germanson TD: The contribution of blast cell properties to outcome variation in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1982, 59: 601-608.
- McKenna HJ, Smith FO, Brasel K, Hirschstein D, Bernstein ID, Williams DE, Lyman SD: Effects of flt3 ligand on acute myeloid and lymphocytic leukemic blast cells from children. *Exp Hematol* 1996, 24: 378-385.
- McNiece IK, Briddell RA, Yan XQ, Hartley CA, Gringeri A, Foote MA, Andrews RG: The role of stem cell factor in mobilization of peripheral blood progenitor cells. *Leuk Lymph* 1994, 15: 405-409.
- Meckenstock G, Aul C, Hildebrandt B, Heyll A, germing U, Wehmeier A, Giagoundidis A, suedhoff T, Burk M, Soehngen D, Schneider W: Dyshematopoiesis in de novo acute myeloid leukemia: cell biological features an prognostic significance. *Leuk Lymphoma* 1998, 29: 523-531.
- Meierhoff G, Dehmel U, Gruss HJ, Rosnet O, Birnbaum D, Quentmeier H, Dirks W, Drexler HG: Expression of flt3-receptor and flt3-Ligand in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 1995, 9: 1368-1372.
- Meyer C, Drexler HG: FLT3 ligand inhibits apoptosis and promotes survival of myeloid leukemia cell lines. *Leuk Lymphoma* 1999, 32: 577-81.
- Mitelman K: ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. Karger: Basel, 1995.
- Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW: Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med* 1990, 172: 69-75.
- Mohle R, Moore MA, Nachman RL, Rafii S: Transendothelial migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: An in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line. *Blood* 1997, 89: 72-80.
- Mohle R, Murea S, Kirsch M, Haas R: Differential expression of L-Selectin, VLA-4 and LFA-1 on CD34+ progenitor cells from the bone marrow and peripheral blood during G-CSF-enhanced recovery. *Exp Hematol* 1995, 23: 1535-1542.
- Mole RH: Radiation from Tschnerobyl and the risk of leukemia. *Leukemia* 1991, 5: 443-444.
- Motoji T, Watanabe M, Uzumaki H, Kusaka M, Fukamachi H, Shimosaka A, Oshimi K, Mizoguchi H: Granulocytic colony stimulating factor (G-CSF) receptor on acute myeloblastic leukemia cells and their relationship with the proliferative response to G-CSF in clonogenic assay. *Br J Haematol* 1991, 77: 54-59.
- Mould AP, Komoriya A, Yamada KM, Humphries MJ: The CS5 peptide is a second site in the IIICS region of fibronectin recognised by the integrin $\alpha 4\beta 1$. *J Biol Chem* 1991, 266: 3579-3585.
- Mrozek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Boomfield CD: Clinical significance of cytogenetics in Acute Myeloid Leukemia. *Seminars in Ocol* 1997, 24: 17-31.
- Mrozek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Boomfield CD: Clinical significance of cytogenetics in Acute Myeloid Leukemia. *Seminars in Ocol* 1997, 24: 17-31.

- Munoz L, Nomdedeu JF, Lopez O, Carnicer MJ, Bellido M, Aventin A, Brunet S, Sierra J: Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica* 2001, 86: 1261-1269.
- Muroi K, Nakamura M, Suda T, Amemiya Y, Miura Y: Expression of c-Kit receptor (CD117) and CD34 in leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 1995, 16: 297-305.
- Muroi K, Suda T, Nojiri H, Amemiya Y, Miura Y, Singhal H, Hakomori S: Expression of sialyl-Lewis(x) in CD34-positive leukemic blasts. *Leukemia* 1993, 7: 336-337.
- Needleman SW, Kraus MH, Srivastava SK, Levine PH, Aaronson SA: High frequency of N-ras activation in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1986, 67: 753-757.
- Nimer SD, Golde DW: The 5q-abnormality. *Blood* 1987, 70: 1705-1712.
- Nombdedeu JF, Mateu R, Altes A, Llorente A, Rio C, Estville C, Lopez O, Ubeda J, Rubiol E: Enhanced myeloid specificity of CD117 compared with CD13 and CD33. (Abstract) *Leuk Res* 1999, 23: 341-347.
- Nowak R, Oelschlagel U, Gurth H, Range U, Albrecht S, Krebs U, Hietschold V, Ehninger G: Relations between IL-3-induced proliferation and in vitro cytokine secretion of bone marrow cells from AML patients. *Cytokine* 1999, 11: 435-442.
- Oblakowski P, Bello-Fernandez C, Rettie JE, Heslop HE, Galatowicz G, Veys P, Wilkes S, Prentice HG, G. Hazlehurst, Hoffbrand AV, Brenner MK: Possible mechanism of selective killing of myeloid leukemic blast cells by lymphokine-activated killer cells. *Blood* 1991, 77: 1996-2001.
- Olive D, Lopez M, Blaise D, Viens P, Stoppa AM, Brandley M, Mawas C, Mannoni P, Maraninchi D: Cell surface expression of ICAM-1 (CD54) and LFA-3 (CD58), two adhesion molecules, is upregulated on marrow leukemic blasts after in vivo administration of high-dose recombinant interleukin-2. *J Immunother* 1991, 10: 412-417.
- Orlic D, Fischer R, Nishikawa S, Nienhuis AW, Bodine DM: Purification and characterization of heterogeneous pluripotent hematopoietic stem cell populations expressing high levels of c-kit receptor. *Blood* 1993, 82: 762-770.
- Otey CA, Pavalko FM, Burridge SJ: An interaction between alpha-actinin and beta-1-integrin subunit in vitro. *J Cell Biol* 1990, 111: 721-729.
- Oxley SM, Sackstein R: Detection of an L-Selectin ligand on a hematopoietic progenitor cell line. *Blood* 1994, 84: 3299-3306.
- Pagana L, Pulsoni A, Tosti ME, Avvisati G, Mele L, Mele M, Martino B, Visani G, Cerri R, Di Bona E, Invernizzi R, Nosari A, Clavio M, Allione B, Coser P, Candoni A, Levis A, Camera A, Melillo L, Leone G, Mandelli F: Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto: Clinical and biological features of acute myeloid leukaemia occurring as second malignancy: GIMEMA archive of adult acute leukaemia. *Br J Haematol* 2001, 112: 109-117.
- Paietta E, Andersen J, Yunis J, Rowe JM, Cassileth PA, Tallman MS, Bennett JM, Wiernik PH: Acute myeloid leukaemia expressing the leukocyte integrin CD11b: a new leukemic syndrome with poor prognosis: result of an ECOG database analysis. Eastern Cooperative Oncology Group. *Br J Haematol* 1998, 100: 265-272.
- Palucka AK, Prowit A, Reizenstein P: A supportive role of neural cell adhesion molecule (NCAM) in adhesion between leukaemic blasts and cytotoxic lymphocytes. (Abstract) *Scand J Immunol* 1992, 35: 399-406.
- Pancook JD, Reisfeld RA, Varki N, Vitiello A, Foy RI, Montgomery AM: Expression and regulation of neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J Immunol* 1997 May 158: 4413-4421.
- Papayannopoulou T, Nakamoto B: Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 9374-9378.
- Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B: Anti-VLA-4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/c-kit ligand pathway. *Blood* 1998, 91: 2231-2239.
- Park LS, Waldron PR, Friend D, Sassenfeld HM, Price V, Andersen D, Cosman D, Andrews RG, Bernstein ID, Urdal DL: Interleukin-3, GM-CSF- and G-CSF-receptor expression on cell lines and primary leukemia cells: Receptor heterogeneity and relationship to growth factor responsiveness. *Blood* 1989, 74: 56-65.
- Pedersen-Bjergaard J, Larsen SO: Incidence of acute non lymphocytic leukemia, preleukemia and acute myeloproliferative Syndrome up to 10 years after treatment of Hodgkin's disease. *New Engl J Med* 1984, 307: 965-971.
- Piacibello W, Fubini L, Sanavio F, Brizzi MF, Severino A, Garetto L, Stacchini A, Pegoraro L, Aglietta M: Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* 1995, 86: 4105-4114.
- Piao YF, Okabe T: Receptor binding of human granulocyte colony stimulating factor to the blast cells of myeloid leukemia. *Cancer Res* 1990, 50: 1671-1674.
- Pietsch T, Kvas U, Steffens U, Yakisan E, Hadam MR, Ludwig WD, Zsebo KM, Welte K: Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* 1992, 119: 1206.
- Plesner T, Ploug M, Ellis V, Ronne E, Hoyer-Hansen G, Wittrup M, Pedersen TL, Tscherning T, Dano K, Hansen NE: The receptor for urokinase type plasminogen activator and urokinase is translocated from two distinct intracellular compartments to the plasma membrane on stimulation of human neutrophils. *Blood* 1994, 83: 808-815.
- Poppe B, Van Limbergen H, Van Roy N, Vandecruys E, De Paepe A, Benoit Y, Spelemann F: Chromosomal aberrations in Bloom syndrome patients with myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2001, 128: 39-42.
- Price G, Brenner MK, Prentice HG, Hoffbrand AV, Newland AC: Cytotoxic effects of tumour necrosis factor and gamma-interferon on acute myeloid

leukaemia blasts. *Br J Cancer*, 1987, 55: 287ff.

Prosper F, Stroncek D, McCarthy JB, Verfaillie CM: Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha4beta1 integrin expression and function. *J Clin Invest* 1998, 101: 2456-2467.

Pui CH, Behm FG, Raimondi SC et al: Secondary acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllo-toxins for acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med* 1989, 321: 136-142.

Pui CH, Ribeiro RC, Hancock ML, Rivera GK, Evans WE, Raimondi SC, Head DR, Behm FG, Mahmoud MH, Sandlund JT, et al: Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllo-toxins for acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med* 1991, 325: 1682-1687.

Rappold I, Ziegler BL, Köhler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, Simmons PJ, Zannettino ACW, Hill B, Neu S, Knapp W, Alitalo R, Alitalo K, Ullrich A, Kanz L, Büning HJ: Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 1997, 90: 111-125.

Reif S, Wiesner D, Duell T, Mittermueller J, Schmetzer H: Not the presence but the amount of clonal DNA detectable in remission of Acute Myeloid Leukemia (AML) is predictive for relapse. *Eur J Haematol* 2001, 67: 207-222.

Reuss-Borst MA, Bühring HJ, Schmidt H, Müller CA: Immunophenotypic heterogeneity and prognostic c-kit expression. *Leukemia* 1994, 8: 258-263.

Reuss-Borst MA, Klein G, Waller HD, Müller CA: Differential expression of adhesion molecules in acute leukemia. *Leukemia* 1995, 9: 869-874.

Reuter C, Auf der Landwehr U, Schleyer E, Zuhlsdorf M, Ameling-Wormann B, Buchner T, Hiddemann W: Modulation of intracellular metabolism of cytosine arabinosid in acute myeloid leukemia by granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. *Leukemia* 1994, 8: 217-25.

Reymond N, Fabre S, Lecocq E, Adelaide J, Dubreuil P, Lopez M: Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V-Domain interaction. *J Biol Chem* 2001, 276: 43205-43215.

Roberts AW, Metcalf D: Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulation factor and other cytokines. *Blood* 1995, 86: 1600-1605.

Roberts R, Gallagher J, Spooncer E, Allen TD, Bloomfield F, Dexter TM: Heparan sulphate bound growth factors: A mechanism for stromal mediated haemopoiesis. *Nature* 1988, 332: 367-368.

Roeb E, Rose-John S: Zytokine: Biologie und therapeutische Relevanz. *Dtsch Med Wochenschr* 1996, 121: 803-809.

Rogers SY, Bradbury D, Kozkowski R, Russel HN: Evidence for internal autocrine regulation of growth in acute myeloblastic leukemia cells. *Exp Hematol* 1994, 593-598.

Rosen H, Law SK: The leukocyte cell surface receptors for the iC3b product of complement. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990, 153: 99-122.

Rosen RB, Kang S-JA: Congenital agranulocytosis terminating in acute myelomonocytic leukemia. *J Pediatr* 1979, 94: 406-408.

Rosenfeld C, Kantarjian H: Is myelodysplastic related acute myeloid Leukemia a distinct entity from de novo acute myelogenous Leukemia? Potential for targeted therapies. *Leuk Lymphoma* 2001, 41: 493-500.

Rosner F, Lee SL: Down's syndrome and acute leukemia: myeloblastic or lymphoblastic? *Am J Med* 1972, 53: 203-218.

Rosnet O, Bühring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainy D, Arnoulet C, Chabannon C, Kanz L, Hannum C, Birnbaum D: Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 1996, 10: 238-248.

Ross L, Davis CM, Molony L: A truncated recombinant intercellular adhesion molecule-1 inhibits adhesion of leukemic cell lines to upregulated endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1994, 30A: 875-880.

Rowe JM, Andersen JW, Mazza JJ, Bennet JM, Paieta E, Hayes FA, Oette D, Cassileth PA, Stadtmauer EA, Wiernik PH: A randomized placebo-controlled phase III study of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in adult patients (>55-70 years) with acute myelogenous leukemia: A study of the Eastern cooperative Oncology Group (E1490). *Blood* 1995, 86: 457-462.

Rowe JM, Liesveld JL: Hematopoietic growth factors and acute leukemia. In: *Diagnostic and therapeutic advances in hematologic malignancies*. Hrsg. Tallman MS, Gordon LI, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1999.

Rowe JM: Use of growth factors during induction therapy for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996, 10 Suppl. 1: 40-43.

Sachs L, Lotem J: Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood* 1993, 82: 15-21.

Sackstein R: Expression of an L-Selectin ligand on hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematol* 1997, 97: 22-28.

Saily M, Koistinen P, Savolainen ER: The soluble form of interleukin-6 receptor modulates cell proliferation by acute myeloblastic leukemia blast cells. *Ann hematomol* 1999, 78: 173-9.

San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Diaz-Mediavilla J, Gutierrez N, Canizo N, Ramos F, Calmuntia MJ, Perez JJ, Gonzalez M, Orfao A: Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001, 98: 1746-1751.

Sanchez-Aparicio P, Dominguez-Jimenez C, Garcia-Pardo A: Activation of the alpha4beta1 integrin through the beta1 subunit induces recognition of the RGDS sequence on fibronectin. *J Cell Biol* 1994, 126: 271-279.

- Santini V, Nooter I, Delwel R, Lowenberg B: Susceptibility of acute myeloid leukemia (AML) cells from clinically resistant and sensitive patients to daunomycin (DNR) assessment in vitro after stimulation with colony stimulating factors (CSFs). *Leukemia Res* 1990, 14: 377-380.
- Satoh T, Nakafuku M, Miyajima A, Kaziro Y: Involvement of ras p21 protein in signal transduction pathways from interleukin 2, interleukin 3 and granulocyte/macrophage colony stimulating factor, but not from interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 199, 88: 3314-3318.
- Savary, CA, Lotzova E: Natural killer cells-mediated inhibition of growth of myeloid and lymphoid clonogenic leukemias. *Exp Hematol* 1989, 17: 183-187.
- Schmetzer H, Poleck B, Mittermüller J, Duell T, Wilmanns W, Gerhartz HH: Clonality analysis as a tool to study the biology and response to therapy in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1997, 11: 660-666.**
- Schmetzer HM, Gerhartz HH, Wilmanns W: GM-CSF stimulates proliferation of clonal leukemic bone marrow cells in acute myeloid leukemia (AML) in vitro. *Ann Hematol* 1999, 78: 449-455.**
- Schmetzer HM, Gerhartz HH: Acute myeloid leukemia (AML) can be oligoclonal. *Leukemia* 1993, 7: 1965-1970.**
- Schmetzer HM, Gerhartz HH, Wilmanns W: Detection of acute myeloid leukemic cells in complete remission and in extramedullary sites by clonal analyses. *Acta Haematol* 1996; 96: 83-87.**
- Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Hoffer H, Janicke F, Graeff H: Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* 1997, 78: 285-296.
- Schoch C, Haase D, Fonatsch C, Haferlach T, Löffler H, Schlegelberger B, Hossfeld DK, Becher R, Sauerland MC, Heinecke A, Wormann B, Buchner T, Hiddemann W: The significance of trisomy 8 in de novo acute myeloid leukemia: the accompanying chromosome aberrations determine the prognosis. German AML Cooperative Study Group. *Br J Haematol* 1997, 99: 605-611.
- Schofield KP, Humphries MJ, de Wynter E, Testa N, Gallagher JT: The effect of alpha4beta1-integrin binding sequences of fibronectin on growth of cells from human hematopoietic progenitors. *Blood* 1998, 91: 3230-38.
- Schön D, Hoffmeister H: Bevölkerungsbezogene Krebsregister in der Bundesrepublik Deutschland, Band 3. MMV Medizin Verlag, München 1995; Zahlen und Fakten: zwölf häufige Krebserkrankungen-Spektrum der Wissenschaft Verlag mbh Heidelberg (1996): 72.
- Schwartz S, Heinecke A, Zimmermann M, Creutzig U, Schoch C, Harbott J, Fonatsch C, Löffler H, Buchner T, Ludwig WD, Thiel E: Expression of the c-kit receptor (CD117) is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML and lacks prognostic significance. *Leuk Lymphoma* 1999, 34: 85-94.
- Schweitzer CM, van der Schoot CE, Dräger AM, van der Valk P, Zevenbergen A, Hooibrind B, Westra AH, Langenhuijsen MMAC: Isolation and culture of human bone marrow endothelial cells. *Exp Hematol* 1995, 23: 41-48.
- Scott AA, Head DR, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Theil KS, Grever MR, Chen IM, Whittaker MH, Griffith BB, Licht JD: HLA-DR-, CD33+, CD56+, CD16-myeloid/natural killer cell acute leukemia: a previous unrecognized form of acute leukemia potentially misdiagnosed as French-American-British acute myeloid leukemia-M3. *Blood* 1994, 84: 2824-2825.
- Seidemann K, Henze G, Beck JD, Sauerbrey A, Kuhl J, Mann F, Reiter A: Non-Hodgkins' lymphoma in pediatric patients with chromosomal breakage syndromes (AT and NBS): experience from the BFM trials. *Ann Oncol* 2000, Suppl1: 141-145.
- Semnani RT, Nutman TB, Hochman P, Shaw S, van Seventer GA: Costimulation by purified intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte-associated antigen-3 induces distinct proliferation, cytokine and cell surface antigen profiles in human „naive“ and „memory“ CD4+T cells. *J Exp Med* 1994, 180: 2125-2135.
- Serve H, Büchner T, Berdel WE: Bewährtes und Neues in Diagnose und Therapie der akuten myeloischen Leukämie. *Educationals DKK Berlin* 2000: 25-30.
- Seymour JF, Pierce SA, Kantarjian HM, Keating MJ, Estey EH: Investigations of karyotypic, morphologic and clinical features in patients with acute myeloid leukemia blast cells expressing the neural cell adhesion molecule (CD56). *Leukemia* 1994, 8: 823-826.
- Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM: Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood* 1996, 87: 3563-3570.
- Shimoda K, Okamura S, Harada N, Ikematsu W, Kondo S, Kawasaki C, Tanaka T, Etou T, Akashi K, Okamura T, Shibuya T, Harada M, Niho Y: Granulocyte colony stimulating factor receptors on human acute leukemia: Biphenotypic leukemic cells possess granulocytes colony stimulating factor receptors. *Cancer Res* 1992, 52: 3052-3055.
- Shinjo K, Takeshita A, Ohnishi K, Ohno R: Granulocyte colony stimulating factor receptor at various differentiation stages of normal and leukemic hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma* 1997, 25: 37-46.
- Siczkowski M, Clarke D, Gordon MY: Binding of primitive hematopoietic progenitor cells to marrow stromal cells involves heparan sulfate. *Blood* 1992, 80: 912-919.
- Simmons PJ, Zannettion A, Gronthos S, Leavesley D: Potential adhesion mechanisms for the localisation of hematopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leuk Lymphoma* 1994, 12: 353-363.
- Simon D, Rao N, Yu H, Wei Y, Majdic O, Ronne E, Kobzik L, Chapman H: Mac-1 (CD11b/CD18) and the urokinase receptor (CD87) form a functional unit on monocytic cells. *Blood* 1996, 88: 3185-3194.
- Smith MA, Smith JG, Pallister CJ, Singer CR: Kinetic characteristics of de novo and secondary AML cells influence their response to haemopoietic growth factor (HGF) priming and correlates with clinical outcome. *Leuk Res* 1999, 23: 987-997.

- Socinski MA, Cannistra SA, Elias A, Antman KH, Schnipper L, Griffin JD: Granulocyte - Macrophage colony stimulation factor expands the circulation of the hematopoietic progenitor cell compartment *Lancet* 1988, 1: 1194-1198.
- Soligo D, Schiro R, Luksch R, Manara G, Quirici N, Parravicini C, Delflers G: Expression of integrins in human bone marrow. *Br J Haematol* 1990, 76: 323-332.
- Southam CM, Craver LF, Dargeon HW et al: A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer* 1951, 4: 39-59.
- Stacchini A, Fubini L, Severino A, Sanavio F, Aglietta M, Piacibello W: Expression of type III receptor tyrosine kinases FLT3 and KIT and responses to their ligands by acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia* 1996, 10: 1584-1591.
- Stamencovic I: The L-Selectin adhesion system. *Curr Sci* 1995, 2: 68-75.
- Steelman LS, Algate PA, Blalock WL, Wyng XY, Prevost KD, Hoyle PE, McCubrey JA: Oncogenic effects of overexpression of the interleukin-3 receptor on hematopoietic cells. *Leukemia* 1996, 10: 528-542.
- Steidl U, Haas R, Kronenwett R: ICAM-1 on monocytes mediates adhesion as well as transendothelial migration and can be downregulated using antisense oligonucleotides. *Ann Hematol* 2000, 79: 414-423.
- Steward WP: Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Lancet* 1993, 342: 153-157.
- Strout MP, Caliguri MA: Developments in cytogenetics and oncogenes in acute leukemia. *Curr Opin Oncol* 1997, 9: 8-17.
- Stucki A, Cordey AS, Monai N, Schapira M, Spertini O: Activation of vascular endothelial cells by leukemic blast cells: A mechanism of leukostasis. *Blood* 1995, 86: 435.
- Sui X, Tsuji K, Ebihara Y, Tanka R, Muraoka K, Yoshida M, Yamada K, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Nakahata T: Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor with IL-6 stimulates Megakaryopoiesis from human CD34+ Cells through glycoprotein (gp)130 signaling. *Blood* 1999, 93: 2525-2532.
- Tafari A, Andreeff M: Kinetic rationale for cytokine- induced recruitment of myeloblastic leukemia followed by cycle-specific chemotherapy in vitro. *Leukemia* 1990, 4: 826-834.
- Tafari A, de Felice L, Goodacre A, Fenu S, Petrucci MT, Valentini T, Alimena G, Petti MC, Meloni G, Mandelli F: Interleukin-3 priming in acute myeloid leukaemia patients. *Br J Haematol* 1995, 91: 234-244.
- Takahira H, Gotoh A, Ritchie A, Broxmeyer HE: Steel factor enhances integrin mediated tyrosine phosphorylation of p125FAK in human hematopoietic cells, possibly through inside-out-signaling. *Blood* 1995, 86: 253.
- Tarella C, Benedetti G, Caracciolo D, Castellino C, Cherasco C, Bondesan P, Omede P, Ruggieri D, Gianni AM, Pileri A: Both early and committed hematopoietic progenitors are more frequent in peripheral blood than in bone marrow during mobilization induced by high dose chemotherapy. *Br J Haematol* 1995, 91: 535-543.
- ten Bosch GJA, Toornvliet AC, Friede T, Melief CJM, Leeksa OC: Recognition of peptides corresponding to the joining region of p210 (BCR-ABL) protein by human T-cells. *Leukemia* 1995, 9: 1344-1348.
- Texeido J, Hemler ME, Greenberger JS, Anklesaria P: Role of $\beta 1$ and $\beta 2$ -integrins in the adhesion of human CD34 HI stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest* 1992, 90: 358-367.
- Thin HF, Wang CH, Lin MT, Lee FY, Liu MC, Chuang SM, Chen YC, Shen MC, Lin KH, Lin DT: Correlation of cytogenetic results with immunophenotype, genotype, clinical features and ras mutation in acute myeloid leukemia. A study of 235 Chinese patients in Taiwan. (Abstract) *Cancer Genet Cytogenet* 1995, 84: 60-68.
- Thomas X, Vila L, Campos L, Sabido O, Archimbaud E: Expression of N-CAM (CD56) on acute leukemia cells: Relationship with disease characteristics and outcome. *Leuk Lymphoma* 1995, 19: 295-300.
- Timar J, Bartha DC, Ladanyi A, Tarcsafalvi A, Lapis K: PMA induces shift from chondroitin to heparan sulphate on proteoglycans correlating with fibronectin adhesion of MDS human leukemia cells. *Anticancer Res* 1994, 14: 1227-1231.
- Timonen T, Patarroyo M, Gahmberg CG: CD11a-c/CD18 and gp84 (LB-2) adhesion molecules on human large granular lymphocytes and their participation in natural killing. *J Immunol* 1988, 141: 1041-1046.
- Tong J, Gordon MS, Srour EF, Cooper RJ, Orazi A, Mc Niece I, Hoffman R: In vivo administration of recombinant methionyl human stem cell factor expands the number of human marrow hematopoietic stem cells. *Blood* 1993, 82: 784-791.
- Torensma R, Raymakers RAP, van Kooyk Y, Figdor CG: Induction of LFA-1 on pluripotent CD34+ bone marrow cells does not affect lineage commitment. *Blood* 1996, 87: 4120-4128.
- Trujillo JM, Cork A, Ahearn MJ, Youness EL, McCredie KB: Hematologic and cytologic characterization of 8/21 translocation acute granulocytic leukemia. *Blood* 1979, 53: 695-706.
- Tsuzuki M, Ezaki K, Maruyama F, Ino T, Kojima H, Okamoto M, Yamaguchi T, Nomura T, Miyazaki H, Wakita M, Matsui T, Hirano M: Proliferative effects of several hematopoietic growth factors on acute myelogenous leukemia cells and correlation with treatment outcome. *Leukemia* 1997, 11: 2125-2130.
- Tucker J, Dorey E, Gregory WM, Simpson AP, Lister TA, Horton MA: Immunophenotype of blast cells in acute myeloid leukemia may be a useful predictive factor for outcome. *Hematol Oncol* 1990, 8: 47-58.

- Turner AM, Lin NL, Issarachai S, Lyman SD, Broudy VC: FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Blood* 1996, 33: 3383-3390.
- Valverde LR, Matutes E, Farahat N, Heffernan A, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Catovsky D: C-Kit receptor (CD117) expression in acute leukemia. *Ann Hematol* 1996, 72: 11-15.
- Verfaillie CM, Mc Carthy JB, McGlave PB: Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alteration in their interactions with fibronectin. *J Exp Med* 1991, 174: 693-703.
- Vila L, Thomas X, Campos L, Sabido O, Archimbaud E: Expression of VLA molecules on acute leukemia cells: Relationship with disease characteristics. *Exp Hematol* 1995, 23: 514-518.
- Wagner C, Hansch GM, Stegmaier S, Deneffeh B, Hug F, Schoels M: The complement receptor C, CR3 (CD11b/Cd18) on T-Lymphocytes: activation-dependent up regulation and regulatory function. *Eur J Immunol* 2001, 31: 1173-1180.
- Wells SJ, Bray RA, Stempora LL, Farhi DC: CD117/CD34 expression in leukemic blasts. *Am J Clin Path* 1996, 106: 192-195.
- Wetzler M, Estrov Z, Talpaz M, Kim KJ, Alphonso M, Srinivasan R, Kurzrock R: Leukemia inhibitory factor in long term adherent layer culture: Increased levels of bioactive protein in leukemia and modulation by IL-4, IL-1beta and TNF-alpha. *Cancer Res* 1994, 54: 1837-1842.
- Whiteside TL, Rabinowich H: the role of FAS/FASL in immunosuppression induced by human tumors. *Cancer Immunol Immunther* 1998, 46: 175-184.
- Wielenga JJ, Vellenga E, Groenewegen A, Sonneveld P, Lowenberg B: Recombinant human interleukin-3 (rH IL-3) in combination with remission induction therapy in patients with relapsed acute myelogenous leukemia (AML): a phase I/II study. *Leukemia* 1996, 10: 43-47.
- Wijermans PW, Rebel VI, Ossenkoppele GJ, Huijgens PC, Langenhuijsen MM: Combined procoagulant activity of acute promyelocytic leukemic cells: reversal of the bleeding disorder by cell differentiation. *Blood* 1989, 73: 800-805.
- Williams, GT, Smith, CA, Spooncer, E, Dexter TM, Taylor DR: Hematopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 1990, 343: 76-79.
- Willmanns W, Nüssler V (Hrsg.): Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge - Leukämien und myelodysplastische Syndrome. 1. Auflage, 1996: 29-75.
- Wilms K: Akute Leukämien. In: Lehrbuch der Inneren Medizin, Kapitel Erkrankungen der Leukopoese (W.Siegenthaler, Hrsg.) 1992, 3. Aufl., Georg – Thieme-Verlag Stuttgart- New York: S. 699 ff
- Winick NJ, McKenna RW, Shuster JJ, Schneider NR, Borowitz MJ, Bowman WP, Jacaruso D, Kamen BA, Buchanan GR: Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide. *J Clin Oncol* 1993, 11: 209-217.
- Winter JN, Lazarus HM, Rademaker A, Villa M, Mangan C, Tallman M, Jahnke L, Gordon L, Newman S, Byrd K, Cooper BW, Horvath N, Crum E, Stadlmauer EA, Conklin E, Bauman A, Martin J, Goolsby C, Gerson SL, Bender J, O'Gorman M: Phase I/II study of combined granulocyte colony stimulating factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor administration for the mobilization of hematopoietic progenitor cells. *J Clin Oncol* 1996, 14: 277-286.
- Wognum AW, de Jong MO, Wagemaker G: Differential expression of receptors for hematopoietic growth factors on subsets of CD34+ hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma* 1996, 24: 11-25.
- Xu ZX, Xu Y, Zhu JK, Li CX, Zhang XG: Effects of dexamethasone on FLT3 receptor expression and proliferation induced by recombinant human Flt3 ligand in malignant hematopoietic cells. *Acta Pharmacol Sin* 2001, 22: 534-540.
- Yamaguchi M, Ikebuchi K, Hirayama F et al: Different adhesive characteristics and VLA-4 expression of CD34+ cells during mobilization with G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1999, 23: 1-8.
- Yan XQ, Briddell R, Hartley C, Stoney G, Samal B, McNiece I: Mobilization of long-term hematopoietic reconstituting cells of mice by the combination of stem cell factors plus granulocyte colony stimulating factor. *Blood* 1994, 84: 795-799.
- Yang G, Hellstrom KE, Hellstrom I, Chen L: Antitumor immunity elicited by tumor cells transfected with B7-2 Ligand for CD28/CTLA-4 costimulatory molecules. *J Immunol* 1995, 154: 2794-2800.
- Yoder MC, Williams DA: Matrix molecules interactions with hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 1995, 23: 961-967.
- Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, Sonoda Y, Abe T, Kashima K, Matsuo Y, Naoe T: Internal tandem duplication of the flt3-gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 1997, 11: 1605-1609.
- Young DC, Griffin JD: Autocrine secretion of GM-CSF in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1986, 68: 1178-1181.
- Young DC, Wagner K, Griffin JD: Constitutive expression of the granulocyte-macrophage- colony stimulating factor gene in acute myelocytic leukemia. *J Clin Invest* 1987, 79: 100-106.
- Zeigler FC, Bennett BD, Jordan CT, Spencer SD, Baumhueter S, Carroll KJ, Hooley J, Bauer K, Matthews W: Cellular and molecular characterization of the FLK-2/FLT-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells. *Blood* 1994, 84: 2422-2430.
- Zeytun A, Hassuneh M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS: Fas-Fas ligand-based interactions between tumor cells and tumor specific cytotoxic T lymphocytes: a lethal two-way street. *Blood*, 1997, 90: 1952-1959.

Zhou YW, Komada Y, Inaba H, Deguchi T, Sugiyama K, Azuma E, Sakurai M: Functional significance of adhesion molecules in Fas dependent apoptotic cell death induced by interleukin-2-activated T-cells. *Immunol Invest* 1998; 27: 309-322.

Zittoun R: The EORTC trials for acute myelogenous leukemia. EORTC Leukemia Cooperative Group. European Organisation of Research and Treatment of Cancer. *Hematol Cell Ther* 1996, 38: 247-252.

EIGENE PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

Graf M, Stein D, Bauer CP:

„**Wirksamkeit von Montelukast und DNCG beim exercise- induced Asthma in Abhängigkeit von der Asthmaform**“ 23. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatr. Pneumologie, Monatszeitschrift Kinderheilkunde, März 2001.

Graf M, Danhauser-Riedl S, Reif S, Schoch C, Schnittger S, Haferlach T, Hiddemann W, Schmetzer H:

„**Expression of Cytokine Receptors on Blasts of Acute Myeloid Leukemia**“
Onkologie, September 2001, 24 (Sonderheft 6): S. 116, Nr. 443.

Graf M, Danhauser-Riedl S, Reif S, Schoch C, Schnittger S, Haferlach T, Hiddemann W, Nüssler V, Schmetzer H:

„**Low CD62L Expression Correlates with Bad Cytogenetic Risk in Patients with Acute Myeloid Leukemia**“
European Journal of Cancer, September 2001, 37, Suppl.3; Nr. 9.

Graf M, Danhauser-Riedl S, Reif S, Schoch C; Schnittger S, Haferlach T, Hiddemann W, Nüssler V, Schmetzer H:

„**Expression of Adhesion Molecules and Costimulatory Antigens in Acute Myeloid Leukemia**“
Blood, November 2001, 98, Suppl.2; Nr.4445.

DANKSAGUNG

Frau PD Dr. rer. nat. Helga Schmetzer danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und der durchflusszytometrischen Daten. Ganz besonders haben mir ihre engagierte Diskussionsbereitschaft, ihre konkreten Anregungen, sowie die menschliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit geholfen. Jederzeit fand ich bei ihr ein offenes Ohr, sogar als Familien- und Laboralltag ihr nur wenig Zeit ließen.

Bei Herrn Professor Dr. med. W. Hiddemann bedanke ich mich für die sehr interessante Arbeit in seiner Klinik und für seine unbürokratische Unterstützung.

Herrn PD Dr. med. V. Nüssler danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Labor, der zahlreichen Diskussionbeiträge im Rahmen der Laborseminare und den vielen aufmunternden Worten und der Unterstützung in schwierigen Phasen dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern unseres Labors für die gute Zusammenarbeit und die fachkundige Unterstützung bedanken: Frau Tanja Kröll, Frau Renate Pelka-Fleischer und Herrn Robert Esterer.

Herrn PD Dr. Dr. med T. Haferlach aus dem Labor für Leukämiediagnostik danke ich für die Überlassung der morphologischen und zytochemischen Untersuchungsbefunde, sowie für die Versendung der Fragebögen und die Übermittlung einiger klinischer Daten.

Bei Frau Dr. C. Schoch aus dem Labor für Leukämiediagnostik bedanke ich mich für die Überlassung der zytogenetischen Befunde.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Freundin Stefanie Kammermeier bedanken für die jahrelange Mitbetreuung meines Sohnes Michaels.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Wolfgang für sein großes Verständnis und die stete Hilfsbereitschaft in allen Phasen dieser Arbeit.

Auch bei meinem Sohn Michael möchte ich mich bedanken. Trotz seiner jungen Jahre hat auch er großes Verständnis für seine „nur vor dem Computer“ sitzende Mutter aufgebracht und geduldig Tag für Tag die Anzahl der Seiten, die noch zu schreiben waren, gezählt.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die durch ihre jahrelange, tatkräftige und „moralische“ Unterstützung diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Ganz besonders möchte ich mich auch für die liebevolle Betreuung meines Sohnes Michaels während meines ganzen Studiums und während der Akutphasen dieser Arbeit bedanken.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:	<p><i>Michaela Graf</i> geb. am 13.01.1973 in Starnberg, ledig</p> <p>Sohn <i>Michael</i>, geb. am 31.10.1990</p>
Schulbildung:	<p>09/1979 - 08/1983 ab 09/1983 08/1992</p> <p>Grundschule Pähl Gymnasium Weilheim Abitur</p>
Studium	<p>ab 11/ 1992</p> <p>Studium der Humanmedizin, LMU München</p> <p>Stipendium aus der Hochbegabtenförderung der Friedrich - Neumüller - Stipendium - Stiftung</p>
08/ 1994	Physikum
03/ 1996	I. Staatsexamen
03/ 1998	II. Staatsexamen
10/ 1999	III. Staatsexamen
Promotion:	<p>Thema: „Bedeutung der Expression von Zytokinrezeptoren, Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Molekülen und deren klinische Relevanz bei der akuten myeloischen Leukämie“ Klinikum Großhadern, Betreuung: PD Dr. H. Schmetzer</p>
seit 4/ 2001	
Praktische Tätigkeiten:	
1995	Famulaturen: Kinderchirurgie (Kenyatta –Hospital, University Nairobi, Kenia)
1997	Kinderheilkunde (Kinderklinik Starnberg) Innere Medizin (Praxis)
1999	Psychiatrie (Psychiatr. Klinik, Nußbaumstr.7, München) Kinderheilkunde (Städt. Krankenhaus Harlaching)
1998/ 99	Praktisches Jahr: Kreiskrankenhaus Starnberg: Chirurgie, Kinderheilkunde, Innere Medizin
12/1999 – 5/2001	Ärztin im Praktikum in der Fachklinik Gaißach (Fachklinik für chron. Erkrankungen des Kindes- und Jugendalters)
seit 3/2002	Medizinisch-wissenschaftliche Projektleitung, Fa. Servier Deutschland