

# **Zytotoxizität von Treosulfan im Vergleich zu Busulfan gegenüber malignen Zellen pädiatrischer Patienten mit akuten Leukämien**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

Von  
**Doreen Munkelt**  
Aus Weißenfels

Frankfurt am Main, 2008

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Erster Gutachter: Prof Dr. J. Kreuter

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. T. Klingebiel

Datum der Disputation: 20.01.2009

***Auch aus Steinen die man dir in den Weg legt,  
kannst du etwas Schönes bauen***

***Für meinen versorbenen Großvater***



---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1. Busulfan – ein Alkylanz mit langer Tradition .....	6
1.1.1. Klinische Erfahrungen und Wirkmechanismen .....	6
1.1.2. Zytotoxizität, Toxizität und Pharmakokinetik .....	9
1.1.3. Orales Busulfan und die <i>in vitro</i> Variante Busilvex® - Klinische Daten und unerwünschte Nebenwirkungen .....	11
<b>1.2. Treosulfan.....</b>	<b>13</b>
1.2.1. Wirkmechanismen.....	13
1.2.2. Pharmakologie, Pharmakokinetik und Toxikologie in nicht klinischen Studien.....	15
1.2.3. Klinische Relevanz von Treosulfan bei Erwachsenen.....	19
1.2.4. Klinische Relevanz von Treosulfan bei Kindern .....	21
<b>1.3. Behandlung hämatologisch onkologischer Patienten.....</b>	<b>23</b>
1.3.1. Akute Leukämien im Kindesalter.....	23
1.3.2. Konditionierung und Stammzell-Transplantation in der pädiatrischen Onkologie .....	26
1.3.3. Immunrestitution nach Stammzell-Transplantation .....	29
<b>2. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>34</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Zellen .....</b>	<b>35</b>
3.1.1. Geräte.....	35
3.1.2. Verbrauchsmaterialien .....	36
3.1.3. Chemikalien, Medien und Zusätze .....	36
3.1.4. Antikörper .....	37
3.1.5. Verwendete Zelllinien.....	38
<b>3.2. Methoden und Patienten .....</b>	<b>39</b>
3.2.1. Pharmakokinetische <i>in vitro</i> Untersuchungen an Zelllinien, Patientenproben und normalen Lymphozyten .....	39
3.2.2. Isolierung mononukleärer Zellen mittels Ficoll .....	40
3.2.3. Verwendete Proben für frische Leukämiezellen .....	41

3.2.4. Aufreinigungsmethoden von Lymphozyten gesunder Spender.....	41
3.2.4.1 Aufreinigungen mittels CliniMACS .....	42
3.2.4.2. Aufreinigung mittels Rosette Sep-Kit .....	42
3.2.5. Kultivierung und Expansion von Zellen .....	43
3.2.5.1. Kultivierung und Expansion von Zelllinien .....	43
3.2.5.2. Kultivierung und Expansion von primären Leukämiezellen.....	43
3.2.5.3. Kultivierung und Expansion von normalen Lymphozyten.....	44
3.2.6. Grundlagen der Durchflusszytometrie .....	44
3.2.7. Bestimmung der Zellzahl .....	46
3.2.8. Bestimmung der Zytotoxizität .....	46
3.2.8.1. Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Assay .....	46
3.2.8.2. Bestimmung der Zytotoxizität mittels durchflusszytometrischem Assay ...	48
3.2.9. Untersuchung der Zytostatika-Interaktion.....	51
3.2.10. Western-Blotting.....	51
3.2.11. <i>In vivo</i> Untersuchungen - Untersuchung der Immunrekonstitution.....	53
3.2.11.1. Einschlusskriterien der Patienten .....	53
3.2.11.2. Messung der Immunstati .....	53
3.2.12. Median-Effekt-Analysen .....	54
3.2.13. Statistik und Auswertung .....	55
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1. Untersuchungen an Zelllinien .....</b>	<b>56</b>
4.1.1. Korrelation zwischen dem MTT-Assay und einem optimierten durchfluss- zytometrischen Assay zur Bestimmung von Zytostatika-Toxizitäten .....	56
4.1.2. Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Leukämie-Zelllinien .....	60
4.1.3. Apoptoseinduktion durch Treosulfan.....	62
4.1.4. Interaktion von Treosulfan und Busulfan mit Fludarabin bei Molt 4/8 Zellen .	63
4.1.5. Untersuchung der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber Neuroblastom-Zelllinien .....	64
<b>4.2. Untersuchungen an Zellen gesunder Spender.....</b>	<b>66</b>
4.2.1. Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf Subpopulationen von Lymphozyten und auf hämatopoetische Stammzellen.....	66
4.2.1.1. Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf normale Lymphozyten .....	66
4.2.1.2. Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf hämatopoetische Stammzellen	67

---

<b>4.3. Untersuchungen an Patientenmaterial.....</b>	<b>69</b>
4.3.1. <i>In vitro</i> Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf frisch isolierte Leukämiezellen pädiatrischer Patienten .....	69
4.3.2. Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf Leukämiezellen im Vergleich zu normalen Lymphozyten .....	75
4.3.3. <i>In vivo</i> Immunrekonstitution nach der Konditionierung mit Treosulfan bzw. Busulfan.....	76
4.3.3.1. Vergleich der Immunrekonstitution unterschiedlicher Lymphozyten- Subpopulationen .....	76
4.3.3.2. Untersuchung der Rekonstitution von naiven, memory und aktivierten T-Zellen nach Konditionierung mit Treosulfan .....	81
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>83</b>
<b>5.1. Korrelation der Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität .....</b>	<b>83</b>
<b>5.2. <i>In vitro</i> Daten zur Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf maligne             Zellen .....</b>	<b>87</b>
<b>5.3. <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Daten zur Konditionierung mit Busulfan und             Treosulfan – Wirkung auf maligne und nicht maligne Zellen.....</b>	<b>91</b>
<b>5.4. <i>In vivo</i> Daten – Immunrekonstitution nach Treosulfan- oder Busulfan-             Konditionierung .....</b>	<b>94</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>98</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>100</b>
<b>8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>116</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AUC	Area Under the Curve
cALL	common ALL
CFU	Colony Forming Units
Cl	Clearance
Cmax	maximale Plasmakonzentration
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie-Virus
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
DMA	(N,N) - Dimethylacetamid
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EFS	Event Free Survival (ereignisfreies Überleben)
FCS	fötales Kälberserum
Flt-3	Fms-related tyrosine kinase 3
FK	Fluoreszenzkanal
G-CSF	Granulocyte-Colony-Stimulating Factor
GvHD	Graft versus Host Disease
GvT	Graft versus Tumor
HDC	Hochdosis-Chemotherapie
HLA	Human Leucocyte Antigen
IC	Inhibitorische Konzentration
KG	Körpergewicht
LC	Lethale Konzentration
LD	Lethale Dosis
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major Histokompatibilitäts Komplex
MNZ	Mononukleäre Zellen
MRD	Minimal Residual Disease
MTX	Methotrexate
MW	Mittelwert
PBSC	Periphere Blutstammzellen
PE	Phycoerythrin

PI	Propidiumiodid
SD	Standardabweichung
SZT	Stammzelltransplantation
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TBI	Total Body Irradiation
TI	Therapeutic Index
Vd/F	scheinbares Verteilungsvolumen
VOD	Veno Occlusive Disease
V <sub>ss</sub>	Volume of distribution at steady state
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVK	Zentraler Venenkatheder

# 1. Einleitung

## 1.1. Busulfan – ein Alkylanz mit langer Tradition

### 1.1.1. Klinische Erfahrungen und Wirkmechanismen

Busulfan ist ein Zytostatikum mit sehr langer Tradition. Es kommt bereits seit über 50 Jahren in der Therapie maligner Erkrankungen zum Einsatz. Busulfan wirkt myeloablativ auf sich teilende Zellen, es ist aber nicht ausgeschlossen, dass es auch auf ruhende Zellen eine Wirkung hat (Produkt Monograph Busulfan 2003). In der Mitte der 50er Jahre wurde das Alkylanz als niedrig dosierte Palliativbehandlung bei akuten und chronischen Leukämien bei Erwachsenen eingesetzt (Galton 1953, Haddow 1953). Dabei wurden die Patienten mit 0,1 mg/kg Körpergewicht pro Tag behandelt (Fachinformation Myleran 1999).

Wird Busulfan in Hochdosis eingesetzt, kommt es zu einer umfangreichen Myelosuppression, was letztlich zu der Aufnahme von Busulfan in Konditionierungsschemata vor Stammzell- oder Knochenmarktransplantation führte (Santos et al. 1983). Die hervorgerufene Myelosuppression führte zu einer drastischen Reduktion der Vorläufer von Granulozyten und Monozyten. Dagegen nahm die Zahl an Lymphozyten und Thrombozyten weniger schnell ab (Morstyn et al. 1981). Bei diesen Hochdosisprotokollen wurde die Standarddosis von 0,1 mg/kg Körpergewicht (KG) pro Tag um ein Vielfaches überschritten. In einer der ersten Studien (Santos et al. 1983) wurden 51 an akuter, nicht lymphatischer Leukämie erkrankte Patienten mit 4 x 1 mg/kg KG / Tag konditioniert und anschließend eine Transplantation mit HLA-identem Knochenmark vorgenommen.

In den letzten Jahrzehnten erfolgte zur Optimierung von Behandlungsprotokollen eine Entwicklung in Richtung von Polychemotherapien, bei denen mehrere, aus verschiedenen Wirkklassen stammende Zytostatika zum Einsatz kamen. So wurde auch Busulfan als Kombinationstherapie eingesetzt, vorrangig mit Cyclophosphamid, Melphalan, Thiothepa, Etoposid und / oder Mitoxantron (Galimberti et al. 1987, Geller und Dix 1999, Geller et al. 1988, Maschan et al. 1997, Nevill et al. 1992, Slattery et al. 1997). Ein häufig gewähltes Schema zur Konditionierung bei Erwachsenen besteht aus 16 Dosen á 0,8 mg/kg KG Busulfan an vier aufeinander folgenden Tagen (-8 bis -5), gefolgt von 2 Therapietagen mit jeweils 60 mg/kg KG Cyclophosphamid (-3 und -2). Dabei wird Busulfan zur Myeloablation eingesetzt und Cyclophosphamid hat eine vorrangig immunsuppressive

Funktion. So wird sichergestellt, dass der Empfänger optimal auf die sich anschließende Transplantation vorbereitet wird.

In den 90er Jahren wurden vier große randomisierte Studien mit oralem Busulfan durchgeführt. In einer Vergleichsstudie von TBI/Cyclophosphamid und Busulfan/Cyclophosphamid vor allogener Knochenmark-Transplantation bei hämatologischen Erkrankungen konnte für die AML ein Vorteil für die TBI/Cyclophosphamid Behandlung gezeigt werden mit Verringerung der Rezidivrate und damit einem besseren Outcome (Blaise et al. 1992). Zehn Jahre nach erfolgter Studie wurde eine erneute Auswertung vorgenommen, bei der festgestellt wurde, dass mit Busulfan behandelte Patienten ein 10% höheres Überleben als die Parallelgruppe zeigten; die Inzidenz für späte Komplikationen war vergleichbar (Blaise et al. 2001).

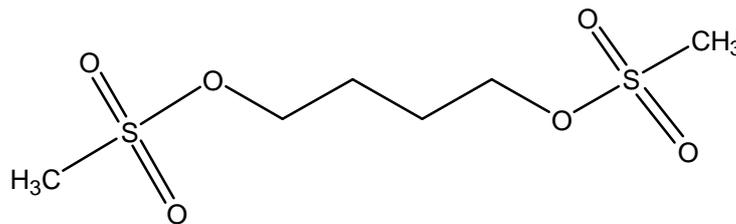
Als therapeutisches Fenster wurden Plasmakonzentrationen von 600 – 1000 ng/ml angegeben, was einer Area under the Curve (AUC) von 900 – 1500  $\mu\text{M} \times \text{min}$  entspricht (Produkt Monograph Busulfan 2003). In einigen Arbeiten wurde demonstriert, dass bei einer AUC > 1500  $\mu\text{M} \times \text{min}$  sehr schwerwiegende Toxizitäten auftreten können, vordergründig ist hier die veno-occlusive disease (VOD) zu nennen (Dix et al. 1996, Grochow 1993, Grochow et al. 1989, Slattery et al. 1997). Allerdings zeigt im Gegensatz dazu eine AUC von < 900  $\mu\text{M} \times \text{min}$  eine geringere Effizienz, was zu einer erhöhten Rezidiv- oder Abstoßungsrate führte (Slattery et al. 1997, Slattery et al. 1995).

Eine besondere Problematik bei der Behandlung von pädiatrisch-onkologischen Patienten stellte die bis 2003 vorherrschende orale Applikation des Medikaments dar. Myleran® war als 2 mg Tabletten auf dem Markt erhältlich. Wollte man ein Kind mit Hochdosis Busulfan behandeln (16 x 1 mg/kg KG über 4 Tage), kam man je nach Gewicht des Kindes auf eine sehr große Anzahl von Tabletten (Beispiel: bei einem 25 kg schweren Kind: bis zu 50 Tabletten täglich). Das führte zu einer großen Abwehrhaltung von Seiten des Patienten, die durch therapiebedingtes Unwohlsein noch verstärkt wurde. 1999 kam die intravenöse Variante Busilvex® auf den Markt, zuerst in den USA, anschließend in Asien und Israel. Am 11. Juli 2003 erhielt Busilvex® in Deutschland die Zulassung (Fachinformation Myleran 1999). Es wird als 2-Stunden Infusion über einen zentralen Venenkatheter (ZVK) verabreicht. Die intravenöse Variante führte zu einer Verringerung der Variabilität der systemischen Verfügbarkeit. Allerdings war auf Grund der geringen Löslichkeit von Busulfan ein Lösungsvermittler, in dem Falle DMA (N, N-Dimethylacetamid), nötig.

Im Gegensatz zu Erwachsenen ist es bei Kindern noch nicht gelungen ein therapeutisches Fenster für Busulfan in der Hochdosis-Chemotherapie (HDC) zu bestimmen. Ein Vorteil

von Busulfan ist, dass Busulfan, im Vergleich zur Bestrahlung, keinen Einfluss auf das Knochenwachstum zeigt (Gutierrez-Delgado et al. 2001, Kroger et al. 2001, Socie et al. 2001).

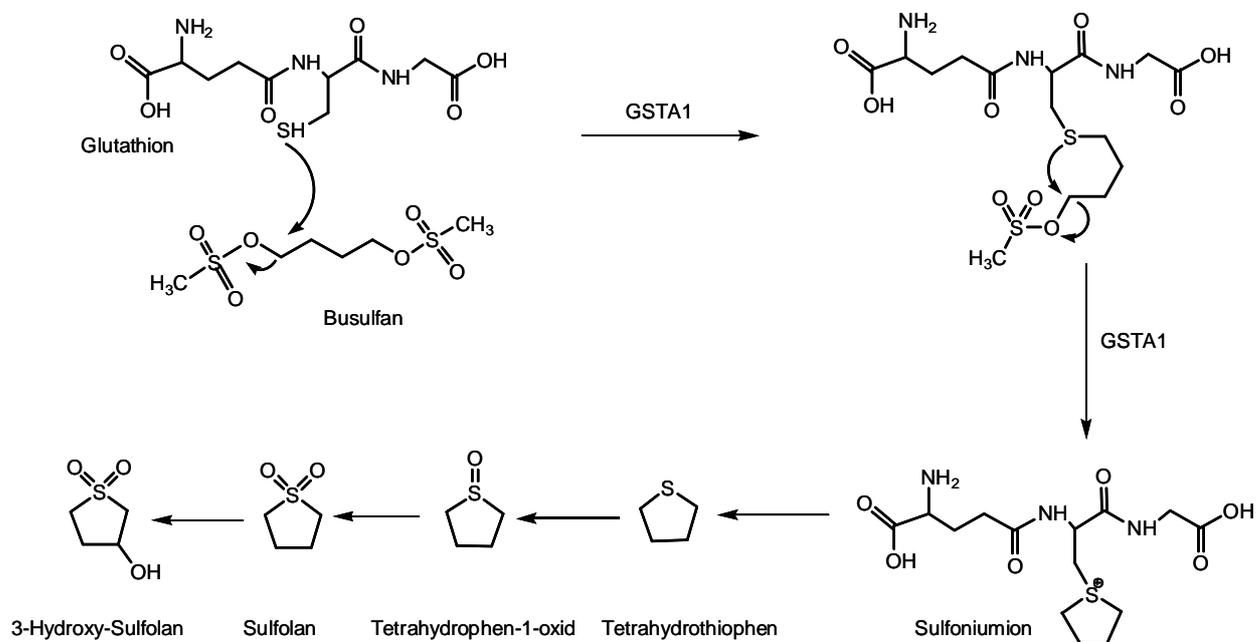
Wie erwähnt, handelt es sich bei Busulfan um ein Alkylanz, die Strukturformel zeigt Abbildung 1. Das Alkylanz gelangt durch passive Diffusion in die Zellen, was eventuell auch die erhöhte Zytotoxizität auf Granulozyten erklärt, da diese eine erhöhte Permeabilität im Vergleich zu anderen Zellen aufweisen (Buggia et al. 1994). Busulfan wird vorrangig hepatisch metabolisiert und weniger als 2% der verabreichten Dosis werden unverändert wieder ausgeschieden (Ehrsson et al. 1983).



**Abbildung 1: Strukturformel Busulfan** (Myleran®, Busilvex®)

Die Metabolisierung von Busulfan erfolgt sowohl enzym- als auch glutathionabhängig (Abbildung 2 (Hassan und Ehrsson 1987a)). Dabei erfolgt als einleitender Schritt eine Konjugation von Busulfan an Glutathion (katalysiert durch das Enzym Glutathion-S-Transferase A1 (GSTA1)) und es entsteht ein Sulfiniumion als instabiles primäres Zwischenprodukt (Marchand et al. 1988), anschließend ein positiv geladenes Sulfoniumion. Die bei der folgenden Hydrolyse und Oxidationskette entstehenden Produkte weisen allerdings keine zytotoxische Aktivität mehr auf (Hassan und Ehrsson 1987b). Der Wirkmechanismus von Busulfan wurde hinreichend aufgeklärt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Busulfan hauptsächlich Guanosylbasen alkyliert (Tong und Ludlum 1980), es kommt zu einer DNA-Quervernetzung (Millar et al. 1986, Tong und Ludlum 1980), die in Einzelstrangbrüchen mündet. Es wurde klar, dass die Anzahl der DNA-Quervernetzungen und damit die Zytotoxizität proportional zur eingesetzten Dosis ist (Chaney und Sancar

1996). Am empfindlichsten reagieren Zellen auf Busulfan in der G1-Phase. Durch die erfolgten DNA-Quervernetzungen wird der Zellzyklus in der G-Phase arretiert (Hassan et al. 2001).



**Abbildung 2: Schema der Metabolisierung von Busulfan.**

GSTA = Glutathion-S-Transferase A1

### 1.1.2. Zytotoxizität, Toxizität und Pharmakokinetik

In zahlreichen präklinischen Studien wurde die Zytotoxizität, Toxikologie, Teratogenität und Karzinogenität von Busulfan untersucht.

In Langzeituntersuchungen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass Busulfan eine Verminderung der Replikation und Differenzierung von Stammzellen zur Folge hat. Behandelte man die Tiere mit 20 mg/kg KG, zeigten 80% einen kompletten Verlust des Knochenmarks (Morley und Blake 1974). Bei Ratten zeigte eine Dosis von 10 mg/kg KG einen maximalen Rückgang an CFU's (Colony Forming Units) von 90%, eine Dosissteigerung zeigte keinen weiteren Effekt (Dunn 1974). Phadungpojna (Phadungpojna 1996) zeigten, dass Hunde sensitiver auf Busulfan reagierten als Menschen und Deeg *et al.* (Deeg et al. 1999) konnten zeigen, dass eine einmalige Dosis von 20 mg/kg KG beziehungsweise 4 x 5 mg/kg KG für eine Myeloablation ausreichen. Die Pharmakokinetik von Busulfan wurde für Erwachsene hinreichend untersucht. 1993

wurde erstmals über die Chronopharmakologie bei oraler Applikation von Busulfan bei einer Gruppe von 27 Kindern berichtet (Vassal et al. 1993a). Es konnte eine mittlere Area under the Curve (AUC) von  $1600 \mu\text{M} \times \text{min}$  ermittelt werden, allerdings mit einer Standardabweichung von  $600 \mu\text{M} \times \text{min}$ . Dies entspricht einer vergleichsweise hohen Variabilität von 37%, die unter anderem in interindividuellem Resorptionsverhalten begründet sein kann. Mit der Einführung von Busilvex® konnte das Medikament systemisch zugeführt werden, wodurch eine geringere Schwankung der inter- und intraindividuellen pharmakologischen Parameter vorhergesagt wurde. Um dies zu untersuchen, wurde eine Studie an 19 Kindern, die im Rahmen ihrer Konditionierung Busulfan i.v. erhalten haben, durchgeführt (Schiltmeyer 2003). In dieser multizentrischen Studie wurden über einen Zeitraum von 1,5 Jahren 19 Kinder im Alter von 0,9 – 17,3 Jahren bis zum Tag 100 nach Transplantation überwacht. Es wurde festgestellt, dass die individuellen pharmakokinetischen Parameter Cl (Clearance), Vd/F (scheinbares Verteilungsvolumen) und  $t_{0,1}$  (Halbwertszeit) vergleichbar sind mit in der Literatur zu findenden Werten für orales Busulfan (Tabelle 1). Es konnte auch festgestellt werden, dass Kinder eine scheinbar höhere Clearance und eine geringere systemische Verfügbarkeit gemessen über die AUC aufweisen als Erwachsene (Tabelle 2).

**Tabelle 1:** Vergleich der pharmakokinetischen Parameter von oralem Busulfan bei Kindern und Erwachsenen

Alter [Jahre]	n	Vd/F [l/kg]	$t_{1/2}$ [h]	Cl/F [ml/min/kg]	Referenz
Kinder					
1,3 – 13,5	19	$0,73 \pm 0,15$	2,4	$3,6 \pm 1,1$	(Shaw 1993)
< 3,6	14	$1,4 \pm 0,8$	1,6	$8,4 \pm 4,3$	(Grochow et al. 1990)
< 2,7	33	$1,6 \pm 1,3$	2,8	$6,8 \pm 3,0$	(Vassal et al. 1993b)
0,9 – 17,3	19	$0,78 \pm 0,27$	2,35	$3,8 \pm 2,0$	(Schiltmeyer 2003)
Erwachsene					
> 18	28	$0,6 \pm 0,5$	2,3	$2,5 \pm 1,4$	(Grochow et al. 1989)
> 18	16	n.d.	2,7	$2,6 \pm 0,6$	(Hassan et al. 1991)

Vd/F scheinbares Verteilungsvolumen  
 Cl/F scheinbare Clearance  
 $t_{1/2}$  Halbwertszeit

In der Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass sich die pharmakokinetischen Parameter an den Tagen 1 und 4 der Behandlung nicht signifikant unterschieden, was auf einen linearen

Verlauf deutet. Außerdem konnten bei der Behandlung mit intravenösem Busulfan keine zusätzlichen Nebenwirkungen im Vergleich zu oralem Busulfan genannt werden.

**Tabelle 2:** AUC nach oraler Busulfan-Gabe bei Erwachsenen und Kindern nach einer Standarddosierung von 1 mg/kg (Grochow 1993, Hassan et al. 1991)

	Erwachsene	Kinder
n	136	14
Alter [Jahre]	> 18	0.2 – 3.6
AUC [ $\mu\text{M} \times \text{min}$ ] (MW $\pm$ SD)	1268 $\pm$ 486	715 $\pm$ 241

AUC: Area under the Curve  
 MW: Mittelwerte  
 SD: Standardabweichung

### 1.1.3. Orales Busulfan und die *in vitro* Variante Busilvex® - Klinische Daten und unerwünschte Nebenwirkungen

In vergleichenden Studien (Ringden et al. 1999, Ringden et al. 1994) wurde beobachtet, dass im Falle einer Behandlung bei schon fortgeschrittener Erkrankung, die behandlungsassoziierten Zytotoxizitäten zeitlich schon früher auftreten, was auch zu einer Erhöhung der Transplantations-bezogenen Mortalitätsrate führt.

Nebenwirkungen von Busulfan, speziell für die orale Applikation, betreffen sehr stark den gastrointestinalen Trakt mit Mukositis, Übelkeit und Erbrechen. Außerdem treten neurotoxische Symptome auf wie Krampfanfälle (Glaxo Wellcome 1999). Deshalb wird zur Prophylaxe eine begleitende antikonvulsive Therapie oft mit Phenytoin oder Clonazepam durchgeführt. Die wichtigste, vor allem dosislimitierende Nebenwirkung stellt die Venooclusive-Disease (VOD) dar, eine Erkrankung, die durch Bildung von subendothelialen Ödemen im Bereich der kleinen Lebervenen zum akuten Leberversagen führen kann, was nicht selten in einem anschließenden Multiorganversagen münden kann. Die Inzidenz und Mortalität für VOD ist zum einen altersabhängig, zum anderen abhängig von der Grunderkrankung. Bei Kindern mit Immundefekten konnte keine VOD beobachtet werden, bei Erwachsenen mit malignen Erkrankungen tritt eine VOD mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 50% auf (Filipovich et al. 1992, Jones et al. 1987, McDonald et al. 1993). Mehrere Arbeiten beschreiben, dass Kinder höhere Dosen an Busulfan vertragen, ohne ein höheres Risiko für eine VOD zu zeigen (Bolinger et al. 2000, Pawlowska et al. 1997,

Poonkuzhali et al. 1999, Slattery et al. 1997). Grochow et al. (Grochow 1993) stellten auch eine Verbindung zwischen der Inzidenz für eine VOD und der systemischen Verfügbarkeit (gemessen über die AUC) her, dabei ist eine AUC von  $> 1500 \mu\text{M} \times \text{min}$  mit einem erhöhten Risiko verbunden. Dies konnte allerdings noch nicht für Kinder bestätigt werden.

Bei Markteinführung von intravenösem Busulfan wurden präklinische Toxizitätsstudien, zum Beispiel an Hunden, durchgeführt. Auch hier konnten Lebertoxizitäten beobachtet werden. Interessanterweise traten diese Nebenwirkungen auch in einer Kontrollgruppe auf, welche nur die Trägersubstanz DMA (N, N-Dimethylacetamid) verabreicht bekamen (Produkt Monograph Busulfan 2003).

In einigen Arbeiten konnten sowohl im Tier-Experiment als auch in der Testung am Menschen hepato- und neurotoxische Eigenschaften des Lösungsvermittlers nachgewiesen werden (Barnes und Ranta 1972, Kim 1988, Weiss et al. 1962).

Vor allem bei Kindern muss diesem Problem große Beachtung geschenkt werden, da Kinder, vor allem in der HDC, vergleichsweise hohe Dosen an DMA verabreicht bekommen, was ein engmaschiges Monitoring erforderlich macht.

In Ratten, Mäusen und Hasen konnte durch Bishop et al. (Bishop und Wassom 1986) eine bestehende Teratogenität nachgewiesen werden, wobei darauf hinzuweisen ist, dass der enthaltene Lösungsvermittler DMA noch zusätzlich teratogene Wirkungen zeigt.

Außerdem ist festzuhalten, dass Busulfan von der International Agency for Research on Cancer als Karzinogen klassifiziert wurde, da die Anwendung von Busulfan die Inzidenz für das Auftreten einer Zweitmalignität erhöht (Produkt Monograph Busulfan 2003).

Ein weiterer Aspekt bei der Behandlung mit Busulfan ist von klinischer Seite zu bedenken. Busulfan wird in der Leber metabolisiert und wie in Abbildung 2 dargestellt, erfolgt dieser Umsatz Glutathion-abhängig. Daraus ergeben sich zahlreiche Wechselwirkungen mit anderen Wirkstoffen die ebenfalls in der Leber über den Glutathionweg umgesetzt werden. Bekannte Beispiele dafür sind: Itraconazol, Phenytoin, Phenobarbital, Paracetamol, Thioguanin und Cyclophosphamid (Glaxo Wellcome 1999).

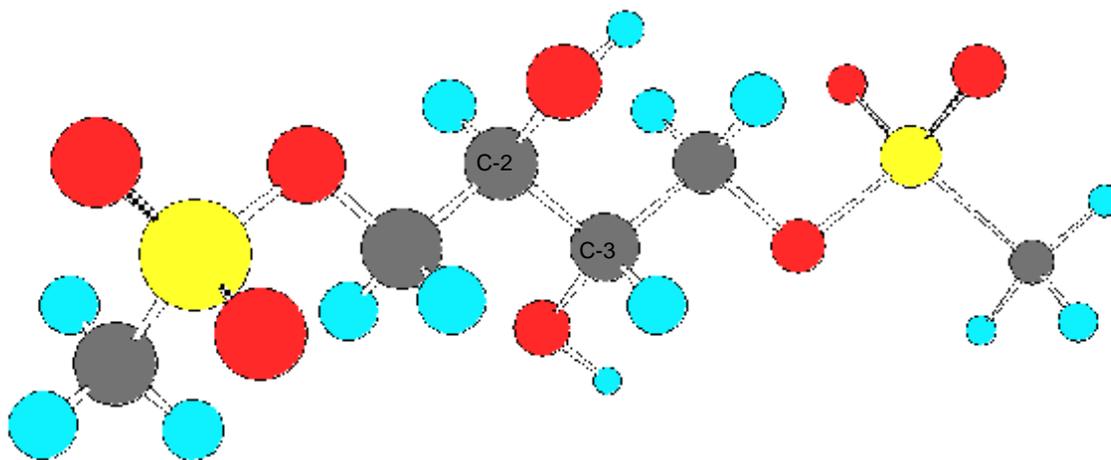
## 1.2. Treosulfan

### 1.2.1. Wirkmechanismen

Treosulfan zählt wie Busulfan zu der Übergruppe der Alkylanzien. Im Unterschied zu Busulfan ist Treosulfan eine bifunktional alkylierende Substanz. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität zu nukleophilen Zentren und ihrer Reaktivität wurden beide Substanzen auch verschiedenen Untergruppen zugeteilt: Busulfan zu den primären Alkylsulfonaten und Treosulfan zu den Epoxiden und  $\beta$ -Laktonen.

Treosulfan zeigt seine zytotoxische Wirkung vorrangig auf schnell proliferierende Zellen, zu denen allerdings nicht nur maligne, sondern u. a. auch hämatologische Zellen zählen.

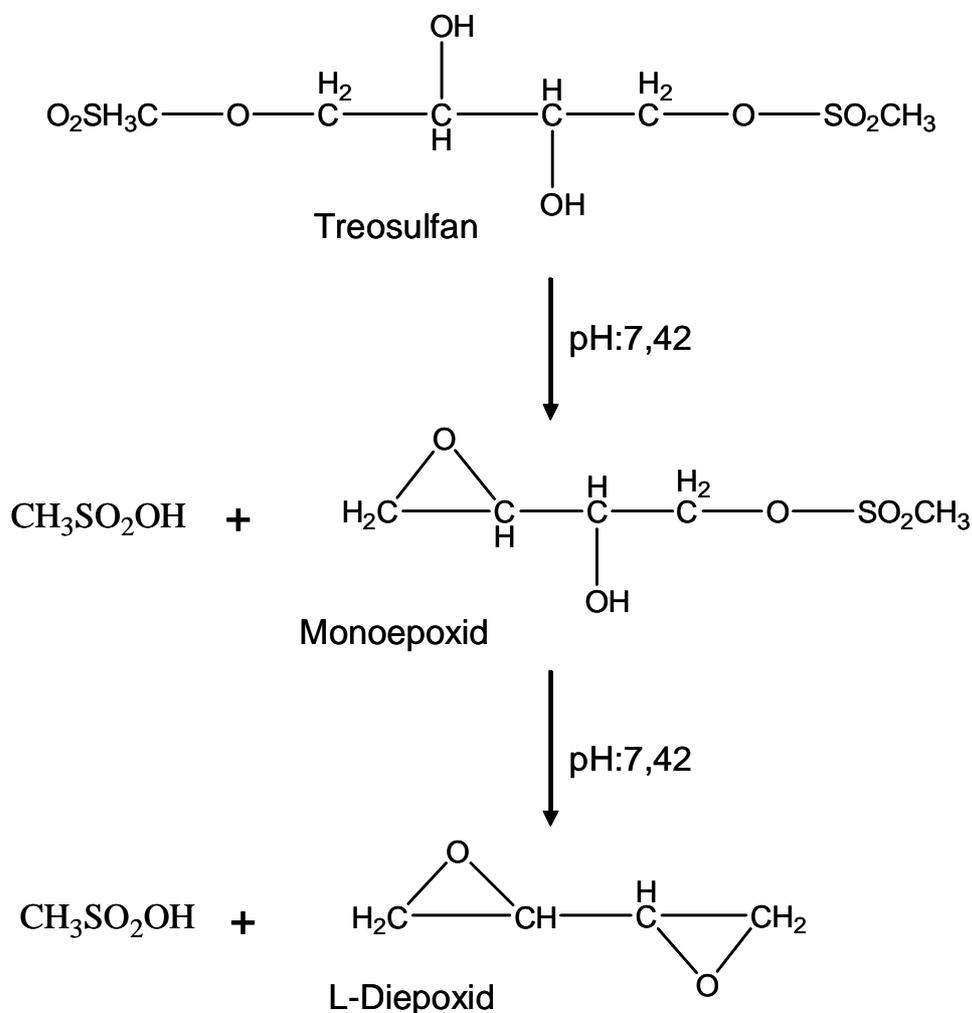
Der Unterschied im Aufbau beider Alkylanzien liegt in der Einführung von zwei Hydroxylgruppen an Position 2 und 3 (Abbildung 3), welche direkten Einfluss auf den Wirkmechanismus haben (Brookes und Lawley 1961, Feit 1982, Feit et al. 1970, Hartley et al. 1999, Kopf-Maier und Sass 1996, Warwick 1963).



**Abbildung 3: Kalottenmodell von Treosulfan.**

Rot: O, Gelb: S, Grau: C, Blau: H. Erstellt mit ChemOffice 2002.

Treosulfan wird durch die Transformation in Epoxidspezies aktiviert (Feit et al. 1970, Hartley et al. 1999), welche die alkylierenden Wirkungen besitzen und damit für die Quervernetzung von DNA und anderen Makromolekülen verantwortlich sind. Bei dieser Aktivierung (Abbildung 4) werden die endständigen Methylsulfonylgruppen in die Nachbarschaft der Hydroxylgruppen gebracht, wodurch es zu einer intramolekularen Alkylierung und Bildung von Epoxidgruppen kommt. So wird Treosulfan in einem ersten Schritt zu einem aktiven Monoepoxid und dann zu L-Diepoxybutan umgewandelt. Die durch eine erste intramolekulare Alkylierung entstandenen Epoxidringe sind dann für die Alkylierung von Makromolekülen zuständig, wobei die initial gebildeten Monoepoxide bereits nukleophile Zentren angreifen können.



**Abbildung 4: Aktivierung von Treosulfan über ein Monoepoxid zum Diepoxyd.** Unter physiologischen Bedingungen, d.h. pH 7,4 und 37°C, läuft diese Reaktion spontan und enzymunabhängig ab. Im Gegensatz dazu wurde Busulfan sowohl enzym- als auch glutathionabhängig aktiviert.

Es wurde beschrieben, dass oftmals bereits nach Bildung des ersten Epoxidringes eine Bindung an das Makromolekül erfolgt und sich daran die zweite Ringbildung anschließt. Dabei verlaufen die DNA-Quervernetzungen sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig, wobei es bei einer verlängerten Inkubationszeit zu irreversiblen Doppelstrangbrüchen der DNA kommt. Bei der experimentellen Inkubation mit DNA wurde gezeigt, dass die Alkylierung vorrangig an Guanin-7-Molekülen erfolgt (Hartley et al. 1999, Park und Tretyakova 2004, Vock 1997), ähnlich wie bei Busulfan.

Die Persistenz der zytotoxischen Wirkung kann in dem Maße verstärkt werden, dass weitere Substanzen in Kombination zu Treosulfaneingesetzt werden, welche die DNA-Reparaturmechanismen behindern oder ausschalten wie z. B. Fludarabin oder Gemcitabin. All diese beschriebenen pharmakodynamischen Daten konnten allerdings nur für die L-Konfiguration des Moleküls bestätigt werden, die D- oder meso-Konfiguration war weitaus weniger aktiv und damit weniger wirksam.

### **1.2.2. Pharmakologie, Pharmakokinetik und Toxikologie in nicht klinischen Studien**

#### ***Pharmakologie***

In zahlreichen Arbeiten wurde gezeigt, dass Treosulfan ein sehr breites Wirkspektrum zeigt. Es wird in einer vergleichsweise hohen Dosis appliziert und zeigt einen breiten therapeutischen Index (TI > 10), beides ist relativ ungewöhnlich für Zytostatika.

*In vitro* Daten zeigten, dass Treosulfan, dosis- und zeitabhängig, zytotoxisch auf Zelllinien verschiedener Entitäten wirkt, z. B. auf Brust- und Ovarialkrebs (Bosanquet 1994, Wilson und Neal 1981), Leukämien und Lymphome (Bosanquet 1994) und andere, größtenteils solide Tumore (Myatt et al. 1997, Neale et al. 1999, Neuber et al. 1999, Reber et al. 1998, Wick 2000). Vor allem für multiple Melanome (MM) existieren zahlreiche Arbeiten. Meinhardt *et al.* (Meinhardt et al. 2003) konnten im Rahmen einer Untersuchung feststellen, dass Treosulfan so effektiv wie Melphalan wirkt. Für den Wirkmechanismus konnte gezeigt werden, dass Treosulfan über den Apoptose-Weg wirkt. Schmidmaier *et al.* (Schmidmaier et al. 2004) detaillierten das, indem sie beschrieben, dass es sich um einen Protein-Kinase C abhängigen Apoptose-Weg handelt. Außerdem konnte eine Caspase-Abhängigkeit nachgewiesen werden und es konnte gezeigt werden, dass Apoptose bei AML schon bei einer LC<sub>90</sub> (Lethal Concentration) von 100 µM induziert wird. Dies entspricht

einer 10-fach niedrigeren Konzentration, als der zu erreichende Plasmalevel darstellt. Meinhardt *et al.* (Meinhardt et al. 2003) konnten zeigen, dass durch Treosulfan Bcl-2 herunterreguliert wird.

Zahlreiche Metabolisierungen erfolgen im Körper unter Einfluss von P450. Für Treosulfan konnte bis 100  $\mu\text{M}$  kein Einfluss auf P450 gezeigt werden (Cole 2003). Das könnte insofern von Bedeutung sein, da z. B. Cyclophosphamid P450-abhängig metabolisiert wird. Bei einer Kombinationschemotherapie von Treosulfan und Cyclophosphamid dürfte durch Treosulfan keine Akkumulation von Cyclophosphamid auftreten.

Obwohl Treosulfan eine recht kurze Halbwertszeit von nur 2 Stunden *in vivo* aufweist, wird darauf hingewiesen, dass in *in vitro* Tests nur Langzeit-Inkubationen sinnvoll sind, da erst nach einer gewissen Inkubationszeit Merkmale der Apoptose bzw. Merkmale der abgeschlossenen Apoptose detektiert werden können (Treosulfan Investigator Brochure, 2004).

Schon in den 60er Jahren wurden erste Transplantationsmodelle in Mäusen und Ratten durchgeführt (Jones et al. 1960, White 1962). Dabei wurde festgestellt, dass die Aktivität von Treosulfan derer des Busulfans überlegen ist.

Neuere Daten zeigen den starken antileukämischen Effekt von Treosulfan in Studien an Mäusen (Fichtner et al. 2003). In drei ALL-Maus-Modellen wurden die Behandlungsschemata von 1 x 3000 mg/kg KG und 3 x 1500 mg/kg KG verglichen und es wurde festgestellt, dass eine einmalige Dosis von 3000 mg/kg KG die effektivere antileukämische Aktivität besitzt.

Diese zum Teil schon frühen Daten schlugen vor, dass Treosulfan in die Konditionierung bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen aufgenommen werden sollte. Dafür ist das wichtigste Kriterium neben der Wirkung auf maligne Zellen, dass Treosulfan eine starke Toxizität gegenüber Stammzellen zeigt, was sowohl in *in vitro* Experimenten als auch *in vivo* gezeigt werden konnte.

Grundlage dafür lieferten die *in vitro* Daten von Ploemacher (Ploemacher 2000), in denen nach 18 stündiger Inkubation von Knochenmark von Mäusen mit 30  $\mu\text{M}$  Treosulfan eine 3 bis 4,5 log fache Depletion aller Stammzellen zu verzeichnen war. Im Vergleich dazu führten 30  $\mu\text{M}$  Busulfan zwar auch zu einer 3 log fachen Depletion, allerdings nur bei einer Untergruppe von Stammzellen (repopulating stem cells).

*In vivo* Daten z. B. von Westerhof *et al.* (Westerhof et al. 2000), zeigten einen Vergleich von einmaliger Applikation von 3000 mg/kg KG und dreifacher Applikation von 3 x 2500 mg/kg, wobei die einmalige Dosis gegenüber der mehrfachen Applikation eine

vergleichsweise moderate Stammzell-Toxizität zeigte. Bei der Applikation von äquivalenten Dosen von Busulfan (1 x 50 mg/kg oder 4 x 25 mg/kg) zeigte sich eine geringere Zytotoxizität auf Progenitoren.

Weiterführende Arbeiten zur Abhängigkeit von der Dosis und dem zeitlichen Ablauf der Applikationen wurden durch Ploemacher *et al.* 2003 (Ploemacher 2003) veröffentlicht. Dabei gilt, je höher die applizierte Dosis und je größer die Anzahl der Applikationen, desto umfangreicher erfolgt die Depletion der Stammzellen. Ein Maximum zeigt sich dabei bei 3 x 200 bzw. 5 x 1000 mg/kg KG (Treosulfan Investigator Brochure 2004, Ploemacher 2003). Die myelosuppressive Wirkung von Treosulfan wurde auch durch andere Arbeiten belegt (Griskevicius 2001, Sjöo *et al.* 2006). Dabei wurden Treosulfan, Busulfan und Cyclophosphamid in einem Transplantationsmodell in Mäusen miteinander verglichen. Treosulfan zeigte eine schnellere und auch länger anhaltendere myelosuppressive Wirkung, Cyclophosphamid eine schnellere Recovery und Busulfan zwar auch eine anhaltende Depletion, diese trat allerdings erst drei Tage nach der von Treosulfan ein.

Neben der myelosuppressiven Wirkung ist außerdem eine immunsuppressive Aktivität nötig, wenn ein in der Konditionierung eingesetztes Zytostatikum den Patienten optimal auf die bevorstehende Transplantation vorbereiten soll. In der Literatur können einige Arbeiten gefunden werden, in denen auf die Wirkung von Treosulfan in erster Linie auf T- und B-Zellen eingegangen wird (Treosulfan Investigator Brochure 2004, Melchers 1999, Melchers 2000a, Melchers 2000b, Sjöo *et al.* 2006). So konnte in Mausmodellen schon bei niedrig dosiertem Treosulfan eine supprimierte Immunantwort beobachtet werden. Im Vergleich zu Methotrexate (MTX) zeigte sich, dass beide Substanzen eine IgM-Antwort supprimieren, eine IgG-Antwort allerdings nur durch MTX.

Im Vergleich von Treosulfan, Busulfan und Cyclophosphamid konnte festgestellt werden, dass Treosulfan Lymphozyten lang anhaltend depletiert im Vergleich zu Cyclophosphamid, wo nach 3 Tagen eine Rekonstitution einsetzte. Bei Busulfan ist im Vergleich zu Treosulfan der Nadir um 3 Tage verzögert. Alle drei Substanzen depletierten sowohl CD3<sup>+</sup> T-Zellen als auch CD19<sup>+</sup> B-Zellen effektiv, wobei die CD4/CD8-Ratio der T-Zellen kaum beeinflusst wird. Mit dieser Depletion der Lymphozyten durch Treosulfan ist auch ein Einfluss auf das Zytokinprofil verknüpft. So senkt Treosulfan z. B. die Produktion von IL-2 oder INF- $\gamma$ , was entscheidend für eine Entstehung einer GvHD sein kann.

**Toxizität**

Die nicht-klinische Toxizität wurde an Mäusen, Ratten, Hunden und Rhesusaffen und unter Berücksichtigung verschiedener Applikationsmöglichkeiten intraperitoneal, intravenös und oral untersucht. In Tabelle 3 sind die Konzentrationen von Treosulfan und Busulfan aufgeführt, die zu einer akuten Toxizität führen.

Mehrere aufeinander folgende niedrige Dosen oder eine anschließende SZT kann das Risiko für akute Toxizitäten verringern.

S` adkd 29 @j t sd Snwlyhse ē qSqdnrt k` mt nē At rt k` m  
'Sqdnrt k` mHudrstf` snq Aqrbgt qd 1// 3(

	<b>LD<sub>4/</sub></b> [mg/kg KG]	<b>LD<sub>4/</sub></b> [mg/kg KG]
<b>Applikationsart</b>	<b>Treosulfan</b>	<b>Busulfan</b>
Oral	> 3500	240
Subkutan	> 3500	200
intravenös	> 3500	/

LD: lethale Dosis

Generell ist über Treosulfan zusammenzufassen, dass es keine Toxizitäten auf das kardiovaskuläre System zeigt (Abdulla 1988).

Die Applikation von toxischen Konzentrationen führte bei Rhesusaffen und Hunden zu Anorexie und Gewichtsverlust, außerdem zu einem Rückgang der Zellzahlen im Knochenmark und im Lymphsystem (Reticulopenie, Leukozytopenie, Thrombozytopenie) (White 1962). Es wurden allerdings keine toxischen Effekte auf das zentrale Nervensystem beobachtet.

Wenn Treosulfan über einen längeren Zeitraum und in höheren Dosen verabreicht wird, werden auch die Erythrozytenzahl und der Hämoglobin-Level beeinträchtigt. Ebenso wird eine reduzierte Gonadenfunktion beobachtet. Die Spermatogenese wird gehemmt oder unterbrochen und auch die ovariale Funktion kann leicht eingeschränkt sein.

Außerdem zeigt auch Treosulfan eine Mutagenität, die durch Chromosomen-Abberationen hervorgerufen wird (Matagne 1969, Zeiger und Pagano 1989).

### 1.2.3. Klinische Relevanz von Treosulfan bei Erwachsenen

#### *Pharmakokinetik und Metabolismus*

Pharmakokinetische Parameter wurden sowohl nach oraler als auch nach intravenöser Gabe von Treosulfan untersucht (Hilger et al. 2000).

Eine Dosisescalation verlief von 20 g/m<sup>2</sup> bis 56 g/m<sup>2</sup> mit anschließender autologer Transplantation. Dabei beobachtete man eine lineare Korrelation von AUC und C<sub>max</sub> mit der applizierten Dosis. Dagegen sind die renale Eliminierung, das Verteilungsvolumen und die terminale Halbwertszeit im Plasma Dosis-unabhängig.

Eine der ersten pharmakokinetischen Studien beschäftigte sich mit einer Hochdosis-Behandlung mit Treosulfan und anschließender autologer SZT bei Patienten mit soliden Tumoren (Hilger et al. 1998). Die Behandlung erfolgte mit 10 bzw. 8 g/m<sup>1</sup>.

Auch Scheulen *et al.* (Scheulen et al. 2000) berichteten von einer linearen Korrelation des Plasmalevels mit der applizierten Dosis und einer Dosisabhängigkeit der renalen Exkretion. 25% der totalen Dosis werden innerhalb der ersten 6 Stunden nach Applikation unverändert wieder ausgeschieden.

Eine andere klinische Phase I Studie verglich den Einsatz zweier Treosulfan Konzentrationen in Kombination mit Cyclophosphamid zur Konditionierung vor allogener SZT (Hilger et al. 2004). Die Patienten mit fortgeschrittenen hämatologischen Erkrankungen wurden zum einen mit 3 x 12 g/m<sup>2</sup>, zum anderen mit 3 x 14 g/m<sup>2</sup> Treosulfan konditioniert und die pharmakokinetischen Parameter wurden bestimmt (Tabelle 4). Darin ist zu erkennen, dass die AUC und die Plasmalevel signifikant mit der Dosis anstiegen und auch hier t<sub>1/2</sub>, Clearance, V<sub>ss</sub> und renale Eliminierung dosisunabhängig waren. Dies bestätigte die Daten von Hilger *et al.* und Scheulen *et al.* (Hilger et al. 1998, Scheulen et al. 2000).

**Tabelle 4:** Pharmakokinetische Parameter nach Treosulfan-Infusion vor allogener Stammzell-Transplantation (Treosulfan Investigator Brochure 2004).

	Treosulfan 3 x 12 g /m <sup>2</sup> (n=8)	Treosulfan 3 x 14 g /m <sup>2</sup> (n=10)
AUC (µg/ml*h) 1. Dosis	898 ± 104	1104 ± 173
C <sub>max</sub> (µg/ml)	260 ± 35	322 ± 47
Halbwertszeit (h)	2 ± 0,5	2,0 ± 0,6
CL <sub>total</sub> (ml/min)	225 ± 23	216 ± 32
V <sub>ss</sub> (l)	34 ± 5	31 ± 7
renale Exkretion (%) der totalen Dosis	39 ± 5	39 ± 7

AUC: Area under the Curve

C<sub>max</sub>: maximale Plasmakonzentration

CL<sub>total</sub> totale systemische Clearance

V<sub>ss</sub>: Volume of distribution at steady state.

### ***Sicherheit und Effektivität***

Es wurde beschrieben, dass eine Dosis von > 10 g/m<sup>2</sup> durch eine auftretende Hämatoxizität, die sich vor allem in Thrombozytopenie äußert, limitierend ist (Hilger et al. 1998). Höhere Dosen Treosulfan können nur mit einer anschließenden Transplantation überwunden werden. Bei dem Einsatz von Treosulfan in Hochdosis-Protokollen mit anschließender Transplantation ist eine Konzentration von > 47 g/m<sup>2</sup> toxisch. Folgende dosislimitierende Zytotoxizitäten treten jenseits dieser Konzentration auf: Diarrhöe, Mukositis, Stomatitis, metabolische Azidose und Haut-Toxizitäten. Allerdings wurden keine weiteren dosis-bedingte Organtoxizitäten beobachtet, speziell keine Neurotoxizitäten, vor allem keine VOD.

Bei soliden Tumoren wird Treosulfan vor allem in Kombination mit Etoposid, Carboplatin, Dacarbazin, Melphalan, Thiothepa oder Rituximab eingesetzt, woran sich eine autologe SZT anschließt. In 60 – 80% ist ein Ansprechen durch die antineoplastische Aktivität von Treosulfan zu verzeichnen.

Auch bei hämatologischen Erkrankungen wird Treosulfan in der Konditionierung eingesetzt, allerdings vor allogener SZT. Hier kommen oftmals die Kombinationspartner Cyclophosphamid und Fludarabin zum Einsatz. Dabei ist bei Erwachsenen ein progressionsfreies Überleben von 50% und ein overall survival von 70% zu verzeichnen. Diese Konditionierungsregime erlauben auch ein schnelles und zuverlässiges Anwachsen des Transplantates sowohl im verwandten als auch im unverwandten Transplantations-Setting.

### ***Unerwünschte Nebenwirkungen***

Bei der Behandlung von malignen Erkrankungen treten vor allem bei Konditionierungsregimen vor anstehender SZT zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen auf.

Allgemein ist zu sagen, dass die Kombinationstherapie von Treosulfan mit anderen Zytostatika meist eine gute Verträglichkeit zeigt. Als unerwünschte Nebenwirkungen können Fieber, Infektionen, Mukositis, Stomatitis, Enteritis, Erbrechen, Durchfall, Hauttoxizitäten, Azidose, erhöhte Leber Transaminasen und Hämatotoxizität auftreten.

Nur in sehr vereinzelt Fällen traten Herzeffekte auf, wobei nicht festgestellt werden konnte, ob es sich dabei um einen Effekt von Treosulfan oder eines der Kombinations-Chemotherapeutika gehandelt hat (Hilger et al. 1998). In Studien mit allogener Transplantationen wurden in 2 von 206 Fällen eine VOD beobachtet, die aber wahrscheinlich auf den Kombinationspartner Cyclophosphamid zurückzuführen waren.

Bei einer langfristigen Anwendung mit Treosulfan wurde auf ein erhöhtes Risiko für Zweit-Malignitäten hingewiesen (Pedersen-Bjergaard et al. 1985). Bei einer Behandlung im Mittel über 12-37 Monate wurde in 8 von 553 Fällen eine nicht-lymphozytäre akute Leukämie entwickelt. Das bedeutet ein 175 fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Zweitmalignität. Dieses Potential ist allerdings geringer als bei Melphalan und Busulfan (Kaldor und Day 1988). Kaldor beschrieb 1990 zwei weitere Fälle (von 10) mit einer Zweitmalignität (Kaldor et al. 1990).

Im Unterschied zu Busulfan ist noch einmal zu nennen, dass Treosulfan nicht glutathionabhängig metabolisiert wird, was insofern einen Vorteil darstellt, dass zahlreiche andere Medikamente wie Cyclophosphamid glutathionabhängig metabolisiert werden. Auf diese Weise kann es zu keiner Wechselwirkung kommen, bei der beispielsweise Cyclophosphamid akkumuliert wird.

### **1.2.4. Klinische Relevanz von Treosulfan bei Kindern**

Wie erwähnt wird Treosulfan schon seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich in der Behandlung von malignen Erkrankungen bei Erwachsenen eingesetzt. Der Einsatz reicht dabei von nicht-hämatologischen Erkrankungen wie dem Ovarialkarzinom und anderen soliden Tumoren bis hin zu den hämatologischen Erkrankungen. Aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen von Busulfan, in erster Linie sind hier schwerwiegende Organtoxizitäten

wie VOD zu nennen, wurde es bei Erwachsenen zunehmend durch das strukturell ähnliche, aber weitaus verträglichere Treosulfan ersetzt. Trotz dieser Daten wird in der Behandlung pädiatrischer Patienten Busulfan eingesetzt. Da es bisher kaum oder keine Erfahrungen vom Einsatz von Treosulfan bei Kindern gibt, weder *in vitro* noch *in vivo* wird Treosulfan in pädiatrischen Behandlungsprotokollen bisher nicht verwendet. Bisher wurden in einer Studie von Drabko *et al.* (Drabko et al. 2005) nur zwei pädiatrische Patienten mit  $10 \text{ g/m}^2$  an den Tagen -5, -4 und -3 vor autologer und allogener Stammzell-Transplantation behandelt. Beide Patienten sind nach über einem Jahr nach Transplantation noch am Leben und es wurden keine behandlungsassoziierten Toxizitäten beobachtet. Während der Erstellung dieser Doktorarbeit wurden weitere 44 Kinder vor allogener SZT mit Treosulfan konditioniert (Styczinsky et al. 2007).

## **1.3. Behandlung hämatologisch onkologischer Patienten**

### **1.3.1. Akute Leukämien im Kindesalter**

Die häufigste Krebsart bei Kindern stellen die Formen der akuten Leukämie dar. Sie nehmen ca. 30% aller Malignitäten im Kindesalter ein (SEER Cancer Statistic Review 2000). Dabei tritt die akute lymphatische Leukämie (ALL) ca. viermal häufiger auf als die akute myeloische Form (AML). Bei einer Leukämie kommt es zu einer Akkumulation von leukämischen Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut. Das geht mit der Reduktion von hämatologischen Zellen anderer Linien wie Erythrozyten, Thrombozyten und Neutrophilen einher. Die Folge sind zahlreiche systemische Effekte wie Anämien, Blutungen, eine erhöhte Infektionsgefahr und durch die Panzytopenie bedingte Schwäche und Ermüdungsgefühl (Meyers et al. 2005). Die Diagnose wird mittels morphologischer und immunphänotypischer Untersuchungen des Knochenmarks getroffen.

Die Therapie akuter Leukämien unterteilt sich in drei Stadien:

1. Induktionstherapie
2. Konsolidierungstherapie
3. Erhaltungstherapie

Eine Übersicht der Therapieprotokolle für die AML und ALL nach BFM im Kindesalter sind im Anhang zu finden. Die Induktionstherapie dient dazu, den Patienten in Remission zu bringen. Ca. 90% aller Patienten erreichen diese Remission unabhängig von der Riskoeinstufung (Hann et al. 2001). In regelmäßigen Abständen erfolgen Knochenmark-Punktionen zur Kontrolle des Behandlungsverlaufs. Je schneller ein Patient auf die Induktionstherapie anspricht, desto besser ist die Prognose (Cave et al. 1998, Coustan-Smith et al. 2006, Ribera et al. 2002, Schrappe et al. 2000b, Visser et al. 2001). Fünf% der Patienten sprechen leider nicht auf die Therapie an (Bleyer 1988). Ein Risikofaktor bei der akuten Leukämie stellt die Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) dar, sie tritt bei ca. 5% aller Patienten auf (Paolucci et al. 2001) und verlangt eine spezielle Therapie. Sie beginnt schon während der Induktionstherapie und erfolgte früher meist durch eine zusätzliche Bestrahlung (LeClerc et al. 2002, von der Weid 2001), welche allerdings aufgrund der hohen Toxizität durch eine Chemotherapie, z. B. mit Cytarabin, Methotrexate und/oder Prednison, abgelöst wurde (Clarke et al. 2003, Gaynon et al. 2000, Harms und Janka-Schaub 2000, Hill et al. 2004, Matloub et al. 2006, Ortega et al. 2001, Paolucci et al. 2001, Pui et al. 2000, Rizzari et al. 2001, Schrappe et al. 2000a). Erfolgt diese Therapie

nicht, kommt es in 80% der Fälle zu einer so genannten leukämischen Meningiosis (Evans et al. 1970).

Die Konsolidierungstherapie erfolgt nach erreichter Remission und dauert ca. 4-6 Monate. Sie dient der Bekämpfung von eventuell vorhandener minimaler Resterkrankung und dem Vorbeugen von Rezidiven und Resistenzen (Gaynon et al. 2000, Hann et al. 2000, Harris et al. 1998, Lange et al. 2002, Lauer et al. 2001, Ortega et al. 2001). Für die Hochrisikogruppe, z. B. bei einer Beteiligung des Philadelphiachromosoms, ist hier eine Transplantation vorgesehen. In der dritten Phase, der Erhaltungstherapie, werden die Patienten für weitere 24-36 Monate mit einer sehr niedrig dosierten Chemotherapie behandelt.

Das Outcome für die akute lymphatische Leukämie hat sich seit den 80er Jahren kontinuierlich auf bis zu 80% verbessert (Gatta et al. 2005, Jemal et al. 2003, Pui et al. 2004, SEER Cancer Statistic Review 2000). In den Entwicklungsländern liegt sie bis heute bei nur 35% (Howard et al. 2004, Metzger et al. 2003, Nandakumar et al. 1995). Das event-free-survival über fünf Jahre liegt bei der Standard-Risikogruppe bei 80-95% (Kamps et al. 2000, Lange et al. 2002, Rizzari et al. 2001, Silverman et al. 2001, Visser et al. 2001), bei der Gruppe mit hohem Risiko bei > 45% (Millot et al. 2001, Rizzari et al. 2001), bei der T-ALL-Gruppe bei Kindern bei 60 – 70% (Steinherz et al. 1998, Uckun et al. 1998), bei Säuglingen bei nur 10 – 30% (Chessells et al. 1994, Pui et al. 1995) und bei einer t(4;11)-Translokation liegt es noch niedriger (Isoyama et al. 2002, Pui et al. 2002).

Die treatment-related-mortality liegt bei der ALL innerhalb des ersten Jahres bei ca. 2,6 – 5% (Christensen et al. 2005, Clarke et al. 2003, Conter et al. 1998, Pui et al. 2000) und sie ist bei einer Beteiligung des Down-Syndroms deutlich erhöht (Chessells et al. 2001).

Leider treten noch in vielen Fällen, zum Teil bereits sehr schnell nach Diagnose, Rezidive auf. Der Erfolg einer Rezidivtherapie ist dann stark abhängig von der Zeitspanne vom Erreichen der kompletten Remission und dem Auftreten des Rezidivs (Craddock et al. 2005, Estey 2000). In ca. 20 – 25% der Fälle tritt ein Rezidiv der ALL noch während oder sehr früh nach der Induktionstherapie auf. Es betrifft meist nur das Knochenmark, manchmal aber auch das ZNS, selten Lymphknoten (Chessells et al. 2003).

Bei der AML konnte ein klonaler Hintergrund für die Erkrankung erkannt werden, d. h. die Erkrankung geht von einer einzigen Zelle aus, bei der durch eine Translokation die regelgerechte Proliferation der Zelle gestört ist (Fialkow et al. 1979, Fialkow et al. 1981, Rabbitts 1994). Der durch die erfolgte Mutation entstandene Klon kann dann zwei Wege einschlagen. Entweder differenziert er in Richtung Granulozyten/Monozyten-Linie oder in

Richtung Erythroide/Megakaryozytäre-Linie (Fearon et al. 1986, Fialkow et al. 1987, Keinanen et al. 1988, van Lom et al. 1993). Die AML wird laut FAB (French-American-British-Classification) in 8 Klassen (M0-M7) eingeteilt.

Die Prognose für die myeloische Form der Leukämie ist schlechter als die der ALL, aber auch hier ist das Ansprechen der Induktionstherapie entscheidend (Buchner et al. 1999, Kern et al. 2003, Preisler et al. 1986, Wheatley et al. 1999) und sie ist außerdem abhängig vom Alter und dem Karyotyp (Estey 2001, Olesen et al. 2005). Das event-free-survival über fünf Jahre liegt bei der Standard-Risikogruppe bei 70%, bei mittlerem Risiko bei 48% und bei der Hochrisiko-Gruppe liegt sie nur noch bei 15% (Wheatley et al. 1999). Auch hier wirkt sich eine Transplantation für die Hochrisikogruppe positiv auf die Prognose aus (Slovak et al. 2000).

In einer anderen Studie lag die mittlere Überlebensrate nach einem Rezidiv bei nur 1,5 Monaten bzw. bei einem einjährigen Überleben für nur 8% der Patienten (Giles et al. 2005). Folgt nach dem Auftreten des Rezidivs eine allogene Stammzelltransplantation liegt das Überleben bei maximal 35% (Grigg et al. 1999).

Die langwierige Behandlung dieser Malignitäten birgt ein hohes Risiko für Spätfolgen, was bei Kindern einen ganz wesentlichen Stellenwert einnimmt. Dazu gehören unter anderem Beeinträchtigungen des ZNS, Verminderung des Wachstums, Unfruchtbarkeit und nicht zu unterschätzen, das Auftreten von Zweitmalignitäten (Hudson et al. 2003, Meeske et al. 2005, Robison und Bhatia 2003). Eine Therapie-induzierte Krebserkrankung tritt bei ca. 2-3% der Patienten auf, vor allem wenn im initialen Behandlungsprotokoll eine Bestrahlung erfolgte (Kadan-Lottick und Neglia 2002, Kimball Dalton et al. 1998, Loning et al. 2000).

---

### 1.3.2. Konditionierung und Stammzell-Transplantation in der pädiatrischen Onkologie

Die pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Uniklinik Frankfurt verfügt über eine langjährige Erfahrung in autologer, allogener und haploidenter SZT (Klingebiel et al. 2005, Koehl et al. 2002, Koehl et al. 2003, Lehrnbecher et al. 2007, Zimmermann et al. 2002, Beck et al. 2006, Bochennek et al. 2005). In der Frankfurter Uniklinik werden ca. 45 erkrankte Kinder pro Jahr transplantiert. Vor SZT wird eine Hochdosischemotherapie durchgeführt, einerseits für eine effektive Zytotoxizität gegenüber residualen malignen Zellen, andererseits zur Myeloablation, um das Einwandern der frisch transplantierten Stammzellen zu gewährleisten und anschließend eine rasche hämatopoetische Regeneration zu erzielen. Bis vor einigen Jahren erfolgte eine SZT ausschließlich mit Knochenmark, welches unter Vollnarkose aus dem Beckenkamm des Spenders entnommen wurde. In den letzten Jahren fand die Mobilisation von peripheren Blutstammzellen (PBSC) immer häufiger Anwendung. Dabei werden durch die Gabe des hämatopoetischen Wachstumsfaktors G-CSF Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut ausgeschüttet. Diese werden anschließend mittels Leukapherese angereichert. Bei soliden Tumoren fungieren oftmals die Erkrankten selbst als Spender, d. h. es wird eine autologe Transplantation durchgeführt. Dabei werden zwischen zwei Chemotherapieblöcken die Stammzellen gesammelt und bis zur Transplantation cryokonserviert. Bei hämatologischen Erkrankungen, bei denen die malignen Zellen in die periphere Blutbahn gestreut wurden wie z. B. bei Leukämien wird eine allogene Transplantation, d. h. eine Fremdspondertransplantation durchgeführt. Eine Sonderform der allogenen Transplantation stellt die haploidente Transplantation dar, bei der ein Elternteil als Spender fungiert. In diesem Fall ist der Spender halb-ident zum Empfänger.

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, ist für Leukämiepatienten im Hochrisikoarm und mit aufgetretenem Rezidiv eine Transplantation vorgesehen, da sich so ihre Heilungschance gegenüber der konventionellen Chemotherapie erhöht.

Bestehen zwischen Spender und Empfänger mehrere Unterschiede im HLA-System (HLA-mismatch), wird das Stammzelltransplantat aufgereinigt (Bader et al. 2005, Barfield et al. 2004, Cao et al. 2001, Handgretinger et al. 1999, Koehl et al. 2002, Lang et al. 2005). Bei einer so genannten Selektion handelt es sich um eine positive Anreicherung, z. B. von den CD34<sup>+</sup> Stammzellen, wogegen bei einer Depletion alle unerwünschten Zellen, z.B. CD3<sup>+</sup> T-Zellen und CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus dem Transplantat entfernt werden. Der Vorteil bei der

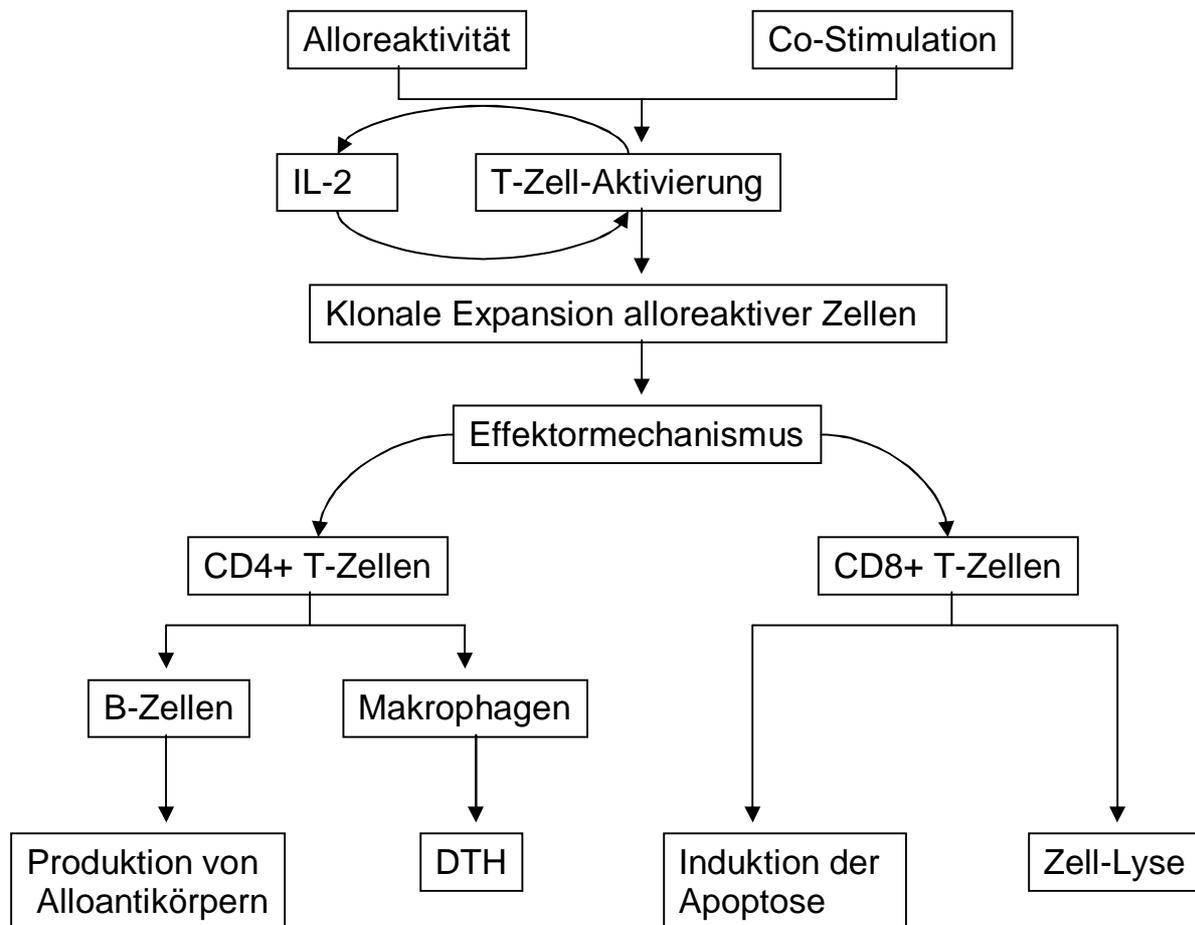
zweiten Purgig-Variante ist das Verbleiben von NK-Zellen, Dendriten und Monozyten im Transplantat. Dies kann von Vorteil sein, da es Hinweise gibt, dass diese Zellen maßgeblich an der Rekonstitution des neuen Immunsystems beteiligt sind. Die entscheidenden Risikofaktoren für eine Transplantat-assoziierte Mortalität (TMR) und die Inzidenz für das Auftreten eines Rezidivs sind in den Tabellen 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Risikofaktoren für eine Transplantat-assoziierte Mortalität (TMR) und die Inzidenz für das Auftreten eines Rezidiv (Gratwohl A 2000).

<b>Faktor</b>	<b>TRM</b>	<b>RI</b>
<i>Patient</i>		
Alter	+++	-
Geschlecht	-	-
Rasse	?	?
Status*	++	-
<i>Erkrankung</i>		
Typ, Subtype	+	+
Stadium bei Diagnose	++	+++
bei Transplantation	+	+
Zeit der Transplantation	++	+++
Organdysfunktion	++	++
Status viraler Infektionen	+++	-
<i>Spender</i>		
Spender-Typ	++	-
Stammzellquelle	+++	+++
Anzahl der Transplantationen bei allogenen Transplantaten	+?	?
Histokompatibilität	++	++
Geschlechtskombination	+++	+++
viraler Status	+++	+
<i>Transplantationsteam</i>		
Erfahrung	++	++
<i>Konditionierung</i>		
intensiviert	+?	-
reduziert	erhöht	erniedrigt
<i>Stammzell Dosis</i>		
hoch	erniedrigt	erniedrigt
<i>GvHD Prophylaxe</i>		
hoch	erniedrigt	erhöht
niedrig	erhöht	erniedrigt

\* z. B. Karnovsky Index  
 TRM: Transplant-related Mortality  
 IR: Relapse-Incidence

Mit der Transplantation soll allerdings nicht nur das Immunsystem des Empfängers durch ein Gesundes ersetzt werden. Man weiß, dass von den im Transplantat enthaltenen Zellen ein antileukämischer Effekt ausgeht. Dieser so genannte Graft versus Leukämie Effekt (GvL) steht allerdings in enger Verknüpfung mit dem unerwünschten Effekt der Graft versus Host Disease (GvHD), bei der die verabreichten Zellen, in erster Linie T-Zellen, die Organe des Empfängers angreifen. Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese beiden Prozesse auf den gleichen mechanistischen Grundlagen beruhen. Versuche im Tiermodell zeigten, dass die Gabe von IL-11 und IL-12 die GvHD verhindert, ohne jedoch den GvT-Effekt zu beeinflussen (Teshima et al. 1999, Yang und Sykes 1999). Auf den GvHD-Effekt soll im nächsten Abschnitt eingegangen werden. Allgemein ist festzuhalten, dass beide Effekte auf die Reaktion von T-Zellen und deren über MHC-Moleküle fungierende Interaktion mit anderen Zellen zurückzuführen ist. Abbildung 5 zeigt die T-Zell-Aktivierung und –Interaktion im Überblick.



**Abbildung 5: T-Zell-Aktivierung und –Interaktion des zellulären Immunsystems bei Alloreaktivität.** (immunbiology, [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com))  
 DTH: delayed type hypersensitivity reactions

Es gibt zahlreiche Studien, die belegen, wie essentiell der GvL-Effekt ist. Am deutlichsten wird dies in vergleichenden Studien bei Stammzell-Transplantation von identen Zwillingen im Vergleich zu Fremd Spendern. Fungiert ein eineiiger Zwilling als Donor, wird nach Transplantation zwar keinerlei GvHD beobachtet, allerdings ist das Rezidivrisiko drastisch erhöht. Man führt dies auf den fehlenden GvL-Effekt zurück (Gale et al. 1994, Horowitz et al. 1990, Thomas et al. 1986). NK-Zellen können auch am GvT-Effekt beteiligt sein, was zwar nicht über MHC-Moleküle geschieht, aber auch hier läuft der Effekt rezeptorvermittelt ab (Boyington et al. 1999, Brooks et al. 1999, Dohring et al. 1996, Litwin et al. 1994, Moretta et al. 1993, Pende et al. 1996). Im Gegensatz dazu sollen NK-Zellen an einer GvHD nicht beteiligt sein.

### **1.3.3. Immunrekonstitution nach Stammzell-Transplantation**

T- und NK-Zellen bilden ein komplementäres System in der zellulären Immunabwehr. T-Zellen gehören zu dem so genannten adaptiven Immunsystem, d. h. sie sind „lernfähig“. Sie benötigen dazu antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen. Bei diesem Prozess entwickeln sie sich von naiven zu Effektor- und anschließend zu Memory/Gedächtniszellen. Die Erkennung von Antigenen läuft dabei über MHC-Komplexe, MHC-I bei den CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen und MHC-II bei den CD4<sup>+</sup>-Suppressor-T-Zellen. Auch bei NK-Zellen gibt es einen Funktionsweg über MHC-Moleküle. Sie erkennen das Fehlen der MHC-I Moleküle auf ihren Zielzellen (Kärre 1985). Sind die MHC-I Moleküle auf der Zielzelle vorhanden, führt deren Bindung zu einem inhibierenden Signal, fehlen sie, fehlt auch das inhibierende Signal und die NK-Zelle startet ihre Immunantwort und schaltet die Zelle aus. Ruhende NK-Zellen unterliegen einem Gleichgewicht von aktivierenden und inhibierenden Signalen (Lanier 1998, Silvennoinen 1988). Es gibt Hinweise, dass auch NK-Zellen Gedächtniszellen bilden können und dann Interaktionen mit dendritischen Zellen eingehen. Das spricht dafür, dass NK-Zellen eine Zwischenposition im adaptiven und angeborenen Immunsystems darstellen (Walzer et al. 2005a, Walzer et al. 2005b).

Wie in dem vorangestellten Abschnitt beschrieben, wird das Immunsystem des Patienten vor einer Transplantation mit der Hochdosischemotherapie supprimiert. Nach erfolgter Transplantation erfolgt eine Regeneration des neuen Immunsystems. Dies erfolgt qualitativ und quantitativ unterschiedlich schnell. Die Normalisierung des Immunsystems dauert bei Erwachsenen ca. 3-5 Jahre, bei Kindern ca. 1-3 Jahre (Storek et al. 2001). Das ist auf den

zunehmenden Funktionsverlust des Thymus im Alter zurückzuführen (Eyrich et al. 2001, Thomas et al. 1986). Diese Immunrestitution unterliegt zahlreichen weiteren Faktoren, nicht nur dem Alter des Patienten. So haben auch Transplantat-Quelle, Transplantataufarbeitung und das im Empfänger herrschende Netzwerk von Zytokinen einen großen Einfluss (Joshi et al. 2001, Kerst et al. 1993, Miller et al. 1997). Dabei ist allerdings unbekannt, ob Polymorphismen in den Zytokinen die Immunrestitution beeinflussen (Fishman et al. 1998).

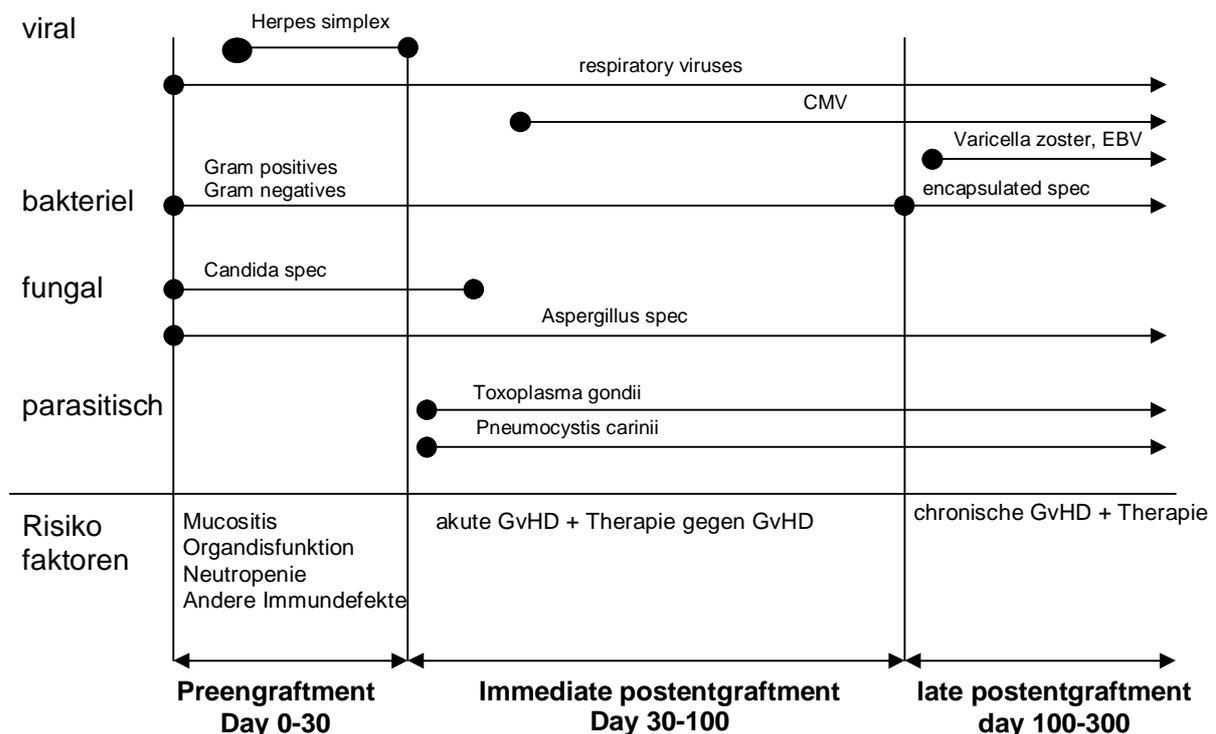
Im Folgenden soll auf die Immunrestitution nach Transplantation eingegangen werden. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass das Erscheinen der unterschiedlichen Subpopulationen des Immunsystems im peripheren Blut starken interindividuellen Schwankungen unterliegt. Als erstes kommt es zu einer überschießenden  $CD56^+$  NK-Zell-Population in den ersten beiden Monaten nach Transplantation. Zwei bis drei Monate nach Transplantation folgt der Take der  $CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen, welche vorrangig dem Gedächtnistyp entsprechen. Die naiven Subtypen folgen nach ca. einem halben Jahr. In der zweiten Hälfte des ersten Jahres nach Transplantation folgen die  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen, wodurch es zu einer schrittweisen Umkehr der  $CD4/CD8$ -Ratio kommt. Es konnte gezeigt werden, dass die Reconstitution der T-Zellen abhängig von der Zahl der bei der Transplantation infundierten T-Zellen ist (Roux et al. 1996). Drei bis sechs Monate nach Transplantation erscheinen die ersten  $CD19^+$  B-Zellen im peripheren Blut, sie können bis zur Beendigung des ersten Jahres Normwerte erreichen. Allerdings schaffen das nur ca. 20% der Patienten. Auch die Subklassen der Immunglobuline erholen sich unterschiedlich schnell (D'Sa et al. 2003). Phagozyten erholen sich innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation.

Aufgrund der lang anhaltenden Immunsuppression der Patienten bis zur Ausreifung des neuen Immunsystems und der Alloreaktivität von T-Zellen kann es in den ersten Monaten nach Transplantation zu Komplikationen kommen. Dazu zählen Infektionen, Auftreten eines Rezidivs und GvHD.

### ***Infektionen***

Die Gefahr an opportunistischen, nosokomialen oder anderen Keimen zu erkranken ist in den ersten Monaten nach Transplantation sehr hoch. Eine Depletion der T-Zellen im Transplantat erhöht nachweislich die Gefahr einer Infektion mit grampositiven Bakterien (Daly et al. 2003). In Abbildung 8 sind die häufigsten Infektionen in den unterschiedlichen Stadien nach Transplantation dargestellt. In der Neutropeniephase (den ersten 30 Tagen nach Transplantation) treten vor allem Infektionen mit grampositiven und –negativen

Bakterien, Herpes Spezies und Pilzinfektionen auf (American Society for Blood and Marrow Transplantation, 2000). Zwischen Tag 30 und Tag 100 stehen vor allem virale Infektionen, vorrangig CMV, im Focus. Später folgen vor allem *Pneumocystis carinii* Infekte (D'Sa et al. 2003, Hauke et al. 1998, Hromas et al. 1994). Vor allem CMV-Infektionen stellen ein großes Problem in der Klinik dar. Sie können Pneumonien und Myelosuppression auslösen und sogar zu Transplantatversagen führen (Reusser et al. 1991). Die Mortalitätsrate ist mit 50% vergleichsweise hoch (Boeckh et al. 1996). Kawalk *et al.* beschrieben auch einen Zusammenhang zwischen dem Alter, der CMV-Reaktivierung und der damit assoziierten Verzögerung der Rekonstitution von T- und B-Zellen (Kalwak et al. 2002). Auch invasive Aspergillosen treten bei ca. 10% der Kinder auf und sind mit einer Mortalitätsrate von 50% assoziiert (Groll 2001). Bei der Abwehr von Aspergillosen spielen T-Zellen eine große Rolle, eine INF- $\gamma$  abhängige T-Helfer-Antwort ist dafür nötig (Bozza et al. 2002, Einsele 2003, Netea et al. 2004, Netea et al. 2003).



**Abbildung 6: Übersicht der Infektionen nach Transplantation.** Beschrieben sind die unterschiedlichen Infektionen in den verschiedenen Stadien nach Transplantation.

**Rezidiv**

Die Immunrekonstitution hat auch Einfluss auf die Rezidiv-Rate. Eine frühe Rekonstitution von T-Zellen ist mit einer niedrigeren Rezidivrate verbunden, wohingegen eine verzögerte Rekonstitution zu einer signifikant erhöhten Rezidivrate führt (Kalwak et al. 2003, Porta et al. 2004, Reddy et al. 2004). Die Kontrolle über ein aufkommendes Rezidiv erfolgt über die minimale Resterkrankung (MRD) (Uzunel et al. 2003). Bei einem kippenden Chimerismus, d. h. bei vermehrtem Auftreten autologer Zellen, erhöht sich die Gefahr eines Rezidivs. Hier kann dann z. B. durch Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) interveniert werden und in einigen Fällen konnte damit ein drohendes Rezidiv abgewendet werden (Bader et al. 1999).

**GvHD**

Unter der Graft versus Host Disease versteht man eine schwere, vor allem T-Zell-bedingte Komplikation nach allogener Transplantation oder DLI (Bensinger et al. 1996, Murphy et al. 2001). Sie entsteht vor allem durch die Produktion von inflammatorischen Zytokinen durch T-Zellen und deren Folgen (Abbildung 6). T-Zellen werden abhängig von ihrem Zytokin-Milieu in Untergruppen unterteilt. Dazu zählen TH1 und TH2-Zellen (Behrens et al. 2007, Radeke et al. 2005, Waibler et al. 2007, Wood und Sakaguchi 2003, Wynn 2005). Der TH1-Typ bildet IL-1, -2, -6 und INF- $\gamma$ , was die GvHD fördert. Der TH2-Typ bildet IL-4, -5 und -13, welche einen Gegenspieler zur GvHD darstellen (Kobayashi et al. 1997, Tanaka et al. 2000). Kommt es zu einem so genannten TH1-Shift kann es zu einer GvHD kommen. Es gibt mehrere Möglichkeiten einer GvHD vorzubeugen. Einmal kann das pharmakologisch durch den Einsatz einzelner oder mehrerer Präparate (Tabelle 6) (Elhasid et al. 2000, Lazarus et al. 1984, Sullivan et al. 1986) geschehen.

Des Weiteren kann einer GvHD durch eine T-Zell-Depletion vorgebeugt werden, entweder direkt im Transplantat oder durch den Einsatz von Anti-T-Zell-Antikörpern wie MabCampath (Anti CD52) oder OKT-3 (Anti CD3) (Hale 1988) zur *in vivo* Depletion der T-Zellen. Allerdings soll auch hier noch einmal darauf hingewiesen werden, dass mit der T-Zell-Depletion auch der erwünschte und zum Teil lebenswichtige GvT-Effekt verloren geht.

**Tabelle 6:** Pharmakologische Prophylaxe von GvHD [nach [www.uptodate-online.com](http://www.uptodate-online.com)]

<b>Präparat(e)</b>	<b>GvHD [%]</b>
keine	52-100
Methotrexat	56-70
Cyclosporin	33-54
ATG-Methotrexat-Prednison	21
Cyclosporin-Methotrexat	15-33
Cyclosporin-Prednison	12-21
Cyclosporin-Methotrexat-Prednison	9-32

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Das alkylierende Agens Treosulfan hat in der Inneren Medizin eine lange Tradition bei der Behandlung maligner Erkrankungen, wie z. B. dem Ovarialkarzinom oder auch bei Leukämien. In der pädiatrischen Onkologie findet bisher, das zu Treosulfan strukturell sehr ähnliche Busulfan Anwendung. Studien in der Inneren Medizin zeigen, dass Busulfan im Vergleich zu Treosulfan ein höheres Risiko für zahlreiche Nebenwirkungen birgt.

Bisher gibt es nur wenige *in vitro* Daten zum Vergleich der Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf Leukämie- und Tumorzellen pädiatrischer Patienten und keine Daten zur Wirkung auf Leukozyten. Daher ist es Ziel dieser Arbeit, *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf maligne Zellen pädiatrischer Patienten mit verschiedenen Leukämien und Zellen gesunder Spender durchzuführen.

Im Einzelnen soll Folgendes erarbeitet werden:

### *In vitro* Untersuchungen

- Etablierung einer Methode zur Messung der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf pathologische Zellen in Patientenmaterial.
- Bestimmung der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf frisch isolierte leukämische Zellen pädiatrischer Patienten.
- Bestimmung der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Lymphozyten-Subpopulationen und Stammzellen gesunder Spender.
- Interaktion von Treosulfan und Busulfan mit dem Purinanalogon Fludarabin, da zahlreiche pädiatrische Behandlungsprotokolle neben Busulfan auch Fludarabin enthalten.

### *In vivo* Untersuchungen

- Immunrekonstitution eines Patienten mit AML, der in einer Pilotstudie mit Treosulfan konditioniert wurde, im Vergleich mit einer Patientengruppe, die Busulfan erhielt.

### 3. Material und Methoden

Die Arbeit wurde im Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapien der Kinderklinik des Universitätsklinikums Frankfurt angefertigt. Hier standen auch die im Folgenden genannten Geräte zur Verfügung.

#### 3.1. Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Zellen

##### 3.1.1. Geräte

Brutschrank, 5% CO <sub>2</sub> -begast, rH 90%	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
CliniMACS-Gerät	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Durchflusszytometer:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• XL-MCL 4-Farbdurchflusszytometer</li> </ul>	Beckmann Coulter, Krefeld
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CYTOMIX FC500 5-Farbdurchflusszytometer</li> </ul>	Beckmann Coulter, Krefeld
<ul style="list-style-type: none"> <li>• FACS-Calibur™ 4-Farbdurchflusszytometer</li> </ul>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Elektro-Gelblotter	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Gelelektrophorese	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Netzgerät für Elektrophorese und Blot	Biometra, Göttingen
Mikroskop, Durchlicht, AXIOVERT-25	Carl Zeiss Service, Jena
Pipetten, Eppendorf-Serie Reference	Eppendorf, Hamburg
Schüttler VIBRAX-VXR	IKA Janke und Kunkel, Staufen
SpectraFluor Absorbance Reader	
Filter: 540 nm	Tecan, Crailsheim
Waage, Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Grant Instruments, Berlin
Vortexer	IKA Janke und Kunkel, Staufen
Zentrifugen:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tischzentrifuge Multispin</li> </ul>	Eppendorf, Hamburg
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Laborzentrifuge Multifuge-4K-R</li> </ul>	Thermo Elektron GmbH, Karlsruhe
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kühlzentrifuge BIOFUGE-FRESCO</li> </ul>	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Auslaufpipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml) steril, einzeln verpackt	Costar Offenburg
CliniMACS Tubing Set	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Nitrozellulose-Filter	Protrans, Hockenheim
Röhrchen für Durchflusszytometrie 5 ml, 75x12 mm ø	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Falcon, München
Reaktionsgefäße, 15 und 50 ml	Falcon, München
Zellkulturflaschen 12,5; 25; 80; 175 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-, 96-Well-Platten	Falcon-München

### 3.1.3. Chemikalien, Medien und Zusätze

CliniMACS PBS/EDTA Puffer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Flow-Count <sup>TM</sup> -Fluoropheresbeads	Beckmann Coulter, Krefeld
Blockingpuffer Blotto	SantaCruz Biotech, Heidelberg
Ficoll-Dichtegradientenlösung Dichte von 1,077 ± 0,001 g/cm <sup>3</sup>	Seromed Biochrom, Berlin
FLT-3-Ligand	CellSystems, St. Katharinen
Fötale Kälber Serum (FCS) Gold	PAA Laboratories GmbH, Österreich
L-Glutamin	Gibco, Paisly, Großbritannien
LS-Puffer	Miltenyi Biozech, Bergisch Gladbach
Humanes Plasma	BSD Hessen, Frankfurt
Interleukin 2 (IL-2)	Chiron, München
Interleukin 3 (IL-3)	CellSystems, St. Katharinen
Interleukin 6 (IL-6)	CellSystems, St. Katharinen
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Linz
Stammzell-Faktor	CellSystems, St. Katharinen
Zellkulturmedium:	
• X-Vivo 10	Cambrex, Verviers
• RPMI 1640	Sigma, Poole, Hants, GB
• IMDM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Zytostatika:

- Treosulfan Medac, Hamburg  
Stock: 50 mg/ml
- Busulfan Pierre Fabre, Freiburg  
Stock: 6 mg/ml
- Fludarabin Schering, Berlin  
Stock 10 mg/ml

Treosulfan wurde aliquotiert bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Busulfan und Fludarabin wurden aus Resten aus Präparationen zur klinischen Applikation, hergestellt von der Klinikapotheke des Universitätsklinikums Frankfurt, verwendet.

### 3.1.4. Antikörper (CD-Nomenklatur siehe Anhang)

*Für Bestimmung der Immunstati:*

tetraCHROME (CYT <sup>®</sup> STAT)	Beckmann Coulter, Krefeld
CD45-FITC/CD4-PE/CD8-ECD/CD3-PC5	
CD45-FITC/CD56-PE/CD19-ECD/CD3-PC5	
CD3-PC5 / ECD	Beckmann Coulter, Krefeld
CD4-PE / PC5 / PC7	Beckmann Coulter, Krefeld
CD8-ECD / PC5 / PC7	Beckmann Coulter, Krefeld
CD14-PE / PC7	Beckmann Coulter, Krefeld
CD25-PE / PC5	Beckmann Coulter, Krefeld
CD28-PE	Immunotech, Krefeld
CD34-PE	Beckmann Coulter, Krefeld
CD45-FITC	Beckmann Coulter, Krefeld
CD45RA-FITC	Beckmann Coulter, Krefeld
CD45RO-PE	Immunotech, Krefeld
CD69-PE	Immunotech, Krefeld
HLA-DR-FITC	Immunotech, Krefeld
7-AAD	Immunotech, Krefeld
PI	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

*Für Apoptose-Messungen*

Annexin-V FITC und PI (Apoptose-Kit-I)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD10 in PE oder PC7	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD13 in PE oder PC7	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD19 in PE oder PC7	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD34 in PE oder PC7	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD45 in PE oder PC7	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD133 in PE oder PC7	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

*Für Kontrollen*

IgG1-FITC / PE / ECD	Beckmann Coulter, Krefeld
IgG1-PC5	Beckmann Coulter, Krefeld
IgG1-PC7	Beckmann Coulter, Krefeld
ImmunoTrol	Beckmann Coulter, Krefeld

*Für immunomagnetische Selektion*

CliniMACS CD3 Reagent	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CliniMACS CD34 Reagent	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

*Für Western Blotting*

Caspase-3 (H277) Antikörper	SantaCruz Biotech, Heidelberg
Isotyp rabbit IgG	

### **3.1.5. Verwendete Zelllinien**

*Leukämie-Zelllinien*

H9	(T-ALL, ATCC-Nr.: HTB-167; (Gootenberg et al. 1981))
K562	(CML, ATCC-Nr.: CCL-243; (Lozzio und Lozzio 1975))
Molt 4/8	(T-ALL, ATCC-Nr.: CRL-1582; (Minowada et al. 1972))

*Tumorzelllinien*

SH-SY5Y	(Neuroblastom, ATCC-Nr.: CRL-2266 <sup>TM</sup> ; (Ross et al. 1983))
UKF-NB3	(Neuroblastom; (Cinatl et al. 1993))

## 3.2. Methoden und Patienten

### 3.2.1. Pharmakokinetische *in vitro* Untersuchungen an Zelllinien, Patientenproben und normalen Lymphozyten

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden pharmakokinetische *in vitro* Untersuchungen an Leukämie-Zelllinien, an Tumorzelllinien, an frisch isolierten leukämischen Proben pädiatrischer Patienten und an gesunden Spenderzellen durchgeführt (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Zusammenfassung der verwendeten Proben zur *in vitro* Untersuchung der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan

<b>Leukämie-Zelllinien</b>
Molt 4/8 (T-ALL)
H9 (T-ALL)
K562 (CML)
<b>Tumorzelllinien</b>
SH-SY5Y (Neuroblastom)
UKF-NB3 (Neuroblastom)
<b>Leukämiezellen von pädiatrischen Patienten (n=21)</b>
cALL (n=12)
reife B-ALL (n=1)
reife T-ALL (n=5) (drei Patienten; ein Patient mit drei Untersuchungszeitpunkten)
prä T-ALL (n=1)
reifes T-NHL (n=1)
AML (n=3) (zwei Patienten; ein Patient mit zwei Untersuchungszeitpunkten)
BAL (n=1)
<b>Zellen gesunder Spender</b>
T-Zellen (n=3)
NK-Zellen (n=2)
Stammzellen (n=1)

Des Weiteren wurde im Rahmen einer Therapie eines an AML erkrankten Patienten eine *in vivo* Studie zur Immunrekonstitution nach Konditionierung mit Treosulfan und allogener KM-Transplantation durchgeführt (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der Patienten zur *in vivo* Untersuchung zur Immunrekonstitution nach Treosulfan- bzw. Busulfan-Konditionierung, bei AML Erkrankung nach mindestens erstem Rezidiv.

Konditionierung	n
Treosulfan, Melphalan, Thiothepa	1
Busulfan, Cyclophosphamid, Melphalan	8

### 3.2.2. Isolierung mononukleärer Zellen mittels Ficoll

Aus peripherem Blut (PB) und Buffy-Coats wurden die mononukleären Zellen (MNZ) mittels Ficoll-Separation isoliert. Buffy-Coats wurden vom Blutspendedienst Hessen (Frankfurt/Main) bezogen.

Bei dieser Methode werden zwei flüssige Phasen, die Zellsuspension und das Trennmedium mit unterschiedlicher Dichte übereinander geschichtet. Durch eine sich anschließende Zentrifugation werden die verschiedenen Zellen, abhängig von ihrer spezifischen Dichte, aufgetrennt. Als Trennmedium fungiert Ficoll-Paque (Biocoll Separating Solution) mit einer Dichte von  $1,077 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$ . Auf ca. 15 ml Trennmedium werden ca. 30 ml Zellsuspension (PB oder Buffy Coats 1:1 verdünnt mit PBS-Puffer) vorsichtig überschichtet. Nach der Zentrifugation des Ficoll-Gradienten (30 min, 399 g, ohne Bremse), stellen sich mehrere Phasen dar. In der obersten Schicht befinden sich das Plasma und die Thrombozyten. Es schließt sich ein schmaler weißer Ring an, in dem sich die mononukleären Zellen (MNZ) befinden. Darunter befindet sich das Trennmedium. Die unterste Schicht stellen Erythrozyten und Granulozyten dar. Der weiße Ring MNZ's wird vorsichtig abpipetiert und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 g, 10 min). Anschließend wird das Zellpellet resuspendiert und in das für den jeweiligen Versuch vorgesehene Medium aufgenommen.

### 3.2.3. Verwendete Leukämieproben

In der Frankfurter Universitäts-Kinderklinik werden jährlich ca. 25-30 Patienten mit Leukämien behandelt. Die Diagnostik der Leukämie-Erkrankungen erfolgt zum einen morphologisch, zum anderen mittels Immunphänotypisierung. So konnte für jeden Patienten ein spezifisches Oberflächenmarkerprofil sowie Profile der cytoplasmatischen und nukleären Antigene für die Leukämie erstellt werden. Zur Immunphänotypisierung der Leukämien wurde eine 4-farb durchflusszytometrische Analyse (FACS Calibur<sup>TM</sup>, Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt, was zur Diagnose von cALL (n=12), reife B- (n=1) und T-ALL (n=5), prä T-ALL (n=1), reifes T-NHL (n=1), AML (n=3), und BAL (n=1) beitrug (Tabelle 7).

Nach Einverständnis der Eltern und der Frankfurter Ethikkommission zur Durchführung der Studie wurden die Restproben der Leukämietypisierung anonymisiert für die vorliegenden Untersuchungen frei gegeben (Nummer des Ethik-Votums: 157/03). Um die pharmakokinetischen Untersuchungen an Leukämie-Zellproben von Kindern vorzunehmen, wurden die MNZ der Untersuchungsproben mittels Ficoll isoliert (siehe 3.2.2.). Es wurden Knochenmark- sowie periphere Blutproben bei Diagnosestellung (n=14), im Blastenschub (n=4) und bei auftretendem Rezidiv (n=6) in die Untersuchungen eingeschlossen. Nach der Aufreinigung der mononukleären Zellen mittels Dichte-Gradientenzentrifugation, wurde eine mediane Reinheit an 75% leukämischer Zellen erreicht (Range zwischen 45% and 95%). Die übrige Zellpopulation stellte periphere mononukleäre Zellen des Blutes dar. Der Einsatz zweier für den jeweiligen Patienten spezifischer Oberflächenmarker diente später zur Abgrenzung von gesunden und malignen Zellen im Durchflusszytometer, um sicher zu stellen, dass die gemessene Zytotoxizität tatsächlich aus der Wirkung auf die Leukämiezellen resultiert. Zum Einsatz kamen dabei in erster Linie die Antikörper CD10, CD19, CD34, CD13, CD45 und CD133, welche mit den Fluoreszenzfarbstoffen PE bzw. PC7 markiert waren.

### 3.2.4. Aufreinigungsmethoden von Lymphozyten gesunder Spender

Mit dem Einverständnis der Spender wurden 20 ml Blut oder 5 ml Leukaphereseprodukt von 5 gesunden Spendern für die Aufreinigung von CD3<sup>+</sup> T-Zellen, CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen und CD34<sup>+</sup> Stammzellen eingesetzt. T-Zellen und Stammzellen wurden positiv angereichert

mittels immunomagnetischen CD3<sup>+</sup> bzw. CD34<sup>+</sup> Mikrobeads und dem MACS-System von Miltenyi (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) (Beck et al. 2006). Zur Aufreinigung von NK-Zellen wurde das Rosette-Sep NK-cell enrichment Kit (CellSystems Biotechnology, St. Katharinen, Deutschland) verwendet (Beck et al. 2006). Mit beiden Methoden lag die Reinheit der Subpopulationen bei  $\geq 93\%$ .

#### **3.2.4.1 Aufreinigungen mittels CliniMACS**

Die Aufreinigung der Stammzellen erfolgte im klinischen Maßstab unter GMP (good manufacturing practice) Bedingungen im Rahmen einer Transplantationsvorbereitung. Die anfallenden Reste wurden nach erfolgreicher Transplantation und Einwilligung der Eltern für diese Forschungszwecke verwendet (Nummer Ethik-Votum: 163/03).

Zur Aufreinigung von T-Zellen wurde die MACS-Technik von Miltenyi Biotech angewandt. Dabei wurden Leukaphereseprodukte nach zweimaligem Auswaschen der Thrombozyten mit Intraglobin inkubiert, um unspezifischen Bindungen vorzubeugen (5min, 4°C). Anschließend erfolgte die Inkubation mit CD3 Microbeads (Eisen-Dextrankolloid-Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD3) für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Zellsuspension von überschüssigen, ungebundenen CD3-Microbeads durch zweimaliges Waschen befreit. Dazu wurde die Zellsuspension auf das 10-fache Volumen mit Puffer verdünnt und für jeweils 10 min bei 300 g zentrifugiert. In dieser Zeit wurde eine Selektionssäule (LS ist geeignet, um  $> 10^7$  markierte Zellen anzureichern) mit LS-Puffer gespült. Die Zellen wurden anschließend auf die sich im Magnetfeld befindliche Säule aufgetragen. Bei dem Durchlauf der Säule wurden alle Microbead-markierten Zellen im Magnetfeld gehalten. Nach mehrmaligem Waschen mit Puffer, um die ungebundenen Zellen aus der Säule zu entfernen, wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die gewünschten Zellen mittels Puffer aus der Säule gespült und aufgefangen.

#### **3.2.4.2. Aufreinigung mittels Rosette Sep-Kit**

Die Aufreinigung von NK-Zellen erfolgte mittels „Human NK cell Enrichment Cocktail“ (StemCell Technologies Inc, Großbritannien). Dabei werden alle unerwünschten Zellen

depletiert, wobei die Prozedur einer herkömmlichen Ficoll-Trennung ähnelt. Ein Mix an spezifischen Antikörpern (so genannte Tetramere-Antikörper-Komplexe (TAC)) vernetzten die unerwünschten hämatopoetischen Zellen mit Erythrozyten.

Es wurden 50 µl des Mixes pro 1 ml peripheren Blutes miteinander gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe im Verhältnis 1:1 mit PBS + 2% FCS gemischt. Dieses Gemisch wurde dann einer herkömmlichen Ficoll-Trennung unterzogen (siehe Kapitel 3.2.2.). Dabei wurden alle ungewollten Zellen mit den Erythrozyten durch das Trennmedium gezogen, in dem weißen Ring an MNZ über dem Trennmedium befanden sich dann nur noch die zu isolierenden Zellen.

### **3.2.5. Kultivierung und Expansion von Zellen**

Die Kultivierung von Zelllinien, primären Leukämiezellen und gesunden Zellen erfolgte bei 37°C und 5% iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre und 90% Luftfeuchte.

#### **3.2.5.1. Kultivierung und Expansion von Zelllinien**

Die Zelllinien H9 und K562 wurden in RPMI 1640 Medium (Sigma, Poole, Hants, Großbritannien), und die Zelllinien Molt 4/8, UKF-NB3 und SH-SY5Y in IMDM (Iscoves Modified Dulbeccos Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis-Missouri, USA) kultiviert. Beide Medien wurden mit 10% FCS (Fetales Kälberserum Gold, PAA Laboratories GmbH, Österreich) und 2 mM L-Glutamin (Gibco, Paisly, Großbritannien) versetzt.

#### **3.2.5.2. Kultivierung und Expansion von primären Leukämiezellen**

Primäre leukämische Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Sigma, Poole, Hants, Großbritannien), angereichert mit 20% FCS (Fetales Kälberserum Gold, PAA Laboratories GmbH, Österreich) und 2 mM L-Glutamin (Gibco, Paisly, Großbritannien), kultiviert.

### **3.2.5.3. Kultivierung und Expansion von normalen Lymphozyten**

Aufgereinigte hämatopoetische Stammzellen wurden in X-Vivo 10 Komplettmedium (Cambrex, Verviers) versetzt mit 5% FCS (Fetales Kälberserum Gold, PAA Laboratories GmbH, Österreich), 2 mM L-Glutamin (Gibco, Paisly, Großbritannien) und den rekombinanten humanen Proteinen: Flt-3-Ligand und Stammzell-Faktor (je 100 ng/ml) sowie Interleukin-3 und -6 (je 20 ng/ml) (IL-3 und IL-6, Cellsystems Biotechnology, St. Katharinen, Deutschland) kultiviert.

T- und NK-Zellen wurden ebenfalls in X-Vivo 10 Komplettmedium (Cambrex, Verviers) mit 5% FCS (Fetales Kälberserum Gold, PAA Laboratories GmbH, Österreich), 2 mM L-Glutamin (Gibco, Paisly, Großbritannien) und unter zusätzlicher Zugabe von 100 IU/ml (für T-Zellen) und 1000 IU/ml (für NK-Zellen) rekombinantes humanes Interleukin-2 (IL-2, Chiron, Ratingen, Deutschland) kultiviert. Nach dieser Expansion der Zellen für 3-15 Tage wurde der Zytotoxizitäts-Test durchgeführt.

### **3.2.6. Grundlagen der Durchflusszytometrie**

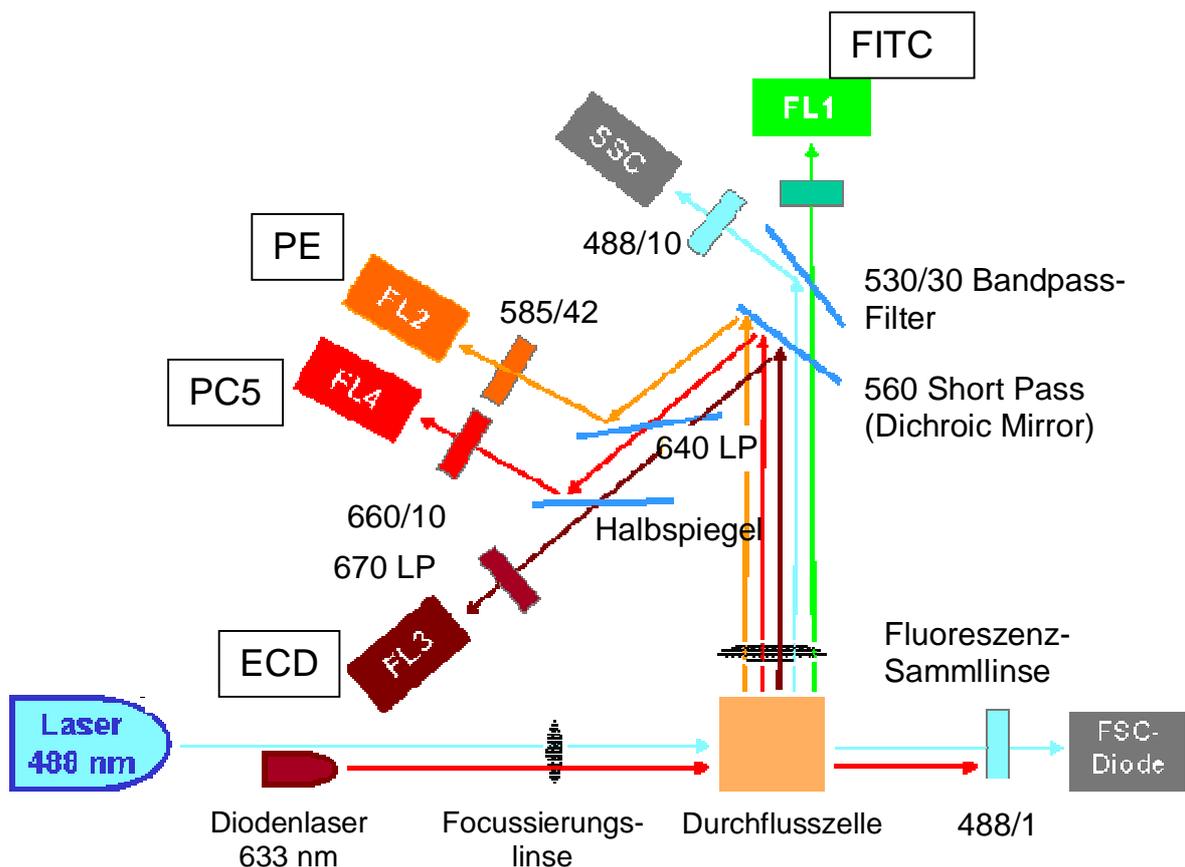
Früher konnte man hämatopoetische Zellen nur auf Grund ihrer Morphologie im Mikroskop charakterisieren. Seitdem zahlreiche Oberflächenproteine, so genannte Antigene, auf immunologischen Zellen identifiziert wurden, konnten neue Methoden zur Charakterisierung unterschiedlicher Zellen entwickelt werden. Die auf den Zellen befindlichen Antigene können mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden, wenn sie mit einem Farbstoff konjugiert werden. Das kann zum einen im Fluoreszenzmikroskop, zum anderen im Durchflusszytometer erfolgen.

Bei der Durchflusszytometrie können mittels Laserlicht auf Einzelzellebene sowohl morphologische als auch antigene Eigenschaften detektiert werden.

Die morphologischen Eigenschaften werden dabei durch die Streuung des Laserlichtes erfasst. Eine Streuung im  $0^\circ$  bis  $10^\circ$ -Winkel wird als Forward-Scatter (FCS) und die Ablenkung des Lichtes im  $90^\circ$ -Winkel wird als Side-Scatter (SSC) bezeichnet. Dabei entspricht der FCS der Zellgröße, der SSC charakterisiert die Granularität (Abbildung 7).

Die antigenen Eigenschaften werden durch die Erfassung von Fluoreszenzen charakterisiert. Man nennt diese Methode auch Immunphänotypisierung. Antikörper werden dabei mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, welche durch einen 488 nm Argon-Ionen-Laser erfasst werden. Dabei ist es vom Gerät abhängig, wie viele Fluoreszenzen in einer Probe

untersucht werden können. Bei einem 4-farb Gerät können 4 Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig eingesetzt werden. Dabei wurde in den in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen im Fluoreszenzkanal (FK) 1 FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), im FK 2 PE (Phycoerythrin), im FK 3 ECD (energy coupled dye) und im FK 4 PC5 (Phycoerythrin-Cyanin 5) eingesetzt (Abbildung 7). Im Falle des 5-farb Gerätes CYTOMIX FC500 kommt im FK 5 PC7 (Phycoerythrin-Cyanin 7) hinzu. Diese Fluoreszenzfarben werden durch den Laser zur Emission von Licht mit bestimmter Wellenlänge angeregt, das anschließend mit spezifischen Detektoren nach elektronischer Verstärkung durch einen Photomultiplier (PMT) erfasst wird. Aber auch andere Farbstoffe können mit diesem Laser angeregt werden, z. B. Propidiumiodid (PI) und 7-AAD, welche beide als Totfarbstoff fungieren, womit eine Einschätzung der Vitalität der zu messenden Probe erfolgen kann.



**Abbildung 7: Aufbau eines 4-farb Durchflusszytometer.** Dargestellt sind der Laser, der Forward-Scatter (FCS) und der Side-Scatter (SSC) mit denen die Zellen nach Größe und Granularität unterschieden werden, die 4 Fluoreszenzkanäle und die in den Kanälen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Durch die gezielte Kombination von mehreren Antikörpern können mittels einer so genannter Gatingstrategie einzelne Subpopulationen von Zellen dargestellt werden (siehe auch Abbildung 9). Dabei werden die zu untersuchenden Populationen systematisch durch Markerkombinationen und Setzen von Gates eingeschränkt.

### 3.2.7. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte zum einen mit einem herkömmlichen Blutzellzählgerät (Coulter AC-T, Beckman Coulter, Krefeld). Die Bestimmung der genauen Zellzahl, unter Einbeziehung der Vitalität der Probe, erfolgte durchflusszytometrisch am CYTOMIX FC500 oder XL-MCL von Beckman Coulter (Krefeld). Dabei wurde PI oder 7AAD als Tot-Farbstoff zur Bestimmung der Vitalität der Probe verwendet. Durch den gleichzeitigen Einsatz von Flow-Count™ -Fluorophoresbeads konnte eine quantitative Analyse erfolgen. Die Flow-Count™ -Fluorophoresbeads werden in exakt gleichem Volumen wie die Probe eingesetzt. Durch das Bekanntsein der genauen Konzentration der Beads-Mikrokügelchen kann mit nachstehender Formel die absolute Zahl der Zellen bestimmt werden:

(Formel 1)

$$\text{Absolutzellzahl (Zellen/}\mu\text{l)} = \frac{\text{Gesamtzahl gezählter Zellen}}{\text{Gesamtzahl gezählter Beads}} \times \text{Beads-Konzentration}$$

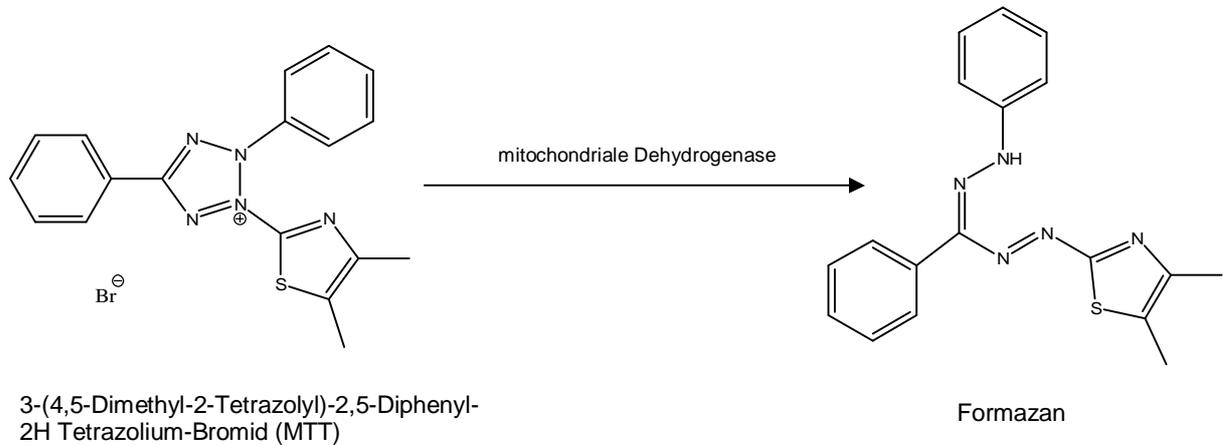
### 3.2.8. Bestimmung der Zytotoxizität

Die Zellen wurden für 24 h, 48 h oder 72 h mit ansteigenden Konzentrationen von Busulfan (0-1000 $\mu$ M) und Treosulfan (0-1000  $\mu$ M) alleine oder in Kombination mit Fludarabin (0-200  $\mu$ M) in Triplikaten inkubiert.

#### 3.2.8.1. Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Assay

In den 80er Jahren wurde ein sehr schneller, effizienter Test, erstmals beschrieben durch Mosmann et al. (Mosmann 1983), zur *in vitro* Testung von Drug-Zytotoxizität eingeführt.

Dieser so genannte MTT-Assay misst die Fähigkeit lebender Zellen, das lösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethyl-2-Tetrazolyl)-2,5-Diphenyl-2H Tetrazolium-Bromid (MTT) in ein unlösliches Formazan-Präzipitat zu überführen.



**Abbildung 8: Dem MTT-Assay zugrunde liegende Reaktion.** Die Umsetzung von MTT zu Formazan erfolgt durch die mitochondriale Dehydrogenase.

Nach der Aufnahme des Tetrazoliumsalzes in die vitale Zelle kommt es in den Mitochondrien zu der in Abbildung 8 dargestellten Reaktion, in der das lösliche, gelbe MTT zu blauen Formazan-Kristallen umgesetzt wird. Diese kristallinen Formen sind impermeabel für die Zellmembran, wodurch es zu einer intrazellulären Akkumulation des Formazans kommt.

Durch die Lyse der Zellen mittels geeigneten Detergenzien und der Beifügung von Alkohol werden die Formazan-Kristalle frei und solubilisiert. Dabei ist die Anzahl der lebenden Zellen direkt proportional zu der gebildeten Formazan Menge. Dadurch kann durch den gleichzeitigen Einsatz von unbehandelten Kontrollen direkt auf die Wirkstärke der zu testenden Substanz geschlossen werden. Die Farbintensität kann an einem ELISA-Gerät bei einer Wellenlänge von 500-600 nm als optische Dichte gemessen werden. An einem Mikrotiterplatten-Lesegeräte kann mittels dieses colorimetrischen Testes eine große Probenanzahl in sehr kurzer Zeit analysiert werden. In zahlreichen Arbeiten wurde dieser Assay genutzt, wodurch eine gute Vergleichsmöglichkeit zu anderen veröffentlichten Daten (Werner et al. 2007) herangezogen werden kann.

Für den Test wurden nach Inkubation mit den Zytostatika  $10^5$  Zellen aus der Zellkultur in 96-Well-Platten transferriert, 500  $\mu\text{g/ml}$  MTT hinzugefügt und für 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5% iger  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Isopropanol absolut + 2% 2N HCl lysiert. Um die optische Dichte des alkohollöslichen Formazans zu messen, wurde der Tecan Spectra-mini (Crailsheim, Deutschland) mit einem 540 nm Filter genutzt.

### 3.2.8.2. Bestimmung der Zytotoxizität mittels durchflusszytometrischem Assay

Mit dem MTT-Assay war es möglich Zelllinien hinsichtlich ihrer Vitalität zu beurteilen. Bei der Untersuchung von Patientenzellen reichte dieser Assay nicht aus, da die Proben von Patienten neben malignen Zellen auch gesunde Zellen enthielten. Daher war es nötig, ein anderes Testverfahren zu etablieren, in dem, in einem ersten Schritt, zwischen gesunden und malignen Zellen unterschieden wird, um dann eine Aussage über die Vitalität der malignen Zellen zu treffen. Desweiteren sollten nicht nur tote, sondern auch apoptotische Zellen detektiert werden.

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist im Gegensatz zur Nekrose ein streng geordneter Prozess, in dem in der Zelle eine Signalkaskade abläuft, die letztendlich im Zelltod mündet. Erstmals wurde die Unterscheidung von Nekrose und Apoptose durch Wyllie et al. (Wyllie 1985) beschrieben. In vitalen Zellen sind Phosphatidylserin-Moleküle in der Zellmembran nach innen verankert. Im Verlauf der Apoptose werden diese Moleküle auf die Außenseite der Membran transferiert, welche durch den Antikörper AnnexinV detektiert werden können. In einer sehr späten Phase der Apoptose wird die Zellmembran der Zelle durchlässig, wodurch der DNA-interkalierende Marker PI (Propidiumiodid) eindringen kann und damit wird die Zelle als tot erfasst.

5-farb durchflusszytometrische Messungen wurden am Beckman Coulter CYTOMIX FC500 durchgeführt. Um zwischen dem Anteil von lebenden, apoptotischen und toten Zellen zu unterscheiden, wurden PI und AnnexinV (AnnexinV-FITC Apoptosis Detection KitI PartA, BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA) eingesetzt. In der gleichen Analyse wurden die Zellen mit zwei zusätzlichen Markern angefärbt, um zwischen gesunden Lymphozyten und leukämischen Zellen zu differenzieren. Dazu wurden Phycoerythrin (PE) oder Phycoerythrin-Cyanin 7 (PC7) konjugierte Antikörper eingesetzt, welche gemäß der bekannten immunologischen Phänotypisierung der Leukämie ausgewählt wurden. Häufigerweise wurden die Antikörper gegen CD10, CD19, CD34, CD13 und/oder CD133 verwendet (Zimmermann et al. 2005).

Basierend auf dem durchflusszytometrischen Assay von Zimmermann et al. und Kloess et al. wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit erneute Optimierungen des Assays vorgenommen. Für diese Messungen wurden die Zellen folgendermaßen vorbereitet: nach der Kultivierung mit und ohne Zytostatika wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen (Zentrifugation: 5 min, 257 g). Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von

---

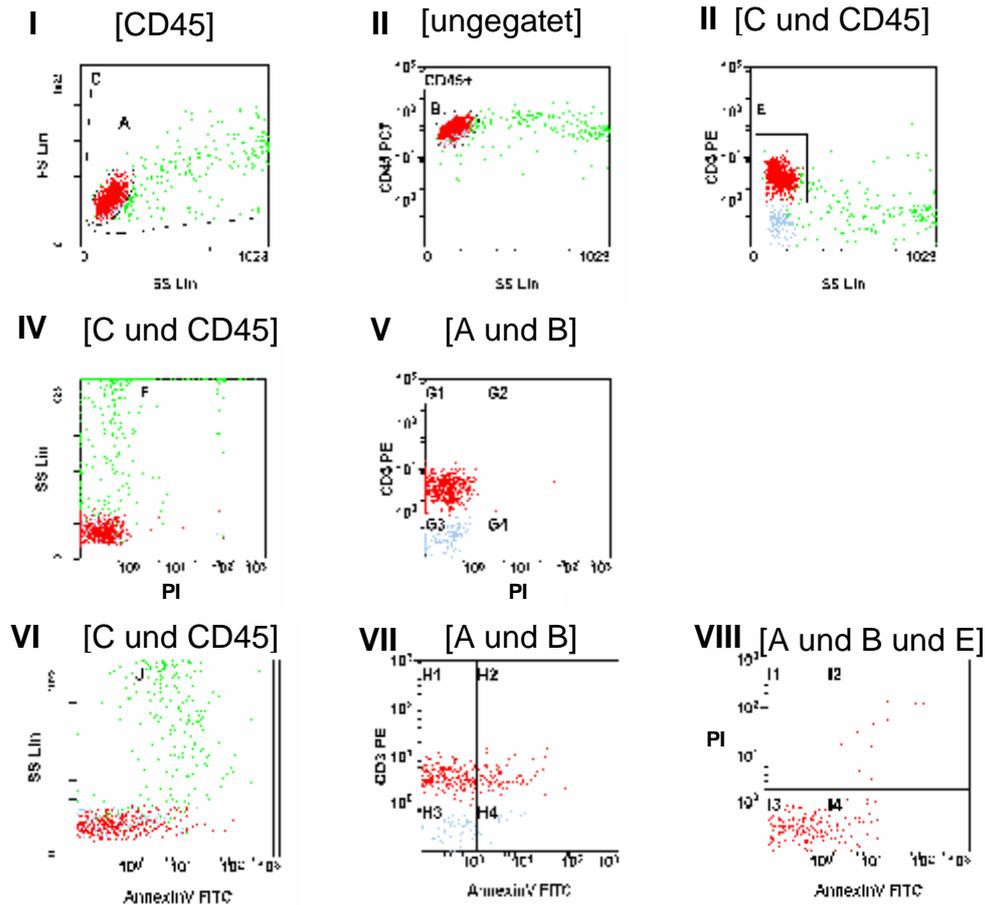
$1 \times 10^6$  Zellen/ml in einfach konzentriertem Bindepuffer (im AnnexinV-FITC Apoptosis Detction KitI PartA enthalten) aufgenommen. Davon wurden 100  $\mu$ l (entspricht  $1 \times 10^5$  Zellen) in ein Röhrchen zur durchflusszytometrischen Messung überführt. Nach Zugabe von 5  $\mu$ l AnnexinV, 10  $\mu$ l PI und je 10  $\mu$ l der ausgewählten Antikörper in PE bzw. PC7 wurde der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 400  $\mu$ l Bindepuffer zur Probe hinzugefügt und die durchflusszytometrische Analyse fand innerhalb einer Stunde statt.

Die verwendete Gating-Strategie ist in Abbildung 9 dargestellt. Um Patientenproben auszuwerten, wurde eine Mindest-Vitalität in der Zell-Kontrolle >65% festgelegt.

Die zytotoxische Wirkung wurde sowohl für den MTT- als auch für den durchflusszytometrischen-Assay mit folgender Gleichung bestimmt.

(Formel 2)

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{\text{Experimenteller Wert}}{\text{Zellkontrolle}} \times 100$$



**Abbildung 9: Gatingstrategie für die Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen und toten Zellen in Leukämieproben pädiatrischer Patienten** (Kombination der Marker CD45 und CD3).

**Dotplot I:** Übersicht aller Leukozyten (CD45+ Zellen), aufgetragen wurde Größe gegen Granularität (FSC und SSC)

**Dotplot II:** Die Zellen wurden ungegated aufgetragen, und Side-Scatter gegen den Marker des 5. Fluoreszenzkanals aufgetragen (CD45-PC7). Das CD45+-Gate beinhaltet alle mononukleären Zellen, das Gate B alle Lymphozyten.

**Dotplot III:** Die Zellen, die positiv für den Marker in der 2. Fluoreszenz (CD3-PE) waren, wurden mit Gate E bezeichnet; dieses wiederum ist auf die CD45+ Leukozyten gated.

**Dotplot IV:** Die Zellen wurden auf B und CD45+ gated und Side-Scatter gegen PI aufgetragen um die Vitalität der Zellen zu überprüfen.

**Dotplot V:** Die Zellen sind auf A und B (Lymphozyten) gated und der Marker in der 2. Fluoreszenz (CD3-PE) gegen PI aufgetragen.

**Dotplot VI:** Die Zellen sind hier auf C und CD45+ (Leukozyten) gated und der Side-Scatter gegen AnnexinV aufgetragen. Das Gate J zeigt alle CD45+AnnexinV<sup>+</sup> apoptotische Zellen.

**Dotplot VII:** Die Zellen sind auf A und B (Lymphozyten) gated und der Marker in Fluoreszenz 2 (CD3-PE) gegen AnnexinV

Dotplot IV bis VII dienen als interne Kontrolle und zur Orientierungshilfe zum Setzen der Gates in Dotplot VIII.

**Dotplot VIII:** Die Zellen wurden auf A, B (Lymphozyten) und E (CD3+-Zellen) gated, d.h. das sind alle Zellen, die sowohl in Gate A lagen als auch positiv für die Marker in Fluoreszenz 5 (CD45-PC7) und Fluoreszenz 2 (CD3-PE) waren; diese Zellen sind dargestellt im Auftrag PI gegen AnnexinV; Quadrant I3 zeigt die vitalen Zellen (AnnexinV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), Quadrant I4 zeigt die Zellen in der frühen Apoptose (AnnexinV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), Quadrant I2 zeigt die Zellen in der späten Apoptose (AnnexinV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) und Quadrant I1 zeigt die toten Zellen/Nekrose (AnnexinV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>).

---

### 3.2.9. Untersuchung der Zytostatika-Interaktion

Zur Testung der Zytostatika-Interaktionen wurde die Zelllinie Molt 4/8 mit ansteigenden Treosulfan- bzw. Busulfan-Konzentration (0-50  $\mu\text{M}$ ) kombiniert mit jeweils 2,5; 6,25; oder 12,5  $\mu\text{M}$  Fludarabin inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 72 h bei 37°C, 5%iger  $\text{CO}_2$  Atmosphäre und 90% Luftfeuchtigkeit. Die Messung der Ergebnisse erfolgte mittels des beschriebenen optimierten durchflusszytometrischem Assay, unter Verwendung von PI und AnnexinV (siehe 3.2.8.2).

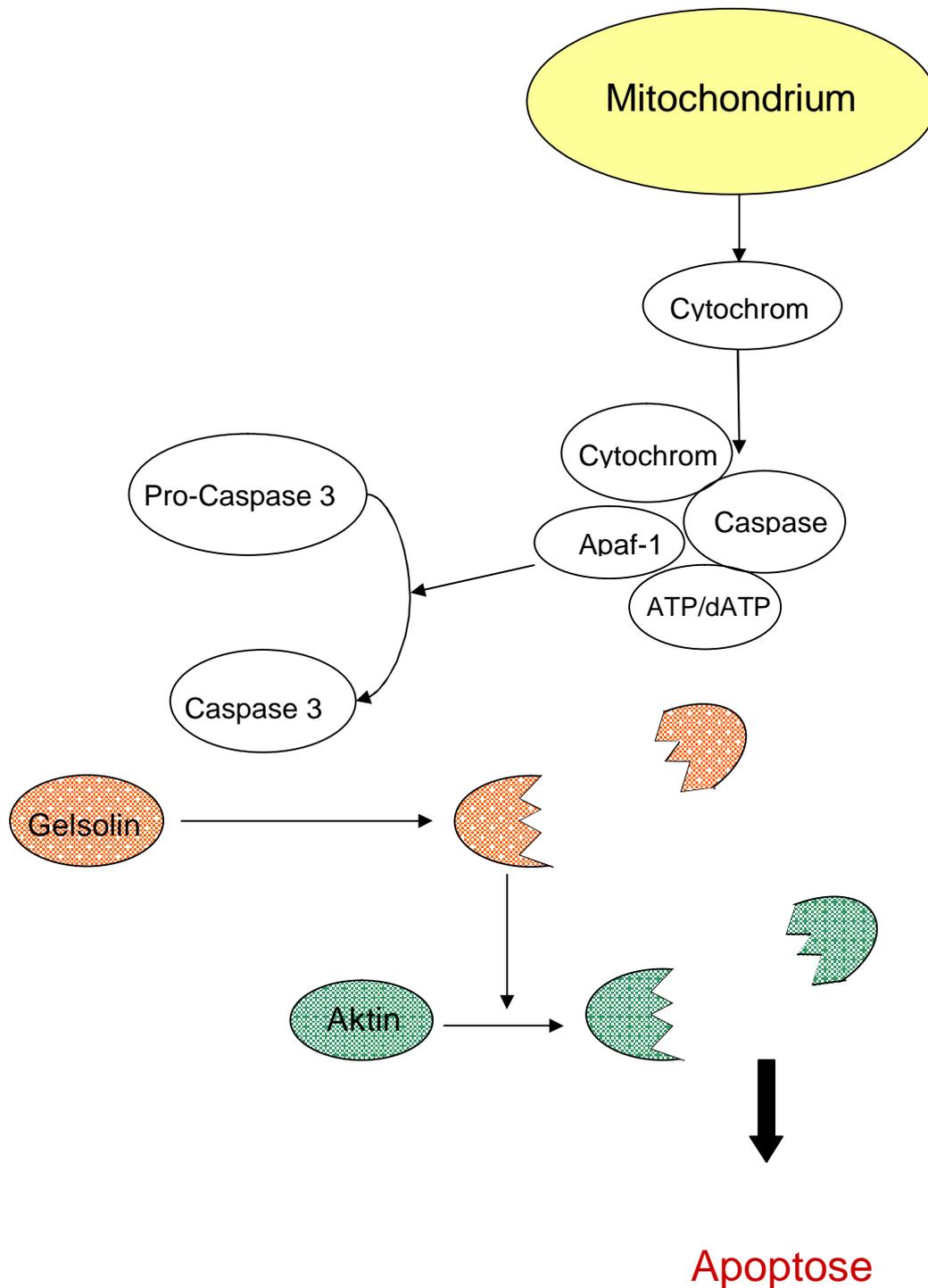
### 3.2.10. Western-Blotting

Der Apoptose-Weg sollte auf eine zweite unabhängige Art und Weise nachgewiesen werden. Dies sollte mittels Western Blotting gegen ein typisches Apoptose-Molekül erfolgen. Eine Hauptrolle im Apoptose-Weg spielen die so genannten Caspasen, bei denen es sich um Proteasen handelt. Ein lohnender Kandidat stellte die Caspase 3 dar, eine Aspartat-spezifische Cysteinyl-Protease, welche in der Apoptose-Kaskade relativ früh zum Tragen kommt.

In Abbildung 10 ist ein typischer Apoptose-Weg, bei dem Caspase 3 eine Rolle spielt, vereinfacht dargestellt. Die inaktive Pro-Caspase3 wird nach intrazellulären Signalen ausgehend von den Mitochondrien über Cytochrom C gespalten, wobei die aktive Form der Caspase 3 entsteht. Diese aktiviert dann wiederum eine weiterführende Spaltungskaskade, bis hin zum Abbau des Zell-Skelettes, was zum Tod der Zelle führt.

Für den Test wurden Zellen der Zelllinie Molt 4/8 und frisch isolierte ALL-Zellen eines Patienten eingesetzt. Die Absolutzahl von  $\sim 20 \times 10^6$  Zellen wurde für die Protein-Präparation für Westernblot-Analysen eingesetzt. Zuvor wurden die Zellen für 40 h mit steigenden Treosulfan Konzentrationen bei 37°C und 5%tiger  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre inkubiert (siehe 3.2.5.). Der Gesamtproteingehalt wurde mit 100% Isopropanol präzipitiert (Phenol-Ethanol-Fällung) und in 1% SDS gelöst. Die Proteine wurden auf Laemmli Gele aufgetragen (40  $\mu\text{g}$  pro Spur), aufgetrennt und mittels Elektrobloetter auf Nitrozellulose Filter (Protrans; Schleicher & Schuell) überführt. Die Blots wurden über Nacht bei 4°C geblockt und für 2 h bei Raumtemperatur mit einem IgG-Antikörper (Rabbit), welcher gegen Caspase-3 gerichtet war (1:100 Verdünnung in Blockingpuffer) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg, Deutschland), inkubiert. Der Nachweis der

immunreaktiven Peptide erfolgte mittels Chemilumineszens durch Exposition auf Röntgenfilmen. Gleichmäßige Beladung des Gels wurde durch den Einsatz von  $\alpha$ -Tubulin (Santa Cruz Biotechnology Europe, Heidelberg, Germany) verifiziert.



**Abbildung 10: Apoptose-Kaskade.** Intrazelluläre Signale über den Cytochrom C-Weg führt zur Aktivierung von Pro-Caspase 3 zu Caspase 3. Dies führt zur Spaltung von Gelsolin, dessen Spaltprodukt zum Abbau von Aktin und damit zum Abbau des Zytoskeletts der Zelle führt.

### **3.2.11. *In vivo* Untersuchungen - Untersuchung der Immunrekonstitution**

Treosulfan ist bisher nicht Bestandteil der Konditionierungsprotokolle in der Pädiatrie. Ein Patient der Frankfurter Uniklinik wurde aufgrund hoher Zytotoxizitäten in der Vorbehandlung vor allogener KM-Transplantation mit Treosulfan konditioniert. Die Immunrekonstitution des Patienten nach Transplantation sollte mit der Rekonstitution bei Patienten, die mit Busulfan konditioniert wurden, verglichen werden.

#### **3.2.11.1. Einschlusskriterien der Patienten**

Als Einschlusskriterien der Patienten galt eine Erkrankung an AML mit mindestens erstem Rezidiv, die zur Transplantation mit allogenen Knochenmark vorgesehen waren. Die Patienten wurden zum einen mit Busulfan, Cyclophosphamid und Melphalan (n=8) und zum anderen mit Treosulfan, Melphalan und Thiothepa (n=1) konditioniert. Der Treosulfan-konditionierte Patient und 6 der 8 Busulfan-konditionierten Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Transplantation in Remission (CR2/CR3). Ein weiteres Kriterium war die anschließende Überwachung der Immunrekonstitution mittels der Erfassung der Immunstati für 14-15 Monate nach Transplantation.

#### **3.2.11.2. Messung der Immunstati**

Die Erhebung von Immunstati wird routinemäßig im Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapien im Frankfurter Universitätsklinikum durchgeführt. Dabei werden die Lymphozytensubpopulationen wie zytotoxische T-Zellen, T-Helfer-Zellen, NK-Zellen, NK-T-Zellen, B-Zellen und deren Aktivierungszustände durchflusszytometrisch bestimmt.

Dazu wurden 100 µl Proben peripheren Blutes (PB) mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern (Tabelle 10) inkubiert und in einem No-Wash-Verfahren automatisch mittels TQ-PREP (Beckman Coulter) lysiert. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Immunstati (T-, B-, NK-Zellen und Untergruppen) mittels dualer Plattform an einem 4-Farb-Durchflusszytometer XL-MCL (Beckman Coulter), einem 5-Farb Durchflusszytometer CYTOMIX FC-500 (Beckman Coulter) und einem elektronischen Zählgerät (SLS, Beckman Coulter). Zur Beurteilung einer Population wurden mindestens 500 Events

aufgenommen. Bei Proben in der frühen Phase der Immunrekonstitution mit WBC-Zahlen unter 100/ $\mu$ l wurden 200-400  $\mu$ l PB Blut zur Analyse eingesetzt.

Die Spezifität der verwendeten Antikörper finden sich im Anhang der Arbeit.

**Tabelle 9:** Durchflusszytometrische Panels zur Bestimmung der Immunrekonstitution (CD-Nomenklatur siehe Anhang)

FITC	PE	ECD	PC5	PC7	Lyse
<b>4-Farb-Panels</b>					
CD45	CD4	CD8	CD3	-	Immunoprep
CD45	CD56	CD19	CD3	-	Immunoprep
IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	-	Immunoprep
HLA-DR	CD69	CD3	CD4	-	Immunoprep
HLA-DR	CD69	CD3	CD8	-	Immunoprep
CD45RA	CD45RO	CD3	CD4	-	Immunoprep
CD45RA	CD28	CD3	CD8	-	Immunoprep
-	CD45RO	CD3	CD8	-	Immunoprep
-	CD25	CD3	CD4	-	Immunoprep
CD45	CD14	-	-	-	Immunoprep
<b>5-Farb-Panels</b>					
CD45	CD4	CD8	CD3	CD14	Immunoprep
CD45	CD56	CD19	CD3	CD16	Immunoprep
IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	Immunoprep
HLA-DR	CD69	CD3	CD4	CD8	Immunoprep
CD45RA	CD45RO	CD3	CD28	CD8	Immunoprep
CD45RA	CD45RO	CD3	CD62L	CD4	Immunoprep
CD62L	CD127	CD3	CD25	CD4	Immunoprep

FITC: Fluorescein-Isothiocyanat

PE: Phycoerythrin

ECD: Phycoerythrin-Texas Red

PC5: Phycoerythrin-Cyanin 5.1

PC7: Phycoerythrin-Cyanin 5.3

### 3.2.12. Median-Effekt-Analysen

Um synergistische und antagonistische Effekte zwischen Treosulfan oder Busulfan und Fludarabin zu untersuchen wurden Median-Effekt Analysen nach Chou und Talalay (Chou und Talalay 1984, Chou 1988) durchgeführt. Mit dieser Methode können Dosis-Effekt Verhältnisse in zellulären Systemen untersucht werden. Die Methode zur Untersuchung der Zytostatika-Interaktion ist in Kapitel 3.2.9. dargestellt. Die so generierten Messwerte

wurden mit Hilfe des Computerprogramms CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, Großbritannien), basierend auf Median-Effekt-Analysen, ausgewertet. Die Median-Effekt-Analyse basiert auf dem Masse-Wirkungs-Gesetz und korreliert die Zytostatika-Konzentration und die Zytotoxizität mit folgender Formel:

$$f_a/f_u = (D/D_m)^m$$

D = Zytostatika-Konzentration

D<sub>m</sub> = Median-Effekt-Dosis

f<sub>a</sub> = fraction affected durch die Dosis D

f<sub>u</sub> = fraction unaffected durch die Dosis D

m = Koeffizient, der die Sigmoidität der Dosis –Effekt-Kurve anzeigt

Die f-Werte für jede Zytostatika-Konzentration und für jede Kombination von Zytostatika wurden in das Computerprogramm eingegeben. Das Programm berechnet dann D<sub>x</sub>, d.h. die Zytostatika-Konzentration, die „x“% der Zellen inhibiert.

Damit kann der CI mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}$$

Ein CI < 1 entspricht dabei Synergismus, CI = 1 entspricht einer additiven Wirkung und CI > 1 Antagonismus.

### 3.2.13. Statistik und Auswertung

Graphen wurden mittels GraphPadPrism Version 4-00 für Windows (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) erstellt. IC<sub>50</sub> Werte wurden durch Auftragung der Zytotoxizität gegen die verwendete Zytostatika-Konzentration ermittelt.

Zur Überprüfung der Signifikanz der erhobenen Daten wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet. Mit diesem parameterfreien statistischen Test wurden die Mediane zweier Stichproben verglichen

## 4. Ergebnisse

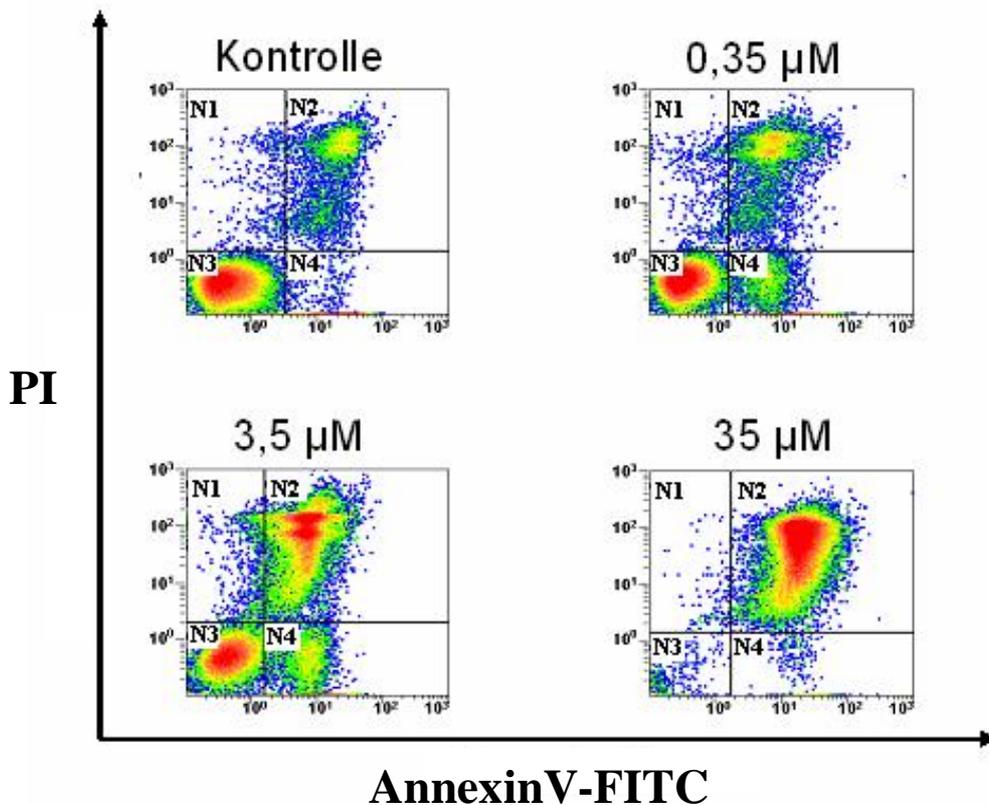
### 4.1. Untersuchungen an Zelllinien

#### 4.1.1. Korrelation zwischen dem MTT-Assay und einem optimierten durchflusszytometrischen Assay zur Bestimmung von Zytostatika-Toxizitäten

Der MTT-Test ist hervorragend für die Arbeit an Zellkulturen geeignet, da die Zellen gut synchronisiert werden können. Außerdem kann in Kultur genügend Zellmaterial produziert werden, um Zytotoxizitätstests in ausreichender Anzahl zu gewährleisten. Dabei kann mit dem MTT-Assay allein die Zytotoxizität einer Substanz auf die gesamte Zellpopulation in einem Ansatz gemessen werden, aber eine Differenzierung zwischen verschiedenen Zellpopulationen ist nicht möglich. Diese Unterscheidung ist jedoch zur Bestimmung der Zytotoxizität auf frisch isolierte Zellen aus Patienten erforderlich, da sich in den Proben sowohl Leukämiezellen als auch nicht maligne Zellen befinden (Zimmermann et al. 2005). Der Prozentsatz der leukämischen Zellen in den 24 im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben pädiatrischer Patienten lag zwischen 41% und 98%, was eine Differenzierung zwischen malignen und nicht malignen Zellen nötig machte. Aus diesem Grund sollte auf der Basis des multiparametrischen durchflusszytometrischen Assays von Zimmermann et al. zunächst dieser Test so ausgebaut werden, dass eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und toten Zellen möglich war. Dazu wurden in einer Analyse zusätzlich PI und AnnexinV zu den spezifischen Leukämiemarkern, die dem jeweiligen Markerprofil der Diagnose entsprachen, eingesetzt (siehe 3.2.3. und 3.2.8.2.). So konnte im Rahmen dieser Arbeit der durchflusszytometrische Assay optimiert werden und erlaubte die Differenzierung zwischen malignen und nicht malignen Zellen mit der jeweiligen Unterscheidung zwischen Zellen in der frühen bzw. späten Apoptose und toten Zellen. Diese durchflusszytometrische 5-Farb-Analyse erforderte hohe Ansprüche an die Kompensation und die Gatingstrategie innerhalb der Analyse, wie in Abbildung 9 (siehe 3.2.8.2.) beschrieben. Bevor dieser Test bei Patientenproben angewandt wurde, sollte er an den Leukämie-Zelllinien Molt 4/8 und H9 getestet werden, um die Vergleichbarkeit mit dem MTT-Assay abzusichern.

In Abbildung 11 ist exemplarisch ein Experiment mit der Zelllinie Molt 4/8 dargestellt, in dem die Zellen mit drei ausgewählten Konzentrationen Treosulfan, bzw. ohne Treosulfan

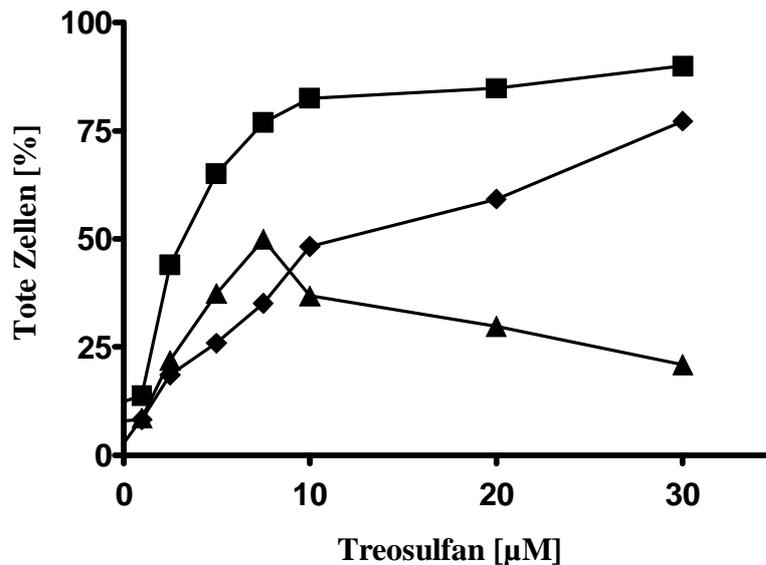
inkubiert wurden und durchflusszytometrisch der Anteil toter und apoptotischer Zellen bestimmt wurde.



**Abbildung 11: Durchflusszytometrische Plots von apoptotischen und toten Zellen nach Treosulfan-Inkubation.** Molt 4/8 Zellen wurden für 72 h inkubiert ohne (Kontrolle) bzw. mit ansteigenden Konzentrationen Treosulfan (siehe Kapitel 3.2.5.1. und 3.2.8.). Zytotoxizität wurde mittels AnnexinV und PI durchflusszytometrisch gemessen. N1: Tote Zellen (PI<sup>+</sup>/AnnexinV<sup>-</sup>) N2: Zellen im späten Stadium der Apoptose (PI<sup>+</sup>/AnnexinV<sup>+</sup>) N3: lebende Zellen (PI<sup>-</sup>/AnnexinV<sup>-</sup>) N4: Zellen im frühen Stadium der Apoptose (PI<sup>-</sup>/AnnexinV<sup>+</sup>). Mit steigender Treosulfan Konzentration kommt es zu einer Verschiebung der Zellen von Quadrant N3 (lebend) über N4 (Apoptose) zu N2 (tot).

Wie in Abbildung 11 dargestellt, ließen sich über 95% der Zellen in der unbehandelten Kontrolle weder mit dem Todfarbstoff PI noch mit dem Apoptose-Marker AnnexinV anfärben, sie lagen im Quadranten N3. Mit steigender Treosulfan Konzentration kam es zu einer Verschiebung der Zellen in den Quadranten N4, die Zellen gingen in ein frühes Stadium der Apoptose über, sie waren AnnexinV<sup>+</sup>, aber noch PI<sup>-</sup>. Mit Voranschreiten der Apoptose durch ansteigende Treosulfan-Konzentrationen wanderten die Zellen in den Quadranten N2, sie waren PI<sup>+</sup> Annexin<sup>+</sup> doppelt positiv und befanden sich im späten Stadium der Apoptose. Bei noch höheren Treosulfan-Konzentrationen war schließlich auch ein Shift von Quadrant N2 zu N1 zu beobachten. Mit Hilfe der Formel 1 aus dem Abschnitt 3.2.8. wurde die Zytotoxizität für die eingesetzte Konzentration an Zytostatika bestimmt.

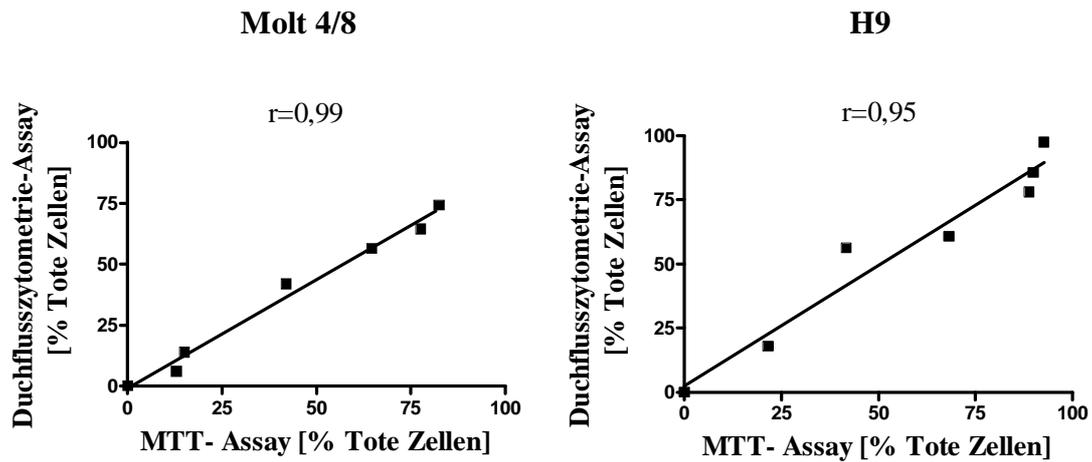
Abbildung 12 verdeutlicht, dass der Prozess der Zytotoxizität über den apoptotischen Weg abläuft. So nimmt zunächst bei niedrigen Treosulfan-Konzentrationen der Anteil der Zellen in der frühen Apoptose deutlich zu, während bei hohen Konzentrationen der Anteil an PI<sup>+</sup> AnnexinV<sup>+</sup> toten Zellen ansteigt.



**Abbildung 12: Unterscheidung von apoptotischen und toten Zellen mittels AnnexinV und PI Färbung.** Zellen in einer frühen und späten Phase des Zelltodes während der Inkubation von Molt 4/8 Zellen mit steigenden Treosulfan-Konzentrationen für 72 h (siehe Kapitel 3.2.5.1. und 3.2.8.) gemessen mittels 5-Farb-Durchflusszytometrie. - ▲ - AnnexinV<sup>+</sup> PI<sup>-</sup> Zellen (Zellen in früher Apoptose) - ◆ - PI<sup>+</sup> AnnexinV<sup>+</sup> Zellen (tote Zellen) - ■ - ∑ Summe der apoptotischen und toten Zellen (Rohdaten siehe Anhang).

Im Folgenden wurde für die Zelllinien Molt 4/8 und H9 eine Korrelation zwischen MTT-Assay und durchflusszytometrischen Assay aufgestellt. Dazu wurde mit beiden Methoden der Anteil toter Zellen nach Inkubation mit ansteigenden Treosulfan-Konzentrationen ermittelt.

In Abbildung 13 ist die Korrelation beider Assays graphisch dargestellt. Es konnte ein Korrelations-Koeffizient von  $r=0,99$  für Molt4/8 und von  $r=0,95$  für H9 ermittelt werden.



**Abbildung 13: Vergleich des durchflusszytometrischen Assay mit dem MTT-Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität von Treosulfan gegenüber Leukämie-Zelllinien.** Die Zellen der Zelllinien Molt4/8 und H9 wurden nach der Anzucht in frischem Medium auf 12,5 ml Kulturflaschen verteilt und ansteigende Treosulfan-Konzentrationen hinzugegeben. Nach 72-stündiger Inkubation wurde der prozentuale Anteil toter Zellen aus ein und derselben Probe sowohl mit dem MTT-Assay als auch mit dem durchflusszytometrischen Assay bestimmt und gegeneinander aufgetragen. Treosulfan-Konzentrationen an den einzelnen Messpunkten:

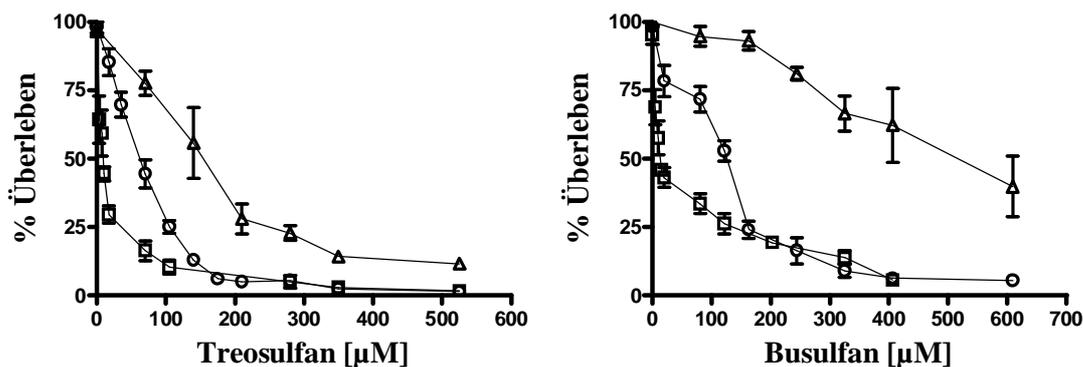
Molt 4/8: 0; 1,75; 3,5; 7,0; 10,5; 17,5 und 35,0  $\mu\text{M}$

H9: 0; 17,5; 35,0; 70,0; 105,0; 140,0 und 175  $\mu\text{M}$ .

#### 4.1.2. Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Leukämie-Zelllinien

Nachdem zwei voneinander unabhängige Testsysteme etabliert wurden, sollten in ersten Versuchen Leukämie-Zelllinien hinsichtlich der Zytotoxizität auf Treosulfan im Vergleich zu Busulfan untersucht werden. Dazu wurden drei im Labor etablierte Zelllinien ausgewählt, H9 und Molt 4/8 als Vertreter der lymphatischen Zellreihe und K562 als Vertreter der myeloischen Zellreihe (Abbildung 14).

In Abbildung 14 sind die Verläufe der Konzentrationsreihen graphisch dargestellt. In Tabelle 10 sind die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte mit Standardabweichungen für beide Zytostatika angegeben.



**Abbildung 14: Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Leukämie-Zelllinien.** Die Zellen aller drei Zelllinien wurden nach der Anzucht in frischem Medium (siehe 3.2.5.1.) auf 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen verteilt und ansteigende Konzentrationen von Treosulfan bzw. Busulfan hinzugegeben. Nach 72-stündiger Inkubation erfolgte die Messung mittels MTT-Assay und/oder durchflusszytometrischem Assay. Es sind Mediane aus 3 Einzelexperimenten dargestellt.

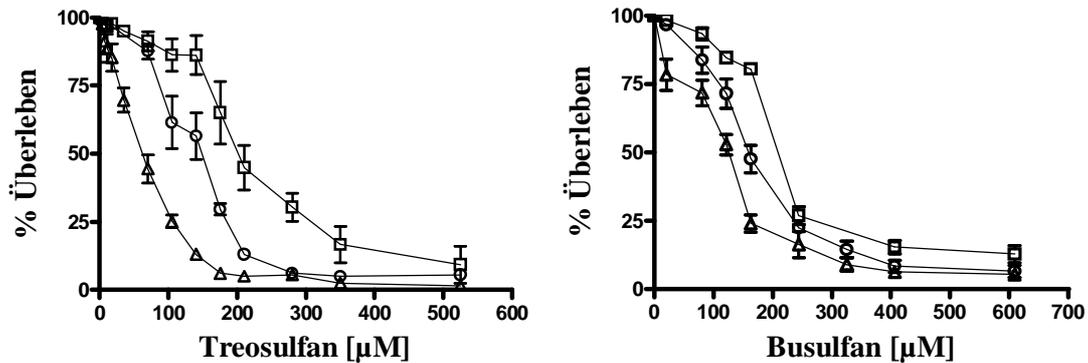
-□- Molt      -○- H9      -△- K562.

**Tabelle 10:** Zusammenfassung der medianen  $IC_{50}$ -Werte mit Standardabweichungen für Treosulfan und Busulfan auf Leukämie-Zelllinien.

Material	Typ	$IC_{50}$ Treosulfan [µM]	$IC_{50}$ Busulfan [µM]
H9	T-ALL	55,0 ± 8,8	122,0 ± 5,4
Molt 4/8	T-ALL	9,8 ± 2,7	15,7 ± 2,1
K562	CML	147,0 ± 22,3	540 ± 29,9

Trotz der starken Ähnlichkeit beider Substanzen auf Molekülebene zeigt Treosulfan eine 2-4-fach höhere Effektivität auf Leukämie-Zelllinien gegenüber Busulfan.

Zusätzlich wurde die Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Leukämie-Zelllinien zeitabhängig untersucht. (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber der Zelllinie H9.** Die Zellen der Zelllinie H9 wurden nach der Anzucht in frischem Medium (siehe 3.2.5.1.) auf 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen verteilt und ansteigende Konzentrationen von Treosulfan bzw. Busulfan hinzugegeben. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation wurden Proben zur Analyse mittels MTT oder durchflusszytometrischem Assay entnommen. Die Ergebnisse sind exemplarisch für die Zelllinie H9 dargestellt

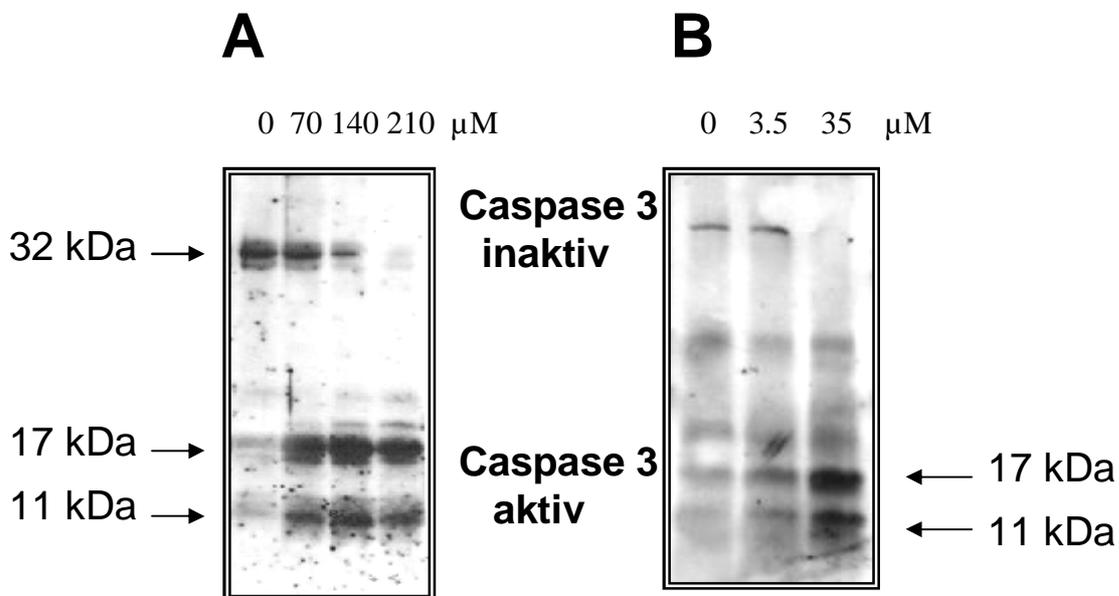
-□- 24 h      -○- 48 h      -△- 72 h.

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass Treosulfan und Busulfan zeitabhängig wirken. Treosulfan zeigt dabei eine scheinbar stärkere Zeitabhängigkeit.

### 4.1.3. Apoptoseinduktion durch Treosulfan

Die durchflusszytometrischen Bestimmungen zeigten, dass eine Zytotoxizität von Treosulfan über Apoptose eingeleitet wird. Dies sollte im Folgenden molekular-biologisch mittels Western Blotting gegen das Apoptose-Molekül Caspase 3 überprüft werden. Zum Nachweis der Caspase 3 wurden Zellen der Zelllinie Molt 4/8 und Zellen eines an ALL erkrankten Patienten für 40 h mit ansteigenden Treosulfan-Konzentrationen parallel zu einer unbehandelten Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde mit den Protein-Präparationen der Nachweis auf Caspase 3 mittels Western Blotting durchgeführt (siehe 3.2.10.).

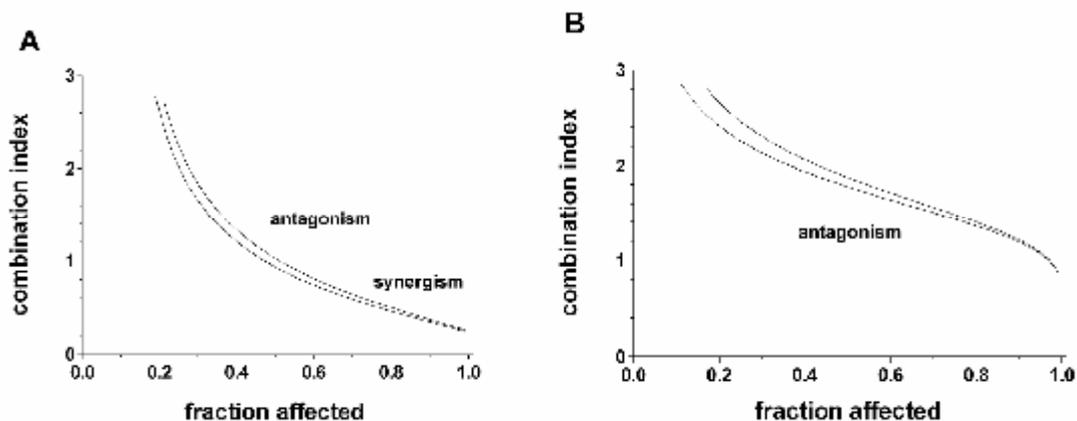
Schon niedrige Treosulfan-Konzentrationen reichten aus, um eine erhöhte Produktion der inaktiven Pro-Caspase 3 (32 kDa) auszulösen (Abbildung 16). Diese wurde mit ansteigenden Konzentrationen zur aktiven Form gespalten (Spaltungsprodukte mit 17 bzw. 11 kDa), deren Anteil stetig zunahm. Im gleichen Maße verschwand die inaktive Form, sie wurde „aufgebraucht“.



**Abbildung 16: Induktion der Apoptose durch Treosulfan.** Molt 4/8 (A) und leukämische Zellen eines pädiatrischen Patienten (ALL) (B) wurden ohne und mit ansteigenden Konzentrationen Treosulfan für 40 h inkubiert. Pro-Caspase 3 (32 kDa) und deren aktiven Spaltprodukte (17 und 11kDa) wurden mittels Chemilumineszenz-Nachweis (siehe 3.2.10.) visualisiert.

#### 4.1.4. Interaktion von Treosulfan und Busulfan mit Fludarabin bei Molt 4/8 Zellen

Als nächstes sollte der Effekt des kombinierten Einsatzes von Treosulfan vergleichend zu Busulfan mit dem Peptidanalogen Fludarabin untersucht werden. Dazu wurde die Zelllinie Molt 4/8 mit ansteigenden Treosulfan- (0-50  $\mu\text{M}$ ; Abbildung 17A) bzw. Busulfan-Konzentration (0-50  $\mu\text{M}$ ; Abbildung 17B) kombiniert mit jeweils 2,5; 6,25 oder 12,5  $\mu\text{M}$  Fludarabin. Anschließend erfolgte eine Auswertung der Messdaten mittels computergestützter Median-Effekt-Analyse (siehe 3.2.12.) Bei einer Kombination von Fludarabin mit einer Busulfan konnte kein additiver oder gar ein synergistischer Effekt nachgewiesen werden, es ergab sich immer ein Antagonismus. Hingegen konnte für Treosulfan-Konzentration größer 1  $\mu\text{M}$  für die Kombination mit 2,5; 6,25 und 12,5  $\mu\text{M}$  Fludarabinein ein deutlicher Synergismus nachgewiesen werden. Bei niedrigeren Treosulfan-Konzentrationen kehrte sich der Synergismus zu Antagonismus. Die Konzentrationsbereiche, in denen Treosulfan und Fludarabin synergistisch wirken, sind bedeutend in der Hochdosis-Chemotherapie.

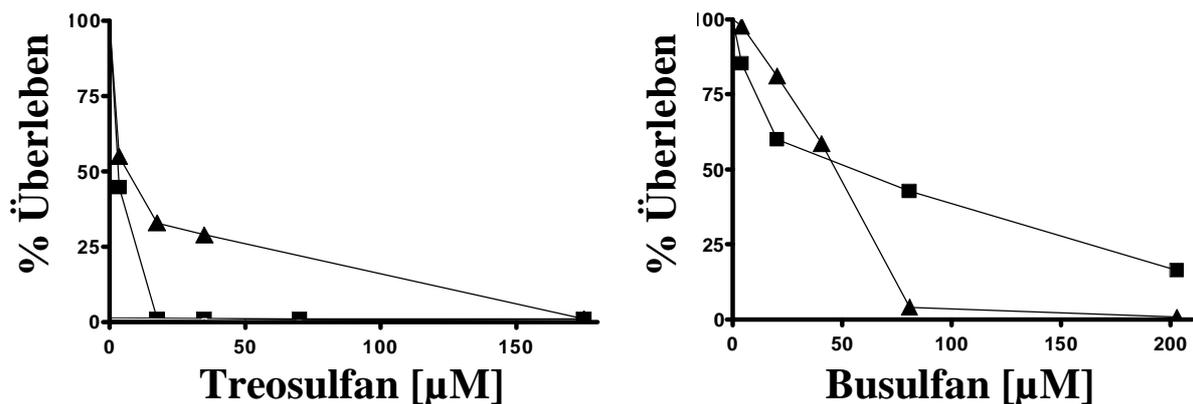


**Abbildung 17: Interaktion von Treosulfan bzw. Busulfan mit Fludarabin.** Molt4/8 Zellen wurden für 72 h mit Treosulfan (A) oder Busulfan (B) alleine (0  $\mu\text{M}$  – 50  $\mu\text{M}$ ) und in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen Fludarabin (2,5; 6,25 und 12,5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Zytotoxizität wurde mittels durchflusszytometrischem Assay bestimmt. Combination Index plots wurden durch Median-Effekt-Analysen mittels mutually non-exclusive isobologram equation (obere Kurven) und mutually exclusive isobologram equation (untere Kurven) erstellt. Ein Kombinationsindex größer 1 kennzeichnet Antagonismus, kleiner 1 Synergismus (siehe 3.2.12.)

#### 4.1.5. Untersuchung der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber Neuroblastom-Zelllinien

Im Vergleich zu den Untersuchungen an leukämischen Zelllinien sollte in Ergänzung die Wirkung von Treosulfan und Busulfan gegenüber soliden Tumoren des Kindesalters untersucht werden. Exemplarisch wurde dafür das Neuroblastom gewählt, da die Prognose bei der Behandlung dieses Tumors nach wie vor nicht zufriedenstellend waren (Simon et al. 2007, Sung et al. 2007) und die Suche nach Zytostatika, auf die Neuroblastomzellen sensitiv reagieren, ein wichtiges Ziel darstellt.

Aus diesem Grund wurden die etablierten Neuroblastom-Zelllinien UKF-NB3 und SH-SY5Y ausgewählt. Nach Inkubation der Zellen mit ansteigenden Konzentrationen Treosulfan bzw. Busulfan wurde die Zytotoxizität mittels MTT-Assay (Abbildung 18) bestimmt.



**Abbildung 18: Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Neuroblastom-Zelllinien.** Die Zellen der Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y und UKF-NB3 wurden nach der Anzucht in frischem Medium (siehe 3.2.5.1.) auf 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen verteilt und ansteigende Konzentrationen von Treosulfan bzw. Busulfan hinzugegeben. Nach 72 h Inkubation wurden Proben zur Analyse mittels MTT entnommen. (Einzelbestimmung).

- ▲ - SH-SY5Y      - ■ - UKF-NB3

Wie in Abbildung 18 zu erkennen, zeigt Treosulfan auch bei den Neuroblastom-Zelllinien eine bessere Wirksamkeit als Busulfan. Es ergaben sich IC<sub>50</sub> Werte für Treosulfan die ca. 20-30 fach niedriger lagen als die, die für Busulfan benötigt wurden (Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Zusammenfassung der  $IC_{50}$ -Werte für Treosulfan auf die Tumor-Zelllinien SH-SY5Y und UKF-NB3.

<b>Material</b>	<b><math>IC_{50}</math> Treosulfan [<math>\mu</math>M]</b>	<b><math>IC_{50}</math> Busulfan [<math>\mu</math>M]</b>
SH-SY5Y	3,5	50
UKF-NB3	2	60

Diese Experimente konnten nur in sehr eingeschränktem Maße durchgeführt werden, da sich die Adhärenz der Zellen und die daraus resultierenden Maßnahmen störend auf die Messung der Zytotoxizität auswirkten (siehe Diskussion).

## 4.2. Untersuchungen an Zellen gesunder Spender

### 4.2.1. Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf Subpopulationen von Lymphozyten und auf hämatopoetische Stammzellen

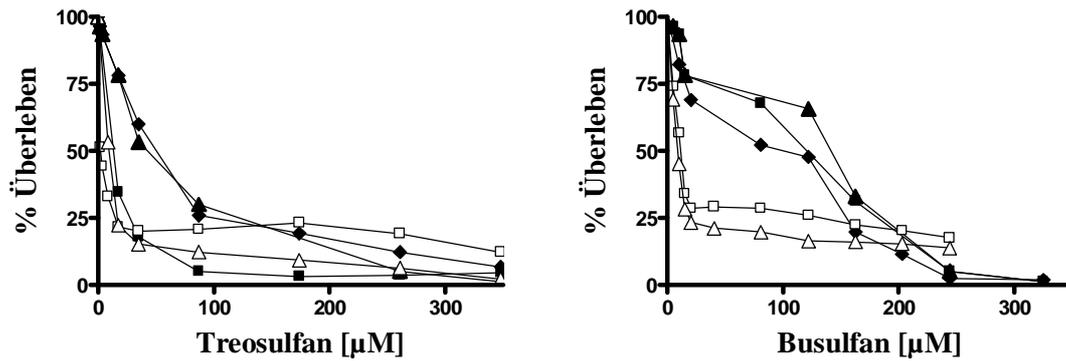
Bei der konventionellen Chemotherapie sind toxische Wirkungen auf das Blut und das blutbildende System ein limitierender Faktor, im Vergleich dazu soll in der Hochdosis-Chemotherapie vor allem die Depletion der Stammzellen gewährleistet werden. Aus diesem Grund war es interessant, die Wirkung von Treosulfan auf Subpopulationen gesunder Lymphozyten sowie auf hämatopoetische Stammzellen zu untersuchen. Dafür wurden Proben gesunder Spender nach Erhalt der Enverständniserklärung verwendet.

#### 4.2.1.1. Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf normale Lymphozyten

Zur Isolation gesunder Spenderlymphozyten wurde von fünf Spendern peripheres Blut genutzt und daraus die T-Zellen (n=3) bzw. NK-Zellen (n=2) angereichert und anschließend kultiviert (siehe 3.2.5.3.). Die Anzucht erfolgte unter Verwendung von Interleukinen, was vorrangig der Kultivierung für den Testzeitraum und nicht explizit zur Stimulation der Zellen diente. Die so erhaltenen Zellen wurden mit steigenden Treosulfan- und Busulfan-Konzentrationen inkubiert und anschließend wurde die Zytotoxizität mittels durchflusszytometrischem Assay bestimmt (Tabelle 12 und Abbildung 19). Die Auswertung und Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte erfolgte wie in Kapitel 3.3. beschrieben.

**Tabelle 12:** IC<sub>50</sub>-Werte für Treosulfan und Busulfan auf aufgereinigte T- und NK-Zellen.

Material		IC <sub>50</sub> Treosulfan [μM]	IC <sub>50</sub> Busulfan [μM]
T-Zellen	Spender 1	12.3	122.0
T-Zellen	Spender 2	45.5	89.8
T-Zellen	Spender 3	49.7	144.6
NK-Zellen	Spender 4	1.8	9.0
NK-Zellen	Spender 5	4.6	12.0



**Abbildung 19: Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber Lymphozyten gesunder Spender.** Aufgereinigte T- und NK-Zellen wurden nach der Anzucht in frischem Medium (siehe 3.2.5.3.) auf 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen verteilt und ansteigende Konzentrationen von Treosulfan bzw. Busulfan hinzugegeben. Nach 72 h Inkubation wurden Proben zur Analyse mittels durchflusszytometrischem Assay entnommen.

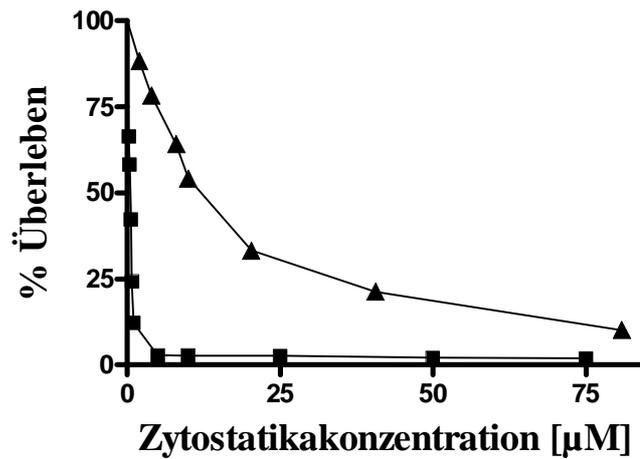
-■- T-Zellen Spender 1    -◆- T-Zellen Spender 2    -▲- T-Zellen Spender 3  
 -△- NK-Zellen Spender 4    -□- NK-Zellen Spender 5.

#### 4.2.1.2. Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf hämatopoetische Stammzellen

Die hämatopoetischen Stammzellen konnten aus einem Leukapherisat durch positive CD34<sup>+</sup>-Anreicherung mittels des CliniMACS-Systems (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) angereichert werden. Unter Zuhilfenahme eines Wachstumsfaktoren-Cocktails (siehe 3.2.5.3.) konnten die Stammzellen für die Dauer des Testes in Kultur genommen werden, um die Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber Stammzellen zu untersuchen (Tabelle 13 und Abbildung 20). Die Messung erfolgte auch hier mittels durchflusszytometrischem Assay.

**Tabelle 13: IC<sub>50</sub>-Werte für Treosulfan und Busulfan auf aufgereinigte hämatopoetischer Stammzellen.**

Material	IC <sub>50</sub> Treosulfan [µM]	IC <sub>50</sub> Busulfan [µM]
Stammzellen Spender 6	<0.4	7.3



**Abbildung 20: Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber aufgereinigter Stammzellen.** CD34<sup>+</sup> angereicherte Stammzellen wurden nach der Anzucht in frischem Medium (siehe 3.2.5.3.) auf 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen verteilt und ansteigende Konzentrationen von Treosulfan bzw. Busulfan hinzugegeben. Nach 72 h Inkubation wurden Proben zur Analyse mittels durchflusszytometrischem Assay entnommen.  
-■- Treosulfan      -▲- Busulfan.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass hämatopoetische Stammzellen und NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen sensitiver auf beide Alkylanzien reagieren und alle drei Ze—typen sensitiver auf Treosulfan als auf Busulfan reagieren.

### **4.3.Unteruchungen an Patientenmaterial**

#### **4.3.1. *In vitro* Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf frisch isolierte Leukämiezellen pädiatrischer Patienten**

Während dieser Studie konnten 24 Proben von 21 pädiatrischen Patienten mit akuten Leukämien untersucht werden. Die Diagnosestellung erfolgte in jedem Fall in der Kinderklinik der J.W. Goethe-Universität, wodurch die Markerprofile der Leukämien bekannt waren (siehe, Tabelle 7 und 3.2.3.). Dabei war es möglich, Proben eines Patienten sowohl bei Diagnose der T-ALL als auch bei auftretendem Rezidiv und während der Rezidivtherapie zu untersuchen. Bei einem zweiten Patienten konnte die Initialprobe und eine Probe am Tag 15 der Initialtherapie untersucht werden, da es sich bei diesem Kind um einen Poor-Responder handelte und somit am Tag 15 der Therapie noch zahlreiche Leukämiezellen im peripheren Blut vorhanden waren, welche den Tests unterzogen werden konnten. Bei allen 24 Proben, die mit 41-98% leukämischen Zellen einen unterschiedlichen Anteil an leukämischen Zellen enthielten, wurde durchflusszytometrisch die Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber den leukämischen Zellen für die verschiedenen Zytostatika-Konzentrationen gemessen und anschließend der IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt (Tabelle 14).

Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte zeigten unter den 24 Proben große Unterschiede sowohl für Treosulfan als auch für Busulfan für die unterschiedlichen Patienten. Die medianen IC<sub>50</sub>-Werte aller Proben lagen bei Treosulfan bei 30,6 µM und bei Busulfan bei 133 µM. Der mediane IC<sub>50</sub>-Wert steigt in den Proben von Diagnose über Progression zu Rezidiv von 11,5, zu 45,9 und zu 153,0 µM für Treosulfan und von 93,9, zu 253,8 und zu 223,3 µM für Busulfan an. Damit zeigte Treosulfan gegenüber Busulfan eine 2-8 fach höhere Zytotoxizität auf die malignen Zellen. Eine Ausnahme bildete die Busulfan:Treosulfan-Ratio mit 60,8 µM bei der Untersuchung der Zellen des reifen T-NHL (Patient 21).

**Tabelle 14:** IC<sub>50</sub>-Werte für Treosulfan und Busulfan in Leukämiezellen pädiatrischer Patienten mit akuter Leukämie

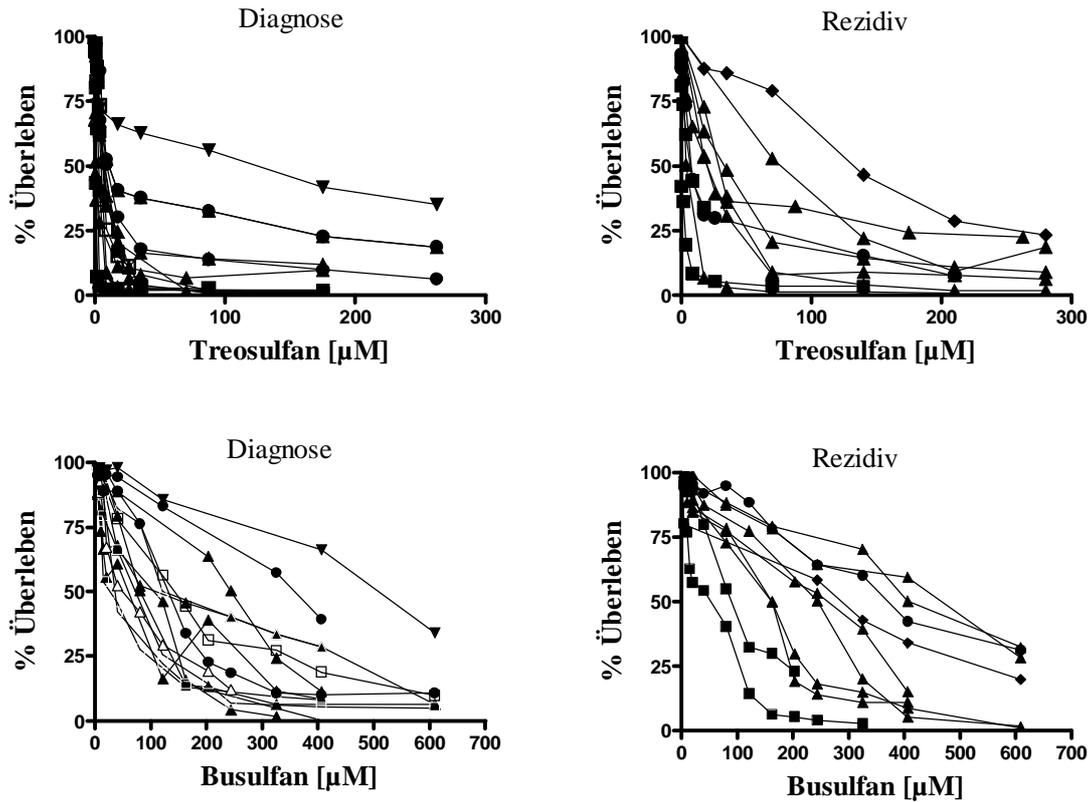
Nr.	Diagnose	Status	IC <sub>50</sub> Treo [μM]	IC <sub>50</sub> Bu [μM]	Bu:Treos Ratio	Bu/Treo Vorbe- handlung <sup>b</sup>
1	cALL	Initial	0,7	8,1	11,6	nein/nein
2	cALL	Initial	52,5	243,6	4,6	nein/nein
3	cALL	Initial	42,0	111,7	2,7	nein/nein
4	cALL	Initial	13,1	81,2	6,2	nein/nein
5	cALL	Initial	35,0	81,2	2,3	nein/nein
6	cALL	Initial	6,0	122,5	20,4	nein/nein
7	cALL	Progression <sup>c</sup>	61,3	243,6	4,0	nein/nein
8	cALL	Progression <sup>c</sup>	61,3	263,9	4,3	nein/nein
9	cALL	Rezidiv	245,0	446,6	1,8	nein/nein
10	cALL	Rezidiv	183,8	162,4	0,9	nein/nein
11	cALL	Rezidiv	122,5	162,4	1,3	nein/nein
12	cALL	Rezidiv	122,5	406,0	3,3	nein/nein
13	reife T-ALL	Initial	13,1	60,9	4,6	nein/nein
14	reife T-ALL	Initial	5,3	35,5	6,7	nein/nein
15 a	reife T-ALL	Initial	1,8	12,2	6,8	nein/nein
15 b	reife T-ALL	Rezidiv	1,8	52,8	29,3	nein/nein
15 c	reife T-ALL	Progression <sup>d</sup>	14,0	89,1	6,4	nein/nein
16	prä T-ALL	Initial	5,3	126,0	23,8	nein/nein
17	reife B-ALL	Initial	490,0	538,0	1,1	nein/nein
18	AML	Initial	9,8	140,0	14,3	nein/nein
19 a	AML	Initial	30,6	365,4	11,9	nein/nein
19 b	AML	d15 Initial-Therapie	30,6	365,4	11,9	nein/nein
20	BAL	Rezidiv	280,0	284,2	1,0	ja/nein
21	reifes T-NHL	Initial	0,7	42,6	60,8	nein/nein

<sup>a</sup> Diagnosestatus zum Untersuchungszeitpunkt

<sup>b</sup> Das Alkylanz Cyclophosphamid wurde an den Tagen 36 und 64 der Initialtherapie verabreicht

<sup>c</sup> Progression der Erkrankung während der Initialtherapie

<sup>d</sup> Progression der Erkrankung während der Rezidivtherapie

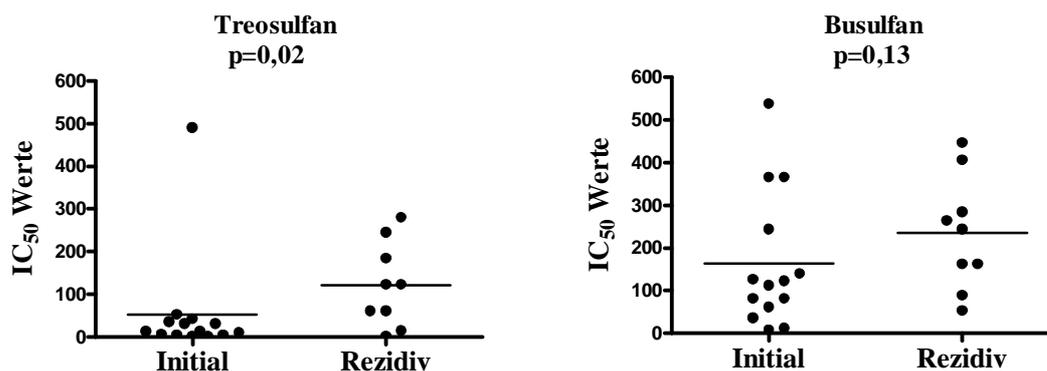


**Abbildung 21: Zytotoxizität von Treosulfan bzw. Busulfan gegen frisch isolierte Leukämiezellen pädiatrischer Patienten.**

Leukämiezellen wurden nach der Anzucht in frischem Medium (siehe 3.2.5.2.) auf 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen verteilt und ansteigende Konzentrationen von Treosulfan bzw. Busulfan hinzugegeben. 72 h Inkubation wurden Proben zur Analyse mittels durchflusszytometrischem Assay entnommen. Verglichen sind Proben von Diagnosestellung und bei auftretendem Rezidiv.

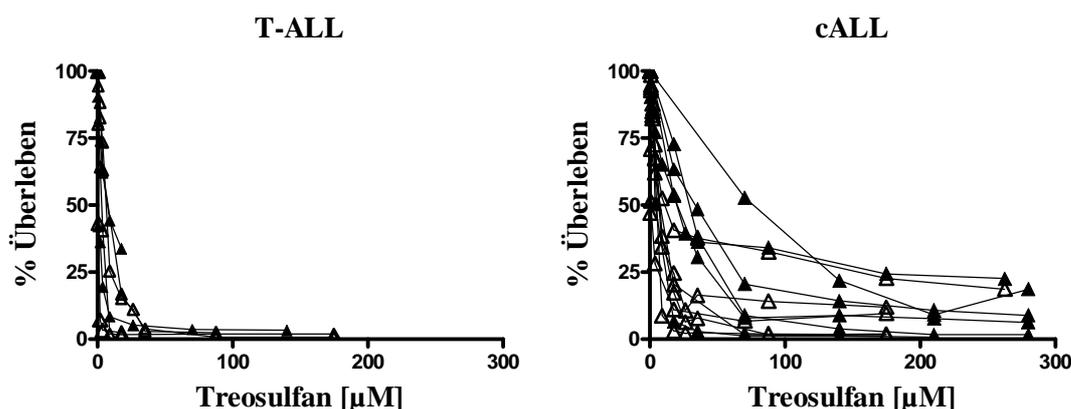
■ - reife T-ALL    ▲ - cALL    ● - AML    ▼ - reife B-ALL  
 □ - prä T-ALL    ◆ - BAL    △ - reifes T-NHL

Vergleicht man die Zytotoxizität von Busulfan und Treosulfan bei initialer Diagnose und bei Rezidiv incl. Progression, so ergibt sich bei den Proben zur Diagnosestellung eine höhere Zytotoxizität von beiden Zytostatika (Abbildung 21). Dabei ist der Unterschied der IC<sub>50</sub>-Werte zwischen Diagnosestellung und Rezidiv bei der Zytostatikabehandlung mit Treosulfan signifikant ( $p=0,02$ ). Dagegen ist der Unterschied bei Busulfan nicht signifikant ( $p=0,13$ ), wie in Abbildung 22 dargestellt.



**Abbildung 22: Vergleich der Zytotoxizität von Treosulfan bzw. Busulfan auf Leukämiezellen pädiatrischer Patienten zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten.** Leukämiezellen wurden mit steigenden Treosulfan und Busulfan Konzentrationen inkubiert. Die Zytotoxizität wurde durchflusszytometrisch untersucht und  $IC_{50}$ -Werte ermittelt (siehe Tab. 14). Mittels Mann-Whitney U-Test konnte für Treosulfan, nicht jedoch für Busulfan ein signifikanter Unterschied zwischen initialer Diagnose und Rezidiv festgestellt werden.

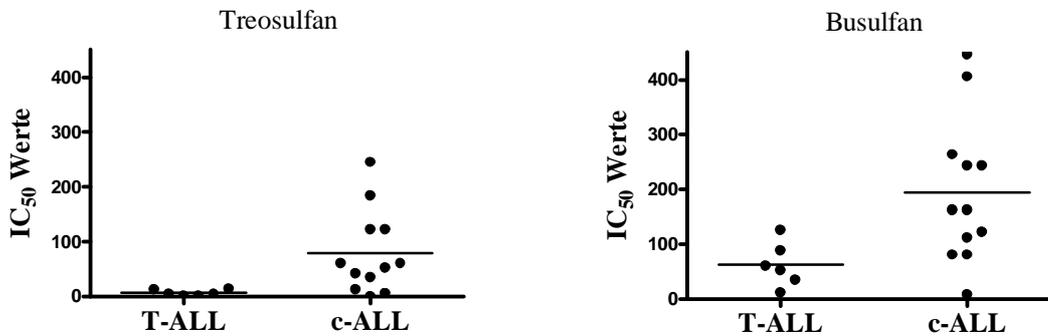
In einer weiteren Gegenüberstellung wurde deutlich, dass auch ein Unterschied der Zytotoxizität von Treosulfan bei unterschiedlichen Leukämie-Entitäten zu beobachten ist. In Abbildung 22 ist der Vergleich von untersuchten cALL- und T-ALL-Proben ungeachtet des Diagnosestatus dargestellt. Es wurde deutlich, dass die T-ALL-Proben deutlich empfindlicher auf das Zytostatikum reagierten als die cALL-Proben.



**Abbildung 23: Zytotoxizität von Treosulfan gegenüber Leukämiezellen pädiatrischer Patienten – Vergleich zwischen cALL und T-ALL.** Die wurden nach der Anzucht in frischem Medium (siehe 3.2.5.2.) auf 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen verteilt und ansteigende Konzentrationen von Treosulfan bzw. Busulfan hinzugegeben. Nach 72 h Inkubation wurden Proben zur Analyse mittels durchflusszytometrischem Assay entnommen. Vergleich zwischen cALL und T-ALL.

-△- bei Diagnosestellung      -▲- bei auftretendem Rezidiv.

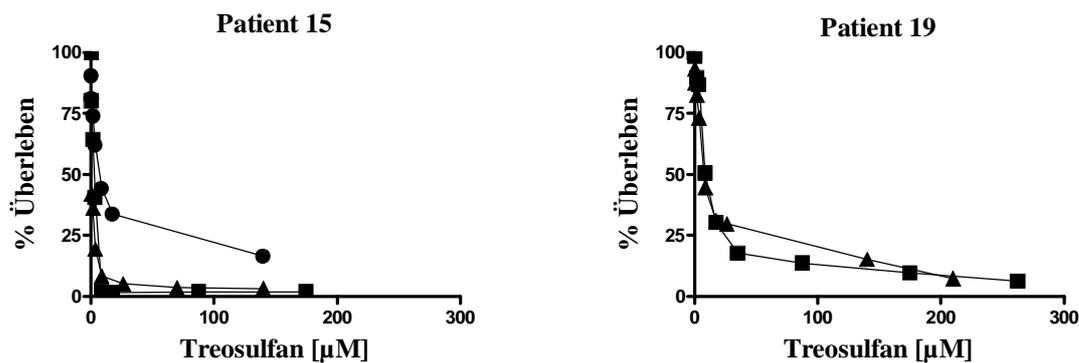
Auch diese Proben wurden hinsichtlich Signifikanz analysiert. Die unterschiedliche Wirkung auf T-ALL und cALL war sowohl für Treosulfan ( $p=0,02$ ) als auch für Busulfan ( $p=0,03$ ) signifikant (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Zytotoxizität von Treosulfan bzw. Busulfan auf Leukämiezellen pädiatrischer Patienten bei T-ALL und cALL.** Leukämiezellen wurden mit steigenden Treosulfan und Busulfan Konzentrationen für 72 h inkubiert. Die Zytotoxizität wurde durchflusszytometrisch untersucht und IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt (siehe Tab. 14). Mittels Mann-Whitney U-Test konnten für Treosulfan und Busulfan signifikante Unterschiede zwischen der Zytotoxizität auf T-ALL und cALL festgestellt werden.

Bei zwei Patienten war es möglich, mehrere Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung zu untersuchen. In Abbildung 25 wurden die graphischen Auswertungen der Untersuchungen beider Patienten dargestellt. Bei Patient 15 konnten drei Untersuchungen erfolgen zur Diagnosestellung, bei auftretendem Rezidiv und bei Blastenpersistenz während der Rezidivtherapie. Es wurde auffällig, dass während der Untersuchung zwischen der Zytotoxizität von Treosulfan gegen die Zellen bei Diagnosestellung und bei auftretendem Rezidiv kaum ein Unterschied zu verzeichnen war. Die untersuchten Zellen aus der Blastenpersistenz während der Rezidivtherapie zeigten allerdings eine deutlich niedrigere Sensitivität.

Bei Patient 19 war es möglich zwei Untersuchungen durchzuführen. Zum einen bei Diagnosestellung zum anderen am Tag 15 der Initialtherapie, da der Patient sehr schlecht auf die Therapie ansprach und somit zu diesem Zeitpunkt noch eine große Zahl an Leukämiezellen im peripheren Blut vorhanden war. Aber es zeigte sich kein auffälliger Unterschied zwischen beiden Untersuchungszeiträumen. Allerdings war auffällig, dass der Patient auf die ihm verabreichte Therapie nur sehr mäßig ansprach, während die Leukämiezellen gegenüber Treosulfan sehr sensitiv waren.



**Abbildung 25: Zytotoxizität von Treosulfan gegen Leukämiezellen jeweils eines pädiatrischen Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung.** Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch.

Patient 15, T-ALL:

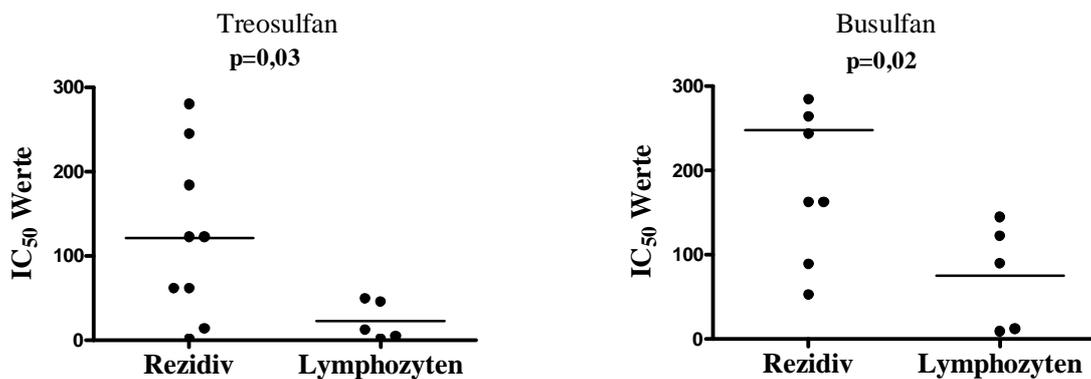
- bei Diagnosestellung
- ▲- bei auftretendem Rezidiv
- bei Blastenpersistenz während Rezidivtherapie.

Patient 19; AML:

- bei Diagnosestellung
- ▲- an Tag 15 der Initialtherapie.

### 4.3.2. Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf Leukämiezellen im Vergleich zu normalen Lymphozyten

Hier soll auf den Vergleich der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf die in dieser Arbeit untersuchten Leukämie-Proben von Patienten und normale Lymphozyten eingegangen werden. Beobachtet man die Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf normale Lymphozyten im Vergleich zu Leukämiezellen bei einem Rezidiv, so wird ein signifikanter Unterschied deutlich ( $p=0,03$  für Treosulfan und  $p=0,02$  für Busulfan) (Abbildung 26). Der Unterschied war nicht signifikant beim Vergleich der normalen Lymphozyten mit allen Leukämie-Proben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, und auch nicht im Vergleich mit den Leukämie-Proben bei Diagnose.



**Abbildung 26: Vergleich der Zytotoxizität von Treosulfan bzw. Busulfan auf leukämische Zellen pädiatrischer Patienten bei Rezidiv und auf Lymphozyten gesunder Spender.** Leukämiezellen und Lymphozyten (T- und NK-Zellen) wurden mit steigenden Treosulfan und Busulfan Konzentrationen inkubiert. Die Zytotoxizität wurde durchflusszytometrisch untersucht und IC<sub>50</sub> Werte wurden ermittelt, welche mittels Mann-Whitney U-Test analysiert wurden.

### **4.3.3. *In vivo* Immunrekonstitution nach der Konditionierung mit Treosulfan bzw. Busulfan**

Durch hohe zytotoxische Vorbehandlungen wurde ein an AML erkrankter pädiatrischer Patient der Frankfurter Universitäts-Klinik der J.W.Goehte-Universität mit dem relativ nebenwirkungsarmen Treosulfan konditioniert. Dadurch ergab sich die Möglichkeit bei diesem Patienten die Immunrekonstitution nach Treosulfan-Konditionierung im Rahmen der Routineuntersuchungen zu ermitteln und mit einer Kontrollgruppe von pädiatrischen Patienten mit AML zu vergleichen, die Busulfan erhielten (n=8). Diese 9 an AML erkrankten Kinder erlitten mindestens einmal ein Rezidiv, wovon 8 Patienten mit Busulfan/Cyclophosphamid/Melphalan behandelt wurden und ein Patient, der mit Treosulfan/Melphalan/Thiothepa-Hochdosis-Chemotherapie auf die allogene Knochenmark-Transplantation vorbereitet wurde. Der Treosulfan-konditionierte Patient und 6 der 8 Busulfan-konditionierten Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Transplantation in Remission (CR2/CR3). Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Transplantation zwischen 3-18 Jahren alt (Median 13 Jahre), der Treosulfanpatient war 13 Jahre alt. Nach der Transplantation erfolgte eine engmaschige Überwachung der Immunrekonstitution der Patienten im Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapien. Im Folgenden soll darauf für den Zeitraum von 15 Monaten nach Transplantation eingegangen werden.

#### **4.3.3.1. Vergleich der Immunrekonstitution unterschiedlicher Lymphozyten-Subpopulationen**

Im Folgenden wurde die Immunrekonstitution der unterschiedlichen Subpopulationen der Lymphozyten untersucht. Es wurde deutlich, dass die KM-Transplantation ein schnelles Anwachsen der transplantierten Zellen gewährleistete, was im raschen Vorhandensein/Ansteigen der Leukozyten (Abb. 27) ersichtlich wurde. Bei beiden Arten der Konditionierung schien die Rekonstitution der Leukozyten gleich gut/schnell zu erfolgen. Die Rekonstitution der Gesamt-CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, der CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T-Helferzellen, der CD19<sup>+</sup> B-Zellen und der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen verlief bei dem Treosulfan-konditionierten Patienten vergleichbar mit der Rekonstitution der Patienten aus der Busulfangruppe (Abbildungen 28, 30-32). Unterschiede zeigten sich in Momenten mit wenigen Messdaten, die dadurch nicht interpretierbar waren.

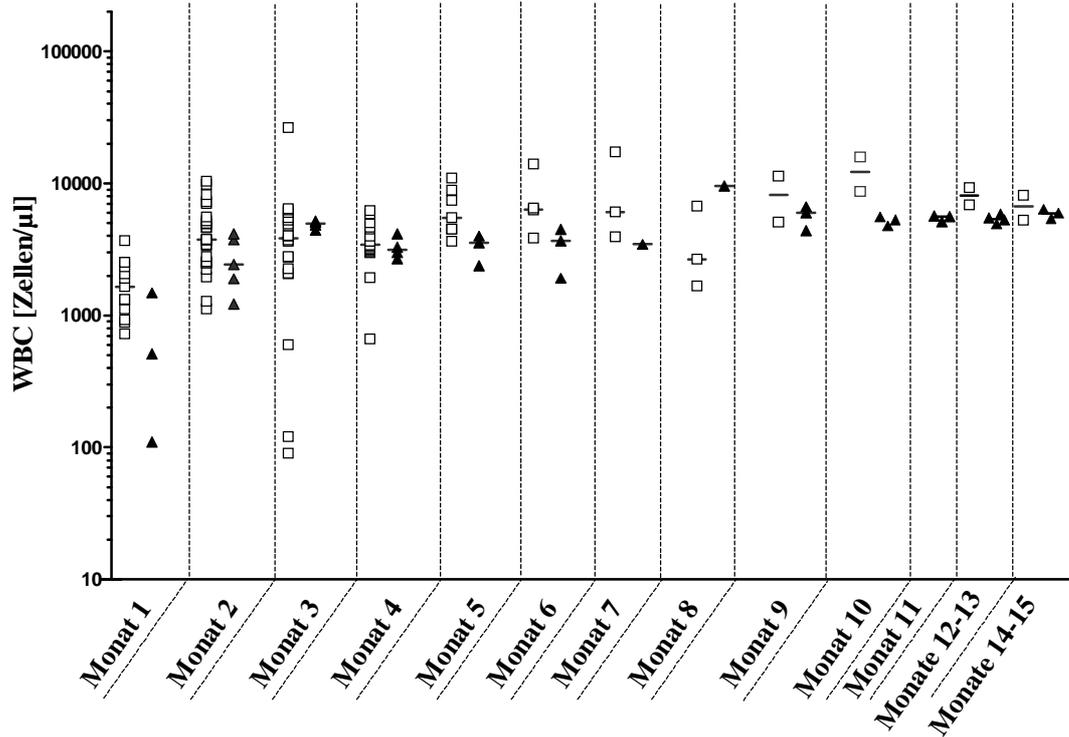


Abbildung 27: Vergleich der Immunrekonstitution der Leukozyten (WBC) nach KM-Transplantation bei pädiatrischen Patienten mit AML (n=9). ▲ Konditionierung mit Treosulfan (n=1), □ Konditionierung mit Busulfan (n=8). Angegeben sind Einzelmesswerte und Median.

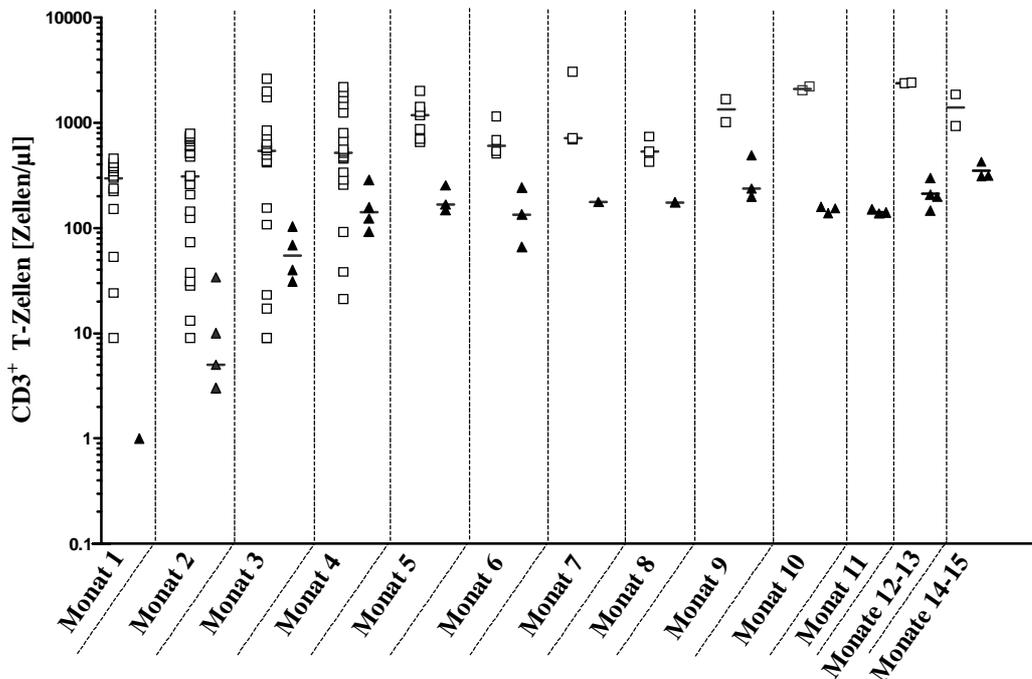


Abbildung 28: Vergleich der Immunrekonstitution der CD3<sup>+</sup> T- Zellen nach KM-Transplantation bei pädiatrischen Patienten mit AML (n=9). ▲ Konditionierung mit Treosulfan (n=1), □ Konditionierung mit Busulfan (n=8). Angegeben sind Einzelmesswerte und Median.

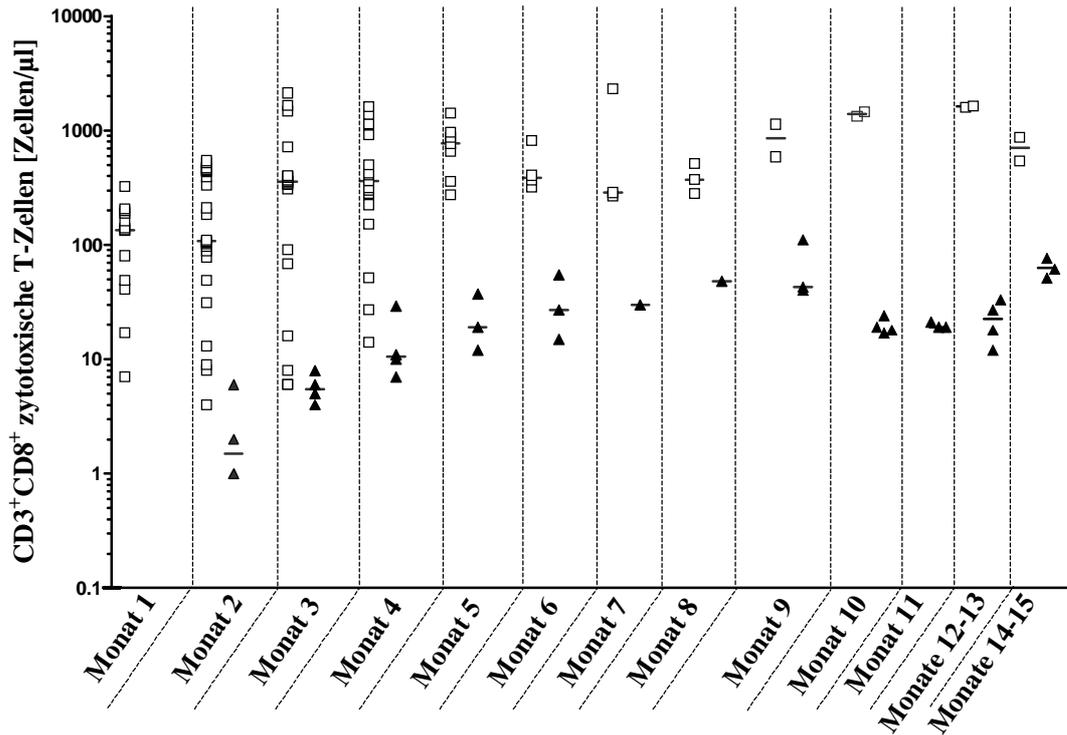


Abbildung 29: Vergleich der Immunrekonstitution der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen nach KM-Transplantation bei pädiatrischen Patienten mit AML (n=9). ▲ Konditionierung mit Treosulfan (n=1), □ Konditionierung mit Busulfan (n=8). Angegeben sind Einzelmesswerte und Median.

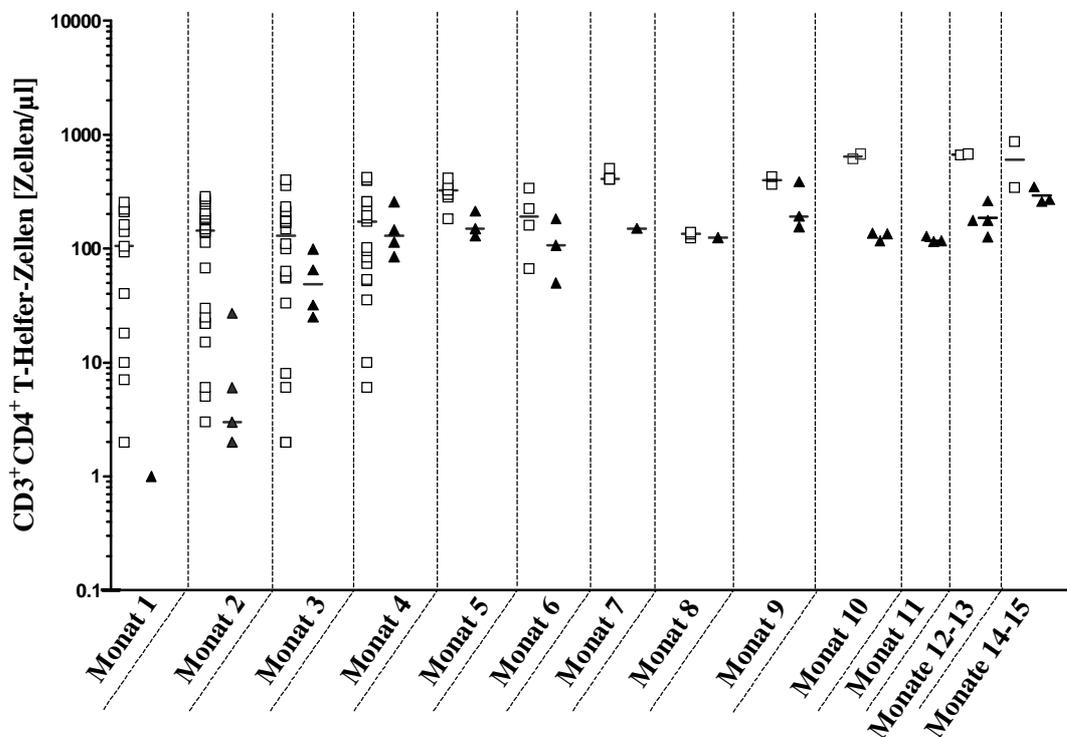


Abbildung 30: Vergleich der Immunrekonstitution der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen nach KM-Transplantation bei pädiatrischen Patienten mit AML (n=9). ▲ Konditionierung mit Treosulfan (n=1), □ Konditionierung mit Busulfan (n=8). Angegeben sind Einzelmesswerte und Median

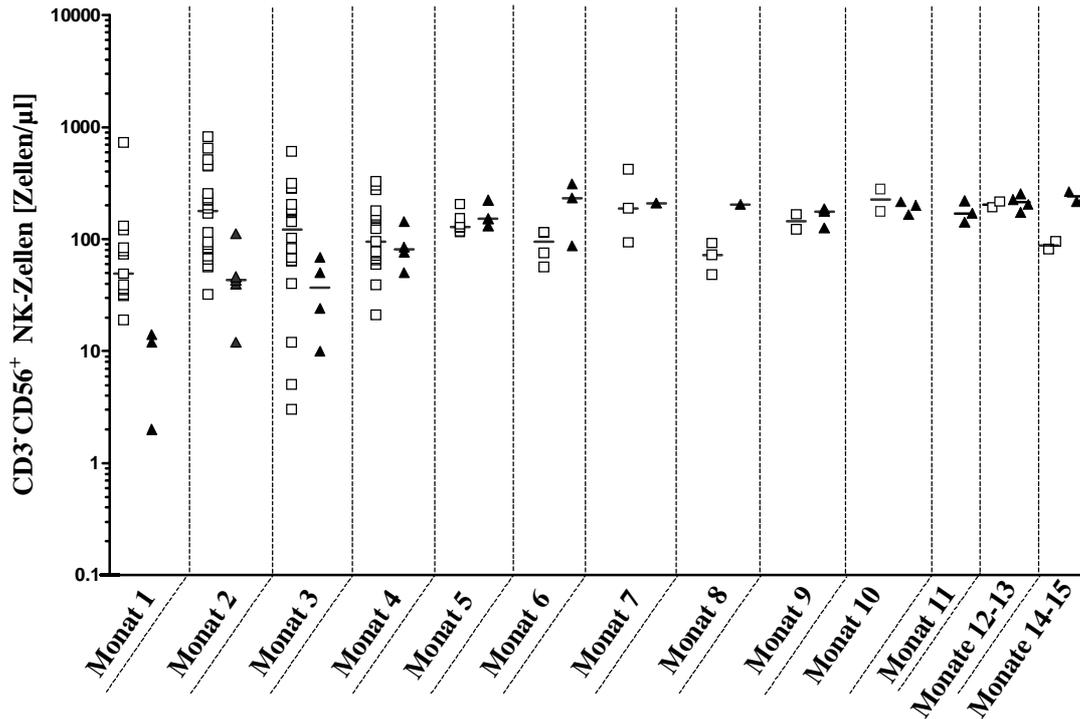


Abbildung 31: Vergleich der Immunrekonstitution der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>-NK -Zellen nach KM-Transplantation bei pädiatrischen Patienten mit AML (n=9). ▲Konditionierung mit Treosulfan (n=1), □ Konditionierung mit Busulfan (n=8). Angegeben sind Einzelmesswerte und Median

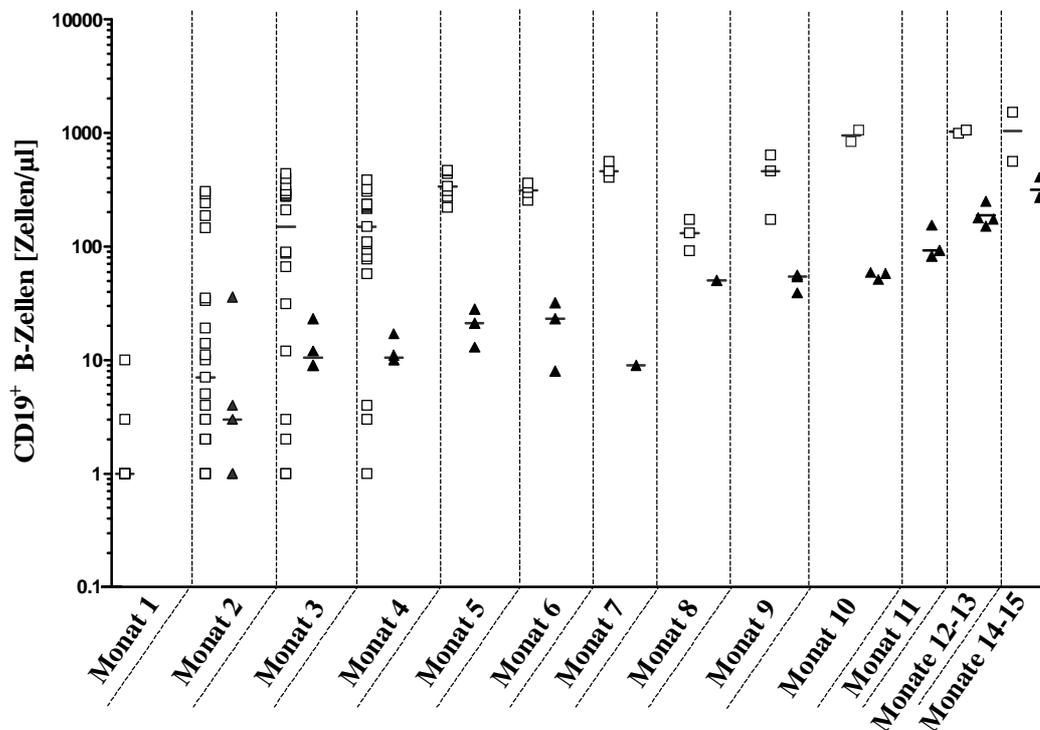
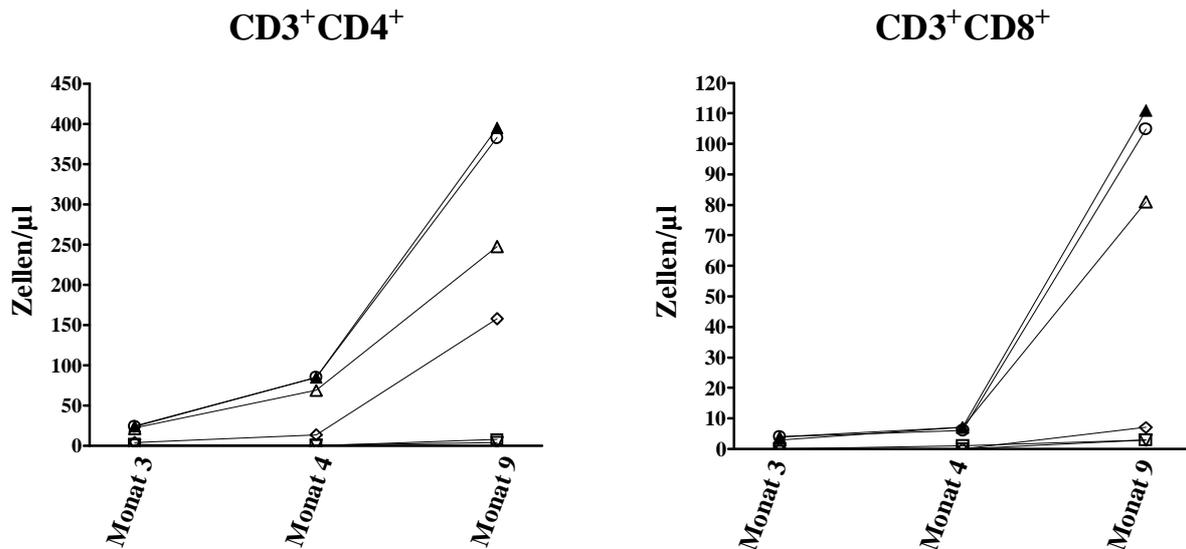


Abbildung 32: Vergleich der Immunrekonstitution der CD19<sup>+</sup> B-Zellen nach KM-Transplantation bei pädiatrischen Patienten mit AML (n=9). ▲Konditionierung mit Treosulfan (n=1), □ Konditionierung mit Busulfan (n=8). Angegeben sind Einzelmesswerte und Median

Die Absolutzahlen pro  $\mu\text{l}$  für die T-Helfer-Zellen ( $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ ) (Abb. 30) pendelten sich nach einigen Monaten bei beiden Gruppen auf ca. 100 Zellen / $\mu\text{l}$  ein. Einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ergab die Rekonstitution der zytotoxischen T-Zellen ( $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ ) ( $p < 0,001$ ). Während die Zellzahlen in der Busulfan-Gruppe auf ca. 1000 Zellen/ $\mu\text{l}$  anstiegen, blieb der Treosulfan-konditionierte Patient mit ca. 10 Zellen / $\mu\text{l}$  deutlich darunter (Abb. 29). Dies korreliert mit den CRP Werten des Patienten. Der CRP stieg im gesamten Verlauf immer wieder an. Eine eindeutige Identifizierung von Keimen konnte nicht erfolgen. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass die zytotoxischen T-Zellen durch einen Infekt „verbraucht“ wurden und daher keine höheren Zellzahlen im Blut zu verzeichnen waren.

#### 4.3.3.2. Untersuchung der Rekonstitution von naiven, memory und aktivierten T-Zellen nach Konditionierung mit Treosulfan

In regelmäßigen Abständen wurde von dem mit Treosulfan konditionierten Patienten auch die Immunrekonstitution weiterer Lymphozytensubpopulation untersucht (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Immunrekonstitution weiterer Lymphozytensubpopulationen bezogen auf  $CD3^+CD4^+$  T-Helfer-Zellen und  $CD3^+CD8^+$  zytotoxische T-Zellen.** Die hier dargestellten Markerprofile wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers im Rahmen der Überwachung der Immunrekonstitution nach Transplantation erhoben (siehe 3.2.11.2.).

*T-Helfer-Zellen ( $CD3^+CD4^+$ ):*

- ▲-  $CD3^+CD4^+$
- $CD4^+CD45RO^+$
- △-  $CD4^+HLA-DR^+$
- $CD4^+CD69^+$
- ◇-  $CD4^+CD25^+$
- ▽  $CD4^+CD45RA^+$

*Zytotoxische T-Zellen ( $CD3^+CD8^+$ ):*

- ▲-  $CD3^+CD8^+$
- $CD8^+CD45RO^+$
- △-  $CD8^+HLA-DR^+$
- $CD8^+CD69^+$
- ◇-  $CD8^+CD45RA^+CD28^-$
- ▽  $CD8^+CD45RA^+CD28^+$

Zwischen dem 4. und dem 9. Monat des Beobachtungszeitraumes stieg sowohl für die T-Helfer-Zellen ( $CD3^*CD4^*$ ) als auch für die zytotoxischen T-Zellen ( $CD3^*CD8^*$ ) die Absolutzellzahl der Gedächtniszellen ( $CD4^*BC45RO^*$  und  $CD8^*BC45RO^*$ ) und die mit dem Aktivierungsmarker HLA-DR deutlich an, während die Absolutzahl der naiven T-Zellen ( $CD4^*BC45RA^*$  und  $CD8^*BC45RA^*$ ) und der früh aktivierten T-Zellen ( $CD4^*CD69^*$  und  $CD8^*CD69^*$ ) weiter niedrig blieb. Außerdem konnte ein Anstieg an

aktivierten T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), unter denen auch regulatorischen T-Zellen enthalten sind, gemessen werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Korrelation der Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität

In den letzten fünf Jahrzehnten wurden zahlreiche Tests zur Untersuchung der Zytotoxizität von Substanzen auf Zellen entwickelt. Dabei ist die Bandbreite der Tests sehr groß.

Einige beruhen auf eher subjektiven Effekten wie ein unterschiedliches Wachstum von Monolayern, beschrieben 1978 von Pollack (Pollack und Anderson 1978). Bei anderen Tests geht es um den Ausschluss von Vitalfarbstoffen von Zellen (Boyse et al. 1964, Gerberick und Sorenson 1983). In anderen Tests wurde die Veränderung der Farbe des Mediums durch lebende Zellen beobachtet (Iglewski und Sadoff 1979) oder die optische Dichte von Farbveränderungen im Medium gemessen (Galloway et al. 1984). Eine weitere Möglichkeit bietet die Verwendung von radioaktiv-markierten Substanzen (Callahan et al. 1984, Thompson und Wannemacher 1984). Dabei wird z. B. die Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die DNA gemessen oder über  $^{51}\text{Cr}$ -Release die Vitalität der Probe geschätzt (Ferguson und Prottey 1974, Wagner und Feldmann 1972). Mosmann et al. (Mosmann 1983) entwickelte in den 80er Jahren einen sehr schnellen, effizienten Test, ursprünglich zur Untersuchung der Proliferation von Säugerzellen. Dieser so genannte MTT-Assay ist ein quantitativer, colorimetrischer Assay, in dem die Fähigkeit lebender Zellen, das lösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethyl-2-Tetrazolyl)-2,5-Diphenyl-2H Tetrazolium-Bromid (MTT) in ein unlösliches Formazan-Präzipitat zu überführen gemessen wird. Dabei wird das Tetrazoliumsalz in den Mitochondrien in einer enzymatischen Reaktion umgesetzt (siehe Abbildung 8). Dabei kommt es zur Bildung von blauen Formazan-Kristallen. Nach anschließender Solubilisierung kann die Farbveränderung gemessen werden. Dabei ist die Anzahl der lebenden Zellen direkt proportional zu der gebildeten Formazan Menge. Der Assay detektiert ausschließlich lebende Zellen und das gemessene „Signal“ ist abhängig von der Aktivität der Zellen. Die Vorteile bei diesem Assay liegen ganz klar in der Schnelligkeit, man kann in kürzester Zeit eine große Probenzahl screenen bei der Tatsache, dass keine Waschschrte nötig sind und dass hier keine radioaktiv-markierten Substanzen zum Einsatz kommen, was einen großen Vorteil für den Durchführenden hat. Somit wird der Test seit den 80er Jahren bis heute häufig genutzt (Holt et al. 1987, Wang et al. 2007).

Auch in dieser Arbeit wurden zahlreiche Experimente mit dem MTT-Assay durchgeführt. In erster Linie sollte die zytotoxische Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf ausgewählte Zelllinien damit getestet werden. Da sehr viele Arbeitsgruppen diesen Test

---

nutzen und gerade für Busulfan schon Daten veröffentlicht wurden, konnte die hier angewendete Methode zur Überprüfung so zu sagen als interne Kontrolle fungieren, indem man Daten mit denen der Literatur verglich. Gleichzeitig hatte man so ein „Werkzeug“, um die gemessenen Daten für Treosulfan hinsichtlich der benutzten Konzentrationen einzustufen. Allerdings kam der Test an Grenzen, wenn es um die Untersuchung der adhärenen Neuroblastom-Zelllinien ging. Um die Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf die verwendeten Neuroblastom-Zelllinien zu testen, wurden die Zellen auf eine bestimmte Zellzahl eingestellt und in 12 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit und ohne Zytostatika inkubiert. Anschließend wurde eine definierte Zellzahl entnommen und in 96-Well-Platten transferiert, um den MTT-Assay durchzuführen. Um die Zellen für den MTT-Assay auf eine bestimmte Zellzahl einzustellen, musste man sie mit Accutase ablösen und DNase verwenden um die Zellen soweit zu vereinzeln, dass eine vernünftige Zellzahlbestimmung erfolgen konnte. Anschließend sollten die Zellen mit den Zytostatika behandelt werden, aber zahlreiche Kulturen wurden erst gar nicht wieder adhären und starben ab. Deshalb wurde der Test derartig modifiziert, dass den Zellen nach Zellzahl-Einstellung einige Stunden (4 Std. – 24 Std.) Zeit gegeben wurde, um erst wieder adhären zu werden und sich neu anzupassen, bevor die Zytostatika-Behandlung startete. Doch zur eigentlichen Messung des Zytostatika-Einflusses trat das gleiche Problem wieder auf. Die Zellen mussten auch hierfür abgelöst werden, um sie in 96-Well-Mikrotiterplatten zu transferieren. In vorangegangenen Experimenten wurde festgestellt, dass die Kultivierung der Zellen von Beginn an in Well-Platten nicht möglich war, da die Zellen nur sehr schlecht wuchsen. Dazu kommt die von Bosanquet et al. (Bosanquet und Burlton 1994) beschriebene airborne cytotoxicity, d. h. dass benachbarte Kulturgefäße in Well-Platten durch Aerosole beeinflusst werden. Dies konnte für Treosulfan nachgewiesen werden, wohingegen Busulfan und dessen Spaltprodukte Tetrahydrofuran und Methansulfonsäure diesen Effekt nicht zeigen. Dieser Störfaktor konnte in den hier vorliegenden Experimenten ausgeschlossen werden, da diese in kleinen Kulturflaschen statt in Well-Platten vorgenommen wurden. Also musste der Ablöse-Schritt mit Accutase zwischen gestellt werden. Daran schloss sich die Behandlung mit der MTT-Lösung an. Es schien, dass die Zellen diese vielen Substanzen in so kurzer Zeit nicht gut vertragen. Da bekannt ist, dass der MTT-Assay nur lebende, aktive Zellen erfasst, wurde das zum Problem. Nach so zahlreichen „Stress-Bedingungen“ für die Zellen, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass die Zellen eine normale physiologische, Stoffwechsel-Aktivität zeigten. Daher konnten im Rahmen dieser Arbeit nur wenige Versuche mit adhärenen Zellen durchgeführt werden.

Außerdem war es mit dem MTT-Assay nicht möglich zwischen unterschiedlichen Stadien der Zell-Vitalität, wie z. B. Apoptose-Stadien zu unterscheiden.

Die Apoptose (Griechisch: „apo“=weg und „ptosis“=“Fall“ (Medicine 1994)), auch programmierter Zelltod genannt, ist im Gegensatz zur Nekrose ein streng geordneter Prozess, in dem in der Zelle eine Signalkaskade abläuft, die letztendlich im Zelltod mündet. Man unterscheidet die Apoptose von der Nekrose, erstmals beschrieben von Wyllie et al. (Wyllie 1985). Im Gegensatz zur Nekrose wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt, wobei Caspasen eine zentrale Rolle spielen. Apoptose und Nekrose lassen sich schon optisch voneinander unterscheiden. Bei der Apoptose schrumpfen die Zellen und ein Abbau der DNA durch Endonukleasen setzt ein. Bei der Nekrose schwillt die Zelle stark an, wobei die Zellmembran zerstört wird. Die Vorgänge der Apoptose unterteilt man in Initiationsphase und Effektorphase/Caspase-Kaskade. In der Initiationsphase unterscheidet man den extrinsischen und den intrinsischen Weg. Ersterer wird durch Ligandenbindung an die TNF-Rezeptorfamilie (z.B. CD95) eingeleitet, wodurch letztendlich Caspase 8 aktiviert wird, welche dann die folgende Caspase-Kaskade in Gang setzt. Bei dem intrinsischen Weg kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c, was zu zahlreichen Aktivierungs-Aktivitäten in der Zelle führt, die in der durch Caspase 9 ausgelösten Caspase-Kaskade endet. In der Effektorphase werden so genannte Effektor-Caspasen, hauptsächlich Caspase 3 und 6 aktiviert, was zum Tod der Zelle führt. Diese Caspasen aktivieren sekundäre Zielproteine wie DNasen und bauen die Zellmembran und Actin ab. Letztendlich schnürt sich die Zelle nach und nach in kleinen Vesikeln ab, welche durch Phagozyten vernichtet werden.

Da mit dem MTT-Assay nicht zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden konnte, sollte mit Hilfe der Durchflusszytometrie diese Differenzierung ermöglicht werden. Ein weiterer, äußerst wichtiger Aspekt verlangte ebenfalls die Entwicklung eines zweiten Zytotoxizitäts-Assays. Da im Rahmen dieser Arbeit auch die Zytotoxizität der Zytostatika auf frische Leukämiezellen pädiatrischer Patienten mit unterschiedlichem Prozentsatz maligner Zellen untersucht werden sollte, war eine Differenzierung zwischen leukämischen Zellen und Leukozyten notwendig. Der Anteil an Leukozyten in den Leukämieproben lag zwischen 5% und 55%. Da aber in diesen Experimenten lediglich die Zytotoxizität der Zytostatika auf maligne Zellen getestet werden sollte, sollte in einem multiparametrischen

---

durchflusszytometrischen Assay eine Differenzierung zwischen malignen Zellen und normalen Zellen erfolgen mit anschließender Differenzierung in lebende, tote und apoptotische Zellen.

Auf der Basis des durchflusszytometrischen Assay von Zimmermann et al. und Klöß et al. (Zimmermann et al. 2005, Kloss et al. 2007) konnten diese Anforderungen durch eigene Optimierungsschritte erfüllt werden. Daher wurden spezielle Protokolle für die Durchflusszytometrie entwickelt. Das fünf-Farb-Gerät CYTOMIX FC500 (Beckman Coulter) liess dabei den Einsatz von bis zu fünf verschiedenen Markern in den 5 verschiedenen Fluoreszenzkanälen zu. In Fluoreszenzkanal (FK) 1 kann FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), in FK 2 kann PE (Phycoerythrin), in FK 3 kann ECD (energy coupled dye), in FK 4 kann PC5 (Phycoerythrin-Cyanin 5) und in FK 5 kann PC7 (Phycoerythrin-Cyanin 7) erfasst werden. Die gesamte Gatingstrategie ist in Kapitel 3.2.8.2. dargestellt. In einem ersten Schritt werden die leukämischen Zellen von den Leukozyten getrennt, indem für die jeweilige Leukämie des Patienten typische Marker in PE und PC7 eingesetzt werden. Nach dem Gating auf die malignen Zellen erfolgte deren Differenzierung zwischen lebenden, toten und apoptotischen Zellen über die Markierung mit AnnexinV und PI. In vitalen Zellen sind Phosphatidylserin-Moleküle in der Zellmembran nach innen verankert. Bei dem erwähnten Abbau der Zellmembran während der Apoptose werden diese Moleküle auf die Außenseite der Membran transferiert, welche durch den Antikörper AnnexinV (in FITC) detektiert werden können. In einer sehr späten Phase der Apoptose wird die Zellmembran der Zelle durchlässig, wodurch der DNA-interkalierende Farbstoff PI (Fluoreszenzkanal 3 und 4) eindringen kann. Trägt die Zelle nur AnnexinV befindet sie sich in einer frühen Phase der Apoptose, trägt die Zelle AnnexinV und PI befindet sie sich in der sehr späten Phase der Apoptose, wird sie ausschließlich mit PI markiert, wird die Zelle als tot erfasst.

Um die optimierte Messmethode zu testen, erfolgten anfangs Zytotoxizitäts-Untersuchungen an Zelllinien parallel zum MTT-Assay. Es konnte eine gute Korrelation zwischen beiden Assays gezeigt werden ( $r=0,98$  für Molt 4/8 und  $r=0,95$  für H9). Dies war die Voraussetzung für die Verwendung des durchflusszytometrischen Tests an frischen Leukämiezellen, da hierbei nicht genügend Material für beide Tests zur Verfügung stand.

## **5.2. *In vitro* Daten zur Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf maligne Zellen**

Das alkylierende Agens Treosulfan ist ein strukturelles Analogon zu Busulfan. Während Busulfan die DNA in den Zellen direkt alkyliert, wird Treosulfan erst in einer nicht-enzymatischen, pH unabhängigen Reaktion in Epoxide überführt, welche dann die DNA alkylieren. Obwohl beide Substanzen unterschiedliche Mechanismen aufweisen, alkylieren sie die gleichen Orte der DNA (Matagne 1969, Ponti et al. 1991). Dabei korrelieren auch die ähnlichen Zytotoxizitäts-Profile beider Substanzen (Lanvers-Kaminsky et al. 2006).

Treosulfan wird bei Erwachsenen sowohl in konventionellen Therapien als auch in Konditionierungs-Regimen vor autologer oder allogener Stammzelltransplantation eingesetzt. In konventionellen Therapien wurde Treosulfan schon seit den 70er Jahren, vor allem zur Behandlung des Ovarialkarzinoms, eingesetzt (Fennelly 1977) und seit Ende der 90er Jahre wird es zur Vorbereitung von Transplantationen genutzt (Scheulen et al. 2000). Auch für hämatologische Erkrankungen wird Treosulfan seit einigen Jahren verwendet (Beelen et al. 2005, Casper et al. 2004).

Wie aus Studien an internistischen Patienten bekannt ist, haben Treosulfan und Busulfan unterschiedliche Nebenwirkungsprofile. Im Vergleich untereinander wird deutlich, dass Treosulfan keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf Niere, Leber, Lunge und das ZNS zeigt (Bojko et al. 2001), während Busulfan vor allem durch GvHD und VOD zu ernsthaften Komplikationen führt (Blaise et al. 1992, Brodsky et al. 1990, Hasegawa et al. 1998, Jones et al. 1998). Von Dressel et al. (Dressel et al. 2003) wurde beschrieben, dass Busulfan Aktivin A induziert, was wiederum Einfluss auf Inflammation, Proliferation, Apoptose und Koagulation hat, welches potentielle Einflüsse für eine VOD darstellen. Ein weiterer Aspekt für potentielle Nebenwirkungen resultiert daraus, dass Treosulfan in Wasser löslich ist und damit intra-venös verabreicht werden kann, wohingegen bei Busulfan ein Lösungsmittel nötig ist, wobei meist DMA ((N,N) - Dimethylacetamid) verwendet wird (Bhagwatwar et al. 1996). Obwohl von Hempel et al. (Hempel et al. 2007) beschrieben wurde, dass es bei einer pharmakokinetischen und -dynamischen Untersuchung von Busulfan an Kindern zu keiner Akkumulation des Lösungsmittels kam, wurde DMA in der Vergangenheit einige Nebenwirkungen, vor allem Neurotoxizität, zugeschrieben (Barnes und Ranta 1972, Kim 1988, Weiss et al. 1962). Damit scheint Busulfan noch ein zusätzliches Risiko für Nebenwirkungen zu bergen.

---

Trotz dieses deutlichen Vorteils von Treosulfan gegenüber Busulfan ist Treosulfan derzeit nicht Bestandteil pädiatrischer Behandlungs-Protokolle und in der Literatur sind bisher kaum *in vitro* Daten zu Treosulfan auf maligne Zellen pädiatrischer Patienten veröffentlicht. Gutiérrez et al. (Gutierrez et al. 2005) beschreibt Unterschiede zwischen kindlichen Leukämien und denen von Erwachsenen. Als Grund wird die Regulation der Methylierung von Tumorsuppressorgenen genannt, welche wiederum altersabhängig zu sein scheint. Aus diesen Gründen erschien es wichtig, die Wirkung von Treosulfan auf Zellen pädiatrischer Patienten zu untersuchen und gleichzeitig mit der Wirkung von Busulfan zu vergleichen, da Busulfan derzeit in mehreren pädiatrischen Protokollen enthalten ist.

Bei 37°C beträgt die Halbwertszeit von Busulfan 16 h, für Treosulfan unter physiologischen Bedingungen nur 1,8 h (Ehrsson et al. 1983), trotzdem wurde die Inkubationszeit beider Substanzen auf 72 h festgelegt. Dies entspricht einer angemessenen Zeit für die Konvertierung des Prodrug Treosulfan in seine aktive Form, die vergleichbar ist mit der Zeit der Wirkung *in vivo* (Feit 1964).

Sowohl Treosulfan als auch Busulfan zeigten einen logarithmischen Anstieg der Zytotoxizität in Proportionalität zur eingesetzten Dosis. Neben der Dosis-Abhängigkeit konnte auch im Rahmen dieser Arbeit eine Zeit-Abhängigkeit bestätigt werden, wie bereits gezeigt (Lanvers-Kaminsky et al. 2006). Treosulfan war in allen Zelllinien zytotoxischer als Busulfan. Außerdem ist fest zu halten, dass Zelllinien, die gegenüber Treosulfan sensitiv waren, es auch gegenüber Busulfan waren und resistenter Linien auch gegen beide Alkylanzien resistenter waren. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber 3 leukämischen und 2 Neuroblastom-Zelllinien untersucht. Die in dieser Arbeit für Treosulfan ermittelten IC<sub>50</sub> Werte für die Leukämie-Zelllinien Molt4/8, H9 und K562 und die Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y und UKF-NB3 sind mit denen in der Literatur zu findenden Werte (Tabelle 15) vergleichbar.

Die Inkubation der Leukämie-Zelllinien Molt4/8, H9 und K562 zeigte IC<sub>50</sub>-Werte von 10 - 47 µM für Treosulfan bzw. 16 - 560 µM für Busulfan. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Daten von Lanvers-Kaminsky und Schmidmaier (Lanvers-Kaminsky et al. 2006, Schmidmaier et al. 2004). Diese Unterschiede in der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan konnte in einigen Arbeiten auch an Tumor-Zelllinien gezeigt werden. Ein genauer Vergleich der Studien wird durch unterschiedliche Inkubationszeiten zwischen 24 und 96 Stunden erschwert.

**Tabelle 15:** Zusammenfassung der in der Literatur veröffentlichten IC<sub>50</sub>-Werte für Treosulfan und Busulfan auf Zelllinien.

		IC <sub>50</sub> Treosulfan [μM]	IC <sub>50</sub> Busulfan [μM]	Literatur
Leuk. Zelllinien	H9 (T-ALL)	n.d.	166,5	(Sanyal et al. 2000)
	Molt-4 (T-ALL)	26,9	389	(Lanvers-Kaminsky et al. 2006)
	U937 (AML)	< 10	n.d.	(Schmidmaier et al. 2004)
Tumor- Zelllinien	Renale Tumor-Zelllinie	5-5000	n.d.	(Kopf-Maier 1998)
	SH-SY5Y (Neuroblastom)	2,54	n.d.	(Lanvers-Kaminsky et al. 2006)
	Ewing-Sarkom-Zelllinie	1-250	200-1000	(Werner et al. 2007)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf frische Leukämiezellen von 21 pädiatrischen Patienten mit Akuten Leukämien untersucht. Limitationen bei den Untersuchungen ergaben sich durch die geringe Menge an Zellmaterial, die nach Abschluss der Diagnostik zur Verfügung gestellt wurde. Desweiteren konnten die Leukämiezellen zum Teil nur sehr schwer in Kulturmedium gehalten werden, wodurch von ursprünglich 35 Leukämie-Proben nur 24 vermessen und ausgewertet werden konnten, da die Vitalität in den anderen Proben mangelhaft war. Für eine Mindest-Vitalität in der Zell-Kontrolle wurden >65% festgelegt.

Die in dieser Arbeit ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte entsprechen den in der Literatur gefundenen. Schmidmaier et al. (Schmidmaier et al. 2004) berichten von IC<sub>50</sub> Werten von 10 μM für Treosulfan in leukämischen Zellen von 5 AML Patienten. Für primäre Zellen solider Tumore erwachsener Patienten sind IC<sub>50</sub>-Werte von 39,4 μM für Treosulfan angegeben (Di Nicolantonio et al. 2004). Die IC<sub>50</sub>-Werte für Treosulfan für das multiple Myelom liegen auch in diesem Größenbereich (Meinhardt et al. 2003). In ähnlichen Bereichen scheinen die Daten für Zelllinien zu liegen, zusammengefasst in Tabelle 15. Für Treosulfan sind Werte von 1-600 μM, für Busulfan von 3-5000 μM zu finden.

In den 24 im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben waren die IC<sub>50</sub>-Werte für Treosulfan 2-8 fach niedriger als die für Busulfan (Median IC<sub>50</sub> für Treosulfan: 30,6 μM, Median IC<sub>50</sub> für Busulfan: 133 μM). Außerdem steigen die IC<sub>50</sub>-Werte vom Zeitpunkt der Diagnose (Median: Treosulfan: 11,45 μM, Busulfan: 96,45 μM) über die Progression (Median: Treosulfan: 45,95 μM, Busulfan: 253,75 μM) bis zum Rezidiv (Median: Treosulfan: 153,15 μM, Busulfan: 223,3 μM) hin an, und zwar um das 8-fache bei Treosulfan und das 2,5-fache bei Busulfan. Der Unterschied der Zytotoxizität von

---

Treosulfan auf Leukämieproben aus Diagnose bzw. aus Rezidiv war statistisch signifikant ( $p=0,02$ ). Der Unterschied bei Busulfan war dagegen nicht signifikant ( $p=0,13$ ). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Treosulfan bei niedrigen Konzentrationen effektiver wirkt als Busulfan. Da keiner der Patienten bis auf einen in vorherigen Behandlungen Treosulfan oder Busulfan erhalten hatte, könnte das auf eine Kreuzresistenz hinweisen. Styczynski et al. (Styczynski et al. 2007) veröffentlichten mediane  $IC_{50}$ -Werte von  $6\mu M$  und  $77\mu M$  für Proben von an AML erkrankten Kindern, die ein Rezidiv erlitten im Vergleich zu denen, die in Remission blieben. Eine andere Erklärung könnte sein, dass es sich um ein statistisches Phänomen handelt, da die Anzahl der Patientenproben für solcherlei Auswertungen sehr limitierend waren. Dies wird auch von den Ergebnissen von Teicher et al. (Teicher et al. 1986) belegt, dass es keinen Hinweis auf pleiotrope Resistenzen von Alkylanzien gibt und auch Schmidmaier konnte keine Korrelation zu einer früheren Chemotherapie beobachten (Schmidmaier et al. 2004).

Interessanterweise zeigte sich für Treosulfan und Busulfan eine signifikant höhere Zytotoxizität gegenüber T-ALL-Proben im Vergleich zu cALL-Proben (Treosulfan  $p=0,02$ , Busulfan  $p=0,03$ ).

Desweiteren wurden die durchflusszytometrischen Ergebnisse zur Apoptose in dieser Arbeit auch über Western Blot zur Caspase 3 Bestimmung überprüft. Auch hier ist sowohl bei den Proben eines Patienten mit ALL als auch bei einer Probe der Zelllinie Molt4/8 eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Treosulfan auf die Zellapoptose zu erkennen. In Studien anderer Arbeitsgruppen konnte ebenfalls bestätigt werden, dass Treosulfan Caspase 3, Caspase 9 und Bcl-2 beeinflusst (Meinhardt et al. 2003, Schmidmaier et al. 2004, Werner et al. 2007). Außerdem wurde sowohl für Treosulfan als auch für Busulfan veröffentlicht, dass beide Substanzen über einen so genannten  $G_2$ -Arrest wirken (Hassan et al. 2001, Werner et al. 2007). Dabei handelt es sich um die prämitotische oder Postsynthesephase, in der sich die Zelle auf die Mitose vorbereitet, was dann letztendlich nach erfolgtem Arrest nicht stattfindet, die Zelle teilt sich nicht mehr und stirbt dann.

### **5.3. *In vitro* und *in vivo* Daten zur Konditionierung mit Busulfan und Treosulfan – Wirkung auf maligne und nicht maligne Zellen**

Die limitierende Dosis von Treosulfan beträgt 47 g/m<sup>2</sup> Körperoberfläche bei Erwachsenen (Scheulen et al. 2000). Bei Busulfan beträgt sie 16 mg/kg KG (Blaise et al. 1992), was nur ca. einem 100fachen Teil der Treosulfandosis entspricht. Dieses Dosis-Wirkungs-Verhältnis wird auch in Xenograftmodellen bestätigt. 2003 wurden die ersten Daten von Fichtner et al. (Fichtner et al. 2003) über ALL-Modelle in NOD/SCID Mäusen veröffentlicht. Dafür wurden leukämische Zellen (T-ALL, B-ALL und prä-B-ALL je n=1) von drei Kindern verwendet. Treosulfan kam in einer 100fach höheren Konzentration (1x3000 mg/kg oder 3x1500 mg/kg oder 3x1000 mg/kg) zum Einsatz als Busulfan (3x10 mg/kg oder 3x20 mg/kg). In allen Vergleichsgruppen zeigte die Verwendung von Treosulfan ein besseres Outcome. Die kürzlich erschienene Arbeit von Werner et al. (Werner et al. 2007) beschreibt, dass Treosulfan auch das Tumorwachstum in Mausmodellen besser supprimiert als Busulfan. Hier wurden Ewing-Sarkome in einem Xenograft-Modell untersucht, wobei auch hier Treosulfan in einer 100fach höheren Dosis gegeben wurde gegenüber Busulfan.

Die zu erreichenden Plasmalevel für Treosulfan liegen bei der Hochdosischemotherapie bei 4,5 mmol/l, bei der konventionellen Therapie bei 1,6 mmol/l (Hilger et al. 1998, Scheulen et al. 2000).

In Xenograft-Modellen konnte in der Vergangenheit nicht nur die Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf maligne Zellen getestet werden, sondern es fanden auch Studien zur Zytotoxizität gegenüber nicht malignen Zellen statt. Dies hat zum einen Einfluss auf die Nebenwirkungen, zum anderen auf die Einsetzbarkeit der Substanzen zur Vorbereitung einer Transplantation. Bei der konventionellen Chemotherapie sind sowohl Organtoxizitäten, vor allem aber toxische Wirkungen auf das Blut und das blutbildende System als limitierende Faktoren bekannt. Im Vergleich dazu soll in einer Hochdosis-Chemotherapie vor allem die Depletion der Stammzellen gewährleistet sein, damit das Knochenmark frei von autologen Stammzellen ist, um ein optimales Anwachsen der transplantierten Zellen zu gewährleisten. Hier spielt aber auch die Depletion der Immunzellen im peripheren Blut eine große Rolle, da vor allem residuale T-Zellen zu einer Abstoßung des Transplantates führen können. Ein optimales, in der Hochdosis-Chemotherapie einzusetzendes Medikament sollte daher neben der zytotoxischen Wirkung auf maligne Zellen eine myelo- und lymphotoxische Wirkung auf Stammzellen und das restliche blutbildende System besitzen. Treosulfan und Busulfan werden sowohl zur

---

autologen als auch zur allogenen Stammzell-Transplantation eingesetzt. Bei Erwachsenen gibt es zahlreiche Daten über das Outcome bei Konitionierung mit Treosulfan (Beelen et al. 2005, Casper et al. 2004, Kroger et al. 2006, Scheulen et al. 2000). Treosulfan wurde dagegen nur sehr spärlich bei Kindern angewendet, veröffentlichte Daten sind nur über drei autolog transplantierte Kinder (Drabko et al. 2005) und von 44 an AML erkrankten Kindern, die nach Treosulfan-Konditionierung eine allogene Stammzell-Transplantation erhielten, zu finden (Styczinsky et al. 2007).

Aus diesem Grund war es interessant, die Wirkung von Treosulfan auf Subpopulationen normaler Lymphozyten sowie auf Stammzellen explizit zu untersuchen. Aus Mausmodellen, veröffentlicht von Sjöo et al. (Sjoo et al. 2006) ist bekannt, dass Treosulfan eine hervorragende immunsuppressive Wirkung hat. Es erfolgte eine rasche Depletion der T- und B-Zellen, wobei in der T-Zell-Population kein Unterschied zwischen zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen festgestellt werden konnte. Es wurde beschrieben, dass das größte Nebenwirkungsrisiko von der Zerstörung von Gewebe und dem damit einsetzenden „Zytokin-Sturm“ ausgeht (Ferrara et al. 2003, Holler 2002). Es wurde auch darüber spekuliert, ob dieser Zytokin-Sturm Donor-Lymphozyten aktiviert (vor allem vom TH1-Typ) (Remberger und Ringden 1995, Remberger et al. 1995). Interessant wird das bei TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und IL-2, da sie sowohl bei der Entstehung der GvHD als auch der VOD eine Rolle spielen (Ferrara et al. 2003, Holler 2002, Remberger und Ringden 1995, Remberger et al. 1995). Da Treosulfan die zytotoxischen T-Zellen erfolgreich depletiert, bleibt ein Zytokin-Sturm aus und so kommt es nicht zu einer VOD. Im Gegensatz dazu induziert Busulfan sogar eine zelluläre Signalkaskade, wodurch das Risiko für eine VOD steigt (Dressel et al. 2003).

Auch Ploemacher et al. (Ploemacher et al. 2004) arbeiteten an Mausmodellen und zeigten, dass Treosulfan in nicht-myeloablativen Konditionierungsprotokollen zu einem erhöhten Spender-Chimerismus und einer immunologischen Toleranz führte.

Für Stammzellen und Progenitoren lassen sich einige Daten in der Literatur finden. Allgemein ist zu sagen, dass Alkylanzien eine höhere Zytotoxizität gegenüber Stammzellen haben als Nukleotidanaloga (Schmidmaier et al. 2006). Sjöo et al. zeigten, dass CFU-GM bei der Behandlung mit Treosulfan schon nach einem Tag, bei Busulfan erst am dritten Tag den Nadir erreichten. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass der mediane IC<sub>50</sub>-Wert für Busulfan auf mesenchymale Stammzellen bei über 3000  $\mu$ M liegt, was im Vergleich zu anderen Zellpopulationen sehr hoch ausfällt (Li et al. 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Treosulfan T-, NK- und Stammzellen

zuverlässig depletiert. Im Vergleich war Treosulfan bei den Lymphozytenpopulationen dreifach und in der Wirkung auf die Stammzellen 20fach effektiver als Busulfan. Die medianen IC<sub>50</sub>-Werte für die normalen Lymphozyten lag für Treosulfan bei 12,3 µM und für Busulfan bei 89,9 µM.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass die Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf normale Lymphozyten im Vergleich auf Leukämiezellen bei einem Rezidiv einen signifikanten Unterschied zeigte (p= 0,03 für Treosulfan und p= 0,02 für Busulfan; siehe Kapitel 4.3.2.). Die Zytotoxizität beider Substanzen auf normale Zellen im Vergleich auf Leukämiezell-Proben aus Diagnose oder auf alle in dieser Arbeit untersuchten Leukämiezellen im Gesamten war nicht signifikant unterschiedlich.

Damit konnten hier erste Daten generiert werden, dass Treosulfan möglicherweise alle Anforderungen an einem Chemotherapeutikum zur Konditionierung erfüllt.

Da zur Konditionierung meist eine Polychemotherapie genutzt wird, ist die Interaktion der verschiedenen Zytostatika von großem Interesse. Daher wurde in dieser Arbeit das mit Hilfe von Median-Effekt-Analysen das Zusammenwirken von Treosulfan bzw. Busulfan mit Fludarabin *in vitro* untersucht. Mittels computergestützter Auswertung konnte für Busulfan in allen Kombinationen mit Fludarabin nur ein Antagonismus nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte bei der Kombination von Treosulfan und Fludarabin ab einer Treosulfan-Konzentration größer 1 µM ein Synergismus nachgewiesen werden. Für Treosulfan-Konzentrationen kleiner 1 µM konnte ebenfalls nur ein Antagonismus nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Treosulfan in Kombination mit Fludarabin in Konditionierungsschemata eingesetzt werden kann. Auch Casper et al. konnten in einer Studie mit 55 Patienten den sicheren und effizienten Einsatz von Treosulfan und Fludarabin zur Konditionierung vor allogener Stammzelltransplantation bei hämatologischen Erkrankungen belegen (Casper et al. 2004).

---

#### **5.4. *In vivo* Daten – Immunrekonstitution nach Treosulfan- oder Busulfan-Konditionierung**

Die Immunrekonstitution wird von zahlreichen Faktoren wie Transplantatquelle oder immunsuppressive Therapie beeinflusst. Während des ersten Monats nach Transplantation erscheinen als erstes die NK-Zellen, gefolgt von den zytotoxischen T-Zellen in den Monaten 2 - 3 und den B-Zellen in den Monaten 3 - 5 nach Transplantation. Die T-Helfer-Zellen rekonstituieren dagegen eher langsam und erreichen normale Werte erst gegen Ende des ersten Jahres nach Transplantation (de Vries et al. 2000, Kalwak et al. 2002, Kim et al. 2004, Kook et al. 1996). Bei den ersten zytotoxischen T-Zellen handelt es sich meist um memory Zellen ( $CD3^+CD8^+CD45RO^+$ ), sie entwickeln sich aus den im Transplantat enthaltenen T-Zell-Vorläufern, die naiven Zellen ( $CD3^+CD8^+CD45RA^+$ ) regenerieren aus den angewachsenen Stammzellen und erscheinen erst einige Wochen bis Monate nach Transplantation im peripheren Blut. Ab der 6. Woche nach Transplantation erscheinen die  $CD4^+CD25^+$  regulatorischen T-Zellen, welche eine große Rolle bei der immunologischen Toleranz gegen eigene und fremde Antigene spielen. Deren Rekonstitution kann somit entscheidend bei der Unterdrückung einer GvHD sein (Hori et al. 2003).

Die Immunrekonstitution unterliegt allerdings zahlreichen Faktoren. Zum einen wird sie durch das Alter des Empfängers variiert. Bei Erwachsenen dauert die komplette Immunrekonstitution vergleichsweise lang mit 2-3 Jahren (Storek et al. 1995). Dies wird in der abnehmenden Thymusfunktion mit steigendem Alter begründet (Chung et al. 2001, Douek et al. 1998, Dumont-Girard et al. 1998, Roux et al. 2000). Bei Kindern beträgt die Zeit der Immunrekonstitution nur 1 bis 1<sup>1/2</sup> Jahre (Eyrich et al. 2001, Eyrich et al. 2003, Eyrich et al. 2005, Kalwak et al. 2002, Kook et al. 1996, Nakamura et al. 2001).

Außerdem hängt die Immunrekonstitution der einzelnen hämatologischen Zellgruppen stark von der Transplantatquelle ab. In der Regel zeigt eine Transplantation mit unmanipulierten peripheren Blutstammzellen eine schnellere Immunrekonstitution als eine Transplantation mit Knochenmark oder manipulierten Stammzellpräparaten (Behringer et al. 1999, Ottinger et al. 1996), was in der unterschiedlichen Anzahl der im Transplantat enthaltenen Lymphozyten begründet ist. G-CSF stimulierte Stammzellprodukte bewirken durch ihre große Anzahl von Lymphozyten und Monozyten eine schnellere Immunrekonstitution und besitzen ein verbessertes therapeutisches Potential (Autran et al. 1997, Henon et al. 1992, Mills et al. 1996, Nolte et al. 1998, Rosillo et al. 1996, Shenoy et al. 1999, Singh et al. 1999, Talmadge 1994, Talmadge et al. 1996, Weaver et al. 1994). Die Rolle der

infundierten Zellen auf die Langzeit-Immunrekonstitution ist allerdings noch unklar (Fry und Mackall 2005, Michallet et al. 2000). Erfolgt eine Transplantation mit unmanipulierten Stammzellpräparaten oder Knochenmark, erfolgt die Immunrekonstitution von T-Zellen in der ersten Zeit aus den im Transplantat enthaltenen T-Zellen. Patienten, die Transplantatquellen mit T-Zell-Depletion erhalten, sind am längsten immundefizient. Diese Methode nutzt man heute sehr oft bei Leukämie-Patienten. Hier zeigen sich deutlich höhere Infektionsraten, allerdings kann dem durch gezielte Donor-Lymphozyten-Infusionen vorgebeugt werden.

Bei der Form der haploidenten Transplantation ist eine T-Zell-Depletion unerlässlich. Bei positiv angereicherten Stammzellen hat man allerdings sowohl ein deutlich verlangsamtes Engraftment als auch eine verzögerte Immunrekonstitution beobachtet. Deshalb wird immer häufiger die Aufreinigungsmethode der CD3/CD19-Depletion angewandt. Bethge et al. (Bethge et al. 2007) zeigten damit eine Verbesserung der Rekonstitution, was auf das Vorhandensein von Monozyten und allen Lymphozytensubpopulationen außer CD3<sup>+</sup> T- und CD19<sup>+</sup> B-Zellen zurückzuführen sein könnte.

Die Immunrekonstitution kann auch von der Chemotherapie abhängig sein. Eine Verringerung der Chemotherapie vor Transplantation wird hinsichtlich der Geschwindigkeit der Immunrekonstitution sehr kontrovers diskutiert. Einige Gruppen sehen einen deutlichen Einfluss der Reduktion der Chemotherapie (Chao et al. 2002, Schulenburg et al. 2005), andere Gruppen zeigen das nicht (Maris et al. 2003). Allerdings wurde auch berichtet, dass einige Chemotherapeutika, in erster Linie Alkylanzien, sich verzögernd auf die Immunrekonstitution auswirken (Boccardo et al. 2002, Tricot et al. 1995).

Ein weiterer Faktor, der die Immunrekonstitution beeinflusst, ist das Auftreten einer GvHD. Zum einen kann eine GvHD eine Thymus-Dysplasie induzieren, wodurch die Reifung von T-Zellen gestört wird (Fukushi et al. 1990, Hollander et al. 1994, Seddik et al. 1980, Seemayer et al. 1977, van den Brink et al. 2000). Außerdem kann die Behandlung einer GvHD einen Einfluss nehmen. Der Einsatz von ATG oder Methotrexat kann zum Beispiel zu einer verlangsamten T-Zell-Rekonstitution führen (Small et al. 1997, Kolb et al. 1973).

Die Folgen einer verlangsamten Immunrekonstitution sind eine erhöhte Infektions- und Rezidiv-Gefahr (Kook et al. 1996, Maraninchi et al. 1987, Ochs et al. 1995, Storek et al. 1997). Bei der Mortalitätsrate nach Transplantation spielen vor allem CMV und Aspergillus-Infektionen eine tragende Rolle (Ganepola et al. 2007) (siehe auch S. 31, 32). Es konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz für eine Adenoviruserkrankung bei Transplantation mit T-Zell-depletiertem Graft und bei aufgetretener GvHD stieg

---

(Feuchtinger et al. 2007). Der Schutz gegen diese und andere Infektionen korreliert mit der Anwesenheit von antigenspezifischen T-Zellen (Parkman 2007). Empfänger, die in der Lage sind, antigenspezifische T-Zellen zu bilden, zeigen ein deutlich besseres Überleben (Parkman et al. 2006). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass sich das Vorhandensein von antigenspezifischen T-Zellen positiv auf die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit auswirkt. Allerdings ist nicht bekannt, ob es einen direkten Einfluss auf ein Rezidiv gibt oder ob die Anwesenheit von antigenspezifischen T-Zellen lediglich ein Immunsystem mit adäquater Kompetenz widerspiegelt (Parkkali et al. 1996).

Wie erwähnt hat auch die Zusammensetzung der Hochdosischemotherapie einen Einfluss auf die Immunrekonstitution. Dies wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit untersucht.

Treosulfan wird in der internistischen Hämatologie/Onkologie seit mehreren Jahren erfolgreich eingesetzt, wobei ein Vorteil gegenüber Busulfan z. B. hinsichtlich des Nebenwirkungsspektrums beobachtet wurde. Busulfan wird auch seit mehreren Jahren in der Pädiatrie zur Konditionierung vor der Stammzell- oder KM-Transplantation eingesetzt. Während der Erstellung dieser Arbeit wurden deutschlandweit nur sehr wenige, vereinzelte Kinder mit Treosulfan konditioniert, da Treosulfan bis jetzt nicht Bestandteil der pädiatrischen Behandlungsprotokolle war.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Immunrekonstitution bei pädiatrischen Patienten mit AML nach allogener Knochenmarktransplantation (n=9) über einen Zeitraum von 15 Monaten überwacht. Einer der Patienten wurde mit Treosulfan konditioniert, die anderen erhielten Busulfan.

Bei beiden Gruppen wurde deutlich, dass die KM-Transplantation ein schnelles Anwachsen der transplantierten Zellen gewährleistete. Bei beiden Arten der Konditionierung schien die Rekonstitution der Leukozyten gleich gut/schnell zu erfolgen.

Bei dem prozentualen Anteil der Lymphozyten waren sehr große Schwankungen zu verzeichnen, wobei die Prozentwerte (Lymphozyten) für den Treosulfan-konditionierten Patienten auch ein Jahr nach Transplantation noch weit unter denen der Busulfan-Gruppe lag. Die Immunrekonstitution der  $CD3^+CD4^+$  T-Helfer-Zellen,  $CD19^+$  B-Zellen und  $CD56^+CD3^-$  NK-Zellen verlief bei dem Treosulfan-konditionierten Patienten ähnlich zu denen der Busulfan-Gruppe.

Mit den zytotoxischen T-Zellen ( $CD3^+CD8^+$ ) lag der Treosulfan-konditionierte Patient bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (15 Monate) mit ca. 100 Zellen / $\mu$ l deutlich unter der Busulfan-Gruppe (ca. 1000 Zellen/ $\mu$ l). Es war über den gesamten Beobachtungszeitraum ein immer wieder ansteigender CRP Werte bei dem Patienten zu

beobachten. Die erniedrigte Zahl CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen könnte ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Infektionen oder einem Rezidiv bergen. Die niedrige Zahl der zytotoxischen T-Zellen könnte zum einen durch verlangsamte Rekonstitution oder durch den „Verbrauch“ der Zellen bei einer bereits bestehenden Infektion begründet sein. Eine solche Infektion würde auch mit den immer wieder steigenden CRP-Werten korrelieren, allerdings konnten keinerlei Erreger nachgewiesen werden. Eine verlangsamte Immunrekonstitution könnte durch die medikamentöse Behandlung mit CSA (bis Monat 2), mit MMF (bis Monat 12) und mit Prednison (von Monat 4 bis Monat 10) begründet sein, da diese Medikamente nachweislich die Immunrekonstitution von T-Zellen verlangsamen. Aber gerade die Rekonstitution der zytotoxischen T-Zellen hat einen großen Einfluss auf die Prognose. Köhl *et al.* (2007) konnte beschreiben, dass die schnelle Immunrekonstitution von zytotoxischen T-Zellen deutlich die Überlebenschance erhöht. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte auch die Rekonstitution naiver, memory und aktivierte T-Zellen bei dem Treosulfan-Konditionierten Patienten verfolgt werden. Es war zu erkennen, dass bis zum Monat 9 nach Transplantation sowohl bei den T-Helfer-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) als auch bei den zytotoxischen T-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) vor allem die Gedächtniszellen (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) dominierten. Das die ersten T-Zellen die im peripheren Blut nach Transplantation erscheinen vom Gedächtnistyp sind, ist auch in der Literatur zu finden (Eyrich *et al.* 2003). Diese Gedächtniszellen entwickeln sich aus den im Transplantat enthaltenen T-Vorläufer-Zellen. Bis zum Monat 9 nach Transplantation waren die naiven und aktivierten T-Zellen noch nicht regeneriert. Allerdings war ein erster Take der regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) zu verzeichnen, was z. B. zum Schutz vor GvHD beitragen kann (Atanackovic *et al.* 2008)

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Treosulfan-Patient mit der Rekonstitution seiner zytotoxischen T-Zellen zum Teil deutlich unter derer der Vergleichsgruppe blieb. Allerdings kann dies nur als Fallbeispiel angesehen werden, was keine allgemeine Gültigkeit besitzen muss. Dafür wäre eine Beobachtung mit größeren Patientengruppen nötig, was derzeit nicht möglich ist, da bisher nur sehr vereinzelt pädiatrische Patienten mit Treosulfan konditioniert werden.

## 6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Leukämiezellen von pädiatrischen Patienten mit Akuten Leukämien zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in vitro* und erste *in vivo* Untersuchungen durchgeführt:

### 1. *In vitro* Untersuchungen

Zuerst wurde eine durchflusszytometrische Methode optimiert zum Nachweis der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf maligne Zellen pädiatrischer Patienten mit Akuten Leukämien. Mit diesem durchflusszytometrischen Assay war es möglich, die Zytotoxizität auf maligne von der auf nicht maligne Zellen zu unterscheiden. Dies war unerlässlich, da in den frisch isolierten Leukämiezellen der Patienten bis zu 55% normale Lymphozyten enthalten waren. Darüber hinaus erlaubte diese Methode die simultane Bestimmung der Zell-Apoptose in jeder Probe.

An Leukämie-Zelllinien wurde dieser multiparametrische Assay anschließend mit dem MTT-Assay verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung von Zytotoxizitäten mit beiden Methoden an den Zelllinien Molt 4/8 und H9 gut korrelierte ( $r \geq 0,95$ ). Für das Arbeiten mit Patientenmaterial wurde ausschließlich die durchflusszytometrische Methode angewendet, da in den Proben der Patienten die Differenzierung zwischen leukemischen Zellen und normalen Lymphozyten essentiell war. In den Leukämie-Zelllinien Molt4/8, H9 und K562 zeigte sich, dass Treosulfan eine stärkere Zytotoxizität zeigte als Busulfan.

In die Untersuchungen frischer Leukämiezellen pädiatrischer Patienten mit Akuten Leukämien konnten 24 Proben unterschiedlicher Leukämien (cALL, reife B-ALL, reife T-ALL, AML) und unterschiedlicher Erkrankungszeitpunkte (bei Diagnose oder bei Rezidiv) eingeschlossen werden. In diesen Proben zeigte Treosulfan eine deutlich bessere Wirkung als Busulfan. Es wurde trotz des kleinen Patientenkollektivs deutlich, dass die T-ALL gegenüber der cALL sensitiver auf Treosulfan reagiert. Außerdem war die Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber der T-ALL signifikant höher als gegenüber c-ALL (Treosulfan:  $p=0,02$ , Busulfan:  $p=0,03$ ). Die  $IC_{50}$ -Werte stiegen vom Zeitpunkt der Diagnose (Median: Treosulfan: 11,45  $\mu\text{M}$ , Busulfan: 96,45  $\mu\text{M}$ ) über die Progression (Median: Treosulfan: 45,95  $\mu\text{M}$ , Busulfan: 253,75  $\mu\text{M}$ ) bis zum Rezidiv (Median: Treosulfan: 153,15  $\mu\text{M}$ , Busulfan: 223,3  $\mu\text{M}$ ) hin an, und zwar um das 8-fache bei Treosulfan und das 2,5-fache bei Busulfan. Der Unterschied der Zytotoxizität von

Treosulfan auf Leukämieproben zum Zeitpunkt der Diagnose gegenüber dem Rezidiv war statistisch signifikant ( $p=0,02$ ). Für Busulfan ergab sich für diese Untersuchungszeitpunkte keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,13$ ).

Vergleichend zu den Ergebnissen an frisch isolierten Leukämiezellen wurde die Wirkung von Treosulfan und Busulfan auf normale Lymphozytensubpopulationen und Stammzellen untersucht. Auch hier zeigte Treosulfan eine stärkere Zytotoxizität im Vergleich zu Busulfan. Insgesamt reagierten normale Lymphozyten sensitiver auf die Alkylanzien im Vergleich zu den Leukämiezellen (Mediane  $IC_{50}$ -Werte für Treosulfan und Busulfan auf Lymphozyten:  $12,3 \mu\text{M}$  und  $89,9 \mu\text{M}$ , auf Leukämieproben:  $30,6 \mu\text{M}$  und  $133 \mu\text{M}$  mit  $p=0,03$  und  $p=0,02$ ).

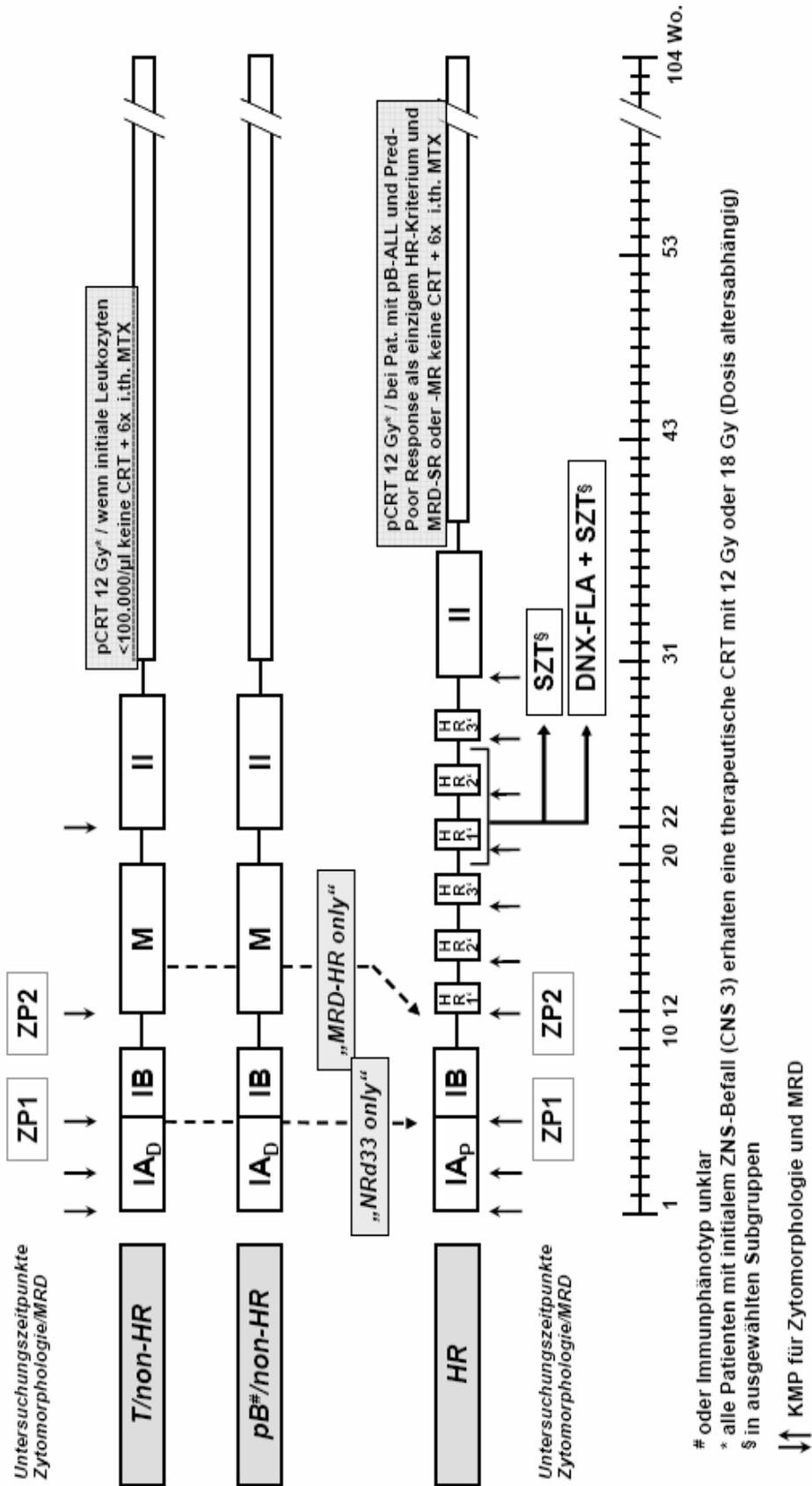
In einem weiteren Experiment sollte die Interaktion von Treosulfan und Busulfan mit Fludarabin untersucht werden. Fludarabin ist ein Purin-Analogen, das in der Pädiatrie in Kombination mit Alkylanzien zur Chemo-Konditionierung eingesetzt wird. Bei der Inkubation von Fludarabin mit Treosulfan-Konzentration größer  $1 \mu\text{M}$  war ein deutlicher Synergismus zu verzeichnen. Die Kombination von Fludarabin mit Busulfan ergab Antagonismus.

## ***2. In vivo Untersuchungen***

Es wurde die zelluläre Immunrekonstitution bei pädiatrischen Patienten mit AML ( $n=9$ ) nach allogener Knochenmarktransplantation überwacht. Ein Patient wurde mit Treosulfan konditioniert ( $n=1$ ), die anderen Patienten ( $n=8$ ) erhielten Busulfan zur Konditionierung. Die Rekonstitution der Leukozyten, B-Zellen, NK-Zellen und T-Helferzellen verlief in beiden Gruppen ähnlich. Ein signifikanter Unterschied konnte für die Rekonstitution der  $CD3^+CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen gezeigt werden, die bei dem Patienten, der mit Treosulfan konditioniert wurde, signifikant niedriger war im Vergleich zur Busulfangruppe. Da bei dem Patienten, der Treosulfan erhielt, die CRP-Werte über einen längeren Zeitraum erhöht waren und Infektionen die Rekonstitution von zytotoxischen T-Zellen maßgeblich beeinflussen, bietet dies eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied. Aussagen können jedoch nur mit einem größeren Patientenkollektiv getroffen werden.

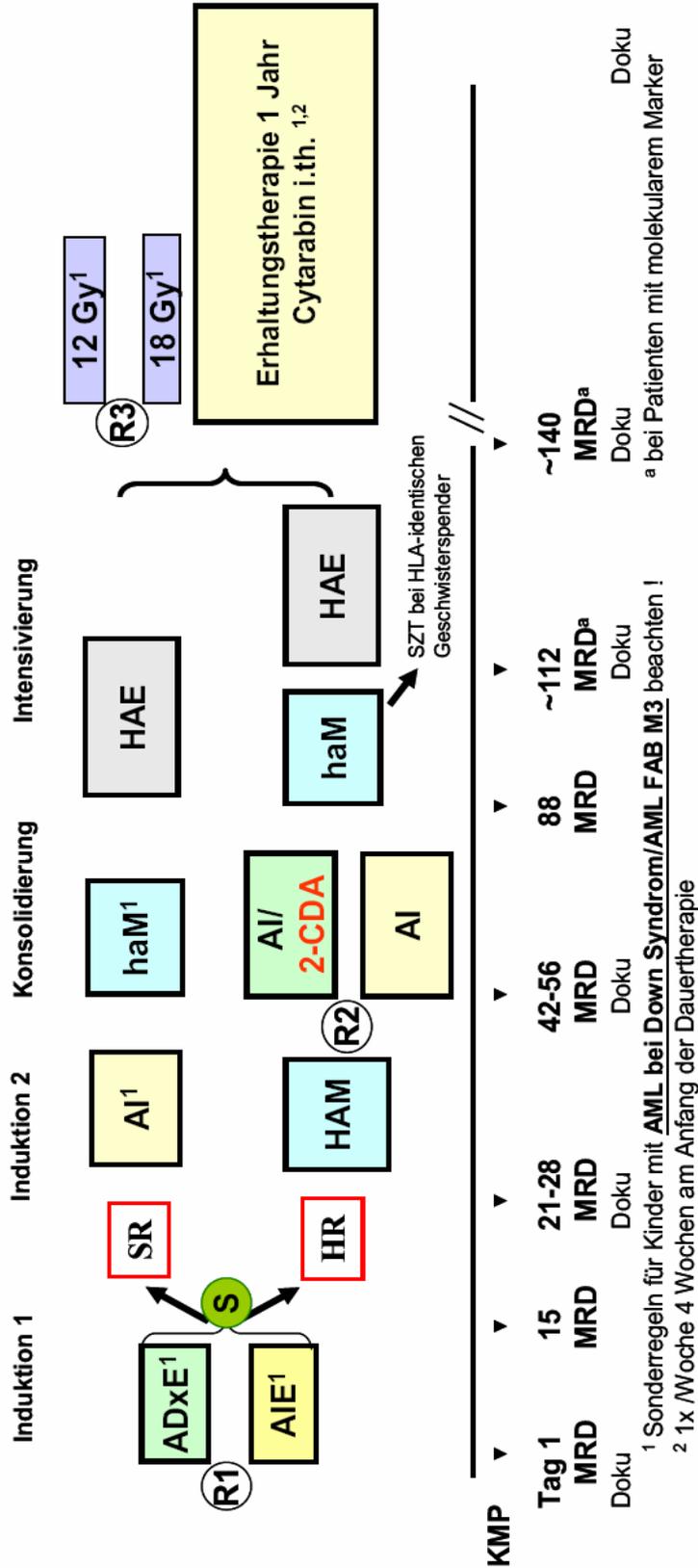
# 7. Anhang

## ALL - BFM 2000 Therapieempfehlung ab 26.09.2007 (Amendment vom 26.09.2007)



Therapieübersicht zur Studie ALL-BFM 2000 gültig ab 26.09.2007

# AML-BFM 2004



**(S)** Stratifizierung  
HAE: Hochdosis Cytarabin/ Etoposid-Phosphat  
**SR:** Standardtrisikogruppe  
**HR:** Hochtrisikogruppe  
**MRD:** Minimal residual disease  
**KMP:** Knochenmarkpunktion  
Doku: obligatorische Dokumentation des Therapieelements

**(R)** Randomisierung  
A: ARA-C; Cytarabin  
Dx: liposomales Daunorubicin; L-DNR  
I: Idarubicin  
E: Etoposid-Phosphat  
**2-CDA:** 2-Chloro-2-deoxyadenosin  
HA: Hochdosis Cytarabin  
M: Mitoxantron  
ha: mittelhochdosiertes Cytarabin

Therapieübersicht zur Studie AML-BFM 2004

---

**CD-Nomenklatur der eingesetzten Antikörper zur Durchflusszytometrie**


---

CD-Nr.	andere Bezeichnung/Molekül/Antigen	zelluläre Reaktivität
CD3	T3, CD3-Komplex	T
CD4	T4, MHC-Klasse II und HIV-Rezeptor	T <sub>H</sub> 1, T <sub>H</sub> 2, M, MΦ
CD8	T8, MHC-Klasse I-Rezeptor	T, NK
CD10	Neutrale Endopeptidase, gp100, Allgem. ALL-Antigen	cALL, Keimzentrums-B, G
CD13	Zink-Metalloprotease, Aminopeptidase N, gp150	M, G
CD14	LPS-/LBP-Rezeptor, gp55	M, G, DC, B
CD19	Bgp95, Slg-Familie, Komplex mit CD21 und CD81	B
CD25	α-Kette des IL-2-Rezeptors, Tac-Antigen	aktivierte T, Treg, B, M, reife DC
CD28	Tp44, CD80-Rezeptor, CD86-Rezeptor	einige T
CD34	My10, bindet CD62L (L-Selectin)	hämatopoetische Vorläufer, Eo
CD45	T200, Allgem. Leukozyten-Antigen	Leukozyten
CD45RA	restringierter T200, gp220, Isoform von CD45	naive T, B, M
CD45RO	restringierter T200, gp180, Isoform von CD45	T-Subpop, G, M, MΦ
CD56	NKH1, Isoform des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls	NK, akt. Lymphozyten
CD69	Aktivierungsinduzierendes Molekül	früh akt. T, B, MΦ
CD127	α-Kette des IL-7-Rezeptor	lymph. Vorläufer, pro B, reife T, M
CD133	AX133	Stammzellen
7-AAD	DNA-Interkalierend	alle Zellen
PI	DNA-Interkalierend	alle Zellen
Annexin-V	Phosphatidyl-Serin-Rezeptor	alle Zellen

---

B: B-Zellen;  
 Eo: eosinophile Granulozyten  
 DC: dendritische Zellen  
 G: neutrophile Granulozyten  
 M: Monozyten  
 MΦ: Makrophagen  
 NK: NK-Zellen  
 T: T-Zellen  
 T<sub>H</sub>: Helfer-T-Zellen  
 Treg: regulatorische T-Zellen

**Unterscheidung von apoptotischen und toten Zellen mittels AnnexinV und PI Färbung**

<b>Treosulfan</b> [ $\mu$ M]	<b>AnnexinV<sup>+</sup></b> [%]	<b>PI<sup>+</sup></b> [%]	<b><math>\Sigma</math> AnnexinV<sup>+</sup> / PI<sup>+</sup></b> [%]
0	2,8	7,9	12,4
1,0	8,6	8,2	13,8
2,5	21,9	18,6	44
5,0	37,4	25,9	65,1
7,5	49,9	35,1	76,8
10,0	36,8	48,2	82,49
20,0	29,8	59,2	84,8
30,0	20,9	77,2	89,9

Tabelle zu Abbildung 12, Kapitel 4.1.

**Vergleich des durchflusszytometrischen Assay mit dem MTT-Assay zur Bestimmung der Treosulfan-Zytotoxizität**

<b>Molt</b>			<b>H9</b>		
<b>Treo</b> [ $\mu$ M]	<b>MTT-Assay</b> [% tote Zellen]	<b>Durchfluss.- Assay</b> [% tote Zellen]	<b>Treo</b> [ $\mu$ M]	<b>MTT-Assay</b> [% tote Zellen]	<b>Durchfluss.- Assay</b> [% tote Zellen]
0	0	0	0	0	0
1,75	12,9	5,9	17,5	21,63	17,98
3,5	15,1	13,8	35,0	41,83	56,4
7,0	42,05	41,9	70,0	68,24	60,72
10,5	64,63	56,4	105	88,99	78,02
17,5	77,63	64,3	140	90,05	85,65
35	82,49	74,18	175	92,77	97,45

Tabelle zu Abbildung 13, Kapitel 4.1.

**Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Leukämie-Zelllinien**

	<b>Molt4/8</b>			<b>H9</b>			<b>K562</b>		
<b>Treo</b> [ $\mu$ M]	<b>Überleben</b> [%]			<b>Überleben</b> [%]			<b>Überleben</b> [%]		
0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	94,0	100,0	92,0	99,8
3,5	68,5	54,3	70,0						
7,0	61,1	50,2	66,8						
10,5	47,3	39,2	44,2						
17,5	30,5	26,1	32,4	75,5	92,0	88,4			
35,0				69,3	77,8	62,1			
70,0	13,3	15,7	20,4	38,1	52,4	42,3	79,4	84,2	69,1
105,0	12,8	10,7	7,6	20,6	26,6	28,2			
140,0				12,8	10,4	15,8	55,3	66,4	68,1
175,0				7,8	5,2	5,4			
210,0				5,3	5,9	4,000	25,500	30,8	20,2
280,0	2,5	5,3	7,2	4,2	3,2	9,200	20,600	28,1	19,6
350,0	2,5	2,9	3,5	4,3	2,2	1,100	16,300	15,3	11,2
525,0	2,1	2,2	0,9	2,3	1,1	1,200	12,300	12,1	10,2
<b>Bus</b> [ $\mu$ M]									
0,0	100,0	88,4	97,4	100,0	98,2	96,5	100,0	92,0	99,8
5,1	81,0	59,3	66,2						
10,15	69,2	48,2	55,3						
15,3	48,3	42,2	46,9						
20,3	49,2	36,4	43,8	89,2	70,3	75,8			
40,6									
80,8	40,7	30,1	29,8	80,9	66,2	68,2	79,4	84,2	69,1
122,0	33,0	20,2	25,6	60,2	50,3	48,2			
162,6				23,9	18,7	29,4	30,0	69,1	68,1
203,0	16,2	22,2	19,8						
244,0				10,6	12,8	25,9	25,5	38,4	20,2
325,2	10,5	12,4	18,8	9,1	4,8	13,3	20,6	28,1	19,6
406,0	5,6	6,8	4,7	6,3	5,2	7,7	16,3	15,3	11,2
609,0				5,8	4,2	6,6	12,3	12,1	10,2

Tabelle zu Abbildung 14, Kapitel 4.2.

**Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber der  
Zelllinie H9**

	24 h			48 h			72 h		
<b>Treo</b> [ $\mu$ M]	<b>Überleben</b> [%]			<b>Überleben</b> [%]			<b>Überleben</b> [%]		
0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
3,5	99,0	100,0	99,0				98,2	100,0	95,1
7,0	97,2	98,3	97,2				82,4	96,2	95,6
10,5	96,5	97,1	96,5				78,4	95,2	92,2
17,5	98,1	97,2	98,1				75,5	92,0	88,4
35,0	94,2	96,5	94,2				69,3	77,8	62,1
70,0	89,3	95,4	89,3	82,4	92,0	88,4	37,0	54,1	42,3
105,0	82,8	93,2	82,8	44,8	77,8	62,1	20,6	26,6	28,2
140,0	78,2	92,0	88,4	40,3	69,2	60,1	12,8	10,4	15,8
175,0	55,3	77,8	62,1	33,8	26,6	28,2	7,8	5,2	5,4
210,0	38,2	54,1	42,3	12,8	10,4	15,8	5,3	5,9	4,000
280,0	36,2	26,6	28,2	7,8	5,2	5,4	4,2	3,2	9,2
350,0	23,8	10,4	15,8	5,3	5,9	4,0	4,3	2,2	1,1
525,0	17,2	5,2	5,4	4,2	3,2	9,2	2,3	1,1	1,2
<b>Bus</b> [ $\mu$ M]									
0,0	100,00	100,0	100,0	100,00	100,0	100,0	100,00	100,0	100,0
5,1									
10,15									
15,3									
20,3	99,10	98,3	97,4	98,20	96,2	95,4	89,20	70,3	75,8
40,6									
80,8	94,30	89,2	96,3	93,20	78,3	79,9	80,90	66,2	68,2
122,0	87,20	81,3	85,3	81,20	62,8	70,3	60,20	50,3	48,2
162,6	83,40	77,8	80,1	57,30	44,2	41,3	23,90	18,7	29,4
203,0									
244,0	24,60	22,8	33,4	22,80	21,4	23,2	10,60	12,8	25,9
325,2				9,30	14,5	19,8	9,10	4,8	13,3
406,0	12,40	13,8	20,2	8,70	4,5	12,1	6,28	5,2	7,7
609,0	10,90	8,7	19,2	7,40	2,3	10,1	5,80	4,2	6,6

Tabelle zu Abbildung 15, Kapitel 4.2.

### Interaktion von Treosulfan bzw. Busulfan mit Fludarabin

Fraction affected	Treosulfan		Busulfan	
	mutual exclusive	mutual non-exclusive	mutual exclusive	mutual non-exclusive
0,260	3,000			
0,275	2,750			
0,290	2,500	3,000		
0,260	3,000			
0,275	2,750			
0,290	2,500	3,000		
0,320	2,150			
0,324		2,405		
0,359		2,040		
0,361	1,801			
0,415	1,442			
0,420		1,610		
0,450		1,400	3,000	
0,480	1,100	1,250	2,700	
0,510	1,000	1,100	2,430	3,000
0,540	0,930	1,000	2,230	
0,570	0,860	0,900	2,050	2,350
0,600	0,790	0,810	1,880	2,100
0,630		0,750		1,900
0,660		0,700	1,550	1,700
0,690	0,620	0,640	1,400	
0,720	0,570	0,590	1,300	
0,735			1,211	
0,740	0,530	0,545		
0,750				1,270
0,780	0,490	0,509	1,100	1,150
0,810	0,460	0,470	1,040	1,049
0,840	0,440	0,450	0,970	0,979
0,870	0,415	0,420	0,930	0,935
0,900	0,390	0,400	0,900	
0,930			0,860	0,864
0,960			0,825	0,827

Tabelle zu Abbildung 17, Kapitel 4.4.

### Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Neuroblastom-Zelllinien

	<b>SH-SY-5Y</b>	<b>Greif</b>
<b>Treo</b> [ $\mu\text{M}$ ]	<b>Überleben</b> [%]	<b>Überleben</b> [%]
0,0	100,0	100,0
3,5	54,9	44,6
17,5	32,9	1,1
35,0	28,9	1,0
70,0		1,0
175,0	1,0	1,0
<b>Bus</b> [ $\mu\text{M}$ ]		
0,0	100,0	100,0
4,0	97,8	85,3
20,3	81,1	60,1
40,6	58,7	
80,8	4,1	42,8
203,0	0,8	16,4

Abbildung 18, Kapitel 4.5.

**Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber Lymphozyten und  
Stammzellen gesunder Spender**

Treosulfan [ $\mu\text{M}$ ]	T-Zellen Überleben [%]			NK-Zellen Überleben [%]		Stammzellen Überleben [%]
	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4	Spender 5	Spender 6
0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,2						66,4
0,4						58,2
0,6						42,4
0,8						24,2
1,0						12,1
1,75		96,6	96,6	51,4		2,8
3,5		93,5	93,5	44,3		2,7
8,7				33,1	53,4	2,6
17,5	34,7	78,4	78,4	21,7	22,3	2,0
35,0	17,9	60,1	53,4	20,1	15,3	1,9
87,0	5,1	26,0	30,1	20,7	12,4	1,7
174,0	3,2	19,3		23,2	9,3	
261,0	3,7	12,4	5,1	19,1	6,4	
348,0	4,6	6,8	1,4	12,4	2,3	
Busulfan [ $\mu\text{M}$ ]	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4	Spender 5	Spender 6
0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2,0						88,3
4,0						78,2
5,1	96,6		96,6	74,2	69,3	64,1
8,0						54,2
10,15	93,5	82,4	93,5	56,8	45,2	33,3
15,3	78,4		78,4	34,1	28,4	21,3
20,3		69,2		28,7	23,4	10,1
40,6				29,2	21,2	100,0
80,8	67,9	52,3		28,7	19,8	88,3
122,0		47,8	65,8	26,0	16,4	
162,6	31,4	19,8	33,1	22,4	16,0	
203,0		11,5		20,3	15,4	
244,0	5,1	2,5	5,1	17,6	13,8	
325,2	1,4	1,9	1,4			
406,0	1,3	2,2	1,3			
609,0	1,3	2,2	1,3			

Abbildungen 19 und 20, Kapitel 4.6.1 und 4.6.2.

**Zytotoxizität von Treosulfan bzw. Busulfan gegen frisch isolierte Leukämiezellen  
pädiatrischer Patienten bei Diagnose**

Treosulfan [µM]	Patienten bei Diagnose													
	1	2	3	4	5	6	13	14	15a	16	17	18	19a	21
0,000	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,175	47,1		100,0						80,2					
0,35	51,5	98,6	70,9	93,9	92,8	94,7	43,4			94,5	94,4	94,7	98,3	68,0
1,75		87,9		85,0	83,4	82,4	7,1	88,4	64,3	82,6	73,3	82,4	89,8	37,2
3,5	28,2	72,7		62,0	67,4	67,6	3,3	63,0	40,4	73,4	72,2	67,6	86,8	5,3
8,75		38,4		8,7	34,5	52,6			1,9	25,3		52,6	50,6	7,0
17,5	11,0	17,4	20,4	3,0	24,5	40,6	2,3	16,8	1,6	15,1	66,1	40,6	30,2	1,6
26,25		6,4		2,1	10,7					11,1				
35,0		7,8		2,3	16,4	37,7		3,8		2,9	62,8	37,7	17,8	2,6
70,0	6,7		1,5											
87,5		1,7		1,9	14,1	32,5		0,6	1,9	2,4	56,1	32,5	13,7	1,1
140,0														
175,0	9,6	1,8	1,2	1,7	11,9	22,6		0,7	1,9		41,7	22,6	9,7	1,1
210,0														
262,5						18,6					35,0	18,6	6,2	
Busulfan [µM]	1	2	3	4	5	6	13	14	15a	16	17	18	19a	21
0,000	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
5,10		100,0	94,0		87,80	98,3	99,3	90,70	90,4	99,3	105,70	95,0	99,30	88,5
10,15	73,4	100,0		99,40	81,50	96,3	88,2		77,3	94,9	98,80	94,7	97,20	93,0
15,30			92,0	96,80	66,60	94,2	79,3	87,30	53,9		102,50	88,9	96,40	89,7
20,30	55,5										97,20		95,30	67,3
40,60	60,8	88,7	66,3	79,30	67,90	82,4	66,3	42,30	45,6	78,2	98,20	88,9	94,40	52,4
80,80				50,30	52,30	76,3			27,8			76,3		42,1
122,0	16,3		46,3			50,1	25,7	22,30		56,4	85,70		83,20	29,4
162,6			15,7	13,90	45,70			14,30	13,2	44,3		33,9		
203,0	39,0	63,6		13,20			14,4			31,2		22,8		19,3
244,0		50,3	4,3		40,30	40,3	6,9					18,6		12,1
325,2	11,6	24,3	1,7	6,40	33,60	33,6			9,3	27,3		10,8	57,40	88,5
406,0	8,4	11,3		6,40	28,70	28,7	5,3	0,20	8,2	18,9	66,30	10,0	39,30	93,0
609,0				6,40	6,40		5,0	90,70		9,8	34,00	10,8	99,30	89,7

Abbildung 21, Kapitel 4.7., Teil Ergebnisse bei Diagnose

**Zytotoxizität von Treosulfan bzw. Busulfan gegen frisch isolierte Leukämiezellen  
pädiatrischer Patienten bei Rezidiv**

Treo [µM]	Patienten bei Rezidiv									
	7	8	9	10	11	12	15b	15c	19b	20
0,000	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,175								90,4	93,3	
0,35	90,4						42,0	81,0	87,5	
1,75	86,3						36,1	73,9	82,5	
3,5	50,4	77,3					19,4	62,0	73,2	
8,75		65,2					8,3	44,2	44,7	
17,5	6,6	53,9		63,4	53,4	72,9		33,8	31,0	87,70
26,25		39,4					5,2		29,8	
35,0	2,9	36,2		48,5	30,6	38,2				85,96
70,0	1,2		52,9	20,5	7,9	8,8	3,5			79,18
87,5		34,2								
140,0	1,2		21,9	14,2	8,9	3,8	3,3		15,2	46,50
175,0		24,3								
210,0	0,8		9,1	10,7	7,7	1,6			7,4	28,70
262,5		22,5						90,4	93,3	
Bus [µM]	7	8	9	10	11	12	15b	15c	19b	20
0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
5,10	100,0	100,0	100,0	100,0		99,8	80,2	95,3	94,1	80,00
10,15	98,3	99,6	100,0	88,3	99,30	99,2	76,8	92,4	93,4	
15,30		93,4					62,6	92,6	95,3	
20,30		84,5	99,1	86,3	89,20	95,3	57,4	93,0	95,5	
40,60	87,3						54,2	79,9	91,8	
80,80		77,2	87,3	78,3	72,80	88,3	40,3	54,9	94,9	
122,0	77,3						14,4	32,3	88,3	
162,6			78,3	49,9	49,80	79,2	6,3	29,8	78,2	
203,0		57,5		29,6	19,00		5,4	22,9		
244,0	50,2	53,3	64,4	18,1	14,00		4,0		64,2	58,30
325,2	20,1	39,4		14,9	11,00	70,3	2,7		60,1	42,80
406,0	5,3	15,1	59,3	8,8	11,00	50,1			42,3	34,00
609,0	1,6		28,3	1,0		32,3			31,1	19,90

Abbildung 21, Kapitel 4.7., Teil Ergebnisse bei Rezidiv

**Zytotoxizität von Treosulfan gegen Leukämiezellenpädiatrischer Patienten –  
Vergleich zwischen cALL und T-ALL**

	<b>Patienten mit T-ALL</b>												
<b>Treo [µM]</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15a</b>	<b>16</b>	<b>15b</b>	<b>15c</b>						<b>15c</b>	
0,000	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0						100,0	
0,175			80,2									90,4	
0,35	43,4			94,5	42,0	81,0						81,0	
1,75	7,1	88,4	64,3	82,6	36,1	73,9						73,9	
3,5	3,3	63,0	40,4	73,4	19,4	62,0						62,0	
8,75			1,9	25,3	8,3	44,2						44,2	
17,5	2,3	16,8	1,6	15,1		33,8						33,8	
26,25				11,1	5,2								
35,0		3,8		2,9									
70,0					3,5								
87,5		0,6	1,9	2,4									
140,0					3,3								
175,0		0,7	1,9										
	<b>Patienten mit cALL</b>												
<b>Treo [µM]</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3a</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	
0,000	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
0,175	47,1		100,0										
0,35	51,5	98,6	70,9	93,9	92,8	94,7	90,4						
1,75		87,9		85,0	83,4	82,4	86,3						
3,5	28,2	72,7		62,0	67,4	67,6	50,4	77,3					
8,75		38,4		8,7	34,5	52,6		65,2					
17,5	11,0	17,4	20,4	3,0	24,5	40,6	6,6	53,9		63,4	53,4	72,9	
26,25		6,4		2,1	10,7			39,4					
35,0		7,8		2,3	16,4	37,7	2,9	36,2		48,5	30,6	38,2	
70,0	6,7		1,5				1,2		52,9	20,5	7,9	8,8	
87,5		1,7		1,9	14,1	32,5		34,2					
140,0							1,2		21,9	14,2	8,9	3,8	
175,0	9,6	1,8	1,2	1,7	11,9	22,6		24,3					

Abbildung 23, Kapitel 4.7.

**Graphische Darstellung der Zytotoxizität von Treosulfan gegen Leukämiezellen  
jeweils eines pädiatrischen Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der  
Erkrankung**

Treo [ $\mu$ M]	Überleben [%]				
	Patient 15			Patient 19	
	Diagnose	Rezidiv	Blastenpersistenz	Diagnose	Tag 15
0,00	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,175	80,2		90,4		93,3
0,35		42,0	81,0	98,3	87,5
1,75	64,3	36,1	73,9	89,8	82,5
3,50	40,4	19,4	62,0	86,8	73,2
8,75	1,9	8,3	44,2	50,6	44,7
17,50	1,6		33,8	30,2	31,0
26,25		5,2			29,8
35,00				17,8	
70,00		3,5			
87,50	1,9			13,7	
140,0		3,3	16,4		15,2
175,0	1,9			9,7	

Abbildung 25, Kapitel 4.7.

---

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

---

Abbildung	Titel	Seite
1	Strukturformel Busulfan (Myleran ®, Busilvex®)	8
2	Schema der Metabolisierung von Busulfan	9
3	Kalottenmodell von Treosulfan	13
4	Aktivierung von Treosulfan über ein Monoepoxid zum Diepoxid	14
5	T-Zell-Aktivierung und –Interaktion des zellulären Immunsystems bei Alloreaktivität	28
6	Übersicht der Infektionen nach Transplantation	31
7	Aufbau eines 4-farb Durchflusszytometer	45
8	Dem MTT-Assay zugrunde liegende Reaktion	47
9	Gatingstrategie für die Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen und toten Zellen in Leukämieproben pädiatrischer Patienten	50
10	Apoptose-Kaskade	52
11	Durchflusszytometrische Plots von apoptotischen und toten Zellen nach Treosulfan-Inkubation	57
12	Unterscheidung von apoptotischen und toten Zellen mittels AnnexinV und PI Färbung	58
13	Vergleich des durchflusszytometrischen Assay mit dem MTT-Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität von Treosulfan gegenüber Leukämie-Zelllinien	59
14	Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Leukämie-Zelllinien	60
15	Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber der Zelllinie H9	61
16	Induktion der Apoptose durch Treosulfan	62
17	Interaktion von Treosulfan bzw. Busulfan mit Fludarabin	63
18	Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Neuroblastom-Zelllinien	64
19	Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber gesunden Lymphozytengesunder Spender	67
20	Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan gegenüber aufgereinigter Stammzellen	68
21	Zytotoxizität von Treosulfan bzw. Busulfan gegen frisch isolierte Leukämiezellen pädiatrischer Patienten	71

---

---

<b>22</b>	Vergleich der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Leukämiezellen pädiatrischer Patienten zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten	<b>72</b>
<b>23</b>	Zytotoxizität von Treosulfan gegenüber Leukämiezellen pädiatrischer Patienten- Vergleich zwischen cALL und T-ALL	<b>72</b>
<b>24</b>	Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf Leukämiezellen pädiatrischer Patienten bei T-ALL und cALL	<b>73</b>
<b>25</b>	Zytotoxizität von Treosulfan gegen Leukämiezellen jeweils eines pädiatrischen Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung	<b>74</b>
<b>26</b>	Vergleich der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan auf leukämische Zellen pädiatrischer Patienten bei Rezidiv und auf Lymphozyten gesunder Spender	<b>75</b>
<b>27</b>	Vergleich der Immunrestitution der Leukozyten (WBC) nach KM-Transplantation bei pädiatrischen Patienten mit AML	<b>77</b>
<b>28</b>	Vergleich der Immunrestitution der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen/ $\mu$ l nach KM-Transplantation bei pädiatrischen Patienten mit AML	<b>77</b>
<b>29</b>	Vergleich der Immunrestitution der CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen/ $\mu$ l nach KM-Transplantation bei pädiatrischen Patienten mit AML	<b>78</b>
<b>30</b>	Vergleich der Immunrestitution der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Helfer-Zellen/ $\mu$ l nach KM-Transplantation bei pädiatrischen Patienten mit AML-Erkrankung	<b>78</b>
<b>31</b>	Vergleich der Immunrestitution der CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> NK-Zellen/ $\mu$ l nach KM-Transplantation bei pädiatrischen Patienten mit AML	<b>79</b>
<b>32</b>	Vergleich der Immunrestitution der CD19 <sup>+</sup> B-Zellen/ $\mu$ l nach KM-Transplantation mit AML	<b>79</b>
<b>33</b>	Immunrestitution weiterer Lymphozytensubpopulationen bezogen auf CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Helfer-Zellen und zytotoxische CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	<b>81</b>

---

---

<b>Tabelle</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
<b>1</b>	Vergleich der pharmakokinetischen Parameter von oralem Busulfan bei Kindern und Erwachsenen	<b>10</b>
<b>2</b>	AUC nach oraler Busulfan-Gabe bei Erwachsenen und Kindern nach einer Standarddosierung von 1 mg/kg	<b>11</b>
<b>3</b>	Akute Toxizität für Treosulfan und Busulfan	<b>18</b>
<b>4</b>	Pharmakokinetische Parameter nach Treosulfan-Infusion vor allogener Stammzell-Transplantation	<b>20</b>
<b>5</b>	Risikofaktoren für eine Transplantat-assoziierte Mortalität (TMR) und die Inzidenz für das Auftreten eines Rezidiv	<b>27</b>
<b>6</b>	Pharmakologische Prophylaxe von GvHD	<b>33</b>
<b>7</b>	Zusammenfassung der verwendeten Proben zur <i>in vitro</i> Untersuchung der Zytotoxizität von Treosulfan und Busulfan	<b>39</b>
<b>8</b>	Zusammenfassung der Patienten zur <i>in vivo</i> Untersuchung zur Immunrestitution nach Treosulfan- bzw. Busulfan-Konditionierung, bei AML Erkrankung nach mindestens erstem Rediziv	<b>40</b>
<b>9</b>	Durchflusszytometrische Panels zur Bestimmung der Immunrestitution	<b>54</b>
<b>10</b>	Zusammenfassung der medianen IC <sub>50</sub> -Werte mit Standardabweichungen für Treosulfan und Busulfan auf Leukämie-Zelllinien	<b>60</b>
<b>11</b>	Zusammenfassung der IC <sub>50</sub> -Werte für Treosulfan auf die Tumor-Zelllinien SH-SY5Y und UKF-NB3	<b>65</b>
<b>12</b>	IC <sub>50</sub> -Werte für Treosulfan und Busulfan auf aufgereinigte T- und NK-Zellen	<b>66</b>
<b>13</b>	IC <sub>50</sub> -Werte für Treosulfan und Busulfan auf aufgereinigte hämatopoetische Stammzellen	<b>67</b>
<b>14</b>	IC <sub>50</sub> -Werte für Treosulfan und Busulfan in Leukämiezellen pädiatrischer Patienten mit akuter Leukämie	<b>70</b>
<b>15</b>	Zusammenfassung der in der Literatur veröffentlichten IC <sub>50</sub> -Werte für Treosulfan und Busulfan auf Zelllinien	<b>88</b>

---

---

## 9. Literaturverzeichnis

- Abdulla, U. M., HH. et al. 1988. Application documents for marketing authorisation of treosulfan Capsules 250 mg in UK, Part III and IV: Animal studies and animal toxicology.
- Alyea, E. P., R. J. Soiffer, C. Canning, D. Neuberg, R. Schlossman, C. Pickett, H. Collins, Y. Wang, K. C. Anderson, and J. Ritz. 1998. Toxicity and efficacy of defined doses of CD4(+) donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. *Blood* 91: 3671-80.
- American Society for Blood and Marrow Transplantation: Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. 2000.: 659-757.
- Apperley, J. F., L. Jones, G. Hale, H. Waldmann, J. Hows, Y. Rombos, C. Tsatalas, R. E. Marcus, A. W. Goolden, E. C. Gordon-Smith, and et al. 1986. Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse. *Bone Marrow Transplant* 1: 53-66.
- Arcese, W., F. R. Mauro, G. Alimena, F. Lo Coco, M. R. De Cuiia, M. Screnci, A. P. Iori, E. Montefusco, and F. Mandelli. 1990. Interferon therapy for Ph1 positive CML patients relapsing after T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 5: 309-15.
- Atanackovic D, Cao Y, Luetkens T, Panse J, Faltz C, Arfsten J, Bartels K, Wolschke C, Eiermann T, Zander AR, Fehse B, Bokemeyer C, Kroger N. 2008. CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cells reconstitute and accumulate in the bone marrow of patients with multiple myeloma following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 93: 423-30
- Attal, M., D. Blaise, G. Marit, C. Payen, M. Michallet, J. P. Vernant, C. Sauvage, X. Troussard, G. Nedellec, J. Pico, and et al. 1995. Consolidation treatment of adult acute lymphoblastic leukemia: a prospective, randomized trial comparing allogeneic versus autologous bone marrow transplantation and testing the impact of recombinant interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation. BGMT Group. *Blood* 86: 1619-28.
- Autran, B., M. Malphettes, N. Dhedin, G. Gorochov, V. Leblond, and P. Debre. 1997. Studies of T cell reconstitution after hematopoietic stem cell transplant. *Hematol Cell Ther* 39: 252-6.
- Bader, P., T. Klingebiel, A. Schaudt, U. Theurer-Mainka, R. Handgretinger, P. Lang, D. Niethammer, and J. F. Beck. 1999. Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia* 13: 2079-86.
- Bader, P., D. Niethammer, A. Willasch, H. Kreyenberg, and T. Klingebiel. 2005. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 35: 107-19.
- Barfield, R. C., M. Otto, J. Houston, M. Holladay, T. Geiger, J. Martin, T. Leimig, P. Gordon, X. Chen, and R. Handgretinger. 2004. A one-step large-scale method for T- and B-cell depletion of mobilized PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy* 6: 1-6.
- Barnes, J. R., and K. E. Ranta. 1972. The metabolism of dimethylformamide and dimethylacetamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 23: 271-6.

- 
- Barrett, A. J., and V. Malkovska. 1996. Graft-versus-leukaemia: understanding and using the alloimmune response to treat haematological malignancies. *Br J Haematol* 93: 754-61.
- Beck, O., C. Seidl, T. Lehrnbecher, H. Kreyenberg, D. Schwabe, T. Klingebiel, E. Seifried, P. Bader, and U. Koehl. 2006. Quantification of chimerism within peripheral blood, bone marrow and purified leukocyte subsets: comparison of singleplex and multiplex PCR amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Eur J Haematol* 76: 237-44.
- Beelen, D. W., R. Trenschele, J. Casper, M. Freund, R. A. Hilger, M. E. Scheulen, N. Basara, A. A. Fauser, B. Hertenstein, H. A. Mylius, J. Baumgart, U. Pichlmeier, J. R. Hahn, and E. Holler. 2005. Dose-escalated treosulphan in combination with cyclophosphamide as a new preparative regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with an increased risk for regimen-related complications. *Bone Marrow Transplant* 35: 233-41.
- Behrens, F., A. Himsel, S. Rehart, J. Stanczyk, B. Beutel, S. Y. Zimmermann, U. Koehl, B. Moller, S. Gay, J. P. Kaltwasser, J. M. Pfeilschifter, and H. H. Radeke. 2007. Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66: 1151-6.
- Behringer, D., H. Bertz, C. Schmoor, C. Berger, A. Dwenger, and J. Finke. 1999. Quantitative lymphocyte subset reconstitution after allogeneic hematopoietic transplantation from matched related donors with CD34+ selected PBPC grafts unselected PBPC grafts or BM grafts. *Bone Marrow Transplant* 24: 295-302.
- Bensinger, W. I., R. Clift, P. Martin, F. R. Appelbaum, T. Demirer, T. Gooley, K. Lilleby, S. Rowley, J. Sanders, R. Storb, and C. D. Buckner. 1996. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematologic malignancies: a retrospective comparison with marrow transplantation. *Blood* 88: 2794-800.
- Benyunes, M. C., C. Massumoto, A. York, C. M. Higuchi, C. D. Buckner, J. A. Thompson, F. B. Petersen, and A. Fefer. 1993. Interleukin-2 with or without lymphokine-activated killer cells as consolidative immunotherapy after autologous bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 12: 159-63.
- Bethge W. A., Faul C. Bornhäuser M., Stuhler G., Beelen D. W., Lang P., Stelljes M., Vogel W., Hägele M., Handgretinger R., Kanz L. 2007 Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: An update. *Blood Cells Mol Dis*, Sep 13 Epub ahead of print
- Bhagwatwar, H. P., S. Phadungpojna, D. S. Chow, and B. S. Andersson. 1996. Formulation and stability of busulfan for intravenous administration in high-dose chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 37: 401-8.
- Bishop, J. B., and J. S. Wassom. 1986. Toxicological review of busulfan (Myleran). *Mutat Res* 168: 15-45.
- Blaise, D., D. Maraninchi, E. Archimbaud, J. Reiffers, A. Devergie, J. P. Jouet, N. Milpied, M. Attal, M. Michallet, N. Ifrah, and et al. 1992. Allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of a busulfan-Cytosar versus Cytosar-total body irradiation as preparative regimen: a report from the Group d'Etudes de la Greffe de Moelle Osseuse. *Blood* 79: 2578-82.
- Blaise, D., D. Maraninchi, M. Michallet, J. Reiffers, J. P. Jouet, N. Milpied, A. Devergie, M. Attal, J. J. Sotto, M. Kuentz, N. Ifrah, C. Dauriac, P. Bordignon, N. Gratecos, F. Guilhot, D. Guyotat, E. Gluckman, and J. P. Vernant. 2001. Long-term follow-up of a randomized trial comparing the combination of cyclophosphamide with total body irradiation or busulfan as
-

- 
- conditioning regimen for patients receiving HLA-identical marrow grafts for acute myeloblastic leukemia in first complete remission. *Blood* 97: 3669-71.
- Bleyer, W. A. 1988. Central nervous system leukemia. *Pediatr Clin North Am* 35: 789-814.
- Boccardo, M., A. Palumbo, S. Bringhen, F. Merletti, G. Ciccone, L. Richiardi, C. Rus, A. Bertola, L. Giaccone, P. Omede, and P. Musto. 2002. Oral melphalan at diagnosis hampers adequate collection of peripheral blood progenitor cells in multiple myeloma. *Haematologica* 87: 846-50.
- Bochennek, K., C. Andreas, C. Margraf, H. Stahlkamp, S. Zimmermann, R. Esser, D. Schwabe, T. Klingebiel, H. P. Gruttner, and U. Koehl. 2005. Hourly monitoring of circulating CD34+ cells to optimize timing of autologous apheresis in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 36: 481-9.
- Boeckh, M., T. A. Gooley, D. Myerson, T. Cunningham, G. Schoch, and R. A. Bowden. 1996. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood* 88: 4063-71.
- Boissel, N., M. F. Auclerc, V. Lheritier, Y. Perel, X. Thomas, T. Leblanc, P. Rousselot, J. M. Cayuela, J. Gabert, N. Fegueux, C. Piguët, F. Huguet-Rigal, C. Berthou, J. M. Boiron, C. Pautas, G. Michel, D. Fiere, G. Leverger, H. Dombret, and A. Baruchel. 2003. Should adolescents with acute lymphoblastic leukemia be treated as old children or young adults? Comparison of the French FRALLE-93 and LALA-94 trials. *J Clin Oncol* 21: 774-80.
- Bojko, P., M. E. Scheulen, R. Hilger, C. Oberhoff, A. E. Schindler, and S. Seeber. 2001. High-dose chemotherapy with peripheral blood stem cell transplantation for patients with advanced ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 243-50.
- Bolinger, A. M., A. B. Zangwill, J. T. Slattery, D. Glidden, K. DeSantes, L. Heyn, L. J. Risler, B. Bostrom, and M. J. Cowan. 2000. An evaluation of engraftment, toxicity and busulfan concentration in children receiving bone marrow transplantation for leukemia or genetic disease. *Bone Marrow Transplant* 25: 925-30.
- Bonini, C., G. Ferrari, S. Verzeletti, P. Servida, E. Zappone, L. Ruggieri, M. Ponzoni, S. Rossini, F. Mavilio, C. Traversari, and C. Bordignon. 1997. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276: 1719-24.
- Bosanquet, A. G. 1994. Efficacy of treosulfan against fresh human tumor cells in vitro. Bath analytic report no 93/23. medac, Hamburg.
- Bosanquet, A. G., and A. R. Burlton. 1994. Airborne cytotoxicity in the DiSC assay caused by solutions of treosulfan but not busulphan. *Cytotechnology* 16: 131-6.
- Boyington, J. C., A. N. Riaz, A. Patamawenu, J. E. Coligan, A. G. Brooks, and P. D. Sun. 1999. Structure of CD94 reveals a novel C-type lectin fold: implications for the NK cell-associated CD94/NKG2 receptors. *Immunity* 10: 75-82.
- Boyse, E. A., L. J. Old, and I. Chouroulinkov. 1964. Cytotoxic Test for Demonstration of Mouse Antibody. *Methods Med Res* 10: 39-47.
- Bozza, S., R. Gaziano, A. Spreca, A. Bacci, C. Montagnoli, P. di Francesco, and L. Romani. 2002. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol* 168: 1362-71.
-

- 
- Breems, D. A., W. L. Van Putten, P. C. Huijgens, G. J. Ossenkoppele, G. E. Verhoef, L. F. Verdonck, E. Vellenga, G. E. De Greef, E. Jacky, J. Van der Lelie, M. A. Boogaerts, and B. Lowenberg. 2005. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* 23: 1969-78.
- Brodsky, R., D. Topolsky, P. Crilley, S. Bulova, and I. Brodsky. 1990. Frequency of veno-occlusive disease of the liver in bone marrow transplantation with a modified busulfan/cyclophosphamide preparative regimen. *Am J Clin Oncol* 13: 221-5.
- Brookes, P., and P. D. Lawley. 1961. The reaction of mono- and di-functional alkylating agents with nucleic acids. *Biochem J* 80: 496-503.
- Brooks, A. G., F. Borrego, P. E. Posch, A. Patamawenu, C. J. Scorzelli, M. Ulbrecht, E. H. Weiss, and J. E. Coligan. 1999. Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. *J Immunol* 162: 305-13.
- Buchner, T., W. Hiddemann, B. Wormann, H. Loffler, W. Gassmann, T. Haferlach, C. Fonatsch, D. Haase, C. Schoch, D. Hossfeld, E. Lengfelder, C. Aul, A. Heyll, G. Maschmeyer, W. D. Ludwig, M. C. Sauerland, and A. Heinecke. 1999. Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood* 93: 4116-24.
- Buggia, I., F. Locatelli, M. B. Regazzi, and M. Zecca. 1994. Busulfan. *Ann Pharmacother* 28: 1055-62.
- Callahan, L. T., 3rd, D. Martinez, S. Marburg, R. L. Tolman, and D. R. Galloway. 1984. Toxoids of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin-A: photoaffinity inactivation of purified toxin and purified toxin derivatives. *Infect Immun* 43: 1019-26.
- Cao, T. M., C. Kusnierz-Glaz, F. Valone, K. E. Stockerl-Goldstein, W. W. Hu, L. Johnston, K. G. Blume, S. Strober, and R. S. Negrin. 2001. Rapid engraftment after allogeneic transplantation of density-enriched peripheral blood CD34+ cells in patients with advanced hematologic malignancies. *Cancer* 91: 2205-13.
- Casper, J., W. Knauf, T. Kiefer, D. Wolff, B. Steiner, U. Hammer, R. Wegener, H. D. Kleine, S. Wilhelm, A. Knopp, G. Hartung, G. Dolken, and M. Freund. 2004. Treosulfan and fludarabine: a new toxicity-reduced conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 103: 725-31.
- Cave, H., J. van der Werff ten Bosch, S. Suci, C. Guidal, C. Waterkeyn, J. Otten, M. Bakus, K. Thielemans, B. Grandchamp, and E. Vilmer. 1998. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med* 339: 591-8.
- Chaney, S. G., and A. Sancar. 1996. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst* 88: 1346-60.
- Chao, N. J., C. X. Liu, B. Rooney, B. J. Chen, G. D. Long, J. J. Vredenburgh, A. Morris, C. Gasparetto, and D. A. Rizzieri. 2002. Nonmyeloablative regimen preserves "niches" allowing for peripheral expansion of donor T-cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 8: 249-56.
-

- 
- Chessells, J. M., O. B. Eden, C. C. Bailey, J. S. Lilleyman, and S. M. Richards. 1994. Acute lymphoblastic leukaemia in infancy: experience in MRC UKALL trials. Report from the Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. *Leukemia* 8: 1275-9.
- Chessells, J. M., G. Harrison, S. M. Richards, C. C. Bailey, F. G. Hill, B. E. Gibson, and I. M. Hann. 2001. Down's syndrome and acute lymphoblastic leukaemia: clinical features and response to treatment. *Arch Dis Child* 85: 321-5.
- Chessells, J. M., P. Veys, H. Kempster, P. Henley, A. Leiper, D. Webb, and I. M. Hann. 2003. Long-term follow-up of relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 123: 396-405.
- Chou, T. C., and P. Talalay. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22: 27-55.
- Chou, T. C. T. P. 1988. Computerized simulation of dose reduction index (DRI) in synergistic drug combinations. *Pharmacologist* 30.
- Christensen, M. S., M. Heyman, M. Mottonen, B. Zeller, G. Jonmundsson, and H. Hasle. 2005. Treatment-related death in childhood acute lymphoblastic leukaemia in the Nordic countries: 1992-2001. *Br J Haematol* 131: 50-8.
- Chung, B., L. Barbara-Burnham, L. Barsky, and K. Weinberg. 2001. Radiosensitivity of thymic interleukin-7 production and thymopoiesis after bone marrow transplantation. *Blood* 98: 1601-6.
- Cinatl, J., M. Mainke, A. Weissflog, H. Rabenau, B. Kornhuber, and H. W. Doerr. 1993. In vitro differentiation of human neuroblastoma cells induced by sodium phenylacetate. *Cancer Lett* 70: 15-24.
- Claret, E. J., E. P. Alyea, E. Orsini, C. C. Pickett, H. Collins, Y. Wang, D. Neuberger, R. J. Soiffer, and J. Ritz. 1997. Characterization of T cell repertoire in patients with graft-versus-leukemia after donor lymphocyte infusion. *J Clin Invest* 100: 855-66.
- Clarke, M., P. Gaynon, I. Hann, G. Harrison, G. Masera, R. Peto, and S. Richards. 2003. CNS-directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: Childhood ALL Collaborative Group overview of 43 randomized trials. *J Clin Oncol* 21: 1798-809.
- Cole, R. J. Feb 10, 2003. Investigation of the potential to inhibit human CYP450-mediated metabolism in vitro. medac internal report study no. MDC/02. medac, Hamburg.
- Conter, V., M. Arico, M. G. Valsecchi, C. Rizzari, A. Testi, R. Miniero, M. T. Di Tullio, L. Lo Nigro, A. Pession, R. Rondelli, C. Messina, N. Santoro, P. G. Mori, G. De Rossi, P. Tamaro, D. Silvestri, A. Biondi, G. Basso, and G. Masera. 1998. Intensive BFM chemotherapy for childhood ALL: interim analysis of the AIEOP-ALL 91 study. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica. *Haematologica* 83: 791-9.
- Coustan-Smith, E., R. C. Ribeiro, P. Stow, Y. Zhou, C. H. Pui, G. K. Rivera, F. Pedrosa, and D. Campana. 2006. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 108: 97-102.
- Craddock, C., S. Tauro, P. Moss, and D. Grimwade. 2005. Biology and management of relapsed acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 129: 18-34.
- Daly, A., S. McAfee, B. Dey, C. Colby, L. Schulte, B. Yeap, R. Sackstein, N. J. Tarbell, D. Sachs, M. Sykes, and T. R. Spitzer. 2003. Nonmyeloablative bone marrow transplantation:
-

- 
- Infectious complications in 65 recipients of HLA-identical and mismatched transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 9: 373-82.
- de Vries, E., M. J. van Tol, R. L. van den Bergh, J. L. Waaijer, M. M. ten Dam, J. Hermans, and J. M. Vossen. 2000. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after paediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25: 267-75.
- Deeg, H. J., U. S. Schuler, H. Shulman, M. Ehram, U. Renner, C. Yu, R. Storb, and G. Ehninger. 1999. Myeloablation by intravenous busulfan and hematopoietic reconstitution with autologous marrow in a canine model. *Biol Blood Marrow Transplant* 5: 316-21.
- Di Nicolantonio, F., L. A. Knight, S. Di Palma, S. Sharma, P. A. Whitehouse, S. J. Mercer, P. A. Charlton, D. Norris, and I. A. Cree. 2004. Ex vivo characterization of XR11576 (MLN576) against ovarian cancer and other solid tumors. *Anticancer Drugs* 15: 849-60.
- Dix, S. P., J. R. Wingard, R. E. Mullins, I. Jerkunica, T. G. Davidson, C. E. Gilmore, R. C. York, L. S. Lin, S. M. Devine, R. B. Geller, L. T. Heffner, C. D. Hillyer, H. K. Holland, E. F. Winton, and R. Saral. 1996. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant* 17: 225-30.
- Dohring, C., D. Scheidegger, J. Samaridis, M. Cella, and M. Colonna. 1996. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* 156: 3098-101.
- Douek, D. C., R. D. McFarland, P. H. Keiser, E. A. Gage, J. M. Massey, B. F. Haynes, M. A. Polis, A. T. Haase, M. B. Feinberg, J. L. Sullivan, B. D. Jamieson, J. A. Zack, L. J. Picker, and R. A. Koup. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396: 690-5.
- Drabko, K., J. Zawitkowska-Klaczynska, B. Wojcik, M. Choma, A. Zaucha-Prazmo, J. Kowalczyk, E. Gorczyńska, J. Toporski, K. Kalwak, D. Turkiewicz, and A. Chybicka. 2005. Megachemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in children with Ewing's sarcoma. *Pediatr Transplant* 9: 618-21.
- Dressel, D., C. A. Ritter, B. Sperker, M. Grube, T. Maier, T. Klingebiel, W. Siegmund, J. F. Beck, and H. K. Kroemer. 2003. Busulfan induces activin A expression in vitro and in vivo: a possible link to venous occlusive disease. *Clin Pharmacol Ther* 74: 264-74.
- D'Sa, S., K. Peggs, A. Pizzey, S. Verfuërth, D. Thurai Sundaram, M. Watts, H. White, G. Hale, H. Waldmann, A. Goldstone, S. Mackinnon, and K. Yong. 2003. T- and B-cell immune reconstitution and clinical outcome in patients with multiple myeloma receiving T-cell-depleted, reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation with an alemtuzumab-containing conditioning regimen followed by escalated donor lymphocyte infusions. *Br J Haematol* 123: 309-22.
- Dumont-Girard, F., E. Roux, R. A. van Lier, G. Hale, C. Helg, B. Chapuis, M. Starobinski, and E. Roosnek. 1998. Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood* 92: 4464-71.
- Dunn, C. D. 1974. The chemical and biological properties of busulphan ("Myleran"). *Exp Hematol* 2: 101-17.
- Ehrsson, H., M. Hassan, M. Ehrnebo, and M. Beran. 1983. Busulfan kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 34: 86-9.
- Einsele, H. 2003. Antigen-specific T cells for the treatment of infections after transplantation. *Hematol J* 4: 10-7.
-

- 
- Elhasid, R., M. W. Ben Arush, S. Pollack, K. Tavor, S. Streichman, S. Postovsky, N. Haddad, and J. M. Rowe. 2000. Immune and hematopoietic reconstitution after transplantation of cord blood progenitor cells: case report and review of the literature. *Leukemia* 14: 931-4.
- Estey, E. H. 2000. Treatment of relapsed and refractory acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 14: 476-9.
- Estey, E.H. 2001. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer* 92: 1059-73.
- Evans, A. E., E. S. Gilbert, and R. Zandstra. 1970. The increasing incidence of central nervous system leukemia in children. (Children's Cancer Study Group A). *Cancer* 26: 404-9.
- Eyrich, M., P. Lang, S. Lal, P. Bader, R. Handgretinger, T. Klingebiel, D. Niethammer, and P. G. Schlegel. 2001. A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a paediatric cohort following transplantation of positively selected human leucocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors. *Br J Haematol* 114: 422-32.
- Eyrich, M., C. Leiler, P. Lang, K. Schilbach, M. Schumm, P. Bader, J. Greil, T. Klingebiel, R. Handgretinger, D. Niethammer, and P. G. Schlegel. 2003. A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34+ peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant* 32: 379-90.
- Eyrich, M., G. Wollny, N. Tzaribashev, K. Dietz, D. Brugger, P. Bader, P. Lang, K. Schilbach, B. Winkler, D. Niethammer, and P. G. Schlegel. 2005. Onset of thymic recovery and plateau of thymic output are differentially regulated after stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant* 11: 194-205.
- Fachinformation Myleran Glaxo Wellcome, H. 1999. Fachinformation Myleran 2 mg Filmtabletten.
- Fearon, E. R., P. J. Burke, C. A. Schiffer, B. A. Zehnbauer, and B. Vogelstein. 1986. Differentiation of leukemia cells to polymorphonuclear leukocytes in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 315: 15-24.
- Feit, P. W. 1964. 1,4-Bismethanesulfonates of the Stereoisomeric Butanetetraols and Related Compounds. *J Med Chem* 7: 14-7.
- Feit, P. W. 1982. Treosulfan: "pro drug" für Epoxid-Verbindungen und analytische Bestimmung im Serum und Urin des Hundes. *Symposien Hannover*, Karlsruhe.
- Feit, P. W., N. Rastrup-Andersen, and R. Matagne. 1970. Studies on epoxide formation from (2S,3S)-threitol 1,4-bismethanesulfonate. The preparation and biological activity of (2S,3S)-1,2-epoxy-3,4-butanediol 4-methanesulfonate. *J Med Chem* 13: 1173-5.
- Fennelly, J. 1977. Treosulfan (dihydroxybusulphan) in the management of ovarian carcinoma. *Br J Obstet Gynaecol* 84: 300-3.
- Ferguson, T. F., and C. Prottey. 1974. A simple and rapid method for assaying cytotoxicity. *Food Cosmet Toxicol* 12: 359-66.
- Ferrara, J. L., K. R. Cooke, and T. Teshima. 2003. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 78: 181-7.
- Feuchtinger, T., P. Lang, and R. Handgretinger. 2007. Adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 48: 244-55.
-

- 
- Fialkow, P. J., J. W. Singer, J. W. Adamson, R. L. Berkow, J. M. Friedman, R. J. Jacobson, and J. W. Moohr. 1979. Acute nonlymphocytic leukemia: expression in cells restricted to granulocytic and monocytic differentiation. *N Engl J Med* 301: 1-5.
- Fialkow, P. J., J. W. Singer, J. W. Adamson, K. Vaidya, L. W. Dow, J. Ochs, and J. W. Moohr. 1981. Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin. *Blood* 57: 1068-73.
- Fialkow, P. J., J. W. Singer, W. H. Raskind, J. W. Adamson, R. J. Jacobson, I. D. Bernstein, L. W. Dow, V. Najfeld, and R. Veith. 1987. Clonal development, stem-cell differentiation, and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 317: 468-73.
- Fichtner, I., M. Becker, and J. Baumgart. 2003. Antileukaemic activity of treosulfan in xenografted human acute lymphoblastic leukaemias (ALL). *Eur J Cancer* 39: 801-7.
- Filipovich, A. H., R. S. Shapiro, N. K. Ramsay, T. Kim, B. Blazar, J. Kersey, and P. McGlave. 1992. Unrelated donor bone marrow transplantation for correction of lethal congenital immunodeficiencies. *Blood* 80: 270-6.
- Fishman, D., G. Faulds, R. Jeffery, V. Mohamed-Ali, J. S. Yudkin, S. Humphries, and P. Woo. 1998. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102: 1369-76.
- Fry, T. J., and C. L. Mackall. 2005. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future. *Bone Marrow Transplant* 35 Suppl 1: S53-7.
- Fukushi, N., H. Arase, B. Wang, K. Ogasawara, T. Gotohda, R. A. Good, and K. Onoe. 1990. Thymus: a direct target tissue in graft-versus-host reaction after allogeneic bone marrow transplantation that results in abrogation of induction of self-tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6301-5.
- Gale, R. P., M. M. Horowitz, R. C. Ash, R. E. Champlin, J. M. Goldman, A. A. Rimm, O. Ringden, J. A. Stone, and M. M. Bortin. 1994. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med* 120: 646-52.
- Galimberti, M., P. Polchi, G. Lucarelli, C. Delfini, P. Politi, C. Giardini, D. Baronciani, and F. Manenti. 1987. Bone marrow transplantation in thalassemia after busulphan and cyclophosphamide. Report on 88 cases. *Ann N Y Acad Sci* 511: 464-7.
- Galloway, D. R., R. C. Hedstrom, and O. R. Pavlovskis. 1984. Production and characterization of monoclonal antibodies to exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 44: 262-7.
- Galton, D. A. 1953. Myleran in chronic myeloid leukaemia; results of treatment. *Lancet* 264: 208-13.
- Ganepola, S., C. Gentilini, U. Hilbers, T. Lange, K. Rieger, J. Hofmann, M. Maier, U. G. Liebert, D. Niederwieser, E. Engelmann, R. Heilbronn, E. Thiel, and L. Uharek. 2007. Patients at high risk for CMV infection and disease show delayed CD8+ T-cell immune recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 39: 293-9.
- Gatta, G., R. Capocaccia, C. Stiller, P. Kaatsch, F. Berrino, and M. Terenziani. 2005. Childhood cancer survival trends in Europe: a EURO CARE Working Group study. *J Clin Oncol* 23: 3742-51.
-

- 
- Gaynon, P. S., M. E. Trigg, N. A. Heerema, M. G. Sensel, H. N. Sather, G. D. Hammond, and W. A. Bleyer. 2000. Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. *Leukemia* 14: 2223-33.
- Geller, R. B., and S. P. Dix. 1999. Oral chemotherapy agents in the treatment of leukaemia. *Drugs* 58 Suppl 3: 109-18.
- Geller, R. B., G. B. Vogelsang, J. R. Wingard, A. M. Yeager, W. H. Burns, G. W. Santos, and R. Saral. 1988. Successful marrow transplantation for acute myelocytic leukemia following therapy for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 6: 1558-61.
- Gerberick, G. F., and W. G. Sorenson. 1983. Toxicity of T-2 toxin, a Fusarium mycotoxin, to alveolar macrophages in vitro. *Environ Res* 32: 269-85.
- Giles, F., S. O'Brien, J. Cortes, S. Verstovsek, C. Bueso-Ramos, J. Shan, S. Pierce, G. Garcia-Manero, M. Keating, and H. Kantarjian. 2005. Outcome of patients with acute myelogenous leukemia after second salvage therapy. *Cancer* 104: 547-54.
- Giles, F., S. Verstovsek, G. Garcia-Manero, D. Thomas, F. Ravandi, W. Wierda, A. Ferrajoli, S. Kornblau, E. Jabbour, J. Shan, S. O'Brien, M. Albitar, and H. Kantarjian. 2006. Validation of the European Prognostic Index for younger adult patients with acute myeloid leukaemia in first relapse. *Br J Haematol* 134: 58-60.
- Giralt, S., S. Escudier, H. Kantarjian, A. Deisseroth, E. J. Freireich, B. S. Andersson, S. O'Brien, M. Andreeff, H. Fisher, A. Cork, and et al. 1993. Preliminary results of treatment with filgrastim for relapse of leukemia and myelodysplasia after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 329: 757-61.
- Giralt, S., J. Hester, Y. Huh, C. Hirsch-Ginsberg, G. Rondon, D. Seong, M. Lee, J. Gajewski, K. Van Besien, I. Khouri, R. Mehra, D. Przepiorka, M. Korbling, M. Talpaz, H. Kantarjian, H. Fischer, A. Deisseroth, and R. Champlin. 1995. CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 86: 4337-43.
- Gootenberg, J. E., F. W. Ruscetti, J. W. Mier, A. Gazdar, and R. C. Gallo. 1981. Human cutaneous T cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T cell growth factor. *J Exp Med* 154: 1403-18.
- Gratwohl A, H. J. 2000. Outcome of blood and marrow transplants. *The EBMT Handbook* Revised edition: 100-118.
- Grigg, A. P., J. Szer, J. Beresford, A. Dodds, K. Bradstock, S. Durrant, A. P. Schwarzer, T. Hughes, R. Herrmann, J. Gibson, C. Arthur, and J. Matthews. 1999. Factors affecting the outcome of allogeneic bone marrow transplantation for adult patients with refractory or relapsed acute leukaemia. *Br J Haematol* 107: 409-18.
- Griskevicius, L. G., U. te al. 2001. The myeloablative and immunosuppressive properties of treosulfan in mice. *ASH Annual Meeting*, Orlando.
- Grochow, L. B. 1993. Busulfan disposition: the role of therapeutic monitoring in bone marrow transplantation induction regimens. *Semin Oncol* 20: 18-25; quiz 26.
- Grochow, L. B., R. J. Jones, R. B. Brundrett, H. G. Braine, T. L. Chen, R. Saral, G. W. Santos, and O. M. Colvin. 1989. Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol* 25: 55-61.
-

- 
- Grochow, L. B., W. Krivit, C. B. Whitley, and B. Blazar. 1990. Busulfan disposition in children. *Blood* 75: 1723-7.
- Groll, A. R., J. 2001. Prävention von Pilzinfektionen bei Kindern und Jugendlichen mit neoplastischen Erkrankungen. *Klin Padiatr* 213: 50-63.
- Gutierrez, M. I., A. K. Siraj, M. M. Ibrahim, A. Hussain, and K. Bhatia. 2005. Childhood and adult ALL: differences in epigenetic lesions associated with cell cycle genes. *Am J Hematol* 80: 158-60.
- Gutierrez-Delgado, F., D. G. Maloney, O. W. Press, J. Golden, L. A. Holmberg, R. T. Maziarz, H. Hooper, C. D. Buckner, F. R. Appelbaum, and W. I. Bensinger. 2001. Autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: comparison of radiation-based and chemotherapy-only preparative regimens. *Bone Marrow Transplant* 28: 455-61.
- Haddow, A. T., GM. 1953. Myleran in chronic myeloid leukaemia-chemical constitution and biological action.
- Hale, G. 1988. Bone marrow therapy with monoclonal antibodies. *Biochem Pharmacol* 37: 3207-14.
- Hamon, M. D., H. G. Prentice, D. J. Gottlieb, I. D. Macdonald, J. M. Cunningham, O. P. Smith, M. Gilmore, L. Gandhi, and C. Collis. 1993. Immunotherapy with interleukin 2 after ABMT in AML. *Bone Marrow Transplant* 11: 399-401.
- Handgretinger, R., M. Schumm, P. Lang, J. Greil, A. Reiter, P. Bader, D. Niethammer, and T. Klingebiel. 1999. Transplantation of megadoses of purified haploidentical stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 872: 351-61; discussion 361-2.
- Hann, I., A. Vora, G. Harrison, C. Harrison, O. Eden, F. Hill, B. Gibson, and S. Richards. 2001. Determinants of outcome after intensified therapy of childhood lymphoblastic leukaemia: results from Medical Research Council United Kingdom acute lymphoblastic leukaemia XI protocol. *Br J Haematol* 113: 103-14.
- Hann, I., A. Vora, S. Richards, F. Hill, B. Gibson, J. Lilleyman, S. Kinsey, C. Mitchell, and O. B. Eden. 2000. Benefit of intensified treatment for all children with acute lymphoblastic leukaemia: results from MRC UKALL XI and MRC ALL97 randomised trials. UK Medical Research Council's Working Party on Childhood Leukaemia. *Leukemia* 14: 356-63.
- Harms, D. O., and G. E. Janka-Schaub. 2000. Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. *Leukemia* 14: 2234-9.
- Harris, M. B., J. J. Shuster, D. J. Pullen, M. J. Borowitz, A. J. Carroll, F. G. Behm, and V. J. Land. 1998. Consolidation therapy with antimetabolite-based therapy in standard-risk acute lymphocytic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 16: 2840-7.
- Hartley, J. A., C. C. O'Hare, and J. Baumgart. 1999. DNA alkylation and interstrand cross-linking by treosulfan. *Br J Cancer* 79: 264-6.
- Hasegawa, S., K. Horibe, T. Kawabe, K. Kato, S. Kojima, T. Matsuyama, and N. Hirabayashi. 1998. Venous-occlusive disease of the liver after allogeneic bone marrow transplantation in children with hematologic malignancies: incidence, onset time and risk factors. *Bone Marrow Transplant* 22: 1191-7.
-

- 
- Hassan, M., and H. Ehrsson. 1987a. Metabolism of <sup>14</sup>C-busulfan in isolated perfused rat liver. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 12: 71-6.
- Hassan, M. 1987b. Urinary metabolites of busulfan in the rat. *Drug Metab Dispos* 15: 399-402.
- Hassan, M., G. Oberg, A. N. Bekassy, J. Aschan, H. Ehrsson, P. Ljungman, G. Lonnerholm, B. Smedmyr, A. Taube, I. Wallin, and et al. 1991. Pharmacokinetics of high-dose busulphan in relation to age and chronopharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol* 28: 130-4.
- Hassan, Z., M. Hassan, and E. Hellstrom-Lindberg. 2001. The pharmacodynamic effect of busulfan in the P39 myeloid cell line in vitro. *Leukemia* 15: 1240-7.
- Hauke, R. J., T. C. Greiner, B. N. Smir, J. M. Vose, S. R. Tarantolo, R. M. Bashir, and P. J. Bierman. 1998. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder after autologous bone marrow transplantation: report of two cases. *Bone Marrow Transplant* 21: 1271-4.
- Hempel, G., D. Oechtering, C. Lanvers-Kaminsky, T. Klingebiel, J. Vormoor, B. Gruhn, and J. Boos. 2007. Cytotoxicity of dimethylacetamide and pharmacokinetics in children receiving intravenous busulfan. *J Clin Oncol* 25: 1772-8.
- Henon, P. R., H. Liang, G. Beck-Wirth, J. C. Eisenmann, M. Lepers, E. Wunder, and G. Kandel. 1992. Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 9: 285-91.
- Higano, C. S., D. Chielens, W. Raskind, E. Bryant, M. E. Flowers, J. Radich, R. Clift, and F. Appelbaum. 1997. Use of alpha-2a-interferon to treat cytogenetic relapse of chronic myeloid leukemia after marrow transplantation. *Blood* 90: 2549-54.
- Hilger, R. A., J. Baumgart, M. E. Scheulen, R. Trenchel, D. Strumberg, S. Seeber, and D. W. Beelen. 2004. Pharmacokinetics of treosulfan in a myeloablative combination with cyclophosphamide prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Clin Pharmacol Ther* 42: 654-5.
- Hilger, R. A., A. Harstrick, W. Eberhardt, C. Oberhoff, M. Skorzec, J. Baumgart, S. Seeber, and M. E. Scheulen. 1998. Clinical pharmacokinetics of intravenous treosulfan in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 42: 99-104.
- Hilger, R. A., G. Jacek, C. Oberhoff, S. Kredtke, J. Baumgart, S. Seeber, and M. E. Scheulen. 2000. Investigation of bioavailability and pharmacokinetics of treosulfan capsules in patients with relapsed ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 45: 483-8.
- Hill, F. G., S. Richards, B. Gibson, I. Hann, J. Lilleyman, S. Kinsey, C. Mitchell, C. J. Harrison, and O. B. Eden. 2004. Successful treatment without cranial radiotherapy of children receiving intensified chemotherapy for acute lymphoblastic leukaemia: results of the risk-stratified randomized central nervous system treatment trial MRC UKALL XI (ISRC TN 16757172). *Br J Haematol* 124: 33-46.
- Hollander, G. A., B. Widmer, and S. J. Burakoff. 1994. Loss of normal thymic repertoire selection and persistence of autoreactive T cells in graft vs host disease. *J Immunol* 152: 1609-17.
- Hollatz, G. 2007. Untersuchungen zur Funktionalität genetisch veränderter Spender-T-Zellen in der adaptiven Immuntherapie für pädiatrische Patienten mit Leukämien. *Dr. Arbeit, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt*.
- Holler, E. 2002. Cytokines, viruses, and graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol* 9: 479-84.
-

- 
- Holt, P. S., S. Buckley, and J. R. DeLoach. 1987. Detection of the lethal effects of T-2 mycotoxin on cells using a rapid colorimetric viability assay. *Toxicol Lett* 39: 301-12.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-61.
- Horowitz, M. M., R. P. Gale, P. M. Sondel, J. M. Goldman, J. Kersey, H. J. Kolb, A. A. Rimm, O. Ringden, C. Rozman, B. Speck, and et al. 1990. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75: 555-62.
- Howard, S. C., M. Pedrosa, M. Lins, A. Pedrosa, C. H. Pui, R. C. Ribeiro, and F. Pedrosa. 2004. Establishment of a pediatric oncology program and outcomes of childhood acute lymphoblastic leukemia in a resource-poor area. *Jama* 291: 2471-5.
- Hromas, R., K. Cornetta, E. Srour, C. Blanke, and E. R. Broun. 1994. Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* 84: 1689-90.
- Hudson, M. M., A. C. Mertens, Y. Yasui, W. Hobbie, H. Chen, J. G. Gurney, M. Yeazel, C. J. Recklitis, N. Marina, L. R. Robison, and K. C. Oeffinger. 2003. Health status of adult long-term survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Jama* 290: 1583-92.
- Iglewski, B. H., and J. C. Sadoff. 1979. Toxin inhibitors of protein synthesis: production, purification, and assay of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. *Methods Enzymol* 60: 780-93.
- immunobiology, w. u. c. s. t.
- Isoyama, K., M. Eguchi, S. Hibi, N. Kinukawa, H. Ohkawa, H. Kawasaki, Y. Kosaka, T. Oda, M. Oda, T. Okamura, S. Nishimura, Y. Hayashi, T. Mori, M. Imaizumi, S. Mizutani, I. Tsukimoto, N. Kamada, and E. Ishii. 2002. Risk-directed treatment of infant acute lymphoblastic leukaemia based on early assessment of MLL gene status: results of the Japan Infant Leukaemia Study (MLL96). *Br J Haematol* 118: 999-1010.
- Jemal, A., T. Murray, A. Samuels, A. Ghafoor, E. Ward, and M. J. Thun. 2003. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 53: 5-26.
- Jones, R., Jr., W. B. Kessler, H. E. Lessner, and L. Rane. 1960. New developments in cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Rep* 10: 99-108.
- Jones, R. J., K. S. Lee, W. E. Beschorner, V. G. Vogel, L. B. Grochow, H. G. Braine, G. B. Vogelsang, L. L. Sensenbrenner, G. W. Santos, and R. Saral. 1987. Venooclusive disease of the liver following bone marrow transplantation. *Transplantation* 44: 778-83.
- Jones, T. R., P. A. Humphrey, and D. C. Brennan. 1998. Transplantation of vascularized allogeneic skeletal muscle for scalp reconstruction in a renal transplant patient. *Transplantation* 65: 1605-10.
- Joshi, S. S., J. C. Lynch, S. Z. Pavletic, S. R. Tarantolo, S. J. Pirruccello, A. Kessinger, and M. R. Bishop. 2001. Decreased immune functions of blood cells following mobilization with granulocyte colony-stimulating factor: association with donor characteristics. *Blood* 98: 1963-70.
- K., K. 1985. Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity. *Callegaert, Herberman RB Mechanisms of cytotoxicity by NK cells.*
-

- 
- Kadan-Lottick, N., and J. P. Neglia. 2002. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: redefining outcomes. *J Pediatr Hematol Oncol* 24: 88.
- Kaldor, J., and N. E. Day. 1988. Epidemiological studies of the relationship between carcinogenicity and DNA damage. *IARC Sci Publ*: 460-8.
- Kaldor, J. M., N. E. Day, F. Pettersson, E. A. Clarke, D. Pedersen, W. Mehnert, J. Bell, H. Host, P. Prior, S. Karjalainen, and et al. 1990. Leukemia following chemotherapy for ovarian cancer. *N Engl J Med* 322: 1-6.
- Kalwak, K., E. Gorczynska, J. Toporski, D. Turkiewicz, M. Slociak, M. Ussowicz, E. Latos-Grazynska, M. Krol, J. Boguslawska-Jaworska, and A. Chybicka. 2002. Immune reconstitution after haematopoietic cell transplantation in children: immunophenotype analysis with regard to factors affecting the speed of recovery. *Br J Haematol* 118: 74-89.
- Kalwak, K., I. Moson, J. Cwian, E. Gorczynska, J. Toporski, D. Turkiewicz, E. Latos-Grazynska, and A. Chybicka. 2003. A prospective analysis of immune recovery in children following allogeneic transplantation of t-cell-depleted or non-T-cell-depleted hematopoietic cells from HLA-disparate family donors. *Transplant Proc* 35: 1551-5.
- Kamps, W. A., A. J. Veerman, E. R. van Wering, J. F. van Weerden, R. Slater, and A. van der Does-van den Berg. 2000. Long-term follow-up of Dutch Childhood Leukemia Study Group (DCLSG) protocols for children with acute lymphoblastic leukemia, 1984-1991. *Leukemia* 14: 2240-6.
- Kärre, K. 1985. Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity. *Callewaert, Herberman RB Mechanisms of cytotoxicity by NK cells.*
- Keinanen, M., J. D. Griffin, C. D. Bloomfield, J. Machnicki, and A. de la Chapelle. 1988. Clonal chromosomal abnormalities showing multiple-cell-lineage involvement in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 318: 1153-8.
- Kern, W., T. Haferlach, C. Schoch, H. Löffler, W. Gassmann, A. Heinecke, M. C. Sauerland, W. Berdel, T. Buchner, and W. Hiddemann. 2003. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial. *Blood* 101: 64-70.
- Kerst, J. M., M. de Haas, C. E. van der Schoot, I. C. Slaper-Cortenbach, M. Kleijer, A. E. von dem Borne, and R. H. van Oers. 1993. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: induction of immunophenotypically and functionally altered neutrophils via an effect on myeloid progenitor cells. *Blood* 82: 3265-72.
- Kim, D. H., J. G. Kim, S. K. Sohn, W. J. Sung, J. S. Suh, K. S. Lee, and K. B. Lee. 2004. Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 125: 217-24.
- Kim, S. N. 1988. Preclinical toxicology and pharmacology of dimethylacetamide, with clinical notes. *Drug Metab Rev* 19: 345-68.
- Kimball Dalton, V. M., R. D. Gelber, F. Li, M. J. Donnelly, N. J. Tarbell, and S. E. Sallan. 1998. Second malignancies in patients treated for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 16: 2848-53.
- Klingebl, T., P. Lang, M. Schumm, U. Koehl, P. Bader, D. Schwabe, P. G. Schlegel, M. Eyrich, J. Greil, J. F. Beck, D. Niethammer, and R. Handgretinger. 2005. Experiences with
-

- 
- haploidentical stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pathol Biol (Paris)* 53: 159-61.
- Kloss, S., K. Bochennek, S. Huenecke, S. Y. Zimmermann, S. Kuci, T. Muller, W. S. Wels, T. Klingebiel, R. Esser, and U. Koehl. 2007. A novel five-colour flow cytometric assay to determine NK cell cytotoxicity against neuroblastoma and other adherent tumour cells. *J Immunol Methods* 325: 140-147.
- Kobayashi, S., M. Imamura, S. Hashino, J. Tanaka, and M. Asaka. 1997. Clinical relevance of serum soluble interleukin-2 receptor levels in acute and chronic graft-versus-host disease. *Leuk Lymphoma* 28: 159-69.
- Koehl U., Bochennek K., Zimmermann S. Y., Lehrnbecher T., Sørensen J., Esser R. Andreas C., Kramm C. Grüttner H. P., Falkenberg E., Orth A., Bader P., Schwabe D., Klingebiel T. 2007. Immune Recovery in children undergoing allogeneic stem cell transplantation: absolute CD8+ CD3+ count reconstitution is associated with survival. *Transplant.* 39:269-78
- Koehl, U., O. Beck, R. Esser, E. Seifried, T. Klingebiel, D. Schwabe, and C. Seidl. 2003. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Frankfurt experience. *Leukemia* 17: 232-6.
- Koehl, U., S. Zimmermann, R. Esser, J. Sorensen, H. P. Gruttner, M. Duchscherer, E. Seifried, T. Klingebiel, and D. Schwabe. 2002. Autologous transplantation of CD133 selected hematopoietic progenitor cells in a pediatric patient with relapsed leukemia. *Bone Marrow Transplant* 29: 927-30.
- Kolb, H. J., C. Schmid, A. J. Barrett, and D. J. Schendel. 2004. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 103: 767-76.
- Kolb, H. J., R. Storb, T. C. Graham, H. Kolb, and E. D. Thomas. 1973. Antithymocyte serum and methotrexate for control of graft-versus-host disease in dogs. *Transplantation* 16: 17-23.
- Kook, H., F. Goldman, D. Padley, R. Giller, S. Rumelhart, M. Holida, N. Lee, C. Peters, M. Comito, D. Huling, and M. Trigg. 1996. Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery. *Blood* 88: 1089-97.
- Kopf-Maier, P. 1998. The alkylator treosulfan shows activity towards human renal-cell carcinoma in vivo and in vitro. *In Vivo* 12: 275-88.
- Kopf-Maier, P., and G. Sass. 1996. Antitumor activity of treosulfan in human lung carcinomas. *Cancer Chemother Pharmacol* 37: 211-21.
- Kroger, N., A. Shimoni, T. Zabelina, H. Schieder, J. Panse, F. Ayuk, C. Wolschke, H. Renges, J. Dahlke, D. Atanackovic, A. Nagler, and A. Zander. 2006. Reduced-toxicity conditioning with treosulfan, fludarabine and ATG as preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) in elderly patients with secondary acute myeloid leukemia (sAML) or myelodysplastic syndrome (MDS). *Bone Marrow Transplant* 37: 339-44.
- Kroger, N., T. Zabelina, W. Kruger, H. Renges, N. Stute, H. Kabisch, N. Jaburg, C. Loliger, A. Krull, and A. R. Zander. 2001. Comparison of total body irradiation vs busulfan in combination with cyclophosphamide as conditioning for unrelated stem cell transplantation in CML patients. *Bone Marrow Transplant* 27: 349-54.
-

- 
- Lang, P., M. Schumm, J. Greil, P. Bader, T. Klingebiel, I. Muller, T. Feuchtinger, M. Pfeiffer, P. G. Schlegel, D. Niethammer, and R. Handgretinger. 2005. A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study. *Klin Padiatr* 217: 334-8.
- Lange, B. J., B. C. Bostrom, J. M. Cherlow, M. G. Sensel, M. K. La, W. Rackoff, N. A. Heerema, R. S. Wimmer, M. E. Trigg, and H. N. Sather. 2002. Double-delayed intensification improves event-free survival for children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 99: 825-33.
- Lanier, L. L. 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16: 359-93.
- Lanvers-Kaminsky, C., A. Bremer, U. Dirksen, H. Jurgens, and J. Boos. 2006. Cytotoxicity of treosulfan and busulfan on pediatric tumor cell lines. *Anticancer Drugs* 17: 657-62.
- Lauer, S. J., J. J. Shuster, D. H. Mahoney, Jr., N. Winick, S. Toledano, L. Munoz, G. Kiefer, J. D. Pullen, C. P. Steuber, and B. M. Camitta. 2001. A comparison of early intensive methotrexate/mercaptopurine with early intensive alternating combination chemotherapy for high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group phase III randomized trial. *Leukemia* 15: 1038-45.
- Lazarus, H. M., P. F. Coccia, R. H. Herzig, J. Graham-Pole, S. Gross, S. Strandjord, E. Gordon, N. K. Cheung, P. I. Warkentin, T. R. Spitzer, and et al. 1984. Incidence of acute graft-versus-host disease with and without methotrexate prophylaxis in allogeneic bone marrow transplant patients. *Blood* 64: 215-20.
- LeClerc, J. M., A. L. Billett, R. D. Gelber, V. Dalton, N. Tarbell, J. M. Lipton, R. Barr, L. A. Clavell, B. Asselin, C. Hurwitz, M. Schorin, S. E. Lipshultz, L. Declerck, L. B. Silverman, H. J. Cohen, and S. E. Sallan. 2002. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber ALL Consortium Protocol 87-01. *J Clin Oncol* 20: 237-46.
- Lehrnbecher, T., J. Kaiser, D. Varwig, J. Ritter, A. H. Groll, U. Creutzig, T. Klingebiel, and D. Schwabe. 2007. Antifungal usage in children undergoing intensive treatment for acute myeloid leukemia: analysis of the multicenter clinical trial AML-BFM 93. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26: 735-738.
- Li, J., H. K. Law, Y. L. Lau, and G. C. Chan. 2004. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol* 127: 326-34.
- Litwin, V., J. Gumperz, P. Parham, J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 1994. NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* 180: 537-43.
- Loning, L., M. Zimmermann, A. Reiter, P. Kaatsch, G. Henze, H. Riehm, and M. Schrappe. 2000. Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy. *Blood* 95: 2770-5.
- Lozzio, C. B., and B. B. Lozzio. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45: 321-34.
- MacKinnon, S. 2000. Who may benefit from donor leucocyte infusions after allogeneic stem cell transplantation? *Br J Haematol* 110: 12-7.
- Malcom, S. M. 2001. Principles of biologic therapy in Cancer treatment. *Edt.C.Haskell* 5. Ausgabe.
-

- 
- Maraninchi, D., E. Gluckman, D. Blaise, D. Guyotat, B. Rio, J. L. Pico, V. Leblond, M. Michallet, F. Dreyfus, N. Ifrah, and et al. 1987. Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet* 2: 175-8.
- Marchand, D. H., R. P. Remmel, and M. M. Abdel-Monem. 1988. Biliary excretion of a glutathione conjugate of busulfan and 1,4-diiodobutane in the rat. *Drug Metab Dispos* 16: 85-92.
- Maris, M., M. Boeckh, B. Storer, M. Dawson, K. White, M. Keng, B. Sandmaier, D. Maloney, R. Storb, and J. Storek. 2003. Immunologic recovery after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Exp Hematol* 31: 941-52.
- Maschan, A. A., O. I. Kryzanovskii, M. I. Yourlova, E. V. Skorobogatova, E. D. Pashanov, Y. E. Potapova, L. A. Timonova, N. Y. Bogatcheva, E. V. Samochatova, and A. G. Roumjantzev. 1997. Intermediate-dose busulfan and cyclophosphamide as a conditioning regimen for bone marrow transplantation in a case of Fanconi anemia in myelodysplastic transformation. *Bone Marrow Transplant* 19: 385-7.
- Matagne, R. 1969. Induction of chromosomal aberrations and mutations with isomeric forms of L-threitol-1,4-bismethanesulfonate in plant materials. *Mutat Res* 7: 241-7.
- Matloub, Y., S. Lindemulder, P. S. Gaynon, H. Sather, M. La, E. Broxson, R. Yanofsky, R. Hutchinson, N. A. Heerema, J. Nachman, M. Blake, L. M. Wells, A. D. Sorrell, M. Masterson, J. F. Kelleher, and L. C. Stork. 2006. Intrathecal triple therapy decreases central nervous system relapse but fails to improve event-free survival when compared with intrathecal methotrexate: results of the Children's Cancer Group (CCG) 1952 study for standard-risk acute lymphoblastic leukemia, reported by the Children's Oncology Group. *Blood* 108: 1165-73.
- McDonald, G. B., M. S. Hinds, L. D. Fisher, H. G. Schoch, J. L. Wolford, M. Banaji, B. J. Hardin, H. M. Shulman, and R. A. Clift. 1993. Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med* 118: 255-67.
- Medicine., S. 1994.  
<http://www.sciandmed.com/sm/journalviewer.aspx?issue=1075&article=872>.
- Meeske, K. A., S. E. Siegel, D. R. Globe, W. J. Mack, and L. Bernstein. 2005. Prevalence and correlates of fatigue in long-term survivors of childhood leukemia. *J Clin Oncol* 23: 5501-10.
- Meinhardt, G., F. Dayyani, B. Jahrsdorfer, J. Baumgart, B. Emmerich, and R. Schmidmaier. 2003. Treosulfan is an effective inducer of cell death in myeloma cell lines and primary myeloma cells from patients. *Br J Haematol* 122: 892-9.
- Melchers, I. 1999. Arbeitsprogramm zur Testung von Treosulfan und anderen Substanzen: Wirkung auf B-Lymphozyten.
- Melchers, I. 2000. Wirkung von Treosulfan und anderen Substanzen auf die spezifische Immunantwort gegen KLH in vivo.
- Melchers, I. R., A. Nov./Dec. 2000. Immunosuppressive activity of low dose Treosulfan. *Joint Annual Meeting of Immunology of the German and Dutch Society (DGfI, NVvI)*, Düsseldorf.
- Metzger, M. L., S. C. Howard, L. C. Fu, A. Pena, R. Stefan, M. L. Hancock, Z. Zhang, C. H. Pui, J. Wilimas, and R. C. Ribeiro. 2003. Outcome of childhood acute lymphoblastic leukaemia in resource-poor countries. *Lancet* 362: 706-8.
-

- 
- Meyers, C. A., M. Albitar, and E. Estey. 2005. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer* 104: 788-93.
- Michallet, M., T. Philip, I. Philip, H. Godinot, C. Sebban, G. Salles, A. Thiebaut, P. Biron, F. Lopez, P. Mazars, N. Roubi, T. Leemhuis, E. Hanania, C. Reading, G. Fine, K. Atkinson, C. Juttner, B. Coiffier, D. Fiere, and E. Archimbaud. 2000. Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34+Thy1+ hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety, and immune reconstitution. *Exp Hematol* 28: 858-70.
- Millar, B. C., M. J. Tilby, M. G. Ormerod, A. W. Payne, S. Jinks, and P. S. Loverock. 1986. Comparative studies of total cross-linking, cell survival and cell cycle perturbations in Chinese hamster cells treated with alkylating agents in vitro. *Biochem Pharmacol* 35: 1163-9.
- Miller, J. S., F. Prosper, and V. McCullar. 1997. Natural killer (NK) cells are functionally abnormal and NK cell progenitors are diminished in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cell collections. *Blood* 90: 3098-105.
- Millot, F., S. Suci, N. Philippe, Y. Benoit, F. Mazingue, A. Uyttebroeck, P. Lutz, F. Mechinaud, A. Robert, P. Boutard, G. Marguerite, A. Ferster, E. Plouvier, X. Riolland, C. Behard, D. Plantaz, M. F. Dresse, P. Philippet, L. Norton, A. Thyss, N. Dastugue, C. Waterkeyn, E. Vilmer, and J. Otten. 2001. Value of high-dose cytarabine during interval therapy of a Berlin-Frankfurt-Munster-based protocol in increased-risk children with acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma: results of the European Organization for Research and Treatment of Cancer 58881 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 19: 1935-42.
- Mills, K. C., T. G. Gross, M. L. Varney, D. G. Heimann, E. C. Reed, A. Kessinger, and J. E. Talmadge. 1996. Immunologic phenotype and function in human bone marrow, blood stem cells and umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 18: 53-61.
- Minowada, J., T. Onuma, and G. E. Moore. 1972. Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* 49: 891-5.
- Miyazaki, Y., K. Kuriyama, S. Miyawaki, S. Ohtake, H. Sakamaki, T. Matsuo, N. Emi, T. Kobayashi, T. Matsushima, K. Shinagawa, R. Ohno, and M. Tomonaga. 2003. Cytogenetic heterogeneity of acute myeloid leukaemia (AML) with trilineage dysplasia: Japan Adult Leukaemia Study Group-AML 92 study. *Br J Haematol* 120: 56-62.
- Moretta, A., M. Vitale, C. Bottino, A. M. Orengo, L. Morelli, R. Augugliaro, M. Barbaresi, E. Ciccone, and L. Moretta. 1993. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 178: 597-604.
- Morley, A., and J. Blake. 1974. An animal model of chronic aplastic marrow failure. I. Late marrow failure after busulfan. *Blood* 44: 49-56.
- Morstyn, G., J. Sullivan, S. Fairhead, D. Cowling, and T. Hurley. 1981. Effects of high dose busulphan on leukaemic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Aust N Z J Med* 11: 609-14.
-

- 
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Murphy, W. J., C. Y. Koh, A. Raziuddin, M. Bennett, and D. L. Longo. 2001. Immunobiology of natural killer cells and bone marrow transplantation: merging of basic and preclinical studies. *Immunol Rev* 181: 279-89.
- Myatt, N., I. A. Cree, C. M. Kurbacher, A. J. Foss, J. L. Hungerford, and P. N. Plowman. 1997. The ex vivo chemosensitivity profile of choroidal melanoma. *Anticancer Drugs* 8: 756-62.
- Nagler, A., A. Ackerstein, R. Or, E. Naparstek, and S. Slavin. 1997. Immunotherapy with recombinant human interleukin-2 and recombinant interferon-alpha in lymphoma patients postautologous marrow or stem cell transplantation. *Blood* 89: 3951-9.
- Nakamura, R., E. Bahceci, E. J. Read, S. F. Leitman, C. S. Carter, R. Childs, C. E. Dunbar, R. Gress, R. Altemus, N. S. Young, and A. J. Barrett. 2001. Transplant dose of CD34(+) and CD3(+) cells predicts outcome in patients with haematological malignancies undergoing T cell-depleted peripheral blood stem cell transplants with delayed donor lymphocyte add-back. *Br J Haematol* 115: 95-104.
- Nandakumar, A., N. Anantha, T. Venugopal, S. Reddy, B. Padmanabhan, K. Swamy, D. Doval, and C. Ramarao. 1995. Descriptive epidemiology of lymphoid and haemopoietic malignancies in Bangalore, India. *Int J Cancer* 63: 37-42.
- Neale, M. H., N. Myatt, I. A. Cree, C. M. Kurbacher, A. J. Foss, J. L. Hungerford, and P. N. Plowman. 1999. Combination chemotherapy for choroidal melanoma: ex vivo sensitivity to treosulfan with gemcitabine or cytosine arabinoside. *Br J Cancer* 79: 1487-93.
- Netea, M. G., R. Suttmuller, C. Hermann, C. A. Van der Graaf, J. W. Van der Meer, J. H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema, and B. J. Kullberg. 2004. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 172: 3712-8.
- Netea, M. G., A. Warris, J. W. Van der Meer, M. J. Fenton, T. J. Verver-Janssen, L. E. Jacobs, T. Andresen, P. E. Verweij, and B. J. Kullberg. 2003. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis* 188: 320-6.
- Neuber, K., A. tom Dieck, N. Blodorn-Schlicht, G. Itschert, and C. Karnbach. 1999. Treosulfan is an effective alkylating cytostatic for malignant melanoma in vitro and in vivo. *Melanoma Res* 9: 125-32.
- Nevill, T. J., J. D. Shepherd, D. E. Reece, M. J. Barnett, S. H. Nantel, H. G. Klingemann, and G. L. Phillips. 1992. Treatment of myelodysplastic syndrome with busulfan-cyclophosphamide conditioning followed by allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 10: 445-50.
- Nolte, A., R. Buhmann, C. Straka, B. Emmerich, and M. Hallek. 1998. Assessment and characterization of the cytolytic T lymphocyte response against Epstein-Barr virus in patients with non-Hodgkin's lymphoma after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 21: 909-16.
- Ochs, L., X. O. Shu, J. Miller, H. Enright, J. Wagner, A. Filipovich, W. Miller, and D. Weisdorf. 1995. Late infections after allogeneic bone marrow transplantations: comparison of incidence in related and unrelated donor transplant recipients. *Blood* 86: 3979-86.
- Olesen, L. H., A. Aggerholm, B. L. Andersen, C. G. Nyvold, P. Guldborg, J. M. Norgaard, and P. Hokland. 2005. Molecular typing of adult acute myeloid leukaemia: significance of
-

- 
- translocations, tandem duplications, methylation, and selective gene expression profiling. *Br J Haematol* 131: 457-67.
- Ortega, J. J., J. M. Ribera, A. Oriol, P. Bastida, M. E. Gonzalez, C. Calvo, I. Egurbide, J. M. Hernandez Rivas, C. Rivas, A. Alcala, J. Besalduch, J. Macia, S. Gardella, M. Carnero, J. M. Lite, F. Casanova, M. Martinez, M. Fontanillas, E. Feliu, and J. F. San Miguel. 2001. Early and delayed consolidation chemotherapy significantly improves the outcome of children with intermediate risk acute lymphoblastic leukemia. Final results of the prospective randomized PETHEMA ALL-89 TRIAL. *Haematologica* 86: 586-95.
- Ottinger, H. D., D. W. Beelen, B. Scheulen, U. W. Schaefer, and H. Grosse-Wilde. 1996. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 88: 2775-9.
- Paolucci, G., V. Vecchi, C. Favre, R. Miniero, E. Madon, A. Pession, R. Rondelli, G. De Rossi, L. Lo Nigro, F. Porta, N. Santoro, P. Indolfi, G. Basso, V. Conter, and M. Arico. 2001. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. Long-term results of the AIEOP-ALL 87 study. *Haematologica* 86: 478-84.
- Park, S., and N. Tretyakova. 2004. Structural characterization of the major DNA-DNA cross-link of 1,2,3,4-diepoxybutane. *Chem Res Toxicol* 17: 129-36.
- Parkkali, T., H. Kayhty, T. Ruutu, L. Volin, J. Eskola, and P. Ruutu. 1996. A comparison of early and late vaccination with Haemophilus influenzae type b conjugate and pneumococcal polysaccharide vaccines after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 18: 961-7.
- Parkman, R. 2007. Antigen-specific immunity following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis*.
- Parkman, R., G. Cohen, S. L. Carter, K. I. Weinberg, B. Masinsin, E. Guinan, J. Kurtzberg, J. E. Wagner, and N. A. Kernan. 2006. Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12: 919-27.
- Pawlowska, A. B., B. R. Blazar, E. Angelucci, D. Baronciani, X. O. Shu, and B. Bostrom. 1997. Relationship of plasma pharmacokinetics of high-dose oral busulfan to the outcome of allogeneic bone marrow transplantation in children with thalassemia. *Bone Marrow Transplant* 20: 915-20.
- Pedersen-Bjergaard, J., J. Ersboll, H. M. Sorensen, N. Keiding, S. O. Larsen, P. Philip, M. S. Larsen, H. Schultz, and N. I. Nissen. 1985. Risk of acute nonlymphocytic leukemia and preleukemia in patients treated with cyclophosphamide for non-Hodgkin's lymphomas. Comparison with results obtained in patients treated for Hodgkin's disease and ovarian carcinoma with other alkylating agents. *Ann Intern Med* 103: 195-200.
- Pende, D., R. Biassoni, C. Cantoni, S. Verdiani, M. Falco, C. di Donato, L. Accame, C. Bottino, A. Moretta, and L. Moretta. 1996. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med* 184: 505-18.
- Phadungpojna, S. A., B. et al. 1996. Preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of parenteral busulfan in dogs. *Pharmaceutical Research* 13.
-

- 
- Ploemacher, R. E. 2003. Preclinical report on Treosulfan as a Conditioning agent in bone marrow transplantation. Treosulfan dose- and regimen-dependent depletion of hematopoietic stem cell subsets in murine bone marrow. medac internal report.
- Ploemacher, R. E., K. W. Johnson, E. J. Rombouts, K. Etienne, G. R. Westerhof, J. Baumgart, M. E. White-Scharf, and J. D. Down. 2004. Addition of treosulfan to a nonmyeloablative conditioning regimen results in enhanced chimerism and immunologic tolerance in an experimental allogeneic bone marrow transplant model. *Biol Blood Marrow Transplant* 10: 236-45.
- Ploemacher, R. E. W. G. R. e. a. 2000. Treosulfan as an alternative conditioning agent in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 25: P421.
- Pollack, M., and S. E. Anderson, Jr. 1978. Toxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A for human macrophages. *Infect Immun* 19: 1092-6.
- Ponti, M., R. L. Souhami, B. W. Fox, and J. A. Hartley. 1991. DNA interstrand crosslinking and sequence selectivity of dimethanesulphonates. *Br J Cancer* 63: 743-7.
- Poonkuzhali, B., A. Srivastava, M. H. Quernin, D. Dennison, E. J. Aigrain, A. S. Kanagasabapathy, R. Krishnamoorthy, and M. Chandy. 1999. Pharmacokinetics of oral busulphan in children with beta thalassaemia major undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 24: 5-11.
- Porta, M. D., G. M. Rigolin, E. P. Alessandrino, M. Maiocchi, L. Malcovati, L. Vanelli, C. Barate, E. Rumi, M. Ciccone, A. Cuneo, M. Lazzarino, and G. Castoldi. 2004. Dendritic cell recovery after allogeneic stem-cell transplantation in acute leukemia: correlations with clinical and transplant characteristics. *Eur J Haematol* 72: 18-25.
- Preisler, H. D., R. Priore, N. Azarnia, M. Barcos, A. Raza, I. Rakowski, R. Vogler, E. L. Winton, G. Browman, J. Goldberg, and et al. 1986. Prediction of response of patients with acute nonlymphocytic leukaemia to remission induction therapy: use of clinical measurements. *Br J Haematol* 63: 625-36.
- Product Monograph Busulfan Pierre Fabre. 09.07.2003. Busilvex busulfan i.v.
- Pui, C. H., J. M. Boyett, G. K. Rivera, M. L. Hancock, J. T. Sandlund, R. C. Ribeiro, J. E. Rubnitz, F. G. Behm, S. C. Raimondi, A. Gajjar, B. Razzouk, D. Campana, L. E. Kun, M. V. Relling, and W. E. Evans. 2000. Long-term results of Total Therapy studies 11, 12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *Leukemia* 14: 2286-94.
- Pui, C. H., P. S. Gaynon, J. M. Boyett, J. M. Chessells, A. Baruchel, W. Kamps, L. B. Silverman, A. Biondi, D. O. Harms, E. Vilmer, M. Schrappe, and B. Camitta. 2002. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 359: 1909-15.
- Pui, C. H., J. R. Kane, and W. M. Crist. 1995. Biology and treatment of infant leukemias. *Leukemia* 9: 762-9.
- Pui, C. H., J. T. Sandlund, D. Pei, D. Campana, G. K. Rivera, R. C. Ribeiro, J. E. Rubnitz, B. I. Razzouk, S. C. Howard, M. M. Hudson, C. Cheng, L. E. Kun, S. C. Raimondi, F. G. Behm, J. R. Downing, M. V. Relling, and W. E. Evans. 2004. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 104: 2690-6.
-

- 
- Rabbitts, T. H. 1994. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372: 143-9.
- Radeke, H. H., H. von Wenckstern, K. Stoidtner, B. Sauer, S. Hammer, and B. Kleuser. 2005. Overlapping signaling pathways of sphingosine 1-phosphate and TGF-beta in the murine Langerhans cell line XS52. *J Immunol* 174: 2778-86.
- Reber, U., U. Wullner, M. Trepel, J. Baumgart, J. Seyfried, T. Klockgether, J. Dichgans, and M. Weller. 1998. Potentiation of treosulfan toxicity by the glutathione-depleting agent buthionine sulfoximine in human malignant glioma cells: the role of bcl-2. *Biochem Pharmacol* 55: 349-59.
- Reddy, V., J. A. Iturraspe, A. C. Tzolas, H. U. Meier-Kriesche, J. Schold, and J. R. Wingard. 2004. Low dendritic cell count after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse, death, and acute graft-versus-host disease. *Blood* 103: 4330-5.
- Remberger, M., and O. Ringden. 1995. Increased levels of soluble interleukin-2 receptor in veno-occlusive disease of the liver after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 60: 1293-9.
- Remberger, M., O. Ringden, and L. Markling. 1995. TNF alpha levels are increased during bone marrow transplantation conditioning in patients who develop acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* 15: 99-104.
- Reusser, P., S. R. Riddell, J. D. Meyers, and P. D. Greenberg. 1991. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78: 1373-80.
- Ribera, J. M., J. J. Ortega, A. Oriol, I. Granada, J. M. Hernandez-Rivas, R. Parody, C. Bethencourt, C. Rivas, P. Bastida, E. del Potro, M. E. Gonzalez-Valentin, M. J. Moreno, J. Besalduch, J. Fernandez-Calvo, M. Tormo, J. Arias, A. Molines, M. A. Sanz, J. Maldonado, F. Milla, E. Feliu, and J. F. San Miguel. 2002. Prognostic value of karyotypic analysis in children and adults with high-risk acute lymphoblastic leukemia included in the PETHEMA ALL-93 trial. *Haematologica* 87: 154-66.
- Ringden, O., M. Labopin, N. C. Gorin, N. Schmitz, U. W. Schaefer, H. G. Prentice, L. Bergmann, J. P. Jouet, F. Mandelli, D. Blaise, L. Fouillard, and F. Frassoni. 2000. Is there a graft-versus-leukaemia effect in the absence of graft-versus-host disease in patients undergoing bone marrow transplantation for acute leukaemia? *Br J Haematol* 111: 1130-7.
- Ringden, O., M. Remberger, T. Ruutu, J. Nikoskelainen, L. Volin, L. Vindelov, T. Parkkali, S. Lenhoff, B. Sallerfors, L. Mellander, P. Ljungman, and N. Jacobsen. 1999. Increased risk of chronic graft-versus-host disease, obstructive bronchiolitis, and alopecia with busulfan versus total body irradiation: long-term results of a randomized trial in allogeneic marrow recipients with leukemia. Nordic Bone Marrow Transplantation Group. *Blood* 93: 2196-201.
- Ringden, O., T. Ruutu, M. Remberger, J. Nikoskelainen, L. Volin, L. Vindelov, T. Parkkali, S. Lenhoff, B. Sallerfors, P. Ljungman, and et al. 1994. A randomized trial comparing busulfan with total body irradiation as conditioning in allogeneic marrow transplant recipients with leukemia: a report from the Nordic Bone Marrow Transplantation Group. *Blood* 83: 2723-30.
- Rizzari, C., M. G. Valsecchi, M. Arico, V. Conter, A. Testi, E. Barisone, F. Casale, L. Lo Nigro, R. Rondelli, G. Basso, N. Santoro, and G. Masera. 2001. Effect of protracted high-dose L-asparaginase given as a second exposure in a Berlin-Frankfurt-Munster-based treatment: results of the randomized 9102 intermediate-risk childhood acute lymphoblastic leukemia
-

- 
- study--a report from the Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica. *J Clin Oncol* 19: 1297-303.
- Robison, L. L., and S. Bhatia. 2003. Late-effects among survivors of leukaemia and lymphoma during childhood and adolescence. *Br J Haematol* 122: 345-59.
- Rosillo, M. C., F. Ortuno, J. M. Moraleda, M. L. Lozano, I. Heras, F. De Arriba, and V. Vicente. 1996. Immune recovery after autologous or rhG-CSF primed PBSC transplantation. *Eur J Haematol* 56: 301-7.
- Ross, R. A., B. A. Spengler, and J. L. Biedler. 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71: 741-7.
- Roux, E., F. Dumont-Girard, M. Starobinski, C. A. Siegrist, C. Helg, B. Chapuis, and E. Roosnek. 2000. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood* 96: 2299-303.
- Roux, E., C. Helg, F. Dumont-Girard, B. Chapuis, M. Jeannet, and E. Roosnek. 1996. Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T-cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood* 87: 3984-92.
- Santos, G. W., P. J. Tutschka, R. Brookmeyer, R. Saral, W. E. Beschorner, W. B. Bias, H. G. Braine, W. H. Burns, G. J. Elfenbein, H. Kaizer, and et al. 1983. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 309: 1347-53.
- Sanyal, U., R. Nanda, S. Samanta, A. Pain, S. Dutta, A. S. Verma, B. J. Rider, and K. C. Agrawal. 2000. Evaluation of dimethylaminosulfonates of alkane diols as a novel group of anticancer agents. *Cancer Lett* 155: 89-97.
- Scheulen, M. E., R. A. Hilger, C. Oberhoff, J. Casper, M. Freund, K. M. Josten, M. Bornhauser, G. Ehninger, W. E. Berdel, J. Baumgart, A. Harstrick, P. Bojko, H. H. Wolf, A. E. Schindler, and S. Seeber. 2000. Clinical phase I dose escalation and pharmacokinetic study of high-dose chemotherapy with treosulfan and autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 6: 4209-16.
- Schiltmeyer, B. W. W. U. M. 2003. Klinisch-pharmazeutische Untersuchungen zur Hochdosis-Chemotherapie mit Busulfan bei Kindern. *Fachbereich Chemie und Pharmazie*. Westfälische Wilhelms Universität Münster.
- Schmidmaier, R., P. Baumann, B. Emmerich, and G. Meinhardt. 2006. Evaluation of chemosensitivity of human bone marrow stromal cells--differences between common chemotherapeutic drugs. *Anticancer Res* 26: 347-50.
- Schmidmaier, R., M. Oellerich, J. Baumgart, B. Emmerich, and G. Meinhardt. 2004. Treosulfan-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells is accompanied by translocation of protein kinase C delta and enhanced by bryostatin-1. *Exp Hematol* 32: 76-86.
- Schrapppe, M., A. Reiter, W. D. Ludwig, J. Harbott, M. Zimmermann, W. Hiddemann, C. Niemeyer, G. Henze, A. Feldges, F. Zintl, B. Kornhuber, J. Ritter, K. Welte, H. Gadner, and H. Riehm. 2000a. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 95: 3310-22.
-

- 
- Schrapppe, M., A. Reiter, M. Zimmermann, J. Harbott, W. D. Ludwig, G. Henze, H. Gadner, E. Odenwald, and H. Riehm. 2000b. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia* 14: 2205-22.
- Schulenburg, A., M. Fischer, P. Kalhs, M. Mitterbauer, W. Rabitsch, H. T. Greinix, and G. Leitner. 2005. Immune recovery after conventional and non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 46: 1755-60.
- Seddik, M., T. A. Seemayer, and W. S. Lapp. 1980. T cell functional defect associated with thymid epithelial cell injury induced by a graft-versus-host reaction. *Transplantation* 29: 61-6.
- Seemayer, T. A., W. S. Lapp, and R. P. Bolande. 1977. Thymic involution in murine graft-versus-host reaction. Epithelial injury mimicking human thymic dysplasia. *Am J Pathol* 88: 119-33.
- SEER Cancer Statistic Review, -. 2000. National Cancer Institute, Bethesda, MD. 467.
- Shaw, P. J. E., J.W. 1993. Pharmacokinetics of busulphan with single daily dosing using BMT conditioning with Busulfan/Cyclophosphamide (BUCY) for AML in children. *Med Ped Oncol*. 21: 539-542.
- Shenoy, S., T. Mohanakumar, G. Todd, W. Westhoff, K. Dunnigan, D. R. Adkins, R. A. Brown, and J. F. DiPersio. 1999. Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 23: 335-46.
- Silvennoinen, O. 1988. Purified human NK cells do not function as accessory cells in T-cell proliferative responses. *Immunology* 64: 495-500.
- Silverman, L. B., R. D. Gelber, V. K. Dalton, B. L. Asselin, R. D. Barr, L. A. Clavell, C. A. Hurwitz, A. Moghrabi, Y. Samson, M. A. Schorin, S. Arkin, L. Declerck, H. J. Cohen, and S. E. Sallan. 2001. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 97: 1211-8.
- Simon, T., A. Langler, F. Berthold, T. Klingebiel, and B. Hero. 2007. Topotecan and etoposide in the treatment of relapsed high-risk neuroblastoma: results of a phase 2 trial. *J Pediatr Hematol Oncol* 29: 101-6.
- Singh, R. K., M. L. Varney, S. Buyukberber, K. Ino, A. G. Ageitos, E. Reed, S. Tarantolo, and J. E. Talmadge. 1999. Fas-FasL-mediated CD4+ T-cell apoptosis following stem cell transplantation. *Cancer Res* 59: 3107-11.
- Sjoo, F., Z. Hassan, M. Abedi-Valugerdi, L. Griskevicius, C. Nilsson, M. Remberger, J. Aschan, H. Concha, U. Gaughan, and M. Hassan. 2006. Myeloablative and immunosuppressive properties of treosulfan in mice. *Exp Hematol* 34: 115-21.
- Slattery, J. T., R. A. Clift, C. D. Buckner, J. Radich, B. Storer, W. I. Bensinger, E. Soll, C. Anasetti, R. Bowden, E. Bryant, T. Chauncey, H. J. Deeg, K. C. Doney, M. Flowers, T. Gooley, J. A. Hansen, P. J. Martin, G. B. McDonald, R. Nash, E. W. Petersdorf, J. E. Sanders, G. Schoch, P. Stewart, R. Storb, K. M. Sullivan, E. D. Thomas, R. P. Witherspoon, and F. R. Appelbaum. 1997. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood* 89: 3055-60.
- Slattery, J. T., J. E. Sanders, C. D. Buckner, R. L. Schaffer, K. W. Lambert, F. P. Langer, C. Anasetti, W. I. Bensinger, L. D. Fisher, F. R. Appelbaum, and et al. 1995. Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant* 16: 31-42.
-

- 
- Slovak, M. L., K. J. Kopecky, P. A. Cassileth, D. H. Harrington, K. S. Theil, A. Mohamed, E. Paietta, C. L. Willman, D. R. Head, J. M. Rowe, S. J. Forman, and F. R. Appelbaum. 2000. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96: 4075-83.
- Small, T. N., D. Avigan, B. Dupont, K. Smith, P. Black, G. Heller, T. Polyak, and R. J. O'Reilly. 1997. Immune reconstitution following T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of age and posttransplant graft rejection prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant* 3: 65-75.
- Socie, G., R. A. Clift, D. Blaise, A. Devergie, O. Ringden, P. J. Martin, M. Remberger, H. J. Deeg, T. Ruutu, M. Michallet, K. M. Sullivan, and S. Chevret. 2001. Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood* 98: 3569-74.
- Steinherz, P. G., P. S. Gaynon, J. C. Breneman, J. M. Cherlow, N. J. Grossman, J. H. Kersey, H. S. Johnstone, H. N. Sather, M. E. Trigg, F. M. Uckun, and W. A. Bleyer. 1998. Treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia with bulky extramedullary disease and T-cell phenotype or other poor prognostic features: randomized controlled trial from the Children's Cancer Group. *Cancer* 82: 600-12.
- Storek, J., M. A. Dawson, B. Storer, T. Stevens-Ayers, D. G. Maloney, K. A. Marr, R. P. Witherspoon, W. Bensinger, M. E. Flowers, P. Martin, R. Storb, F. R. Appelbaum, and M. Boeckh. 2001. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 97: 3380-9.
- Storek, J., T. Gooley, R. P. Witherspoon, K. M. Sullivan, and R. Storb. 1997. Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4 T cell counts. *Am J Hematol* 54: 131-8.
- Storek, J., R. P. Witherspoon, and R. Storb. 1995. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* 16: 413-25.
- Sullivan, K. M., H. J. Deeg, J. Sanders, A. Klosterman, D. Amos, H. Shulman, G. Sale, P. Martin, R. Witherspoon, F. Appelbaum, and et al. 1986. Hyperacute graft-v-host disease in patients not given immunosuppression after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 67: 1172-5.
- Sung, K. W., S. H. Lee, K. H. Yoo, H. L. Jung, E. J. Cho, H. H. Koo, S. K. Lee, J. Kim, D. H. Lim, Y. L. Suh, and D. W. Kim. 2007. Tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell rescue in patients over 1 year of age with stage 4 neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant* 40: 37-45.
- Styczynski J, Toporski J, Wysocki M, Debski R, Chybicka A, Boruckowski D, Wachowiak J, Wojcik B, Kowalczyk J, Gil L, Balwierz W, Matysiak M, Krawczuk-Rybak M, Balcerska A, Sonta-Jakimczyk D (2007) Fludarabine, treosulfan and etoposide sensitivity and the outcome of hematopoietic stem cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *Anticancer Res* 27:1547-1552
- Talmadge, J. E. 1994. The combination of stem cell transplantation and immunotherapy: future potential. *In Vivo* 8: 675-90.
- Talmadge, J. E., E. C. Reed, A. Kessinger, C. A. Kuszynski, G. A. Perry, C. L. Gordy, K. C. Mills, M. L. Thomas, S. J. Pirruccello, B. A. Letheby, M. A. Arneson, and J. D. Jackson. 1996.
-

- 
- Immunologic attributes of cytokine mobilized peripheral blood stem cells and recovery following transplantation. *Bone Marrow Transplant* 17: 101-9.
- Tanaka, J., Y. Tutumi, A. Mori, S. Ohta, S. Kobayashi, M. Asaka, and M. Imamura. 2000. Sequential analysis of HLA-C-specific killer cell inhibitory receptor (CD158b) expressing peripheral blood mononuclear cells during chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 26: 287-90.
- Tanswell, P., G. Heinzl, H. Weisenberger, and W. Roth. 1995. Pharmacokinetic-pharmacodynamic and metabolite modeling with TopFit. *Int J Clin Pharmacol Ther* 33: 550-4.
- Teicher, B. A., C. A. Cucchi, J. B. Lee, J. L. Flatow, A. Rosowsky, and E. Frei, 3rd. 1986. Alkylating agents: in vitro studies of cross-resistance patterns in human cell lines. *Cancer Res* 46: 4379-83.
- Teshima, T., G. R. Hill, L. Pan, Y. S. Brinson, M. R. van den Brink, K. R. Cooke, and J. L. Ferrara. 1999. IL-11 separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 104: 317-25.
- Thomas, E. D., R. A. Clift, A. Fefer, F. R. Appelbaum, P. Beatty, W. I. Bensinger, C. D. Buckner, M. A. Cheever, H. J. Deeg, K. Doney, and et al. 1986. Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med* 104: 155-63.
- Thompson, W. L., and R. W. Wannemacher, Jr. 1984. Detection and quantitation of T-2 mycotoxin with a simplified protein synthesis inhibition assay. *Appl Environ Microbiol* 48: 1176-80.
- Tong, W. P., and D. B. Ludlum. 1980. Crosslinking of DNA by busulfan. Formation of diguanyl derivatives. *Biochim Biophys Acta* 608: 174-81.
- Treosulfan Investigator Brochure. 2004. medac, Hamburg.
- Tricot, G., S. Jagannath, D. Vesole, J. Nelson, S. Tindle, L. Miller, B. Cheson, J. Crowley, and B. Barlogie. 1995. Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment in 225 patients. *Blood* 85: 588-96.
- Uckun, F. M., M. G. Sensel, L. Sun, P. G. Steinherz, M. E. Trigg, N. A. Heerema, H. N. Sather, G. H. Reaman, and P. S. Gaynon. 1998. Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 91: 735-46.
- Uzunel, M., M. Jaksch, J. Mattsson, and O. Ringden. 2003. Minimal residual disease detection after allogeneic stem cell transplantation is correlated to relapse in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 122: 788-94.
- van den Brink, M. R., E. Moore, J. L. Ferrara, and S. J. Burakoff. 2000. Graft-versus-host-disease-associated thymic damage results in the appearance of T cell clones with anti-host reactivity. *Transplantation* 69: 446-9.
- van Lom, K., A. Hagemeijer, E. M. Smit, and B. Lowenberg. 1993. In situ hybridization on May-Grunwald Giemsa-stained bone marrow and blood smears of patients with hematologic disorders allows detection of cell-lineage-specific cytogenetic abnormalities. *Blood* 82: 884-8.
- Vassal, G., D. Challine, S. Koscielny, O. Hartmann, A. Deroussent, I. Boland, D. Valteau-Couanet, J. Lemerle, F. Levi, and A. Gouyette. 1993a. Chronopharmacology of high-dose busulfan in children. *Cancer Res* 53: 1534-7.
-

- 
- Vassal, G., A. Fischer, D. Challine, I. Boland, F. Ledheist, S. Lemerle, E. Vilmer, C. Rahimy, G. Souillet, E. Gluckman, and et al. 1993b. Busulfan disposition below the age of three: alteration in children with lysosomal storage disease. *Blood* 82: 1030-4.
- Verdonck, L. F., E. J. Petersen, H. M. Lokhorst, H. K. Nieuwenhuis, A. W. Dekker, M. G. Tilanus, and R. A. de Weger. 1998. Donor leukocyte infusions for recurrent hematologic malignancies after allogeneic bone marrow transplantation: impact of infused and residual donor T cells. *Bone Marrow Transplant* 22: 1057-63.
- Visser, J. H., G. Wessels, P. B. Hesseling, I. Louw, E. Oberholster, and E. P. Mansvelt. 2001. Prognostic value of day 14 blast percentage and the absolute blast index in bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 18: 187-91.
- Vock, E. L., W.K. et al. 1997. Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the pathogenesis of DNA double-strand breaks. Assessment by pulsed-field gel electrophoresis in cultured human lung epithelial cells. *SOT Annual Meeting*, Cincinnati.
- von der Weid, N. 2001. Late effects in long-term survivors of ALL in childhood: experiences from the SPOG late effects study. *Swiss Med Wkly* 131: 180-7.
- Wagner, H., and M. Feldmann. 1972. Cell-mediated immune response in vitro. I. A new in vitro system for the generation of cell-mediated cytotoxic activity. *Cell Immunol* 3: 405-20.
- Waibler, Z., U. Kalinke, J. Will, M. H. Juan, J. M. Pfeilschifter, and H. H. Radeke. 2007. TLR-ligand stimulated interleukin-23 subunit expression and assembly is regulated differentially in murine plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Mol Immunol* 44: 1483-9.
- Walzer, T., M. Dalod, S. H. Robbins, L. Zitvogel, and E. Vivier. 2005a. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106: 2252-8.
- Walzer, T., M. Dalod, E. Vivier, and L. Zitvogel. 2005b. Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin Biol Ther* 5 Suppl 1: S49-59.
- Wang, S., Y. Liu, F. Fan, J. Yan, X. Wang, and J. Chen. 2007. Inhibitory effects of emodin on the proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cell-induced by angiotensin II. *Phytother Res*.
- Warwick, G. P. 1963. The Mechanism of Action of Alkylating Agents. *Cancer Res* 23: 1315-33.
- Weaver, C. H., K. Longin, C. D. Buckner, and W. Bensinger. 1994. Lymphocyte content in peripheral blood mononuclear cells collected after the administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 13: 411-5.
- Weiden, P. L., N. Flournoy, E. D. Thomas, R. Prentice, A. Fefer, C. D. Buckner, and R. Storb. 1979. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 300: 1068-73.
- Weiden, P. L., K. M. Sullivan, N. Flournoy, R. Storb, and E. D. Thomas. 1981. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 304: 1529-33.
- Weiss, A. J., L. G. Jackson, R. A. Carabasi, E. L. Mancall, and J. C. White. 1962. A phase I study of dimethylacetamide. *Cancer Chemother Rep* 16: 477-85.
- Welte, K., N. Ciobanu, M. A. Moore, S. Gulati, R. J. O'Reilly, and R. Mertelsmann. 1984. Defective interleukin 2 production in patients after bone marrow transplantation and in vitro
-

- 
- restoration of defective T lymphocyte proliferation by highly purified interleukin 2. *Blood* 64: 380-5.
- Werner, S., A. Mendoza, R. A. Hilger, M. Erlacher, W. Reichardt, A. Lissat, C. Konanz, M. Uhl, C. M. Niemeyer, C. Khanna, and U. Kontny. 2007. Preclinical studies of treosulfan demonstrate potent activity in Ewing's sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Westerhof, G. R., R. E. Ploemacher, A. Boudewijn, I. Blokland, J. H. Dillingh, A. T. McGown, J. A. Hadfield, M. J. Dawson, and J. D. Down. 2000. Comparison of different busulfan analogues for depletion of hematopoietic stem cells and promotion of donor-type chimerism in murine bone marrow transplant recipients. *Cancer Res* 60: 5470-8.
- Wheatley, K., A. K. Burnett, A. H. Goldstone, R. G. Gray, I. M. Hann, C. J. Harrison, J. K. Rees, R. F. Stevens, and H. Walker. 1999. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br J Haematol* 107: 69-79.
- White, F. R. 1962. L-Threitol dimethanesulfonate. *Cancer Chemother Rep* 24: 95-7.
- Wick, W. e. a. June 3-6 2000. Glutathion depletion in malignant glioma cells: Sensitization to Treosulfan action in vitro and in vivo. *Fourth Congress of the European Association of Neuro-Oncology*, Copenhagen.
- Wilson, A. P., and F. E. Neal. 1981. In vitro sensitivity of human ovarian tumours to chemotherapeutic agents. *Br J Cancer* 44: 189-200.
- Wood, K. J., and S. Sakaguchi. 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3: 199-210.
- [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). section: transplantation immunobiology.
- Wyllie, A. H. 1985. The biology of cell death in tumours. *Anticancer Res* 5: 131-6.
- Wynn, T. A. 2005. T(H)-17: a giant step from T(H)1 and T(H)2. *Nat Immunol* 6: 1069-70.
- Yang, Y. G., and M. Sykes. 1999. The role of interleukin-12 in preserving the graft-versus-leukemia effect of allogeneic CD8 T cells independently of GVHD. *Leuk Lymphoma* 33: 409-20.
- Zeiger, E., and D. A. Pagano. 1989. Mutagenicity of the human carcinogen treosulphan in Salmonella. *Environ Mol Mutagen* 13: 343-6.
- Zimmermann, S. Y., R. Esser, E. Rohrbach, T. Klingebiel, and U. Koehl. 2005. A novel four-colour flow cytometric assay to determine natural killer cell or T-cell-mediated cellular cytotoxicity against leukaemic cells in peripheral or bone marrow specimens containing greater than 20% of normal cells. *J Immunol Methods* 296: 63-76.
- Zimmermann, S. Y., T. Klingebiel, U. Koehl, J. Soerensen, and D. Schwabe. 2002. Tecelac as antithymocyte globulin in conditioning for childhood allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29: 957-62.
-

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation der Firma medac GmgH Hamburg und der Abteilung pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik III der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter Leitung von Prof. Dr. Klingebiel angefertigt.

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Jörg Kreuter, für die freundliche Aufnahme als Promotionsstudent und für die Ratschläge beim Verfassen meiner Publikation.

Herrn Prof. Dr. Klingebiel für die Möglichkeit diese Arbeit am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Frankfurt anzufertigen.

Der Firma medac GmbH und dem Verein „Hilfe für krebskranke Kinder Frankfurt e. V.“ ohne deren großzügige finanzielle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein persönlicher Dank gilt Dr. Joachim Baumgart für die stets schnelle Hilfe bei fachlichen Fragen.

Frau Dr. Ulrike Köhl für das in mich gesetzte Vertrauen, die immerwährende fachliche Hilfestellung, die zahlreichen Tipps rund um diese Arbeit und das immer offene Ohr für Probleme aller Art. Außerdem Danke ich Frau Dr. Köhl für die Möglichkeit zu umfangreichen Aus- und Weiterbildung in zahlreichen Gebieten, die nicht direkt die Doktorarbeit betreffen.

Frau Rabia El Kaläaoui und Frau Regine Quaritsch für die tolle Hilfe bei der experimentellen Arbeit. Mädels, ohne Euch hätte ich das manchmal nicht gepackt.

Frau Sibylle Wehner für die „Vermittlung“ von Proben und die tolle Zusammenarbeit.

Allen Beschäftigten des Labors für Stammzelltransplantation und Immuntherapien für das tolle Betriebsklima, die ständige Hilfe in labortechnischer, aber auch privater Sicht.

Außerdem meiner gesamten Familie, ohne die ich diese Ausbildung nicht hätte genießen können. Die ständige emotionale und nicht zuletzt finanzielle Unterstützung meiner Eltern und Großeltern haben mir immer Kraft gegeben.

---

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

---

**Name:** Doreen Munkelt  
**Adresse:** Flughafenstrasse 100  
 60528 Frankfurt am Main  
**Mobil:** 0177 6864472  
**Email:** [D.Munkelt@web.de](mailto:D.Munkelt@web.de)  
**Geburtsdatum:** 31.01.1980  
**Geburtsort:** Weißenfels  
**Nationalität:** deutsch  
**Familienstand:** ledig

## AUSBILDUNG

---

<b>1992-1998</b>	<b>Gymnasium Weißenfels West</b> <i>Allgemeine Hochschulreife</i> Abiturdurchschnitt: 1,9 <i>Abiturprüfungen in: Biologie, Englisch, Deutsch, Sozialkunde</i>	<b>Weißenfels</b>
<b>SS1998-WS2004</b>	<b>Martin-Luther-Universität</b> <i>Biologiestudium</i> Vordiplom Note.: 3,0 Diplom Note: 1,6 <i>Diplomprüfung in: Mikrobiologie, Genetik, Immunologie, Biochemie</i>	<b>Halle (Saale)</b>
<b>Seit 2004</b>	<b>Klinikum der Johann-Wolfgang Goethe-Universität</b> <i>Promotion</i> <b><i>Zytotoxizität von Treosulfan im Vergleich zu Busulfan gegenüber malignen Zellen pädiatrischer Patienten mit akuten Leukämien</i></b> Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin Klinik III, Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapien	<b>Frankfurt am Main</b>

## WEITERBILDUNGEN

---

<b>2005-2007</b>	<b>Teilnahme am "ZAFES-Curriculum on Drug Research and Development for Postgraduates and Graduates"</b>	<b>Frankfurt am Main</b>
------------------	---	------------------------------

## TAGUNGEN

---

10_2004	ZAFES KICK-OFF SYMPOSIUM „LIPID SIGNALING“ <i>Posterpräsentation: Comparison of Cytotoxicity of Treosulfan and Busulfan on Malignant Cells</i>	Frankfurt am Main
03_2005	EBMT <i>Poster-Präsentation: Cytotoxic activity of Treosulfan compared to Busulfan against malignant and normal cells</i>	Prag
06_2005	Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung <i>Vortrag: Zytotoxische Aktivität von Treosulfan im Vergleich zu Busulfan gegen maligne und gesunde Zellen</i>	Wilsede
05_2006	ISCT <i>Posterpräsentation: ISHAGE based single platform flowcytometric analysis for detection of absolute viable T cells in fresh or cryopreserved products CD34 or CD133 selected or CD3 and CD19 depleted stem cells, DLI and highly purified CD56+ CD3- NK cells; Cytotherapy, Volume 8, Supplement 1, 2006</i>  <i>Vortrag: Immunoreconstitution of antigen specific T cells against CMV post stem cell transplantation</i>	Berlin

## PUBLIKATIONEN

2004	Grass G, Otto M, Fricke B, Haney CJ, Rensing C, Nies DH, Munkelt D: <i>FieF (YiiP) from Escherichia coli mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress.</i> Arch. Microbiol. 2005 Jan;183(1):9-18. Epub 2004 Nov 11.
2004	Munkelt D, Grass G, Nies DH: <i>The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from Wautersia metallidurans CH34 are transporters of broad metal specificity.</i> J. Bacteriol. 2004 Dec;186(23):8036-43.
2007	Munkelt D, Ulrike Koehl, Stephan Kloess, Stephanie-Yvonne Zimmermann, Rabia El Kalaoui, Sibylle Wehner, Dirk Schwabe, Thomas Lehrnbecher, Ralf Schubert, Joerg Kreuter, Thomas Klingebiel, Ruth Esser. <i>Cytotoxic effects of Treosulfan and busulfan Busulfan against leukemic cells of pediatric patients.</i> Cancer Chemother Pharmacol. 2008 Oct;62(5):821-30
2008	Warzecha J, Bonke L, Koehl U, Munkelt D, Göttig S, Percic D, Arabmotlagh M, Kurth A. <i>The hedgehog inhibitor cyclopamine induces apoptosis in leukemic cells in vitro.</i> Leuk Lymphoma 2008 Dec;49(12):2383-6

Frankfurt, den 20.12.2008