

Aus der Medizinischen Poliklinik - Innenstadt
der Ludwig – Maximilians Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**Expressionsanalyse pathophysiologisch relevanter
Zytokine, Onkogene und Oberflächenmoleküle bei der
kindlichen cALL – Zusammenhang mit dem späteren
Auftreten eines Rezidivs**

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

vorgelegt von
Barbara Kreutzer

aus Würzburg

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Peter Nelson

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dolores Schendel
Prof. Dr. Stefan Bohlander
Prof. Dr. Thomas Kirchner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Irene Teichert von Lüttichau

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2008

„ Because scientists are all too human, most of them will, in the not too-distant future, become discouraged by the enormous complexity of the cytokine network... Fortunately, some investigators will persist and I foresee a long-term future for the discipline of cytokinology as a biomedical science.”

Jost J. Oppenheim, International Journal of Hematology 2001

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	8
2. Einleitung.....	10
2.1. B-Zell Entwicklung und Hämatopoese	10
2.2. Akute lymphatische Leukämie (ALL).....	11
2.3. Zytokine.....	13
2.3.1. Zytokine, Signaltransduktion und Transkription.....	14
2.3.2. Zytokine und Proliferation.....	15
2.3.3. Zytokine und Apoptose.....	15
2.3.4. Zytokine und Immunantwort.....	16
2.3.5. Leukämie und Immunsystem.....	17
2.3.6. Kindliche ALL und Immuntherapie.....	18
2.4. Zusammenhang zwischen der ALL und den untersuchten Zytokinen, Onkogenen, Oberflächenrezeptoren und –liganden.....	19
2.4.1. Interleukin 1 (IL1).....	19
2.4.2. Interleukin 4 (IL4).....	19
2.4.3. Interleukin 6 (IL6).....	19
2.4.4. Interleukin 10 (IL10).....	20
2.4.5. Interleukin 2 (IL2).....	20
2.4.6. CD40.....	21
2.4.7. C-fos und c-myc.....	21
2.4.8. LIF (leukaemia inhibitory factor)	22
2.4.9. Transforming growth factor β (TGF β).....	22
2.4.10. Tumor necrosis factor α (TNF α).....	22
3. Problemstellung.....	24

4. Material und Methoden.....	26
4.1. Material.....	26
4.1.1. Patienten.....	26
4.1.1.1. <i>Diagnose.....</i>	30
4.1.1.2. <i>Risikogruppen</i>	31
4.1.1.3. <i>Rezidiv.....</i>	31
4.1.1.4. <i>Versuchsgruppen.....</i>	32
4.1.2. Labormaterial.....	34
4.1.2.1. <i>Allgemeiner Laborbedarf und Geräte.....</i>	34
4.1.2.2. <i>Reagenzien.....</i>	34
4.1.2.2. <i>Enzyme.....</i>	35
4.1.2.3. <i>Nukleotide.....</i>	36
4.1.2.4. <i>PCR-primer</i>	36
4.1.2.5. <i>Stimulantien.....</i>	38
4.1.2.6. <i>Lösungen und Puffer.....</i>	38
4.1.2.7. <i>Lösungen für die RNA Isolation.....</i>	39
4.1.2.8. <i>Lösungen für die Verdünnung der AMV-RT.....</i>	40
4.1.2.9. <i>Lösung für die cDNA-Synthese.....</i>	41
4.1.2.10. <i>Lösungen für die RT-PCR.....</i>	41
4.2. Methoden.....	42
4.2.1. Prinzip des Versuchsablaufs.....	42
4.2.2. Vorversuche und Kontrollen.....	44
4.2.2.1. <i>Festlegung der Zellzahl, aus der RNA extrahiert wurde.....</i>	44
4.2.2.3. <i>β-Aktin und GAPDH als interne Kontrollen.....</i>	44
4.2.2.4. <i>Negativkontrollen zum Ausschluss von Verunreinigungen.....</i>	44
4.2.2.5. <i>Test auf fehlerfreie Funktion der eingesetzten primer.....</i>	45
4.2.3. Zellseparation.....	45
4.2.4. Stimulation der Zellen.....	46
4.2.5. RNA Präparation.....	48
4.2.5.1. <i>Maßnahmen im Umgang mit RNA.....</i>	49

4.2.6.	Reverse Transkription - cDNA Synthese.....	49
4.2.7.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	50
4.2.8.	Gelelektrophorese.....	52
4.2.9.	Statistische Auswertung.....	53
4.2.9.1.	<i>Fisher Test</i>	54
4.2.9.1.1.	<i>Die Expression eines Markers korreliert mit dem Auftreten eines Rezidivs (negativ prognostisch)</i>	55
4.2.9.1.2.	<i>Die Expression eines Markers korreliert mit dem Ausbleiben eines Rezidivs (positiv prognostisch)</i>	55
4.2.9.1.3.	<i>Die Nicht-Expression eines Markers korreliert mit dem Auftreten eines Rezidivs (negativ prognostisch)</i>	56
4.2.9.1.4.	<i>Die Nicht-Expression eines Markers korreliert mit dem Ausbleiben eines Rezidivs (positiv prognostisch)</i>	56
4.2.10.2.	<i>Mc Nemar Test</i>	57
5.	Ergebnisse und Auswertung	59
5.1.	Zusammenhang zwischen Expression und Rezidiv.....	60
5.1.1.	Interleukin 4 Expression und Rezidiv.....	60
5.1.2.	Interleukin 6 Expression und Rezidiv.....	61
5.1.3.	Interleukin 10 Expression und Rezidiv.....	63
5.1.4.	Interleukin IL1 β Expression und Rezidiv.....	65
5.1.5.	Interleukin 2 Expression und Rezidiv.....	66
5.1.6.	Zytokine, Onkogene und Oberflächenmoleküle deren Expression nicht in Zusammenhang mit dem Auftreten eines Rezidivs steht.....	67
5.1.7.	Einfluss des Blastenanteils im untersuchten Material auf das Expressionsmuster.....	67
5.1.8.	Zusammenfassung der Ergebnisse über den Zusammenhang von Expression und Rezidiv.....	69

5.2.	Expressionsmusters vor und nach Stimulation.....	71
5.2.1.	Veränderung der IL6 Expression nach IL6 Stimulation.....	71
5.2.2.	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss der Stimulation auf das Expressionsmuster.....	72
6.	Diskussion.....	73
7.	Anhang.....	81
7.1.	Abkürzungen.....	81
7.2.	Tabellenverzeichnis.....	84
7.3.	Abbildungsverzeichnis.....	86
7.4.	Lebenslauf.....	87
7.5.	Danksagung.....	88
7.6.	Literaturverzeichnis.....	89

1. Zusammenfassung

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. 80% der Kinder können heute dauerhaft geheilt werden. Eine weitere Verbesserung des Therapieerfolges ist durch alleinige Intensivierung der Therapie nicht zu erreichen, vielmehr muss die Therapieintensität dem individuellen Rezidivrisiko angepasst werden („tailored therapy“). Hochrisikopatienten müssen frühzeitig identifiziert werden, um durch Intensivierung der Therapie bzw. neue Therapieformen deren Heilungschancen zu verbessern. Bei Niedrigrisiko Patienten ist das Ziel durch Therapiereduktion Toxizität und Spätfolgen zu minimieren, ohne jedoch die Heilungschancen zu verringern. In der Risikostratifizierung haben sich das Ansprechen auf Therapie und genetische Veränderungen als besonders wichtige Parameter herausgestellt.

Die ALL ist gekennzeichnet durch eine ungehemmte klonale Proliferation lymphatischer Vorläuferzellen. Physiologische Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Zelltod der Blasten sind gestört. Zytokine sind Botenstoffe, die interzellulär agieren und diese Prozesse regulieren. Bei der ALL spielen sie eine komplexe Rolle in der Genese und im Verlauf der Erkrankung. Sie beeinflussen die Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, wirken direkt leukämio-gen oder stimulieren die Blasten. Sie beeinflussen u.a. die Apoptose von Leukämiezellen und das Ansprechen auf Therapie über veränderte Zytostatikaempfindlichkeit und Chemo-resistenz. Auch die Effektivität der anti-leukämischen Immunantwort wird durch Zytokine reguliert.

Die vorliegende Arbeit untersucht, im Sinne eines screenings, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression pathophysiologisch relevanter Zytokine, Onkogene sowie Oberflächenmoleküle und dem späteren Auftreten eines Rezidivs gibt. Dazu wurde von 26 Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie zum Diagnosezeitpunkt Knochenmark untersucht. Ziel war es neue prognostische Faktoren zu identifizieren. Bei 14 Patienten wurde zusätzlich der Einfluss verschiedener stimulatorisch wirkender Proteine auf das Expressionsmuster untersucht. Für einige Faktoren hat sich ein Zusammenhang zwischen initialer Expression und dem späteren Auftreten eines Rezidivs herausgestellt:

Die Expression von *IL4* in leukämischen Blasten ist ein stark positiv prognostischer Marker. Bei keinem Patienten, der *IL4* exprimiert, tritt ein Rezidiv auf. Bei den hier

untersuchten Patienten ist die Expression von IL6 ein negativ prognostischer Marker. Die Expression von *IL10* korreliert mit dem Auftreten eines Rezidivs. Die *IL1 β* Expression ist mit dem Auftreten eines Rezidivs assoziiert, bzw. die Nicht-Expression mit rezidivfreiem Überleben.

Für einige maligne Erkrankungen konnte bereits die prognostische Aussagekraft von Zytokinexpressionen gezeigt werden. Auch bei der kindlichen ALL könnte die Expression bestimmter Zytokine prognostische Aussagekraft besitzen. Die hier dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Zytokine bei der kindlichen ALL prognostische Relevanz haben können. Dies muss jedoch an einem größeren Patientenkollektiv verifiziert werden.

2. Einleitung

2.1. B-Zell Entwicklung und Hämatopoese

Die *Hämatopoese* findet im Knochenmark, in einem komplexen Milieu aus Stromazellen, lymphohämatopoetischen Zellen, extrazellulärer Matrix, Zytokinen und Wachstumsfaktoren (= *hämatopoetisches microenvironment*) statt. Dieses Mikromilieu steuert und kontrolliert die Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellen, die Differenzierung und die funktionelle Aktivität der zirkulierenden reifen Zellen. *Zytokine* sind lösliche extrazelluläre Proteine und Glykoproteine. Sie werden von Zellen des hämatopoetischen Mikromilieus, aber auch von unreifen und differenzierten hämatopoetischen Zellen sezerniert und können die Entwicklungsprozesse der Hämatopoese in auto- oder parakriner Weise beeinflussen (Janowska-Wieczorek *et al.*, 2001). Zytokine regulieren auch viele andere komplexe Prozesse im Körper, wie z.B. die Immunantwort (Oppenheim, 2001). Neben löslichen Faktoren ist auch der direkte Kontakt zwischen den Zellen der Hämatopoese und denen des lymphohämatopoetischen Mikromilieus für einen kontrollierten Ablauf der B-Zell Entwicklung unerlässlich (Bertrand *et al.*, 2000). Die *Apoptose*, der programmierte Zelltod, ist ein wichtiger Kontrollmechanismus, der die normale Entwicklung sicherstellt. Beschädigte, unnötige oder potentiell gefährliche Zellen werden eliminiert und so die „Zellzahl“ und Integrität des Organismus erhalten. Ein ausgewogener und geordneter Ablauf der B-Zell Entwicklung ist abhängig von Wachstumsfaktoren und akzessorischen Zellen, die Zell Wachstum, Proliferation, Differenzierung und programmierten Zelltod der B-Vorläuferzellen sowie das Überleben normaler B-Zellen regulieren (Bertrand *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2005c). Zytokine spielen in diesem Prozess eine entscheidende Rolle (Wu *et al.*, 2005c). Störungen an Schlüsselstellen der B-Zell Entwicklung können zur Entwicklung von *Leukämien* führen, insbesondere Veränderungen im Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung (Billips *et al.*, 1995) sowie die fehlende Elimination und Apoptose maligner Zellen.

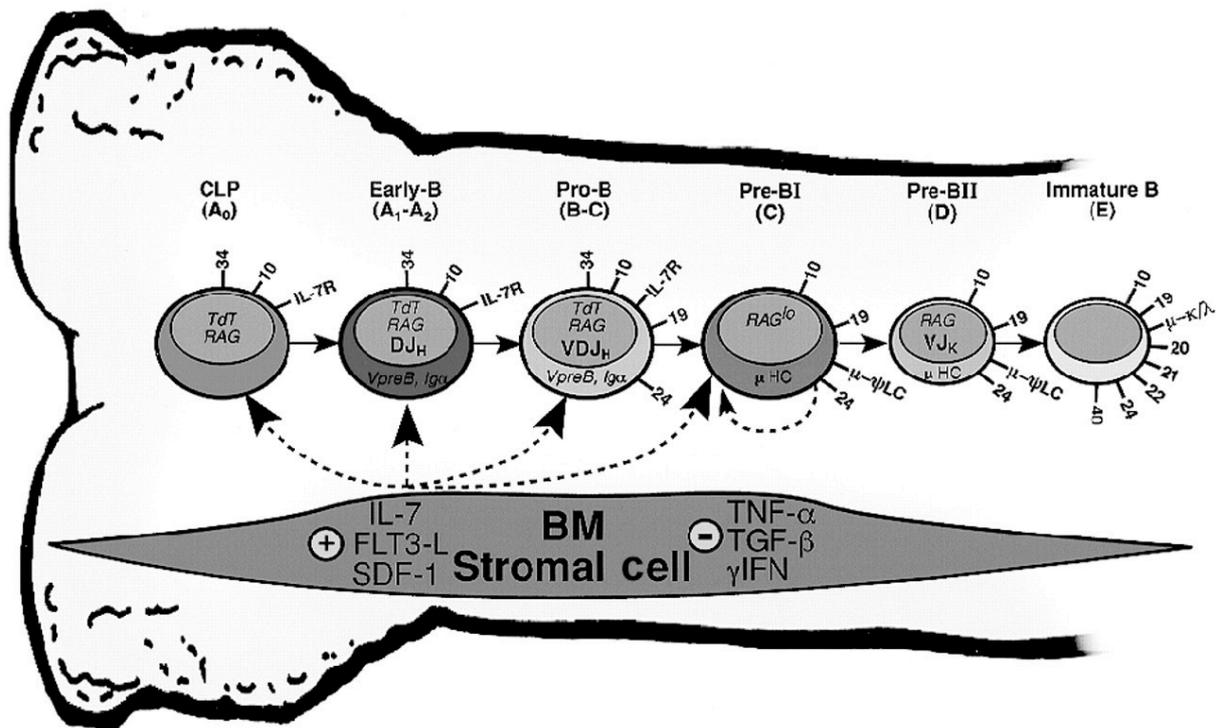


Abb. 1: Stadien der B-Zell Entwicklung. Dieses Modell beschreibt 6 Entwicklungsstadien, angefangen bei der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle CLP bis hin zur unreifen B-Zelle. Die Zahlen auf der Zelloberfläche (19, 20) stehen für die CD Antigene, die die unterschiedlichen Stadien der B-Zell Entwicklung definieren. Intrazelluläre Expressionsmuster können mittels RT-PCR oder Immunfluoreszenz ermittelt werden. Die gestrichelten Pfeile bezeichnen mögliche positive oder negative Wachstumsregulatoren und Chemokine, die von den Knochenmarkstromazellen produziert werden (LeBien, 2000).

2.2. Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die ALL (akute lymphatische Leukämie) ist charakterisiert durch die fehlende Differenzierung und die klonale Proliferation der unreifen, lymphatischen Vorläuferzellen (Wu *et al.*, 2005b). Während nicht maligne Zellen weitere Reifungs- und Differenzierungsschritte durchlaufen und schließlich absterben, stabilisiert sich bei den Leukämiezellen ein normalerweise transients Phänotyp, sie reifen weder vollständig aus, noch werden sie als „schädliche Zellen“ erkannt und eliminiert. Die *pathogenetischen Ereignisse*, die zur Entwicklung einer ALL führen sind noch nicht im Detail bekannt. Man geht von einem mehrstufigen Prozess aus. Eine Reihe leukämieassoziiertes, genetischer Mutationen und Translokationen, z.T. schon pränatalen Ursprungs, sind bekannt. Sie verändern Schlüsselprozesse der Zellfunktion. Kontrollmechanismen der normalen Proliferation werden unterlaufen und die weitere Differenzierung wird blockiert, was zu unbegrenzter Selbsterneuerung führt. Zum anderen kann Resistenzentwicklung gegenüber

Apoptose die Elimination entarteter Zellen verhindern (Pui *et al.*, 2001; Pui and Evans, 1998; Pui *et al.*, 2004). Auch die Empfindlichkeit der Blasten gegenüber Chemotherapie ist zu einem Teil genetisch bedingt und wird bei der Entwicklung einer ALL verändert. Wirksamkeit und Toxizität der Therapie werden durch metabolisierende Enzyme des Wirts sowie Transporter und Zielstrukturen von Pharmaka, wie Rezeptoren und Enzyme, der leukämischen Blasten beeinflusst. Genpolymorphismen für bestimmte Enzyme korrelieren mit erhöhten Medikamentenspiegeln, damit auch einer besseren Wirksamkeit, bei jedoch gleichzeitig erhöhter Toxizität (Pui *et al.*, 2004).

Die ALL ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter, die common ALL der häufigste Subtyp. Betroffen sind unreife lymphoblastische Vorläuferzellen der B-Zell Reihe (Gutjahr, 2004), charakterisiert durch die Expression von CD10, CD19 und TdT (Harms *et al.*, 2003; Lemmers *et al.*, 2000). Fast 80% der Kinder mit einer ALL können heute mit Polychemotherapie und, je nach Stadium der Erkrankung, Radiotherapie dauerhaft geheilt werden (Creutzig, 2002). Eine präzise initiale *Evaluierung des individuellen Risikos* ist nötig, um die Therapie so zu steuern, dass der Patient weder zuviel Therapie erhält, mit dem Risiko schwerwiegender akuter und chronischer Nebenwirkungen, noch zu wenig mit dem Risiko eines Rezidivs. In den letzten 15 Jahren konnten Alter, Leukozytenzahl und frühes Therapieansprechen als Risikofaktoren etabliert werden. Heute werden auch molekulargenetische Veränderungen der Blasten zur Risikostratifizierung herangezogen. Seit Anfang der 90er Jahre stehen Techniken zur Verfügung, mit deren Hilfe nach Erreichen der morphologisch kompletten Remission (weniger als 5% Blasten im Knochenmark) im weiteren Therapieverlauf die minimale Resterkrankung (MRD =minimal residual disease) bestimmt werden kann. MRD ist heute der wichtigste prognostische Parameter. Mit molekulargenetischen Methoden werden für den einzelnen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose individuelle T Zell-Rezeptor- und Immunglobulingen Rearrangements der Blasten identifiziert. Mit entsprechenden Genproben kann ein maligner Klon (bei subklinischer Persistenz oder Rezidiv) mit einer Sensitivität von 10^{-4} bis 10^{-5} detektiert werden (van Dongen *et al.*, 1998). Grundlage für eine weitergehende Verbesserung der Prognose ist ein noch detaillierteres Verständnis der Pathogenese der Erkrankung (Pui *et al.*, 2004). Die Suche nach *neuen prognostischen Markern* fokussiert auf die *biologischen Eigenschaften* der Blasten,

die Wachstum, Proliferation, Apoptoseverhalten, Immunantwort und Ansprechen auf Therapie beeinflussen.

2.3. Zytokine

Zytokine sind lösliche extrazelluläre Proteine und Glykoproteine. Sie sind entscheidende Botenstoffe der interzellulären Kommunikation (Oppenheim, 2001) und wirken auf Zellen, die entsprechende Oberflächenrezeptoren für das jeweilige Zytokin exprimieren. Zytokine haben eine zentrale Funktion in der normalen Hämatopoese. Sie regulieren Zell-Wachstum, Proliferation, Differenzierung und programmierten Zelltod der hämatopoetischen Vorläuferzellen (Bertrand *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2005c). Auch in der Biologie maligner Erkrankungen spielen Zytokine eine entscheidende Rolle. Sie sind beteiligt am Prozess der malignen Transformation, an der Regulation der Apoptose und der antileukämischen Immunantwort (Wu *et al.*, 2005a).

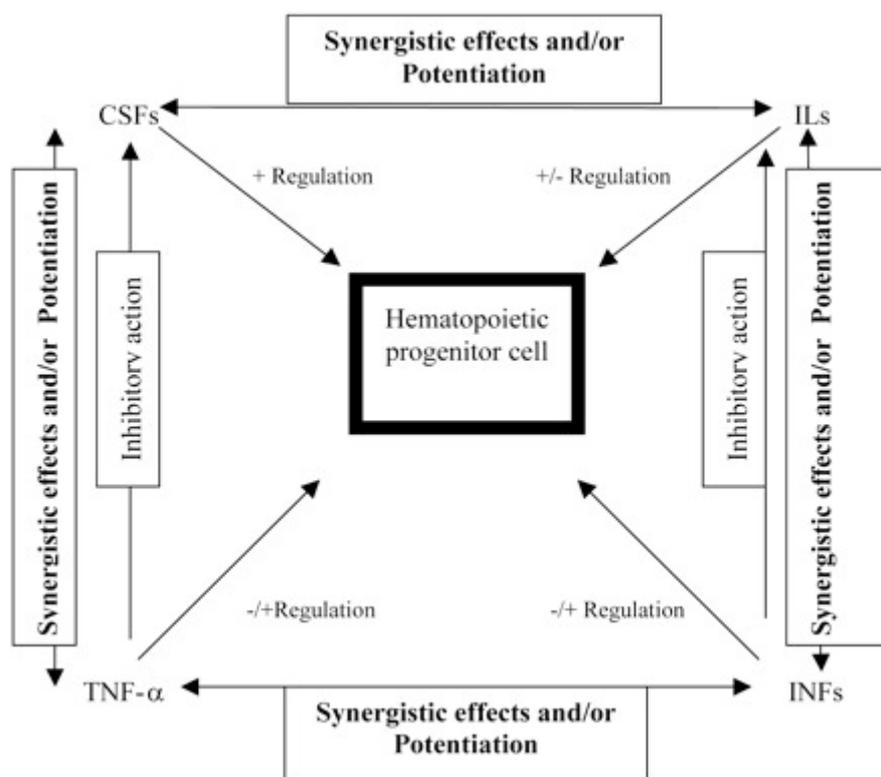


Abb. 2: Regulation der Hämatopoese durch Zytokine. Das Diagramm fasst vereinfacht die Aktionen und Interaktionen der wichtigsten Zytokine, insbesondere positive und negative Wachstumsregulation, zusammen. +/- steht für eine eher positive, -/+ für eine eher negative Regulation (Moqattash and Lutton, 2004).

2.3.1. Zytokine, Signaltransduktion und Transkription

Von den spezifischen Oberflächenrezeptoren der Zytokine wird das Signal, über so genannten Januskinasen (JAKs) und weiter über STATs (signal transducers and activators of transcription) in den Zellkern geleitet (Male, 2005). STATs sind DNA Bindungsproteine, die in den Zellkern eindringen und an spezifische Regulatorsequenzen binden, die die *Transkription* von Zielgenen aktivieren oder unterdrücken (O'Shea *et al.*, 2002; O'Shea *et al.*, 2005; Rawlings *et al.*, 2004). Die Produkte dieser Gene sind die entsprechenden Antworten der Zelle auf das Zytokin (Male, 2005). *JAK und STAT* sind die Hauptsignalübertragungswege für eine Vielzahl von Zytokinen. Sie regulieren die zytokinabhängige Genexpression und wichtige Schritte der Hämatopoese, Apoptose und Immunantwort (O'Shea *et al.*, 2002; Rawlings *et al.*, 2004). Die Transkriptionsfaktoren wirken als Modulatoren der Zellproliferation und Differenzierung. Sie regulieren das Gleichgewicht zwischen der Aktivität apoptotischer und antiapoptotischer Gene (Seth and Watson, 2005). Bei der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen ist die *onkogene Aktivierung der Transkription* ein Schlüsselereignis (Seth and Watson, 2005). Mutationen führen zur Entstehung von Fusionsgenen, die Proliferation fördern, Tumorsuppressorgene hemmen oder Signalwege, die nötig sind zur Differenzierung, unterbrechen (Wilson *et al.*, 2002). Die inadäquate Expression von Zytokinen und abnormale Aktivierung von Zytokinrezeptoren können genetische Aberrationen in der Leukämieogenese ergänzen, indem sie Überleben und Proliferation der Leukämiezellen zusätzlich unterstützen (Wu *et al.*, 2005b). *STAT3 und STAT5* werden über Zytokinrezeptoren aktiviert und führen zu zellulärer Expansion durch Aktivierung von Proteinen, die Zellüberleben fördern, wie antiapoptotisch wirkendes bcl-2 (O'Shea *et al.*, 2002). Die Aktivierung von STAT Transkriptionsfaktoren, v.a. STAT3 und STAT5, bei vielen Krebsarten legt nahe, dass Zytokine eine wichtige Rolle bei Entwicklung und Wachstum von Tumoren spielen (Hodge *et al.*, 2005). STAT5 ist bei bestimmten hämatoonkologischen Erkrankungen konstitutiv aktiviert, könnte also eine Rolle in der Leukämieogenese spielen. Die genaue Funktion in der hämatopoetischen Zelltransformation und Proliferation ist aber noch unklar (Baskiewicz-Masiuk and Machalinski, 2004).

2.3.2. Zytokine und Proliferation

Überleben und Proliferation leukämischer Blasten werden vom Mikromilieu des Knochenmarkes, insbesondere durch Zytokine beeinflusst (*Nishigaki et al., 1997*). Autokrine Wachstumsschleifen, in denen Leukämiezellen ihre eigene Proliferationsfaktoren bilden, sind v.a. für myeloische Leukämien beschrieben (*Janowska-Wieczorek et al., 2001*). Aktuelle Studien haben gezeigt, dass auch bei der ALL eine inadäquate Zytokinexpression und abnorme Aktivierung der Rezeptoren zu klonaler Expansion von transformierten lymphatischen Vorläuferzellen führen kann (*Wu et al., 2005c*).

2.3.3. Zytokine und Apoptose

Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein Hauptkontrollmechanismus, durch den beschädigte oder entartete Zellen aus dem Körper eliminiert werden. Apoptose kontrolliert die Zellzahl und Proliferation im Rahmen der normalen Entwicklung (*Ghobrial et al., 2005*). Zytokine regulieren Apoptose. Veränderungen im Prozess der Apoptose sind ein wichtiger Schritt bei der Entstehung und Progression von malignen Erkrankungen. Zellen, die Gene exprimieren, wie c-myc, mutant p53 oder bcl-2, die Apoptose inhibieren, zeigen *in vivo* eine erhöhte Leukämiogenität (*Lotem and Sachs, 2002b*). Bei normalen Zellen wirken Wachstumsfaktoren und Zytokine als Überlebensfaktoren, indem sie Apoptose verhindern und Differenzierung bis zur reifen Zelle ermöglichen (*Lotem and Sachs, 2002b*). Der Tumor Nekrose Faktor α ist ein solches antiapoptotisch wirkendes Zytokin. Bei Patienten mit malignen Lymphomen korrelieren erhöhte TNF α Spiegel mit ungünstiger Prognose (*Rothman et al., 2006*). Der Mechanismus der Zytokin vermittelten Hemmung der Apoptose ist noch wenig verstanden. Mitglieder der bcl-2 Familie scheinen in diesen Prozess involviert. Bcl-2 schützt Zellen vor Apoptose, neoplastische Zellen auch vor medikamenteninduzierter Apoptose. Bax wirkt als bcl-2 Antagonist und fördert den Zelltod (*Findley et al., 1997; Karawajew et al., 2000*). In Wachstumsfaktor abhängigen Zelllinien verzögert die Überexpression von bcl-2 die durch Zytokinenzug ausgelöste Apoptose. Eine Überexpression von bax induziert oder steigert den spontanen Zelltod (*Karawajew et al., 2000*).

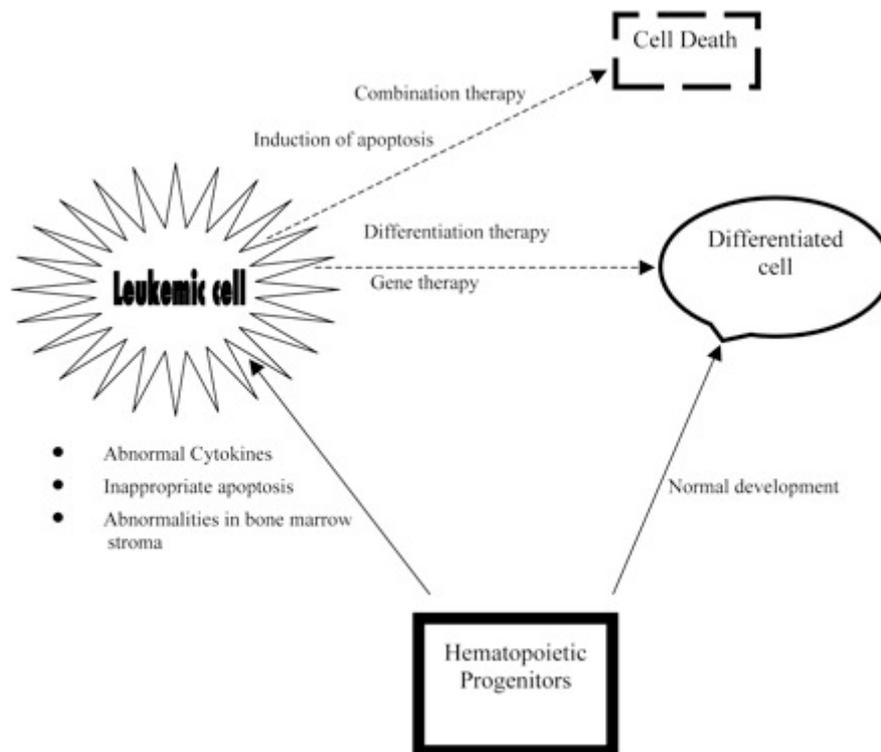


Abb. 3: Leukämiegenese und mögliche Therapieansätze. Das Diagramm zeigt eine schematische Darstellung von Faktoren, die zur Entwicklung einer Leukämie führen können. Die gestrichelten Linien stehen für mögliche Therapieansätze (Moqattash and Lutton, 2004).

2.3.4. Zytokine und Immunantwort

Zytokine steuern die Immunantwort. Sie regulieren die Balance der T Helfer (=TH) Zellen zwischen zellvermittelter TH1 Immunität und humoraler TH2 Immunität. TH1 Zellen sind mitverantwortlich für die Elimination maligner Zellen. Sie produzieren so genannte TH1 Zytokine wie IL2, die zellvermittelte Immunität und damit auch die anti-Tumor Antwort fördern. TH2 Zellen produzieren u.a. IL4, IL6 und IL10, die B-Zellen aktivieren und die Immunglobulinproduktion fördern. Eine Imbalance zwischen TH1 und TH2 Zytokinen scheint bei der Entwicklung bestimmter maligner, insbesondere lymphatischer Erkrankungen, ein wichtiger pathogenetischer Faktor zu sein (Lan *et al.*, 2006). TH2 Zytokine, wie IL10 könnten für die Tumor assoziierte immunologische Anergie mitverantwortlich zu sein, die es den Leukämiezellen ermöglicht, der körpereigenen Überwachung zu entkommen und im Körper zu akkumulieren (Kebelman-Betzing *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2001). Erhöhte Zytokinspiegel, insbesondere für IL6 und IL10, wurden bei Lymphom Patienten nachgewiesen und korrelieren mit schlechter Prognose und ungünstigem klinischen Ausgang der Erkrankung (Rothman *et al.*, 2006).

2.3.5. Leukämie und Immunsystem

Tiermodelle haben gezeigt, dass das Immunsystem Tumoren erkennen und abstoßen kann (Banchereau and Palucka, 2005). Beim Melanom oder Nierenzellkarzinom wird gelegentlich eine spontane Regression beobachtet, was die prinzipielle Kompetenz des Immunsystems unterstreicht (Velders *et al.*, 2001). Tumoren besitzen jedoch die Fähigkeit sich der Entdeckung und Eindämmung durch das Immunsystem zu entziehen (De Vita *et al.*, 1999).

Die *Immunantwort gegen Tumoren* wird vorwiegend über T Zellen vermittelt. CD4+ T Helfer (=TH) Zellen unterstützen als TH1 Zellen andere Zellen des Abwehrsystems bei der zellvermittelten Immunantwort. CD8+ *zytotoxische T Zellen* (=CTL) können Tumor Zellen direkt eliminieren (Velders *et al.*, 2001). Voraussetzung hierfür ist, dass die Tumor Zellen immunogenes Antigen, MHC I (MHC =Major Histocompatibility Complex) und kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 exprimieren (Velders *et al.*, 2001). Auf der Mehrzahl der Tumoren fehlt jedoch die Expression kostimulatorischer Moleküle. Die Aktivierung der T Zell Antwort ist dann abhängig von der Mithilfe *antigenpräsentierender Zellen* (=APCs) (Velders *et al.*, 2001). Professionelle Antigen präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen (=DC), haben die Fähigkeit nekrotische und apoptotische Zellen aufzunehmen sowie Antigen, das auf diesen Zellen exprimiert wird, zu prozessieren und den T Zellen zu präsentieren (Velders *et al.*, 2001). DC sind die potentesten APCs des Immunsystems (Stripecke *et al.*, 2002). Sie zeigen eine starke Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen (Stripecke *et al.*, 2002). DC spielen bei der Immunabwehr gegen Krebs eine entscheidende Rolle, sie präsentieren nativen T Zellen Peptide und induzieren dadurch eine zelluläre Immunantwort die sowohl CD4+ T Helfer als auch CD8+ zytotoxische T Zellen involviert (Banchereau and Palucka, 2005). APCs sind auf Interaktion mit TH Zellen angewiesen (Velders *et al.*, 2001). Die T Helfer Zelle bindet mit ihrem CD40 Liganden (=CD40L) an den Oberflächenrezeptor CD40 auf den APCs (Velders *et al.*, 2001). Die Aktivierung über CD40 ist unerlässlich für die Funktion der APCs (Velders *et al.*, 2001). Durch CD40 – CD40L Interaktion wird die MHC Expression auf APC heraufreguliert, die Zytokinproduktion, insbesondere von IL12, sowie die Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 gefördert (Velders *et al.*, 2001).

Wichtig ist die Frage der immunologischen Toleranzentwicklung gegen Tumorzellen, die die Elimination maligner Zellen durch das Immunsystem verhindert (Velders *et*

al., 2001). Die Strategien der Tumorzellen hierfür sind unterschiedlich: Präsentation von Antigenen ohne kostimulatorische Moleküle (Velders *et al.*, 2001), Verlust von MHC Molekülen, Abstoßen von Tumor-Antigenen mit nachfolgender Blockierung relevanter Immunzellrezeptoren, Hemmung der Funktion Antigen präsentierender Zellen, Expression wenig immunogener Tumor-Antigene, Produktion und Freisetzen löslicher Faktoren die spezifische Immunzellfunktionen unterdrücken (De Vita *et al.*, 1999).

2.3.6. Kindliche ALL und Immuntherapie

Insbesondere für Hochrisiko Patienten, die auf die üblichen Chemotherapieregime nicht ansprechen, ist die Entwicklung neuer Therapien wichtig. Die *Immuntherapie* könnte hier einen viel versprechenden Ansatz darstellen (D'Amico *et al.*, 2004b). Dendritische Zellen sind entscheidend für die spezifische Immunabwehr gegen maligne Zellen. Sie präsentieren den T Zellen immunogene Peptide und lösen dadurch die zelluläre, antileukämische Immunantwort aus (Banchereau and Palucka, 2005). Leukämiezellen sind in der Regel wenig immunogen, ihnen fehlen kostimulatorische Moleküle zur Aktivierung der T Zellen (Velders *et al.*, 2001). Die Steigerung der Tumor Zell Immunogenität ist ein wichtiger Ansatz für die Immuntherapie (D'Amico *et al.*, 2004b). Bei den Leukämien der B-Zellreihe verbessert die Expression des CD40 Liganden deutlich die Immunogenität der Leukämiezellen (Stripecke *et al.*, 2002). Über die Interaktion mit dem CD40 Rezeptor (=CD40R) auf APCs werden diese aktiviert und die zelluläre Immunantwort in Gang gesetzt. Verschiedene Versuche haben gezeigt, dass über die Aktivierung von CD40L auf BCP (b cell precursor =B-Vorläuferzellen) ALL Zellen APCs generiert werden können, d.h. die Leukämiezellen präsentieren dem Immunsystem ihre eigenen leukämiespezifischen Antigene (D'Amico *et al.*, 2004a). Diese Zellen könnten, nach initialer chemotherapeutischer Reduktion der Leukämiezelllast, als autologe Vakzine genutzt werden, um die Immunantwort gegen eigene Leukämiezellen zu stimulieren (Stripecke *et al.*, 2002).

Ein Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter Zytokine, Onkogene oder Oberflächenrezeptoren und -liganden und den biologischen Eigenschaften leukämischer Blasten - und damit auch Prognose - liegen vor diesem Hintergrund

nahe. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb einige der vielversprechendsten Kandidaten untersucht.

2.4. Zusammenhang zwischen der ALL und den untersuchten Zytokinen, Onkogenen, Oberflächenrezeptoren und -liganden

2.4.1. Interleukin 1 (IL1)

IL1 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das vorwiegend von Makrophagen produziert wird und zusammen mit anderen Akutphaseproteinen die Entzündungsreaktion initiiert. Es stimuliert Proliferation, Differenzierung und Funktion von Granulozyten, Lymphozyten, NK Zellen und Makrophagen. *Proliferative* Effekte von IL1 auf myeloische Blasten bei der AML (im Sinne einer autokrinen Wachstumsschleife) sind beschrieben. Andererseits stimuliert IL1 *Immunzellen* (u.a. T Zellen und NK Zellen) und fördert die Entwicklung einer *anti-Tumor Immunantwort* (Apte and Voronov, 2002).

2.4.2. Interleukin 4 (IL4)

IL4 wird von aktivierten T Zellen, Mastzellen und basophilen Granulozyten in nennenswerten Mengen produziert. Es spielt eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und bei der Regulation der Immunantwort, insbesondere der T Zell Effektor Antwort (Brown and Hural, 1997). TH1 Zellen sind Effektorzellen der zellulären Immunität. IL4 unterdrückt die Bildung von TH1 Zellen und fördert die durch Antikörper (=AK) vermittelte *TH2 Immunantwort* (Brown and Hural, 1997; Li-Weber and Krammer, 2003). Verschiebungen im Gleichgewicht zwischen TH1 und TH2 Immunantwort sind Grundlage verschiedener Erkrankungen. Ein Überwiegen der TH1 Antwort kann zu Autoimmunerkrankungen führen, ein Überwiegen der TH2 Antwort zu allergischer Entzündung (Li-Weber and Krammer, 2003). TH1 Zellen sind mitverantwortlich für die Elimination maligner Zellen. Eine Imbalance zwischen TH1 und TH2 Zytokinen wird als pathogenetischer Faktor bei der Entwicklung von Lymphomen diskutiert (Lan *et al.*, 2006).

2.4.3. Interleukin 6 (IL6)

IL6 wird u.a. von B und T Zellen, Monozyten, Fibroblasten produziert (Naka *et al.*, 2002). Es hat ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten bei der

Immunregulation und Hämatopoese und spielt bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen eine Rolle (Hirano, 1998; Naka *et al.*, 2002). IL6 wird auch von Tumorzellen gebildet und beeinflusst die Pathogenese maligner Erkrankungen in vielfältiger Weise: IL6 wirkt als auto- und parakriner *Wachstumsfaktor*, es unterdrückt die Apoptose maligner Zellen und hemmt die spezifische Immunantwort der dendritischen Zellen (Alberti *et al.*, 2004; Fayad *et al.*, 2001; Preti *et al.*, 1997). Bei malignen lymphatischen Erkrankungen ist IL6 als negativ prognostischer Faktor bekannt (Fayad *et al.*, 1998; Fayad *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2002; Naka *et al.*, 2002; Preti *et al.*, 1997; Seymour *et al.*, 1997; Yamamura *et al.*, 1998).

2.4.4. Interleukin 10 (IL10)

IL10 wird von TH2 Zellen, Monozyten und Makrophagen, normalen und neoplastischen B-Zellen produziert (Fayad *et al.*, 2001). Durch Hemmung der TH1 Zytokine - und damit der zellulären Immunität -. hat IL10 eine starke *immunsuppressive* Wirkung. IL10 kontrolliert und limitiert Entzündungsreaktionen (Moore *et al.*, 2001).

Bei malignen Erkrankungen greift IL10 an verschiedenen Stellen an und fördert den Krankheitsprogress. TH2 Zytokine, wie IL10, unterdrücken eine effektive spezifische und unspezifische anti-Tumor Antwort und könnten für die Tumor assoziierte immunologische Anergie mitverantwortlich sein, die die Akkumulation maligner Zellen im Körper ermöglicht (Kebelman-Betzing *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2001). IL10 wirkt auch als Wachstumsfaktor bei malignen B-Zell Erkrankungen und hemmt die Apoptose maligner Zellen. Eine Assoziation von erhöhten IL10 Spiegeln mit negativer klinischer Prognose ist beschrieben (De Vita *et al.*, 1999; Fayad *et al.*, 2001; Khatri and Caligiuri, 1998).

2.4.5. Interleukin 2 (IL2)

IL2 wurde zunächst als T Zell Wachstumsfaktor entdeckt (Nelson, 2004). IL2 steigert die *T Zell Effektorantwort*, auch die anti-Tumor Antwort. Bei soliden Tumoren wie dem metastasierten Melanom und Nierenzellkarzinom und bestimmten malignen, hämatologischen Erkrankungen konnte die klinische Wirksamkeit von IL2 in der Tumorthherapie demonstriert werden (Atkins, 2002). IL2 findet therapeutische Anwendung in der Therapie von Leukämien nach haploidenter

Stammzelltransplantation bei Patienten mit hohem Rezidivrisiko. Viel versprechend sind auch Therapieansätze mit ex vivo IL2-aktivierten NK Zellen bei Patienten mit ALL und minimaler Resterkrankung (Koehl *et al.*, 2004). Neuere Studien zeigen allerdings, dass die physiologischen Hauptaufgaben von IL2 die T Zell Toleranz und Limitierung der T Zell Antwort sind (Malek and Bayer, 2004).

2.4.6. CD40

Für die *spezifische Tumorabwehr* sind Antigen präsentierende Zellen (APCs) und dendritische Zellen entscheidend. Sie präsentieren den T Effektorzellen Tumor Antigen und lösen damit die spezifische, zytotoxische anti-Tumor Antwort aus. CD 40 ist ein Schlüsselmolekül für die Regulation der Immunantwort. Es wird als Rezeptor auf Antigen präsentierenden Zellen exprimiert. Über Ligation von CD40 werden APCs aktiviert und die zelluläre Immunantwort initiiert (D'Amico *et al.*, 2004a). B ALL Zellen, die CD40 Liganden (CD40L) exprimieren sind immunogener und lösen eine effizientere antileukämische Immunantwort aus, als CD40L negative Leukämiezellen (Stripecke *et al.*, 2002).

2.4.7. c-fos und c-myc

C-fos und c-myc sind Protoonkogene, die bei malignen Erkrankungen direkt als Wachstums- oder Transkriptionsfaktoren wirken (Volm *et al.*, 2002). Transkriptionsfaktoren steuern über die Regulation der Genexpression Zellwachstum, Entwicklung, Differenzierung und Apoptose. Veränderungen dieser Kontrollmechanismen können zu malignen hämatologischen Erkrankungen führen (Crans and Sakamoto, 2001). Die Aktivierung von Protoonkogenen ist vermutlich ein wichtiger Schritt in der *Pathogenese* maligner hämatologischer Erkrankungen (Sauerbrey *et al.*, 1996). C-fos führt zur Beschleunigung des Zell Zyklus, was die Proliferationsrate der Zellen steigert (Okada *et al.*, 1999). Bei BCP (=b cell precursor, B Vorläufer) Zelllinien ist c-fos überexprimiert (Astier *et al.*, 2003). C-myc hemmt die Differenzierung vieler Zelltypen. Konstitutive oder deregulierte Expression von c-myc findet man bei vielen Krebserkrankungen (Pelengaris *et al.*, 2002). Mäuse die c-myc überexprimieren neigen u.a. zu Neoplasien der Pro B-Zellen (Janz, 2005).

2.4.8. Leukaemia inhibitory factor (LIF)

LIF wurde als ein Faktor entdeckt, der bei der myeloischen Leukämie M1 der Maus die ungehemmte Proliferation stoppt und die Ausreifung zu Makrophagen bewirkt (Metcalf, 2003).

2.4.9. Transforming growth factor β (TGF β)

TGF β spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Homeostase, es reguliert Zellwachstum, Zellalterung, Differenzierung und Apoptose (Downing, 2004). Das Wachstum wird durch Unterdrückung der c-myc Expression gehemmt. Imbalancen in diesem Gleichgewicht durch inaktivierende Mutationen oder verminderte TGF β Expression spielen eine wichtige Rolle bei der Krebsentwicklung (Lin *et al.*, 2005). Bereits 1995 wurde eine verminderte TGF β Rezeptor Expression bei lymphoiden Tumorzelllinien beschrieben (Capocasale *et al.*, 1995). Bei der T ALL kann TGF β die T Zell Proliferation hemmen (Downing, 2004).

2.4.10. Tumor necrosis factor α (TNF α)

TNF α ist ein potenter *Immunmediator* und ein proinflammatorisches Zytokin. Zentrale Bedeutung hat TNF α in der Pathophysiologie der Sepsis (Fidani *et al.*, 2004). Über Rezeptoren der TNF Familie wird die extrinsische Aktivierung der *Apoptose* getriggert. Die intrinsische Aktivierung findet in den Mitochondrien statt (Ghobrial *et al.*, 2005). Apoptose, der programmierte Zelltod, führt zur Elimination transformierter Zellen. Dysregulation des extrinsischen Weges führt zu maligner Transformation. Mutationen in entsprechenden Genen findet man bei einigen malignen hämatologischen Erkrankungen wie dem NHL (Landowski *et al.*, 2001). TNF α kann selbst über Bindung an Oberflächenrezeptoren der TNF Familie und den fas Signalübertragungsweg Apoptose auslösen (Lauten *et al.*, 2002). Auch Glucocorticoide, wichtige Chemotherapeutika bei der kindlichen Leukämie, induzieren Apoptose, allerdings über andere Mechanismen (Haarman *et al.*, 2003). Sie diffundieren passiv in die Zelle, binden an intrazelluläre GC Rezeptoren und beeinflussen die Transkription pro- und antiapoptotischer Faktoren auf mitochondrialer Ebene (sog. intrinsische Aktivierung der Apoptose) (Ghobrial *et al.*, 2005). Trotz unterschiedlicher Mechanismen der Apoptoseinduktion weisen Untersuchungen bei Kindern mit einer cALL auf einen statistischen Zusammenhang

zwischen dem TNF Genotyp und dem Therapieansprechen auf Cortison hin. Der TNF Genotyp scheint das Rezidivrisiko bei Hochrisikopatienten zu beeinflussen: Patienten mit schlechtem Therapieansprechen auf Cortison, die das TNF2 Allel exprimieren, haben ein statistisch signifikant höheres Rezidivrisiko. Dieser Zusammenhang muss allerdings noch an einem größeren Studienkollektiv verifiziert werden (Lauten *et al.*, 2002).

Die Expressionsanalyse der beschriebenen Parameter in den leukämischen Blasten kann zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung beitragen. Das Expressionsmuster dieser Faktoren spiegelt das biologische Verhalten der Blasten wider. Es liegt nahe, dass biologisch aggressives Verhalten der Blasten sich auf den klinischen Verlauf auswirkt und damit in Zusammenhang mit dem Auftreten eines Rezidivs stehen könnte. In der vorliegenden Studie wurde deshalb bei Kindern mit einer cALL die Expression der oben beschriebenen Zytokine, Onkogene, Oberflächenrezeptoren und -liganden in den leukämischen Blasten auf mRNA Ebene untersucht. Die mögliche prognostische Aussagekraft der Expression wurde in Gegenüberstellung mit dem späteren Auftreten eines Rezidivs geprüft. Ziel der vorliegenden Arbeit war, basierend auf einer umfangreichen und weitgefassten Testung möglicher Kandidaten, neue Prognoseparameter zu identifizieren.

Eine gesteigerte Empfindlichkeit der Blasten für aktivierende und proliferativ wirkende Faktoren ist bei der kindlichen ALL denkbar. Die Zytokinexpression, als Antwort auf die Stimulation der Blasten, spiegelt den Aktivierungszustand der Zellen wider. Wir haben deshalb zusätzlich den Einfluss solcher Faktoren (IL1, IL6 und Ionomycin) auf das Zytokinexpressionsmuster der leukämischen Blasten untersucht.

3. Problemstellung

Die ALL ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter mit ca. 480 betroffenen Kindern pro Jahr alleine in Deutschland. Die Heilungsrate beträgt durch die multimodale Therapie und genaue Risikostratifizierung fast 80% (Schrappe, 2004c). Langzeitstudien zeigen jedoch, dass dieser Therapieerfolg z. T. mit schwerwiegenden Spätfolgen erkauft ist. Deshalb ist eine noch präzisere Abschätzung des individuellen Rückfallrisikos bei Diagnosestellung notwendig, um die Therapie individuell anzupassen und sowohl die Therapieergebnisse weiter zu verbessern, als auch Nebenwirkungen und Spätfolgen zu verringern. Ein genaues Verständnis der Pathophysiologie der Leukämie ist für die Identifizierung neuer prognostisch relevanter Marker, die zur Therapiestratifizierung dienen sollen, von grundlegender Bedeutung.

Zytokine sind als „biologic response modifiers“ beteiligt an Hämatopoese, B-Zell Entwicklung und B-Zellbiologie. Sie spielen eine Rolle bei der Pathogenese, dem Wachstum und der Abwehr maligner Erkrankungen und beeinflussen deren Verlauf (Apte and Voronov, 2002). Zytokinspiegel korrelieren mit Ausbreitung und Prognose der Erkrankung (De Vita *et al.*, 1999; Fayad *et al.*, 1998; Fayad *et al.*, 2001; Khatri and Caligiuri, 1998; Kurzrock, 1997, , 2001; Kurzrock *et al.*, 1993).

Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob die Expression definierter Zytokine, Onkogene und Oberflächenrezeptoren in leukämischen Blasten eine Korrelation mit dem Auftreten oder Ausbleiben eines Rezidivs zeigt.

Die untersuchten Zytokine, Onkogene und Oberflächenrezeptoren sind auf unterschiedliche Weise in die Biologie maligner Erkrankungen involviert. Die Expression bzw. Nicht-Expression jedes analysierten Markers wurde mit dem späteren Auftreten eines Rezidivs korreliert, um die prognostische Aussagekraft zu definieren. Die Expression von Zytokinen, Onkogenen und Oberflächenrezeptoren wird *in vivo* durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur die Basisexpression untersucht, sondern auch das Expressionsmuster nach Stimulation mit einigen ausgewählten Faktoren.

Ziel der Arbeit war es, durch Analyse des Zytokinexpressionsmusters leukämischer Blasten, neue Risikofaktoren zu etablieren, mit Hilfe derer die Stratifizierung der

Therapie für den einzelnen Patienten oder Patientengruppen bereits bei Diagnosestellung individuell adaptiert werden kann.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Patienten

In die statistische Auswertung gingen 26 neuerkrankte Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) ein (Erstdiagnose 1990-1996). Von diesen Patienten wurde Knochenmark untersucht.

Bei den Patienten wurde initial protokollgemäß, nach Einverständniserklärung der Patienten oder ihrer Erziehungsberechtigten, eine diagnostische Knochenmarkspunktion durchgeführt. Die Diagnose wurde morphologisch und mittels Durchflußzytometrie gestellt. Nach Versand des Materials zur Diagnosestellung wurde das Restmaterial für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen verwendet. Bei 3 Patienten war nicht ausreichend Knochenmark vorhanden. Für die Untersuchungen wurde deshalb auf peripheres Blut zurückgegriffen.

In der nachfolgenden Tabelle sind die wichtigsten Charakteristika der Patienten dargestellt.

Patienten	26
Geschlecht: männlich/weiblich	1,6
Alter bei Diagnose (Median in Jahren)	4,0 (2,0 – 15,6 J)
Beobachtungszeit (Median in Jahren)	9,1 (7,0 – 10,6J)
Überlebende	22
verstorbene	4
Risikogruppe	
Niedrig	13
Hoch	13
Rezidiv	
Kein Rezidiv	17
Rezidiv	9

Tabelle 1: klinische Merkmale der untersuchten Patienten

Material	
Knochenmark	23
Peripheres Blut	3
Blastenanteil im untersuchten Material (Mittelwert %)	83 (30-95)

Tabelle 2: untersuchtes Material

Alle pädiatrischen onkologischen Patienten werden im Rahmen von klinischen Therapieoptimierungsstudien betreut. Diese umfassen sowohl diagnostische als auch therapeutische Richtlinien. Nach der Einschätzung des individuellen Rückfallrisikos, entsprechend der jeweiligen prognostischen Kriterien, werden die Patienten in Hoch- und Niedrigrisiko Gruppen eingeteilt. Die Therapie wird dementsprechend risikoadaptiert durchgeführt, d.h. die Hochrisikopatienten werden mit einer intensivierten Therapie behandelt.

22 der untersuchten Patienten haben an den Studien COALL-89 und COALL-92 teilgenommen, 3 Patienten wurden in der ALL-BFM 90 Studie behandelt. Ein Patient wurde nach Protokoll NHL-BFM 90 im Therapiezeit PBLL behandelt, der der ALL BFM Therapie entspricht.

Nachfolgend sind Übersichten der Therapieprotokolle COALL 92 und ALL-BFM 90 abgebildet.

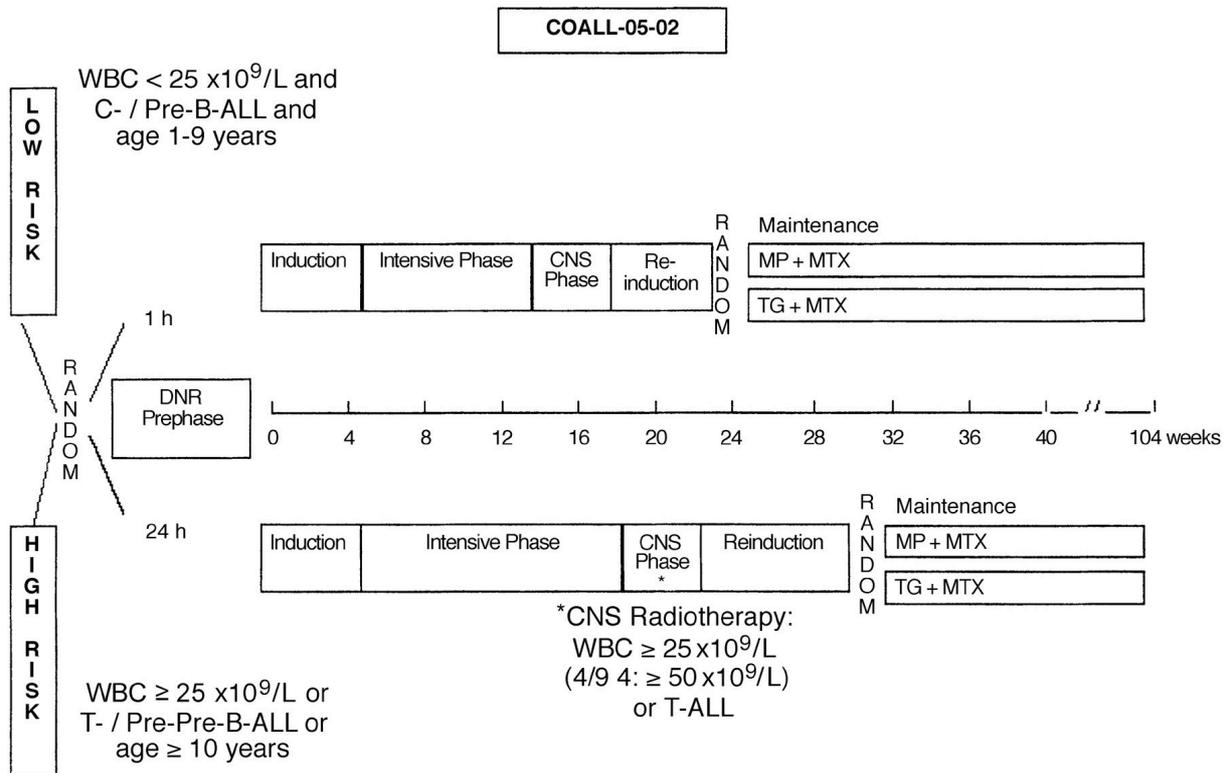


Abbildung 4: Therapieprotokoll COALL 92. Risikostratifizierung: Die Patienten werden entsprechend der COALL Risikokriterien in die Niedrig- und Hochrisiko Gruppe eingeteilt. Die risikoadaptierte Chemotherapie läuft in Blöcken ab: An eine Vorphase mit Daunorubicin schließt sich die Induktionstherapie an, gefolgt von einer Intensivierung mit ZNS Phase (CNS =central nervous system) und erneuter Reinduktion. Nach Ende der intensiven Chemotherapie folgt eine langdauernde orale Erhaltungstherapie an. Die einzelnen Therapieblöcke bestehen jeweils aus mehreren Chemotherapeutika, die im Wechsel verabreicht werden (Harms *et al.*, 2003).

Die Indikation zur Schädelbestrahlung wurde in COALL-92, im Vergleich zur vorausgegangenen Studie COALL-89, zurückhaltender gestellt um neurotoxische Spätfolgen zu vermeiden. In der Erhaltungstherapie wurden zwei verschiedene Purinanologa (Mercaptopurin und Thioguanin) randomisiert appliziert. Abgesehen von diesen Veränderungen sind beide Therapien vergleichbar.

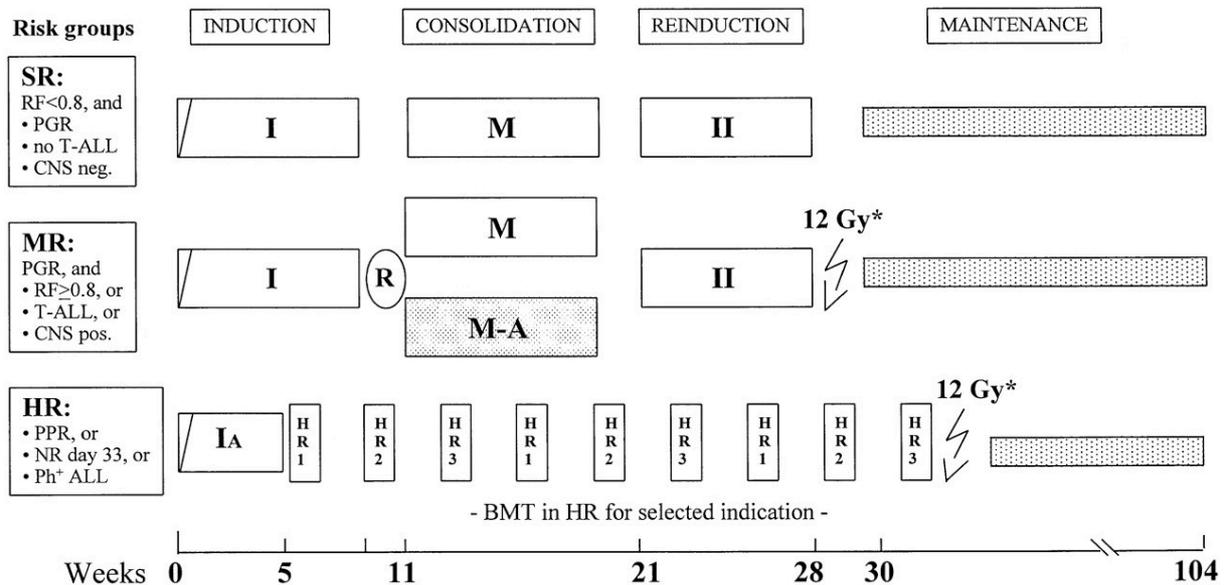


Abbildung 5: Therapieprotokoll ALL-BFM 90. Risikostratifizierung: die Patienten werden entsprechend der ALL-BFM Risikokriterien in die Niedrig-, mittlere und Hochrisiko Gruppe eingeteilt. Die risikoadaptierte Chemotherapie läuft in Blöcken ab: eine initiale Induktionstherapie, anschließender Konsolidierung, gefolgt von einer erneuten Reinduktion. Nach Ende der intensiven Chemotherapie schließt eine lang dauernde orale Erhaltungstherapie an. Hochrisiko Patienten erhalten nach einer verkürzten Induktionstherapie 9 hochdosierte, kurze Therapieblöcke, bzw. bei entsprechender Indikation eine Knochenmarkstransplantation. Die einzelnen Therapieblöcke bestehen jeweils aus mehreren Chemotherapeutika, die im Wechsel verabreicht werden (Schrappe *et al.*, 2000).

Beide Therapieprotokolle verwenden ähnliche Medikamente in leicht veränderter Abfolge. Die Therapie nach COALL 92 unterscheidet sich von der Therapie nach ALL-BFM 90 im Wesentlichen für Patienten mit niedrigem Rezidivrisiko durch eine initiale Daunorubicingabe, eine hochdosierte Cytarabingabe und einmalige Gabe VM26, ein Epipodophyllotoxin. Für die Hochrisikopatienten wurden in der ALL-BFM 9 Blöcke hochdosierter Chemotherapie eingeführt. Die 5 Jahres Überlebensraten (=5 EFS) der beiden Therapiestudien unterscheiden sich nicht wesentlich. In der ALL-BFM 90 Studie beträgt das 5J EFS für alle Patienten 78%, für Patienten mit Standard Risiko (=SR) 84%, mit mittlerem Risiko (=MR) 82%, mit hohem Risiko (=HR) 44% (Schrappe, 2000). In der COALL 92 Studie beträgt das 5J EFS für alle Patienten 78% (Harms *et al.*, 2003), für Patienten mit Standard Risiko 82%, für Hochrisikopatienten 75% (Harms and Janka-Schaub, 2000).

Um das vorliegende Patientenkollektiv zum Gesamtkollektiv der COALL-92 Therapiestudie in Relation zu setzen, sind im folgenden Abschnitt die vergleichenden

Prozentangaben aus den Studienauswertungen zu Geschlecht, Alter, Risikogruppen, Rezidiven und Überlebenszeiten in Klammern angegeben.

16 der 26 untersuchten Patienten waren männlich, 10 weiblich. Dies entspricht einem Verhältnis männlich zu weiblich von 1,6 (vgl. (Harms and Janka-Schaub, 2000) *männlich : weiblich 1,4*). Das Alter bei Diagnosestellung betrug im Median 4,0 Jahre (vgl. (Schrappe, 2004a) *Alter bei Diagnosestellung im Median 7J*). Die Nachbeobachtungszeit, d.h. die Zeit von der Erstdiagnose bis zur letzten Meldung, betrug bei den rezidivfrei überlebenden Patienten mindestens 7 Jahre, maximal 10,6 Jahre. In der vorausgegangenen Therapiestudie COALL-89 änderte sich das EFS (=event free survival) nach 5 Jahren nur noch geringfügig, das EFS nach 5 Jahren betrug 78,5%, nach 10 Jahren 75,0% (Harms and Janka-Schaub, 2000). Der Großteil der Rezidive trat innerhalb der ersten 3 Jahre nach Diagnosestellung auf (Harms and Janka-Schaub, 2000). Man kann also davon ausgehen, dass bei den in dieser Untersuchung als rezidivfrei gewerteten Patienten auch in Zukunft kein Rückfall der Grunderkrankung auftreten wird. Die Daten der Patienten wurden zuletzt im Juli 2003 aktualisiert.

4.1.1.1. Diagnose

Die Diagnose einer ALL wurde morphologisch und mittels Immunfluoreszenz gestellt. Definitionsgemäß musste der Anteil der Blasten an den kernhaltigen Zellen des Knochenmarks mehr als 25% betragen oder es waren Blasten im Liquor nachweisbar. Knochenmark, Blutaussstriche und Liquorpräparate wurden zentral im Labor der Studie in Hamburg mitbegutachtet. Die immunophänotypischen Untergruppen der ALL wurden nach den Kriterien der „European Group for the Immunological Characterization of Leukemias“ bestimmt: die common ALL war durch folgende Kriterien definiert: TdT+ (=terminale Desoxynucleotidtransferase), CD19⁺, CD10⁺, cyIgM⁻ (=zytoplasmatisches Immunoglobulin M), slg⁻ (=surface Ig). Der Nachweis der Oberflächenantigene wurden als positiv gewertet, wenn mindestens 20% der Blasten das Antigen exprimierten (Harms *et al.*, 2003; Lemmers *et al.*, 2000).

Der Blastenanteil betrug bei den untersuchten Patienten im Mittel 83%.

4.1.1.2. Risikogruppen

Jeweils die Hälfte der untersuchten Patienten (je 13) wurde nach COALL-92 Kriterien in die Niedrig- bzw. Hochrisikogruppe eingeteilt (vgl.(Harms and Janka-Schaub, 2000) COALL-92: 48% low risk, 52% high risk). Die Kriterien für die Einteilung in Hoch- und Niedrigrisikogruppe sind nachfolgend aufgeführt (Harms and Janka-Schaub, 2000).

Einteilung in Risikogruppen nach COALL-92			
Niedriges Risiko		Hohes Risiko	
Leukozyten <25/nl bei Diagnose	und	Leukozyten >25/nl bei Diagnose	oder
Alter ≤1 bis <10 Jahre	und	Alter ≥10 Jahre	oder
Common ALL oder prä-B-ALL	und	Pro-B-ALL oder T ALL	oder
Komplette Remission am Tag 29 im Knochenmark	und	Keine komplette Remission am Tag 29 im Knochenmark	oder

Tabelle 3: Einteilung in Risikogruppen entsprechend den Kriterien der Therapiestudie COALL-92. Die Daten wurden bei Diagnosestellung erhoben. Die Einteilung in die immunophänotypischen Untergruppen erfolgte gemäß den Richtlinien der „European Group for the Immunological Characterization of Leukemias“ (Harms *et al.*, 2003; Lemmers *et al.*, 2000). Protokollgemäß wird für alle Patienten nach der Induktionstherapie am Tag 29 eine Kontrollpunktion zur Beurteilung der Remission im Knochenmark durchgeführt. Definitionsgemäß wird das Rezidivrisiko als niedrig eingeschätzt, wenn alle aufgeführten Kriterien erfüllt sind. Ein hohes Rezidivrisiko liegt bereits vor, wenn eines der genannten Hochrisikomerkmale erfüllt ist.

Die Patienten der ALL-BFM 90 Studie wurden für die statistische Auswertung gemäß COALL 92 Kriterien den Risikogruppen zugeordnet.

4.1.1.3. Rezidiv

Ein Rezidiv einer ALL kann entweder im Knochenmark, im Liquor oder in den Hoden auftreten. Auch ein kombinierter Befall ist möglich. Die Diagnose wird gestellt, wenn nach erfolgreicher Therapie im Knochenmark erneut >25% Blasten, bzw. im Liquor oder Hodenbiopsat Blasten nachweisbar sind (Schrappe, 2004a).

Bei 9 von 26 Patienten, das entspricht 35% der untersuchten Patienten, trat ein Rezidiv auf, 65% der Patienten blieben innerhalb des Beobachtungszeitraums rezidivfrei (vgl.(Harms and Janka-Schaub, 2000) COALL-92 EFS nach 5 J 78,5%).

Tabelle 4 schlüsselt die Rezidive innerhalb der Risikogruppen auf.

Rezidive innerhalb der einzelnen Risikogruppen

Niedrigrisiko Gruppe: 4 von 13 Patienten (30%) erlitten ein Rezidiv (vgl.(Harms and Janka-Schaub, 2000) 6% COALL-92)

Hochrisiko Gruppe: 5 von 13 Patienten (38%) erlitten ein Rezidiv (vgl.(Harms and Janka-Schaub, 2000) 30% COALL-92)

Rezidivpatienten, aufgeschlüsselt nach ihrer initialen Risikoeinteilung

44% der Rezidivpatienten waren initial in die Niedrigrisiko Gruppe eingeordnet worden (vgl.(Harms and Janka-Schaub, 2000) 31% COALL-92)

56% der Rezidivpatienten waren initial in die Hochrisiko Gruppe eingeordnet worden (vgl.(Harms and Janka-Schaub, 2000) 69% COALL-92)

Tabelle 4: Rezidivrate innerhalb der Risikogruppen. Nicht alle Patienten werden initial, mit Hilfe der bekannten prognostischen Parameter als Hochrisiko Patienten erkannt. Ein Großteil der Rezidiv Patienten wird zunächst als Niedrigrisiko eingestuft und möglicherweise so untertherapiert. Hier differiert der Anteil in unserem Patientenkollektiv mit 30% Rezidiven innerhalb der Niedrigrisiko Gruppe am deutlichsten vom Studienkollektiv mit 6% (Harms and Janka-Schaub, 2000).

Bei den hier untersuchten Patienten trat bei 4/13 Patienten der Niedrigrisiko Gruppe (vgl.(Harms and Janka-Schaub, 2000) 6% COALL-92) und bei 5/13 Patienten der Hochrisikogruppe (vgl.(Harms and Janka-Schaub, 2000) 30% COALL-92) ein Rezidiv auf. Das bedeutet, dass 44% der Rezidivpatienten initial der Niedrigrisiko Gruppe zugeordnet wurden (vgl.(Harms and Janka-Schaub, 2000) 31% COALL-92).

4.1.1.4. Versuchsgruppen

Zwei Versuchsansätze mit unterschiedlicher Fragestellung wurden durchgeführt und ausgewertet. Von allen 26 oben beschriebenen Patienten wurde bei Erstdiagnose die spontane Expression der vorher beschriebenen Zytokine, Onkogene, Rezeptoren und Liganden in nicht kultivierten Zellen im Knochenmark bzw. im peripheren Blut (n=3) untersucht und in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt. Bei 14 dieser Patienten war ausreichend Material vorhanden um die Expression der Targets zusätzlich nach Kultivierung und Stimulation zu untersuchen. Statistisch entsprechen diese 14 Patienten einer zufälligen Patientenauswahl. Die Ergebnisse der Stimulationsuntersuchungen stehen damit für das Gesamtkollektiv.

In der nachfolgenden Tabelle sind die klinischen Merkmale dieser 14 Patienten aufgeführt.

Patienten, bei denen Stimulationsversuche durchgeführt wurden	14
Geschlecht: männlich/weiblich	1,8
Alter bei Diagnose (Median in J)	4,9 (2,0 – 12,7)
Risikogruppe	
Niedrig	6
Hoch	8
Rezidiv	
Kein Rezidiv	7
Rezidiv	7

Tabelle 5: klinische Merkmale der Patienten, bei denen zusätzlich der Einfluss von Stimulantien auf das Expressionsmuster untersucht wurde

9 der 14 Patienten waren männlich, 5 weiblich. Das entspricht einem Verhältnis männlich : weiblich von 1,8 (vgl.(Harms and Janka-Schaub, 2000) COALL-92 männlich : weiblich 1,4). Das Alter bei Diagnosestellung betrug im Median 4 Jahre (vgl.(Schrapppe, 2004a) 4,7 J).

6 von 14 Patienten wurden bei Diagnosestellung in die Niedrigrisikogruppe (entspricht 43%), 8 von 14 Patienten in die Hochrisikogruppe (entspricht 57%) eingestuft (vgl. (Harms and Janka-Schaub, 2000) COALL-92 48% low risk, 52% high risk;). Bei 7 von 14 Patienten (entspricht 50%) trat ein Rezidiv auf (vgl.(Harms and Janka-Schaub, 2000) 5J EFS 78,5%).

4.1.2. Labormaterial

4.1.2.1. Allgemeiner Laborbedarf und Geräte

Einmalpipetten steril, 1, 2, 5, 10 und 25 ml	Costar, Cambridge MA, USA
Mikropipetten 200-1000µl, 50-250µl, 10-100µl, 0,5-10µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen steril, mit Filter für Eppendorfpipetten	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße steril, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, Safe Lock steril, 0,5 bzw. 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
96-well Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge Hettich rotanta TRC für Reaktionsgefäße von 10-50 ml	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Hettich Typ 1306 für Reaktionsgefäße von 0,5 - 2ml	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
sterile Werkbank RETEC C4301-1	Retec, Mühlheim Ruhr, Deutschland
Brutschrank „Funktion Linie“ 37 °C, 5% CO ₂	Heraeus, Hanau, Deutschland
Schüttler VF2	IKA-Werk, Staufen, Deutschland
DNA Thermal Cycler	Perkin-Elmer, Rodgau – Jügesheim, Deutschland
Elektrophoresebox	
UV-Platte Fluo-Link	Bachofer, Reutlingen, Germany

4.1.2.2. Reagenzien

Borsäure	Fluka, Steinheim, Deutschland
Zitronensäure 30%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diethyl-Pyrocbonat	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
DTT (=Dithiothreitol)	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
EDTA (Na ₂)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 99%	Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethanol 70 % und 100 % unvergällt	Apotheker der Universitätsklinik der LMU, München, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Pan-Systems, Aidenbach, Deutschland
Ficoll-Paque spezifisches Gewicht 1,077 g/ml	Pharmacia, Upsala, Schweden
Gel loading solution	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
Glycerol	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
Guanidinium-Thiocyanat	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Metaphor Agarose	FMC Bio Products, Rockland, USA
Mineralöl	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
Molekulargewichtsmarker pBR322 HaeIII Digest	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
Na ₃ Citrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na-Acetat 3xH ₂ O	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland
NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-Lauroylsarcosin	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
Non-Idet P-40	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
Phenol-Chloroform 1:5 (Wasser gesättigt)	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
RPMI 1640	Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland
Tris Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma – Aldrich, München, Deutschland

4.1.2.2. Enzyme

AMV Reverse Transkriptase (25.000 U/ml)	Böhringer, Mannheim, Deutschland
RNAse Inhibitor (10-50 x 10 ³ U/ml)	Böhringer, Mannheim, Deutschland
Taq DNA-Polymerase (1-5 x 10 ³ U/ml)	Böhringer, Mannheim, Deutschland

4.1.2.3. Nukleotide

Oligo dT (1A ₂₆₀ U in 50 µl gelöst)	Böhringer, Mannheim, Deutschland
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) je 100 mM)	Pharmacia

4.1.2.4. PCR-primer

primer (1 µM/RT-PCR Ansatz)	Stratagene, La Jolla, USA
--------------------------------	---------------------------

In der nachfolgenden Tabelle sind die Sequenzen der einzelnen primer aufgeführt.

Interleukin 1α	
Sense primer	5' GAG AGC ATG GTG GTA GTA GCA ACC 3'
Antisense primer	5' CTG ATG ACC CAC ACG AAC CGT CCC 3'
Interleukin 1β	
Sense primer	5' CTT CAT CTT TGA AGA AGA ACC TAT CTT CTT 3'
Antisense primer	5' ATC TCG ACC TCT CAC ATC TAG GGT TTT TAA 3'
Interleukin 2	
Sense primer	5' ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT T 3'
Antisense primer	5' AGT TTC GTA GTA GAG TTG TGA CTG 3'
Interleukin 4	
Sense primer	5' ATG GGT CTC ACC TCC CAA CTG CT 3'
Antisense primer	5' TAC TCT CTC TTT ATA AGT TTC ACA AGC 3'
Interleukin 6	
Sense primer	5' ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC 3'
Antisense primer	5' TCA GGT CGG ACT CCC GAG AAG 3'
Interleukin 6 Rezeptor	
Sense primer	5' CAT CTT TCT CGA CAG AGG GAG 3'
Antisense primer	5' CCG TTC AGC CCG ATA TCT GAG 3'

Interleukin 10	
Sense primer	5' AAG GAT CCA TGC ACA GCT CAG CAC TGC 3'
Antisense primer	5' CTG CTC CAC TGC CTT GCT CTT ATT 3'
CD40 Ligand	
	Sequenzen vom Hersteller nicht angegeben
CD40 Rezeptor	
	Sequenzen vom Hersteller nicht angegeben
c-fos	
Sense primer	5' CTA CGA GGC GTC ATC CTT 3'
Antisense primer	5' TCT GTC TCC GCT TGG AGT 3'
c-myc	
Sense primer	5' CCA GCA GCG ACT CTG GTA 3'
Antisense primer	5' CCA AGA CGT TGT GTG TTC 3'
Leukemia Inhibitory Factor	
Sense primer	5' GCC ATA CGC CAC CCA TGT CAC AAC 3'
Antisense primer	5' GAC CTG TTC GAT ACA CCG GGG TTG 3'
Transforming Growth Factor β1	
Sense primer	5' CAG AAA TAC AGC AAC AAT TCC TGG 3'
Antisense primer	5' CTG CTG TGC CTA TTG TGT GAC GTT 3'
Tumor Necrosis Factor α	
Sense primer	5 CGG GAC GTG GAG CTG GCC GAG GAG 3'
Antisense primer	5' CTC GAC TCT CTA TTG GTC GAC CAC 3'
β-Aktin	
Sense primer	5' TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA 3'
Antisense primer	5' GG GAG GTA GCA GGT GGC GTT ACG AAG ATC 3'
GAPDH	
Sense primer	5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA 3'
Antisense primer	5' TCT ACA CGG CAG GTC AGG TCC ACC 3'

Tabelle 6: Sequenzen der primer für die RT-PCR. Mit diesen primern wurde mittels RT-PCR Zytokinexpression in der mononukleären Fraktion des KM untersucht.

4.1.2.5. Stimulantien

rekombinantes humanes IL1 α (3000 U/ml)	genetics institute, Cambridge, USA
rekombinantes humanes IL6 (11.220 U/ml)	genetics institute, Cambridge, USA
Ionomycin (50 μ M)	Sigma – Aldrich, München, Deutschland

4.1.2.6. Lösungen und Puffer

Der gewünschte pH Wert der Lösungen wurde mit NaOH oder HCl eingestellt.

DEPC Wasser (Diethyl-Pyrocbonat Wasser)

Diethyl-Pyrocbonat (Sigma)	2 ml
aqua bidest	ad 2000 ml

unter dem Abzug 2h rühren, dann autoklavieren.

PBS 1x (phosphate buffered saline)

Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	50,60 g
KH ₂ PO ₄	12,17 g
NaCl	21,92 g
aqua bidest	ad 5 l

TBE-Puffer

Tris Base	10,8 g
Bor Säure	5,5 g
EDTA 0,5 M, pH 8	4 ml
aqua bidest	ad 1000 ml

EDTA 0,5M Lösung: 9,3 g in 50 ml aqua bidest, pH 8 einstellen

Hämolysepuffer

NH ₄ Cl	8,3 g
NaHCO ₃	1,0 g
EDTA (Na ₂)	40 mg
aqua bidest	ad 1000 ml
pH 7,2 einstellen	

0,75 M Na₃Citrat

Na ₃ Citrat	44,12 g
aqua bidest	ad 200 ml
mit 30% Zitronensäure pH 7,0 einstellen	
Autoklavieren	
Zitronensäure 30%: 30g Zitronensäure + 100ml Aqua bidest	

2 M Na-Acetat

Na-Acetat 3xH ₂ O (Sigma)	54,44 g
DEPC-H ₂ O	ad 200 ml
mit Essigsäure 99% pH 4,0 einstellen	

3 M Na-Acetat

Na-Acetat 3xH ₂ O (Sigma)	81,66 g
DEPC-H ₂ O	ad 200 ml
mit Essigsäure 99% pH 5,2 einstellen	

4.1.2.7. Lösungen für die RNA Isolation

4,4 M Guanidinium-Thiocyanat

Guanidinium-Thiocyanat (Sigma)	104 g
aqua bidest	ad 200 ml
kann nicht autoklaviert werden	

Sacrosyl 10%

N-Lauroylsarcosin (Sigma)	10 g
aqua bidest	ad 100 ml
Autoklavieren	

Chomczynski-Lösung oder Lösung D (=Denaturierungslösung)

4,4 M Guanidinium-thiocyanat	6 ml
0,75 M Citrat	220 μ l
Sarcosyl 10%	330 μ l
Mercaptoethanol	47,5 μ l

die Chomczynski-Lösung kann nicht autoklaviert werden.

4.1.2.8. Lösungen für die Verdünnung der AMV-RT

1 M K⁺-Phosphat Lösung

K ₂ HPO ₄	22,82 g
DEPC Wasser	100 ml

KH ₂ PO ₄	13,61 g
DEPC Wasser	100 ml

40,1 ml der K₂HPO₄ Lösung und 9,4 ml der KH₂PO₄ Lösung mischen, pH 7,4 einstellen und autoklavieren

20mM DTT

DTT	3,084 g
DEPC Wasser	1000 ml
Autoklavieren	

Verdünnungslösung für AMV-RT

Glycerol	1 ml
1 M K ⁺ Phosphat	100 μ l
Non idet P40	20 μ l
DTT 20 mM	1 ml
DEPC Wasser	7880 μ l
ergibt 10 ml Verdünnungslösung für AMV-RT	

4.1.2.9. Lösung für die cDNA-Synthese

Der Inkubationspuffer wurde mit der AMV Reverse Transkriptase geliefert (Böhringer, Mannheim, Deutschland)

Inkubationspuffer

Tris Cl	250 mM
MgCl	40 mM
KCl	150 mM
DTT	5 mM
pH 8,5.	

4.1.2.10. Lösungen für die RT-PCR

Der PCR-Reaktionspuffer wurde mit der TaqDNA Polymerase geliefert (Böhringer, Mannheim, Deutschland)

PCR-Reaktionspuffer (10x-konzentriert)

Tris-HCl	100 mmol/l
MgCl ₂	15 mmol/l
KCl	500 mmol/l
pH 8,3	

dNTP (1,25 mM)

dATP 100nM	15 μ l
dCTP 100nM	15 μ l
dGTP 100nM	15 μ l
dTTP 100nM	15 μ l
aqua bidest	1140 μ l

PCR-Master Mix

PCR-Reaktionspuffer (10x-konzentriert)	10 μ l
dNTP 1,25 mM	16
aqua bidest	51,5 μ l

4.2. Methoden

4.2.1. Prinzip des Versuchsablaufs

Die mRNA Expression verschiedener, für die Biologie der ALL interessanter Proteine, durch die Leukämiezellen wurde untersucht. Der Nachweis der Expression mittels RT-PCR wurde für jeden der untersuchten Stoffe in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt, um die prognostische Aussagekraft zu prüfen. Die Untersuchungen wurden an mononukleären Zellen des Knochenmarks, das den Patienten zu initialer klinischer Diagnostik entnommen wurde, durchgeführt. Der Anteil leukämischer Blasten lag im Mittel bei 83%.

Vereinfacht spielt sich die Bildung von Proteinen in folgenden Schritte ab: Nach Aktivierung bestimmter Gene durch Transkriptionsfaktoren werden im Zellkern Kopien des entsprechenden Gens in Form von RNA erstellt (=Transkription). Diese messenger RNA (mRNA) wird ins Zytosol der Zelle transportiert, um dort als Matrize für die eigentliche Proteinproduktion zu dienen (=Translation). Je nach Anzahl der gebildeten mRNA-Moleküle wird später eine unterschiedliche Menge des Proteins, z.B. eines bestimmten Zytokins, gebildet. Die RT-PCR detektiert die in der Zelle kursierenden mRNA Moleküle für ein bestimmtes Protein. Somit lässt sich der Aktivierungszustand der Zelle auf dem Niveau der mRNA, also der Transkription, bestimmen.

Folgende Schritte sind notwendig, um in den Zellen die mRNA zu detektieren:

1. Isolierung der Gesamt RNA (siehe Material und Methoden 4.2.5.)
2. Reverse Transkription der RNA in cDNA (siehe Material und Methoden 4.2.6.)
3. Detektion durch Vervielfältigung der cDNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) (siehe Material und Methoden 4.2.7.)
4. Visualisierung der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese (siehe Material und Methoden 4.2.8.)

Die mononukleären Zellen wurden von allen 26 Patienten direkt unkultiviert und ohne weitere Zusätze verarbeitet. Von 14 Patienten war ausreichend Material für weitere Versuchsansätze vorhanden. Die Zellen wurden kultiviert und mit verschiedenen Stimulantien inkubiert, um Veränderungen der Expression nach Stimulation zu untersuchen.

In den nachfolgenden Tabellen sind die untersuchten Proteine und die verwendeten Stimulantien aufgeführt.

Untersuchte Zytokine, Rezeptoren, Liganden und Onkogene	Abkürzung
Interleukin 1 α	IL1 α
Interleukin 1 β	IL1 β
Interleukin 2	IL2
Interleukin 2-Rezeptor	IL2R
Interleukin 4	IL4
Interleukin 6	IL6
Interleukin 6-Rezeptor	IL6R
Interleukin 10	IL10
CD40 Ligand	CD40L
CD40 Rezeptor	CD40R
c-fos	c-fos
c-myc	c-myc
Leukemia Inhibitory Factor	LIF
Transforming Growth Factor β 1	TGF β
Tumor Necrosis Factor α	TNF α
β -Aktin	β -Aktin
Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase	GAPDH

Tabelle 7: Untersuchte Zytokine, Rezeptoren, Liganden und Onkogene. Die aufgeführten Stoffe spielen eine Rolle in der Biologie der ALL. Die Expression wurde auf mRNA Ebene untersucht und der mögliche Zusammenhang mit dem späteren Auftreten eines Rezidivs geprüft.

Verwendete Stimulantien	Abkürzung
Interleukin 1 α	IL1
Interleukin 6	IL6
Ionomycin	Iono

Tabelle 8: verwendete Stimulantien. Untersucht wurde, ob diese Stimulantien das Expressionsmuster der Blasten für die oben aufgeführten Stoffe verändert.

4.2.2. Vorversuche und Kontrollen

Um den Versuchsablauf zu etablieren wurden Vorversuche mit Zellen der JM9-Zelllinie (Jurkat), einer T Zell Leukämie Zelllinie (Gillis and Watson, 1980) und peripherem Blut von freiwilligen Spendern durchgeführt.

4.2.2.1. Festlegung der Zellzahl, aus der RNA extrahiert wurde

Mehrere Versuchsreihen mit unterschiedlichen Zellzahlen wurden durchgeführt. Bei einer Zellzahl von 250.000 war für alle untersuchten RT-PCR Amplifikate ein deutliches Signal in der Gelelektrophorese nachweisbar. Von den untersuchten Patienten wurde aus 250.000 Zellen direkt RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Pro Stimulation (mit IL1, IL6 und Ionomycin) wurden ebenfalls 250.000 Zellen eingesetzt, stimuliert, anschließend die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben.

4.2.2.3. β -Aktin und GAPDH als interne Kontrollen

Als interne Kontrolle für den fehlerfreien Ablauf wurde bei jeder RT-PCR die Expression von β -Aktin und GAPDH untersucht. β -Aktin und GAPDH werden in menschlichen Zellen konstitutiv exprimiert. Beide Kontrollen waren in den ausgewerteten Versuchen stets deutlich nachzuweisen.

4.2.2.4. Negativkontrollen zum Ausschluss von Verunreinigungen

Zum Nachweis möglicher Verunreinigungen mit RNA oder DNA wurden Negativkontrollen eingeführt: Pro Versuch wurde eine PCR ohne cDNA durchgeführt. In der Gelelektrophorese durfte kein Amplifikat, weder für Zytokine noch β -Aktin oder GAPDH nachweisbar sein. In den Versuchen waren keine Verunreinigungen nachweisbar.

4.2.2.5. Test auf fehlerfreie Funktion der eingesetzten primer

Alle RT-PCR primer wurden an peripherem Blut und Jurkat Zellen getestet. In der Gelelektrophorese konnten für die einzelnen primer PCR-Amplifikate definierter Länge nachgewiesen werden.

4.2.3. Zellseparation

Mononukleäre Zellen (MNC =mononuclear cells) wurden aus dem Knochenmarksaspirat (bzw. aus dem peripheren Blut bei 3 Patienten) durch Dichtegradientenzentrifugation separiert.

Die Knochenmarksproben waren mit Heparin als Antikoagulans versetzt. Sie wurden in 50 ml Reaktionsgefäße transferiert und mit PBS auf ein Endvolumen von ca. 30-35 ml verdünnt. Anschließend wurde Ficoll-Hypaque-Lösung unter die Proben geschichtet (ca. 10-15 ml). Auf Grund der höheren spezifischen Dichte der Ficoll-Lösung fand keine Durchmischung statt. Nach Zentrifugation mit 400g bei 25 °C für 20 Minuten hatten Erythrozyten und Granulozyten, wegen ihres höheren spezifischen Gewichts, die Zuckerlösung durchwandert und sedimentierten auf den Boden des Gefäßes (die Granulozyten bildeten, wegen des vergleichsweise geringeren Gewichts, eine dünne Schicht über den Erythrozyten). Auf der Ficollschicht bildete sich eine so genannte Interphase, in der sich Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten fanden, darüber dann das verdünnte Plasma mit Antikörpern und anderen Proteinen. Diese Interphase wurde vorsichtig in ein neues Gefäß transferiert.

Für die weitere Aufarbeitung der Zellen und später auch zur Stimulation (siehe 4.2.4. Material und Methoden) wurde PBS mit FCS (=fetal calf serum) angereichert als Medium verwendet. FCS wurde vor Herstellung des Mediums, zur Inaktivierung von Komplement, für 40 min auf 60 °C erhitzt.

Durch zwei weitere Waschschrte mit PBS mit 2% FCS wurden verunreinigende Erythrozyten und Thrombozyten entfernt (Zentrifugation jeweils mit 300g bei 4 °C für 10 min). Das Zellpellet wurde mit RPMI mit 2% FCS resuspendiert und dann wurde die Zellzahl in der Neubauerzählkammer bestimmt. Mit der Trypanblaufärbung wurde der Anteil der toten Zellen nachgewiesen (bei den untersuchten Proben Vitalität >95%).

War nach der Separation der Anteil der verbleibenden Erythrozyten zu groß (makroskopische Rotfärbung), erfolgte eine Lyse der Erythrozyten mit dem oben beschriebenen Hämolysepuffer. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal gewaschen und dann wie beschrieben weiterverarbeitet.

Bei gefrorenem Material wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Proben waren gemäß den üblichen Protokollen in RPMI mit FCS eingefroren und in flüssigem Stickstoff bei $-178\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert worden. Sie wurden bei Bedarf im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad rasch aufgetaut, anschließend 2x mit RPMI bei 300g gewaschen (Stachel *et al.*, 2004). Mittels Trypanblaufärbung wurde die Vitalität der aufgetauten Zellen bestimmt (bei den verwendeten Proben $>95\%$).

4.2.4. Stimulation der Zellen

Die isolierten mononukleären Zellen dieser 14 Patienten wurden für 2 Stunden unter Zusatz von Stimulantien kultiviert, um den Einfluss der einzelnen Substanzen auf Expressionsmuster zu untersuchen. Als Referenzwert wurde von jedem Patienten ein Ansatz ohne weitere Zusätze kultiviert. Die Expression nach Stimulation wurde mit diesem Basiswert, d.h. der Expression ohne Zusatz von Stimulantien kultivierter Zellen verglichen und so der Einfluss dieser Stimulantien auf das Expressionsmuster der Zellen verifiziert.

In der nachfolgenden Tabelle sind die unterschiedlichen Versuchsansätze beschrieben.

Benennung	Aufarbeitung der Zellen	Fragestellung
<i>unkultiviert</i>	Unmittelbare Extraktion der RNA	Die spontane Expression der Zellen wird untersucht
<i>unstimuliert</i> kultiviert	Die Zellen werden für 2 Stunden ohne Zusatz von Stimulantien kultiviert	Die Expression kultivierter Zellen wird untersucht. Sie dient als Referenzwert für das Expressionsmuster der Zellen nach Stimulation
<i>stimuliert</i> kultiviert	Die Zellen werden für 2 Stunden mit verschiedenen Stimulantien kultiviert	Die Expression stimulierter Zellen wird untersucht. Durch den Vergleich mit dem Expressionsmuster kultivierter Zellen soll der Einfluss der Stimulantien untersucht werden.

Tabelle 9: Versuchsansätze: *unkultivierte*, *unstimulierte* und *stimulierte* Zellen wurden hinsichtlich ihres Expressionsmusters untersucht. An unkultivierten Zellen wird die spontane Expression gemessen. Die Expression nach Kultur ohne Stimulantien (=unstimuliert) spiegelt den Zustand der Zellen nach 2h wieder und dient gleichzeitig als Bezugsgröße, bzw. Basiswert für die Untersuchungen zum Einfluss der Stimulantien auf das Expressionsmuster. Die Ergebnisse aller 3 Ansätze werden in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt, um die prognostische Aussagekraft der Expressionsmuster zu testen.

Von allen Ansätzen, d.h. *unkultiviert*, *unstimuliert* kultiviert und *stimuliert* wurde der Zusammenhang zwischen Expressionsmuster und dem späterem Auftreten eines Rezidivs geprüft, um mögliche neue prognostische Marker zu identifizieren. In einer Gegenüberstellung des Expressionsmusters unstimulierter und stimulierter Zellen sollte untersucht werden, ob die Stimulation der Zellen, eine Veränderung des Expressionsmusters bewirkt.

Genetics institute, Cambridge, stellte uns freundlicherweise rekombinantes humanes IL1 α und IL6 als Stimulantien zur Verfügung. 1 Einheit des entsprechenden Zytokins ist definiert als die Konzentration mit dem halbmaximalen Stimulationseffekt im entsprechenden Proliferationsversuch. Zur Stimulation von je 250.000 Zellen pro Ansatz wurden 50 U des jeweiligen Zytokins verwendet, was, nach den Angaben des Herstellers, einer Zugabe im Überschuss entspricht. Ionomycin wurde in einer Konzentration 100 nM/ml verwendet (Alli *et al.*, 2005). Die Stimulantien wurden mit RPMI 10% FCS auf das 10-fache der gewünschten Endkonzentration verdünnt: IL1 und IL6 auf 500 U/ml, Ionomycin auf eine 1 μ M Lösung. Nach der Zellzählung wurde mit RPMI mit 10% FCS die gewünschte Zellkonzentration eingestellt (1Mio Zellen in 900 μ l). Pro Stimulationsansatz wurden 225 μ l dieser Zellsuspension verwendet, was 250.000 Zellen entspricht. Dazu wurden jeweils 25 μ l Stimulans gegeben. Die Endzellkonzentration betrug dann 10⁶Zellen/ml, die Konzentration der Stimulantien:

50 U/ml für IL1 und IL6, 100 nM für Ionomycin. Die Zellen wurden in 96-well Mikrotiterplatten für 2 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 2 h ist eine RNA Expression für die untersuchten Substanzen als Antwort auf die Stimulation zu erwarten (Crabtree, 1989).

Zur Untersuchung der spontanen Expression wurden aus den Zellen unmittelbar die RNA extrahiert (im Folgenden „unkultiviert“ genannt). In 2 weiteren Ansätzen wurden die Zellen für 2h in Kultur genommen, zu einem Ansatz wurde anstelle des Stimulans die entsprechende Menge RPMI 10% FCS zugegeben („unstimuliert kultiviert“). Dieser Ansatz wurde als Vergleichsansatz für die Stimulationsansätze herangezogen, für die die Zellen nach Zugabe von verschiedenen Stimulantien kultiviert wurden. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen in Eppendorfröhrchen transferiert und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation mit 400g bei 4°C). Daran anschließend wurde sofort die RNA isoliert.

4.2.5. RNA Präparation

Die RNA-Präparation erfolgte nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). Die Zellen wurden sofort (unkultivierte Zellen unmittelbar nach Separation, die kultivierten Zellen nach 2 h Inkubation) weiterverarbeitet. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml Chomczynski-Lösung aufgenommen (ab diesem Schritt waren die Zellen fixiert und konnten bei -20 °C mehrere Wochen gelagert werden). 50 µl 2 M Na-Acetat und 0,6 ml Phenol-Chloroform 5:1 wurden zugegeben und kräftig gemischt, dann für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Die RNA fand sich danach im wässrigen Überstand, DNA und Proteine in der darunterliegenden Inter- und Phenolphase. Die wässrige Phase mit der RNA wurde vorsichtig ohne Interphase mit der Pipette abgenommen und in ein neues Eppendorfröhrchen transferiert. 1,2 ml eisgekühltes 100% Ethanol wurden zugegeben, um die RNA zu präzipitieren. Dazu wurde mindestens für 1 h bei -20 °C inkubiert (Inkubation auch über Nacht möglich). Abschließend wurde 15 min mit 10.000g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das verbleibende RNA Pellet wurde in 150 µl Chomczynski-Lösung aufgenommen, 10 µl 3 M Na-Acetat und 300 µl 100% Ethanol (eisgekühlt) wurden zugegeben, anschließend nur vorsichtig aufgeschüttelt und nochmals mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Dann wurde nochmals mit 70 % Ethanol gewaschen und zuletzt die RNA in 38,8 µl DEPC Wasser aufgenommen.

Die gelöste RNA wurde unverzüglich in stabile cDNA umgeschrieben (=Reverse Transkription). Die cDNA kann problemlos bei -20° C aufbewahrt werden.

4.2.5.1. Maßnahmen im Umgang mit RNA

RNA ist ubiquitär vorkommenden RNasen ausgesetzt und sehr viel instabiler als DNA. Im Umgang mit RNA war besondere Sorgfalt notwendig: Tragen von Einmalhandschuhen, Verwendung eines gesonderten Pipettensatzes mit Filtern, Arbeiten unter dem sterilen Abzug. Reagenzien und Lösungen für das Arbeiten mit RNA wurden soweit möglich autoklaviert (mit Ausnahme von Guanidinium Thiocyanat und der Denaturierungslösung). Wasser wurde zuvor mit DEPC (Diethyl-Pyrocarbonat) behandelt, welches die RNasen inaktiviert.

4.2.6. Reverse Transkription - cDNA Synthese

Durch die Reverse Transkription wird von sämtlichen mRNA (=messenger RNA) Strängen der Probe mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase eine Kopie in DNA erstellt. Diese cDNA (=complementary DNA) kann mittels der Polymerasekettenreaktion (=PCR) detektiert werden. Die mRNA ist charakterisiert durch eine PolyA Sequenz (ca. 100-200 Basenpaare) an ihrem 3'Ende. Gibt man Thymidin-Basen (Oligo-dT) als primer hinzu, lagern sich diese an die Poly-A-Sequenz an (primer-annealing). Die Reverse Transkriptase setzt dann genau hier an, um den Strang komplett in cDNA zu übersetzen. Ausgehend von der so entstandenen cDNA können verschiedene spezifische Sequenzen mittels PCR nachgewiesen werden.

Für die Reverse Transkription wurde die AMV-RT verwendet (=avian myeloblastosis virus reverse Transkriptase) (Boehringer, Mannheim). Das Enzym wird in einer Konzentration von 25.000 U/ml geliefert, im Reaktionsansatz nach Firmenprotokoll beträgt die Enzymkonzentration 2000 U/ml. Durch Verdünnung auf eine Endkonzentration von 250-500 U/ml lässt sich die Enzymaktivität auf ca. das Doppelte steigern. Das Enzym wurde für jeden Ansatz mit der oben beschriebenen Lösung 1:5 verdünnt (Endkonzentration 400 U/ml)(Krug and Berger, 1987).

Für die Reverse Transkription wurde die in DEPC Wasser gelöste RNA für 10 min im 65° C Wasserbad erwärmt und anschließend auf Eis gegeben. Durch diesen Schritt

werden die Tertiärstrukturen der RNA aufgebrochen, die Effizienz der Reversen Transkription wird gesteigert.

Reaktionsansatz für die RT

Inkubationspuffer	16 μ l
Oligo dT (primer dT)	8 μ l
dNTP	8 μ l
RNase Inhibitor	2,4 μ l
AMV-RT (verdünnt)	6,8 μ l
RNA gelöst in DEPC Wasser	38,8 μ l
Gesamtmenge	80 μ l

Die einzelnen Proben wurden mit je 50 μ l Mineralöl überschichtet und in den Thermocycler eingesetzt. Das Thermocycler Programm für die Reverse Transkription läuft wie folgt ab:

42⁰C für 60 min

99⁰C für 5 min

5⁰C für 5 min

anschließend abkühlen auf 4⁰C

Die cDNA wurde bei –80⁰C aufbewahrt.

4.2.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die einzelnen Stränge der gewonnenen cDNA lassen sich selektiv mittels PCR exponentiell vervielfältigen (amplifizieren). Die Amplifikate können durch Ehtidiumbromid, einen fluoreszierenden Farbstoff, sichtbar gemacht werden.

Das Grundprinzip der PCR besteht in der enzymatischen Duplikation einer definierten DNA-Sequenz. Spezifische primer binden selektiv an cDNA Stränge der gewünschten Sequenz. In sich wiederholenden Zyklen von Hitzedenaturierung der DNA, Hybridisierung Sequenz-spezifischer Oligonukleotid-primer und Synthese der DNA, wird der zwischen den primern liegende Sequenzbereich amplifiziert. Pro PCR-Zyklus erstellt das Enzym Polymerase eine Kopie des markierten cDNA Strangs.

Das Patientenmaterial lag nur in begrenzter Menge vor. Um alle gewünschten Untersuchungen durchführen zu können, wurde die cDNA verdünnt. Laut Protokoll ist

für die PCR mit der verwendeten Taq Polymerase der Einsatz von 10 μ l gelöster DNA pro Ansatz vorgesehen. Die aus 250.000 Zellen extrahierte RNA lag, nach der RT, als cDNA in insgesamt 80 μ l gelöst vor. Bei einem Einsatz von 2 μ l gelöster cDNA war reproduzierbar ein gleichbleibend starkes Amplifikat wie bei 10 μ l gelöster cDNA in der Gelelektrophorese nachweisbar. 2 μ l gelöste cDNA deshalb wurden für einen PCR Reaktionsansatz mit 8 μ l DEPC Wasser verdünnt.

Der Reaktionsansatz für die PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz PCR

PCR-Mastermix (ohne Enzym)	38,75 μ l
Taq Polymerase	0,25 μ l
DEPC Wasser	8 μ l
cDNA	2 μ l
Primer (1 μ M)	2 μ l
Gesamtvolumen	51 μ l

Die einzelnen Proben wurden mit je 50 μ l Mineralöl überschichtet und in den Thermocycler eingesetzt. Das Thermocycler PCR-Programm läuft wie folgt ab:

1 Zyklus 94⁰C für 5 min 60⁰C für 5 min
35 Zyklen 72⁰C für 90 sec 94⁰C für 45 sec 60⁰C für 45 sec
1 Zyklus 72⁰C für 10 min
Danach auf 4⁰C abkühlen.

Das Grundprinzip der PCR besteht in der enzymatischen Duplikation einer spezifischen DNA-Sequenz. Nach fünfminütigem Schmelzen der DNA-Doppelstränge bei 94⁰C und anschließendem Abkühlen auf 60⁰C, dem sog. pretreatment, wurden 35 Amplifikationszyklen, bestehend aus jeweils 3 Schritten durchgeführt:

Hitzedenaturierung der DNA (94⁰C für 45 sec), annealing (=Anlegen der primer) (60⁰C für 45 sec) und die eigentliche DNA-Synthese (72⁰C für 90 sec). Als posttreatment bezeichnet man die abschließende, einmalige Elongation über 10 min bei 72⁰C. Anschließend kühlte die PCR-Maschine auf 4⁰C ab. Diese Temperatur wurde bis zur Probenentnahme konstant gehalten.

Anschließend werden die PCR-Produkte bei -20⁰C aufbewahrt.

4.2.8. Gelelektrophorese

Zum Nachweis und zur Identifikation der PCR-Amplifikate wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Amplifikate wurden in einem elektrischen Spannungsfeld aufgetrennt. Sie wandern unterschiedlich weit, abhängig von ihrem Molekulargewicht (Basenpaarlängen). Als Referenz wurde ein standardisierter Molekulargewichtsmarker (Molekulargewichtsmarker pBR322 HaeIII Digest, Sigma), entsprechend der zu erwartenden Basenpaarlängen der PCR-Amplifikate, gewählt.

Die im Gel enthaltenen PCR-Amplifikate wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und waren dann als fluoreszierende Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, indem es sich zwischen benachbarte Basen schiebt. So kann es UV-Strahlung absorbieren und diese Energie als Fluoreszenz wieder freisetzen.

PCR-Amplifikate

Interleukin 1 α	564 bp
Interleukin 1 β	332 bp
Interleukin 2	457 bp
Interleukin 4	456 bp
Interleukin 6	628 bp
Interleukin 6 Rezeptor	240 bp
Interleukin 10	432 bp
CD40 Ligand	293 bp
CD40 Rezeptor	434 bp
c-fos	482 bp
c-myc	345 bp
Leukemia Inhibitory Factor	564 bp

Transforming Growth Factor $\beta 1$	332 bp
Tumor Necrosis Factor α	457 bp
β -Aktin	456 bp
GAPDH	628 bp

Tabelle 10: Länge der PCR-Amplifikate (bp =Basenpaare). Die PCR-Amplifikate wurden in der Gelelektrophorese, im Vergleich zu einem standardisierten Molekulargewichtsmarker, anhand ihrer charakteristischen Basenpaarlänge identifiziert.

Zur Herstellung des Gels wurden 300 ml TBE-Puffer und 6 g Metaphor unter Rühren auf einer Wärmeplatte bei 250°C für 20 min erhitzt, danach auf 70°C abgekühlt und dann in die entsprechende Form gegossen. Dort kühlte das Gel 40 min aus und härtete anschließend noch mindestens 40 min bei 4°C aus. Jeweils 1 μ l PCR-Amplifikate wurden mit 9 μ l der Gel loading solution markiert, in eine Geltasche gegeben und 2 ½ h einer Spannung von 120 V ausgesetzt. Zur Kontrolle der Größe der PCR-Amplifikate wurde der Molekulargewichtsmarker an den Anfang jeder Gelzeile auftragen. Anschließend wurde das Gel in 500 ml TBE-Puffer mit 25 μ l Ethidiumbromid versetzt gefärbt. Die Auswertung der Banden erfolgte auf der UV-Platte (10 mW/cm²). Die PCR-Amplifikate wurden anhand ihrer Länge, die im Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker ermittelt wurde, identifiziert.

Die übliche Verifizierung der PCR-Amplifikate wurde im Anschluss an diese Arbeit als southern blot durchgeführt. Die PCR Amplifikate wurden auf eine Nylonmembran transferriert, anschließend mit einer chemisch luminiszierenden Gensonde markiert und auf Photopapier detektiert. Die Ergebnisse gingen nicht mehr in die Auswertung ein.

4.2.9. Statistische Auswertung

Ein positives Versuchsergebnis ist definiert als sichtbare Bande an der typischen Stelle im Gel, d.h. der Nachweis eines PCR-Amplifikats der entsprechenden Länge laut Tabelle 8. Ein negatives Ergebnis ist als Fehlen dieser Bande definiert. Für die statistische Auswertung wurde einem positiven Versuchsergebnis der Wert 1, einem negativen der Wert 0 zugeordnet.

4.2.9.1. Fisher Test

Um die prognostische Aussagekraft der untersuchten Marker statistisch zu prüfen, wurden die Patienten in einer 2x2 Kreuztabelle nach den Merkmalen Expression des Markers ja/nein und Rezidiv ja/nein gruppiert. Das folgende Schema zeigt die Einordnung der Patienten in der 2x2 Kreuztabelle.

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	Patienten, die den Marker nicht exprimieren und rezidivfrei überleben	Patienten, die den Marker nicht exprimieren und ein Rezidiv erleiden	Anzahl der Patienten, die den Marker nicht exprimieren
	ja	Patienten, die den Marker exprimieren und rezidivfrei überleben	Patienten, die den Marker exprimieren und ein Rezidiv erleiden	Anzahl der Patienten, die den Marker exprimieren
Gesamt		Anzahl der Patienten, die kein Rezidiv erleiden	Anzahl der Patienten, die ein Rezidiv erleiden	Anzahl aller ausgewerteten Patienten

Tabelle 11: Eingruppierung der Patienten in der 2x2 Kreuztabelle nach den Merkmalen Rezidiv und Expression: Für den jeweils untersuchten Marker wurde die Expression mittels RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese nachgewiesen/bzw. nicht nachgewiesen. Jedem Patienten wurden 2 Merkmale zugeordnet: Expression ja/nein, späteres Auftreten eines Rezidivs ja/nein. Entsprechend der individuellen Merkmalskombination werden die Patienten in die 2x2 Kreuztabelle eingeordnet.

Der Fisher Test untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten bzw. Ausbleiben eines Rezidivs und der Expression, bzw. Nicht-Expression der untersuchten Marker besteht (Volm *et al.*, 1997). Der Zusammenhang gilt als signifikant - und damit der Marker als prognostisch aussagekräftig - wenn im 2-seitigen Fisher Test $p \leq 0,1$ ist.

Es gibt negativ und positiv prognostische Marker mit einseitiger oder zweiseitiger Aussage. In den folgenden Tabellen sind die verschiedenen Möglichkeiten beschrieben. Negativ prognostische Marker korrelieren mit dem Auftreten eines Rezidivs, positiv prognostische Marker mit rezidivfreiem Überleben. Die nachfolgenden Tabellen sind exemplarisch für die Ergebnisdarstellung.

4.2.9.1.1. Die Expression eines Markers korreliert mit dem Auftreten eines Rezidivs (negativ prognostisch)

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	7	0	7
	ja	0	7	7
Gesamt		7	7	14
2-seitiger Fisher Test p=				

Tabelle 12: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für negativ prognostische Marker. Es handelt sich hier um einen zweiseitig negativ prognostischen Marker, d.h. die Expression korreliert mit dem Auftreten eines Rezidivs, die Nicht-Expression mit Rezidivfreiheit.

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	7	2	9
	ja	0	5	5
Gesamt		7	7	14
2-seitiger Fisher Test p=				

Tabelle 13: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für negativ prognostische Marker. Es handelt sich hier um einen einseitig negativ prognostischen Marker, d.h. die Expression korreliert mit dem Auftreten eines Rezidivs; Nicht-Expression tritt bei Nicht-Rezidiv- und Rezidivpatienten auf und erlaubt keine prognostische Aussage.

4.2.9.1.2. Die Expression eines Markers korreliert mit dem Ausbleiben eines Rezidivs (positiv prognostisch)

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	0	7	7
	ja	7	0	7
Gesamt		7	7	14
2-seitiger Fisher Test p=				

Tabelle 14: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für positiv prognostische Marker. Es handelt sich hier um einen zweiseitig positiv prognostischen Marker, d.h. die Expression korreliert mit Rezidivfreiheit; Nicht-Expression korreliert mit dem Auftreten eines Rezidivs.

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	2	7	9
	ja	5	0	5
Gesamt		7	7	14
2-seitiger Fisher Test p=				

Tabelle 15: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für positiv prognostische Marker. Es handelt sich hier um einen einseitig positiv prognostischen Marker, d.h. die Expression korreliert mit Rezidivfreiheit; Nicht-Expression tritt bei Rezidivpatienten und rezidivfrei überlebenden Patienten auf und erlaubt keine prognostische Aussage.

4.2.9.1.3. Die Nicht-Expression eines Markers korreliert mit dem Auftreten eines Rezidivs (negativ prognostisch)

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	0	5	5
	ja	7	2	9
Gesamt		7	7	14
2-seitiger Fisher Test p=				

Tabelle 16: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für negativ prognostische Marker. Es handelt sich hier um einen einseitig negativ prognostischen Marker, d.h. Nicht-Expression korreliert mit Rezidiv, aber Expression tritt bei rezidivfrei überlebenden Patienten und Rezidivpatienten auf und erlaubt keine prognostische Aussage.

4.2.9.1.4. Die Nicht-Expression eines Markers korreliert mit dem Ausbleiben eines Rezidivs (positiv prognostisch)

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	5	0	5
	ja	2	7	9
Gesamt		7	7	14
2-seitiger Fisher Test p=				

Tabelle 17: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für positiv prognostische Marker. Es handelt sich hier um einen einseitig positiv prognostischer Marker, d.h. die Nicht-Expression korreliert mit Rezidivfreiheit, aber Expression tritt bei Rezidivpatienten und rezidivfrei überlebenden Patienten auf und erlaubt keine prognostische Aussage.

4.2.10.2. Mc Nemar Test

Von 14 Patienten war ausreichend Material vorhanden um die Expression nach vorangegangener Stimulation zu untersuchen. Die Blasten wurden für 2h mit IL1, IL6 und Ionomycin stimuliert. Für den direkten Vergleich wurden Zellen 2h im Brutschrank ohne Zusatz von Stimulans inkubiert (=unstimuliert). Somit gelten dieselben Latenzzeiten für die Zytokinexpressionen und die selben Umgebungsbedingungen (Inkubation im Brutschrank, „Ruhephase und Erholung“ der Zellen nach der Aufarbeitung). In einer 2x2 Kreuztabelle werden die Ergebnisse der unstimulierten und der stimulierten Expression gegenübergestellt. Der Mc Nemar Test prüft die Änderung der Merkmalsverteilung (hier Expression, bzw. Nicht-Expression eines Markers) in der 2x2 Kreuztabelle bei verändertem Versuchsaufbau (hier kultiviert, bzw. verschiedene Stimulationen). Konkret: Ändert eine Stimulation signifikant die Expression einer untersuchten Substanz (vorher – nachher). Tabelle 18 zeigt die verschiedenen Möglichkeiten, die sich nach vorheriger Stimulation der Blasten ergeben können.

		Expression unstimuliert kultivierter Zellen		Gesamt
		nein	ja	
Expression nach Stimulation	nein	Patienten, die weder unstimuliert noch nach Stimulation den Marker exprimieren	Patienten, die unstimuliert nicht, aber nach Stimulation den Marker exprimieren	Anzahl der Patienten, die nach Stimulation den Marker nicht exprimieren
	ja	Patienten, die unstimuliert den Marker exprimieren, aber nach Stimulation nicht mehr exprimieren	Patienten, die sowohl unstimuliert als auch stimuliert den Marker exprimieren	Anzahl der Patienten, die nach Stimulation den Marker exprimieren
Gesamt		Anzahl der Patienten, die unstimuliert den Marker nicht exprimieren	Anzahl der Patienten, die unstimuliert den Marker exprimieren	Anzahl aller untersuchter Patienten

Tabelle 18: 2x2 Kreuztabelle: Einfluss der Stimulatoren auf die Expression der Blasten. Die Blasten wurden mit verschiedenen Substanzen stimuliert und anschließend wurden mittels RT-PCR die Expression der bereits beschriebenen Stoffe untersucht. Vergleicht man das Expressionsmuster der Blasten in unstimuliertem und stimuliertem Zustand, lässt sich der Einfluss der Stimulantien auf die Expression beurteilen.

Stimulantien können die Expression eines Markers fördern, d.h. vor Stimulation fehlt die Expression, nach Stimulation ist eine Expression nachweisbar. Sie können aber auch hemmend wirken, d.h. eine unstimuliert nachweisbare Expression ist nach Stimulation nicht mehr vorhanden.

Verschiedene Aussagemöglichkeiten ergeben sich. Ein Stimulans kann die Expression fördern, d.h. in unstimuliertem Zustand ist keine Expression nachweisbar, nach Stimulation ist die Expression nachweisbar. Auch ein hemmender Effekt des Stimulans ist möglich. Das bedeutet, eine in unstimuliertem Zustand nachweisbare

Expression ist nach Stimulation nicht mehr vorhanden. Stimulantien, die keinen Effekt haben, verändern die Expression nicht. Das heißt eine unstimuliert nachweisbare Expression bleibt auch nach Stimulation nachweisbar, eine unstimuliert fehlende Expression ist auch nach Stimulation nicht vorhanden.

5. Ergebnisse und Auswertung

Zytokine, Onkogene und Oberflächenmoleküle können Entstehung, Pathophysiologie und Verlauf einer Leukämie beeinflussen. Sie spielen eine Rolle bei der malignen Transformation von Zellen, der Proliferation von Leukämiezellen, der Apoptose und der antileukämischen Immunantwort. Ihre Wirkung ist jedoch ambivalent, d.h. sie können das Krankheitsgeschehen propagieren oder inhibieren und die Dynamik des Krankheitsverlaufs widerspiegeln. Ihre Expression kann mit dem weiteren Krankheitsverlauf, d.h. dem Ausbleiben oder Auftreten eines Rezidivs, assoziiert sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster von ausgesuchten Zytokinen, Onkogenen und Oberflächenmolekülen in leukämischen Blasten bei 26 Kindern mit einer cALL untersucht. Aus Knochenmark, das im Rahmen der initialen diagnostischen Punktion gewonnen wurde, wurde mRNA isoliert. Die Expression der Faktoren wurde mittels Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) analysiert. Diese Methode wurde gewählt, weil sie die in der Zelle aktivierten Proteine erfasst und durch ihre hohe Sensitivität, auch bei nur in geringer Quantität vorhandenem Untersuchungsmaterial, eine genaue Auswertung ermöglicht.

Die Expression der Zytokine IL1 α und β , IL2, IL4, IL6, IL10, LIF, TGF β und TNF α , der Oberflächenmolekülen und Rezeptoren (CD40R, CD40L, IL2R, IL6R) und der Onkogene c-fos, c-myc wurde analysiert. Wir haben untersucht, ob die Expression dieser Proteine, in Zusammenhang mit dem späteren Auftreten eines Rezidivs steht und damit prognostische Aussagekraft besitzt.

Die Homeostase normaler Zellen beinhaltet die Kontrolle des Wachstums- und Differenzierungspotentials und der Apoptose. Zytokine steuern in einem fein abgestimmten Netzwerk diesen Prozess und verändern den Aktivierungszustand der Zellen. In leukämischen Zellen funktioniert die Regulation des Entwicklungsprogramms nicht, was zu autonomem Wachstum, klonaler Expansion und Resistenz gegenüber Apoptose führen kann. So sind z.B. für IL1 und IL6 autokrine Wachstumsschleifen beschrieben. Wir haben bei einem Teil der Patienten die Zellen kultiviert, mit IL1, IL6 und Ionomycin stimuliert und die Änderung des Zytokinexpressionsprofils untersucht.

5.1. Zusammenhang zwischen Expression und Rezidiv

Ziel der Arbeit war es, prognostische Marker (Expressionsmuster) zu finden, die bereits bei Diagnosestellung erfasst werden und Hinweise auf die Prognose geben können. Hierfür wurde die Expression der oben beschriebenen Zytokine, Oberflächenmoleküle und Onkogene untersucht. Das Expressionsmuster der *unkultivierten*, *kultivierten* und *stimulierten* Zellen wurde dem späteren Auftreten, bzw. Ausbleiben eines Rezidivs gegenübergestellt und hinsichtlich seiner prognostischen Aussagekraft überprüft (siehe auch Material und Methoden Tabelle 9). Im Folgenden sind die interessanten Ergebnisse, sortiert nach der Expression der untersuchten Proteine aufgeführt.

5.1.1. Interleukin 4 Expression und Rezidiv

Die Expression von IL4 wurde untersucht, weil es die Proliferation von BCP-Leukämiezellen hemmt und die Apoptose fördert (Manabe *et al.*, 1994; Okabe *et al.*, 1991; Pandrau *et al.*, 1992) und somit einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben könnte. In Tabelle 19 ist die IL4 Expression der unkultivierten Blasten dem Auftreten eines Rezidivs gegenübergestellt.

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	9	9	18
	ja	8	0	8
Gesamt		17	9	26
2-seitiger Fisher Test p=0,023				

Tabelle 19: Zusammenhang zwischen unkultivierter IL4 Expression und dem Auftreten eines Rezidivs. Der Nachweis von IL4 in den unkultivierten Blasten mittels RT-PCR wurde in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt. Bei keinem Patienten, der IL4 exprimiert trat ein Rezidiv auf. Der Fisher Test wies einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von IL4 und rezidivfreiem Überleben nach.

Die Ergebnisse zeigen, dass Patienten, die IL4 exprimieren kein Rezidiv erleiden. Eine fehlende Expression von IL4 kann sowohl bei Patienten, die ein Rezidiv erleiden (9/9) wie auch bei Patienten, die kein Rezidiv erleiden (9/17), vorkommen. Die IL4 Expression ist in dem untersuchten Patientenkollektiv ein statistisch signifikanter, positiv prognostischer Marker. Nach Kultivierung für 2h (ohne Zusatz von Stimulantien) wird IL4 nur von 2/7 rezidivfrei überlebenden Patienten exprimiert. Dies

könnte darauf hinweisen, dass das Maximum der IL4 Expression in den Zellen zu einem früheren Zeitpunkt (<2h) liegt und die Expression anschließend wieder abnimmt.

Es ist denkbar, dass Aktivierung der Blasten durch proliferativ wirkende Faktoren wie IL1 und IL6 oder auch Ionomycin, die Expression protektiver Faktoren wie IL4 hemmt. Nach IL1 und Ionomycin Stimulation exprimieren nur 2/7 rezidivfrei überlebenden Patienten IL4; es ist keine Korrelation mit rezidivfreiem Überleben nachweisbar (jeweils $p=1,0$).

In Tabelle 20 ist die IL4 Expression nach Stimulation der Blasten mit IL6 dem Auftreten eines Rezidivs gegenübergestellt.

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	4	7	11
	ja	3	0	3
Gesamt		7	7	14
Im 2-seitigen Fisher Test $p=0,192$				

Tabelle 20: Zusammenhang zwischen IL4 Expression nach IL6 Stimulation und dem Auftreten eines Rezidivs. Der Nachweis von IL4 in den mit IL6 stimulierten Blasten mittels RT-PCR wurde in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt. Kein Patient, der IL4 exprimierte erlitt ein Rezidiv. Allerdings war dieser Zusammenhang im Fisher Test nicht statistisch signifikant ($p=0,192$).

3/7 rezidivfrei überlebenden Patienten exprimieren IL4, allerdings fehlt bei 4/7 die IL4 Expression. Kein Patient, der rezidiviert, exprimiert IL4. Die Stimulation mit IL6 scheint die Expression von IL4 weniger zu beeinträchtigen als die Stimulation mit IL1 und Ionomycin.

5.1.2. Interleukin 6 Expression und Rezidiv

IL6 wirkt als auto- und parakriner Wachstumsfaktor bei verschiedenen malignen lymphatischen Erkrankungen (Preti *et al.*, 1997), hohe IL6 Zytokinspiegel korrelieren mit ungünstiger klinischer Prognose (Fayad *et al.*, 2001). In unserem Kollektiv zeigt sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen IL6 Expression und ungünstiger Prognose. In der folgenden Tabelle ist die IL6 Expression der unkultivierten Blasten dem Auftreten eines Rezidivs gegenübergestellt.

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	15	5	20
	ja	2	4	6
Gesamt		17	9	26
2-seitigen Fisher Test p=0,138				

Tabelle 21: Zusammenhang zwischen unkultivierter IL6 Expression und dem Auftreten eines Rezidivs. Der Nachweis von IL6 in den unkultivierten Blasten mittels RT-PCR wurde in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt. IL6 wurde v.a. von Rezidivpatienten exprimiert, der Großteil der rezidivfrei überlebenden Patienten exprimiert kein IL6. Diese Korrelation erwies sich im Fisher Test als nicht statistisch signifikant ($p=0,138$).

In unkultiviertem Zustand wird IL6 überwiegend von Rezidivpatienten exprimiert. 4/9 Rezidivpatienten exprimieren IL6, nur 2/17 rezidivfrei überlebenden Patienten exprimieren IL6.

Stimulation mit potentiellen Wachstumsfaktoren wie IL1 und IL6 könnte, im Sinne einer autokrinen Wachstumsschleife, die IL6 Expression weiter steigern. Für IL1 β ist eine stimulierende Wirkung auf die IL6 Produktion in leukämischen Blasten beschrieben (Apte and Voronov, 2002). Die Gegenüberstellung von IL6 Expression, nach vorangegangener Stimulation mit IL1, zeigt die folgende Tabelle.

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	7	3	10
	ja	0	4	4
Gesamt		7	7	14
Im 2-seitigen Fisher Test p=0,07				

Tabelle 22: Zusammenhang zwischen der IL6 Expression nach vorheriger Stimulation mit IL1 und dem Auftreten eines Rezidivs. Der Nachweis von IL6 in den mit IL1 stimulierten Blasten mittels RT-PCR wurde in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt. Wie in der 2x2 Kreuztabelle dargestellt, wurde IL6 ausschließlich von Rezidivpatienten exprimiert, alle rezidivfrei überlebenden Patienten exprimierten kein IL6. Im Fisher Test erwies sich dieser Zusammenhang als statistisch signifikant ($p=0,07$). Die IL6 Expression nach IL1 Stimulation ist ein negativer prognostischer Marker.

Alle Patienten, die IL6 exprimieren, erleiden ein Rezidiv, allerdings exprimieren 3/7 Rezidivpatienten kein IL6. Die IL6 Expression ist ein negativer prognostischer Marker. Kein rezidivfrei überlebender Patient exprimiert IL6 (7/7). IL1 scheint die IL6

Expression zu stimulieren, 4/7 Rezidivpatienten exprimieren nach IL1 Stimulation IL6, im Gegensatz zu 4/9 Patienten im nativen Zustand.

Die folgende Tabelle stellt die IL6 Expression, nach vorangegangener Stimulation mit Ionomycin, dem Auftreten eines Rezidivs gegenüber.

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	7	4	11
	ja	0	3	3
Gesamt		7	7	14
Im 2-seitigen Fisher Test $p=0,192$				

Tabelle 23: Zusammenhang zwischen der IL6 Expression nach vorheriger Stimulation mit Ionomycin und dem Auftreten eines Rezidivs. Der Nachweis von IL6 in den mit Ionomycin stimulierten Blasten mittels RT-PCR wurde in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt. Wie in der 2x2 Kreuztabelle dargestellt, wurde IL6 ausschließlich von Rezidivpatienten exprimiert, alle rezidivfrei überlebenden Patienten exprimierten kein IL6. Allerdings war dieser Zusammenhang im Fisher Test nicht statistisch signifikant ($p=0,192$).

Auch nach Ionomycin Stimulation exprimieren nur Rezidivpatienten IL6; dieser Zusammenhang ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,192$). Die Aktivierung über Ionomycin steigert die IL6 Expression im Vergleich zum Nativzustand nicht.

In den übrigen Versuchen, kultiviert ohne Stimulans und nach IL6 Stimulation, ließ sich keine Korrelation zwischen der IL6 Expression und dem Auftreten eines Rezidivs herstellen.

5.1.3. Interleukin 10 Expression und Rezidiv

IL10 spielt eine Rolle bei der Pathogenese maligner Lymphoproliferation (Khatri and Caligiuri, 1998) und wirkt als autokriner Wachstumsfaktor bei verschiedenen malignen B-Zell Erkrankungen (ALL, CLL, Burkitt Lymphom, AIDS assoziierte Lymphome) (Fayad *et al.*, 2001). Außerdem hemmt IL10 eine effektive spezifische anti-Tumor Antwort (De Vita *et al.*, 1999), wodurch es zu einer Akkumulation von Leukämiezellen kommen kann (Schulz *et al.*, 2001). Die Expression von IL10 könnte ein negativer prognostischer Marker sein. In Tabelle 24 ist die IL10 Expression der kultivierten, unstimulierten Blasten dem Auftreten eines Rezidivs gegenübergestellt.

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	6	2	8
	ja	1	5	6
Gesamt		7	7	14
2-seitiger Fisher Test p=0,103				

Tabelle 24: Zusammenhang zwischen der IL10 Expression in kultivierten, unstimulierten Blasten und dem Auftreten eines Rezidivs. Der Nachweis von IL10 in den kultivierten, unstimulierten Blasten mittels RT-PCR wurde in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt. IL10 Expression fand sich fast ausschließlich bei Rezidivpatienten, eine fehlende Expression vorwiegend bei rezidivfrei überlebenden Patienten. Im zweiseitigen Fisher Test war $p=0,103$, d.h. es zeigt sich eine mögliche Korrelation, der Zusammenhang ist aber nicht statistisch signifikant.

IL10 wird in unserem Patientenkollektiv vorwiegend von Rezidivpatienten exprimiert. 5/6 Patienten, die IL10 exprimieren, erleiden ein Rezidiv. Eine fehlende IL10 Expression findet sich vorwiegend bei rezidivfrei überlebenden Patienten. 6/8 Patienten, die kein IL10 exprimieren erleiden kein Rezidiv. Für 11/14 Patienten stimmt eine Zuordnung nach dem IL10 Expressionmuster mit dem späteren Auftreten bzw. Ausbleiben eines Rezidivs überein. Nur ein Nicht-Rezidivpatient exprimiert IL10, bzw. 2 Rezidivpatienten exprimieren kein IL10. Die IL10 Expression könnte ein negativer prognostischer Marker, bzw. eine fehlende IL10 Expression ein positiv prognostischer Marker sein. Es lässt sich jedoch keine statistische Signifikanz nachweisen. Die Aussage muss an einem größeren Kollektiv verifiziert werden.

Ohne Kultivierung sowie nach IL1 und IL6 Stimulation besteht kein Zusammenhang zwischen der IL10 Expression und dem Auftreten eines Rezidivs ($p=1,0$). Es exprimieren mehr Nicht-Rezidivpatienten und weniger Rezidivpatienten IL10: unkultiviert 5/2 Nicht-Rezidivpatienten und 4/7 Rezidivpatienten, nach IL1 Stimulation 3/7 Nicht-Rezidiv Patienten und 4/7 Rezidiv Patienten, nach IL6 Stimulation 2/7 Nicht-Rezidiv Patienten und 2/7 Rezidiv Patienten. Insgesamt scheint IL6 die IL10 Expression zu verringern (4/14 vs. 6/14 unstimuliert kultiviert). Nach Ionomycin Stimulation wird IL10 zwar von der Mehrzahl (4/7) der Rezidivpatienten exprimiert und der Mehrzahl (5/7) der rezidivfrei überlebenden Patienten nicht exprimiert. Es lässt sich aber keine statistische Signifikanz nachweisen ($p=0,592$).

5.1.4. Interleukin IL1 β Expression und Rezidiv

Eine Beteiligung von IL1 an der Leukämieogenese durch Verlust von Kontrollmechanismen während der Proliferation von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen wird diskutiert (Apte and Voronov, 2002). Parakrine Wachstumsschleifen sind beschrieben: Von leukämischen Blasten sezerniertes IL1 β induziert die Produktion anderer proliferativ wirkender hämatopoetischer Zytokine in malignen Zellen und KM Stromazellen (Apte and Voronov, 2002). In Tabelle 25 ist die IL1 β Expression der Blasten, nach vorheriger Stimulation mit Ionomycin, dem Auftreten eines Rezidivs gegenübergestellt.

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	6	2	8
	ja	1	5	6
Gesamt		7	7	14
Im 2-seitigen Fisher Test $p=0,103$				

Tabelle 25: Zusammenhang zwischen der IL1 β Expression nach Stimulation mit Ionomycin und dem Auftreten eines Rezidivs. Der Nachweis von IL1 β in den mit Ionomycin stimulierten Blasten mittels RT-PCR wurde in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt. IL1 β Expression fand sich fast ausschließlich bei Rezidivpatienten exprimiert, eine fehlende Expression vorwiegend bei rezidivfrei überlebenden Patienten. Im zweiseitigen Fisher Test war $p=0,103$, d.h. es zeigt sich eine mögliche Korrelation, der Zusammenhang ist aber nicht statistisch signifikant. Die IL1 β Expression könnte ein negativer prognostischer Marker, eine fehlende Expression ein positiv prognostischer Marker sein.

IL1 β Expression findet sich v.a. bei Rezidivpatienten. 5/6 Patienten, die IL1 β exprimieren, erleiden ein Rezidiv. Eine fehlende IL1 β Expression liegt gehäuft bei rezidivfrei überlebenden Patienten vor. 6/8 Patienten, die kein IL1 β exprimieren, erleiden kein Rezidiv. Für 11/14 Patienten stimmt die Zuordnung in die Rezidiv-, bzw. Nicht-Rezidivgruppe nach IL1 β Expressionmuster mit dem späteren Auftreten, bzw. Ausbleiben eines Rezidivs überein. Nur ein Nicht-Rezidivpatient exprimiert IL1 β , bzw. 2 Rezidivpatienten exprimieren kein IL1 β . Jedoch ist dieser Zusammenhang nicht statistisch signifikant. In unkultiviertem Zustand besteht keine Korrelation zwischen der IL1 β Expression und dem Auftreten eines Rezidivs. Unstimuliert kultiviert wird IL1 β zwar von der Mehrzahl (4/7) der Rezidivpatienten exprimiert und der Mehrzahl (5/7) der rezidivfrei überlebenden Patienten nicht exprimiert. Es lässt sich aber keine statistische Signifikanz nachweisen ($p=0,592$).

Nach IL1 Stimulation exprimieren mehr Rezidivpatienten (4/7) als Nicht-Rezidivpatienten (3/7) IL1 β ; es besteht aber keine statistische Signifikanz ($p=1,0$).

Nach IL6 Stimulation exprimieren insgesamt mehr Patienten IL6 (10/14), jedoch Patienten, die kein Rezidiv erleiden ebenso wie Rezidivpatienten (jeweils 5). Damit lässt sich keine Korrelation zwischen Expression und Rezidiv nachweisen.

5.1.5. Interleukin 2 Expression und Rezidiv

Interleukin 2 besitzt unspezifische und spezifische anti-Tumor Aktivität. *In vitro* werden Leukämiezellen durch IL2 aktivierte NK Zellen und oder AG spezifische T Zellen abgetötet (Atkins, 2002). In Tabelle 26 ist die IL2 Expression der Blasten nach vorheriger Stimulation mit IL1 dem Auftreten eines Rezidivs gegenübergestellt.

		Rezidiv		Gesamt
		kein Rezidiv	Rezidiv	
Expression	nein	4	7	11
	ja	3	0	3
Gesamt		7	7	14
Im 2-seitigen Fisher Test $p=0,192$				

Tabelle 26: Zusammenhang zwischen der IL2 Expression nach Stimulation mit IL1 und dem Auftreten eines Rezidivs. Der Nachweis von IL2 in den mit IL1 stimulierten Blasten mittels RT-PCR wurde in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt. Kein Patient, der IL2 exprimierte, erlitt ein Rezidiv. Allerdings war dieser Zusammenhang im Fisher Test nicht statistisch signifikant ($p=0,192$).

IL2 wird ausschließlich von Nicht-Rezidivpatienten exprimiert. Dieser Zusammenhang ist nicht statistisch signifikant. Bei allen Rezidivpatienten fehlt die IL2 Expression.

In den übrigen Versuchen zeigt sich unkultiviert, nach IL6 und Ionomycin Stimulation ebenfalls, dass IL2 vorwiegend von rezidivfrei überlebenden Patienten exprimiert wird. Der Zusammenhang ist aber nicht statistisch signifikant (unkultiviert $p =0,576$, nach IL6 Stimulation $p=0,462$, nach Ionomycin Stimulation $p=1,0$). Unstimuliert kultiviert exprimiert kein Patient IL2.

5.1.6. Zytokine, Onkogene und Oberflächenmoleküle, deren Expression nicht in Zusammenhang mit dem Auftreten eines Rezidivs stehen

IL1 α wird sowohl von Rezidiv- als auch Nicht-Rezidivpatienten exprimiert. Unkultiviert exprimieren 9 der 26 Patienten IL1 α , 7/17 Nicht-Rezidivpatienten und 2/9 Rezidivpatienten. Die IL1 α Expression besitzt somit keine prognostische Aussagekraft. Der IL6 Rezeptor wird von 16 von 17 Patienten konstitutiv exprimiert. Die Onkogene c-fos und c-myc werden von allen 17 untersuchten Patienten exprimiert. Diese Marker haben wir deshalb nach den ersten 17 Patienten nicht weiter untersucht. Der CD40 Rezeptor wird ebenfalls von der Mehrzahl der Patienten exprimiert. Bei 22/26 Patienten war die Expression in unkultiviertem Zustand nachweisbar. Auch für die Expression des CD40 Liganden lässt sich keine Korrelation zum späteren Auftreten eines Rezidivs herstellen. In unkultiviertem Zustand wird der CD40 Ligand von 14/17 Nicht-Rezidivpatienten und 8/9 Rezidivpatienten exprimiert. Für LIF und TGF β lässt sich ebenfalls kein eindeutiger Zusammenhang mit dem Auftreten eines Rezidivs herstellen. In unkultiviertem Zustand wird LIF von 6/17 Nicht-Rezidivpatienten und 6/9 Rezidivpatienten exprimiert, TGF β von 13/17 Nicht-Rezidivpatienten und 7/9 Rezidivpatienten. Für TNF α war in den hier vorliegenden Untersuchungen nur bei 1/26 Patienten in der Gelelektrophorese eine eindeutige Bande nachweisbar. TNF α wird v.a. von Makrophagen und T Zellen produziert (Vassalli, 1992), müsste also von mononukleären Zellen des peripheren Blutes oder T Zelllinien exprimiert werden. In den Vorversuchen an peripherem Blut und Zelllinien (u.a. Jurkat, einer T Zell Leukämie Zelllinie) war TNF α nur selten und schwach nachzuweisen, gleichzeitig waren für andere primer und die Positivkontrollen eindeutige Amplifikate nachweisbar. Als Ursache hierfür ist am ehesten ein technisches Problem des TNF α primers anzunehmen.

5.1.7. Einfluss des Blastenanteils im untersuchten Material auf das Expressionsmuster

Der Blastenanteil, bezogen auf die mononukleäre Zellfraktion, lag im untersuchten Material zwischen 30% und 95% (Mittelwert 83%). Bei 23/26 untersuchten Patienten waren mindestens 75% Blasten nachweisbar, bei den 3 Patienten (im folgenden P14, 18 und 26) mit dem niedrigsten Blastenanteil im Untersuchungsmaterial lag der Blastenanteil bei 53%, bzw. 30%, bzw. 70%. Bei diesen 3 Patienten lag nicht

ausreichend Material für Stimationsversuche vor; es wurde daher nur das native Expressionsmuster untersucht. Damit beeinflussen diese Patienten auch nicht die Ergebnisse der Stimationsversuche.

Nachfolgend werden die interessanten Untersuchungsergebnisse noch einmal für diese Patienten gesondert betrachtet, um festzustellen, ob der geringe Blastenanteil und damit gleichzeitig höhere Anteil an MNC - insbesondere T Zellen - Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse hat, bzw. die Ergebnisse dieser Patienten sich von denen des Gesamtkollektivs unterscheiden.

Die *IL4 Expression* korreliert in unseren Untersuchungen mit rezidivfreiem Überleben. In der Gruppe der Patienten mit niedrigem Blastenanteil (<75%) exprimiert ein Patient mit einem Blastenanteil von 30%, entgegen dem Expressionsmuster der rezidivfrei überlebenden Patienten, kein IL4, was auf den geringeren Blastenanteil zurückzuführen sein könnte.

Patient	Blastenanteil	Rezidiv	IL4 Expression un kultivierter Zellen
P14	53%	1	0
P18	30%	0	0
P26	70%	1	0

Tabelle 27: IL4 Expression un kultivierter Zellen bei Patienten mit geringem Blastenanteil (<75%) im untersuchten Material. Der Nachweis von IL4 in den un kultivierten Blasten mittels RT-PCR wurde in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt. Im Gesamtkollektiv zeigt sich eine Korrelation zwischen der IL4 Expression und rezidivfreiem Überleben. P18, mit einem Blastenanteil von 30%, zeigt keine IL4 Expression, trotz rezidivfreien Überlebens und fällt damit aus dem Expressionsmuster des Gesamtkollektivs heraus.

Die *IL6 Expression* zeigt im Gesamtkollektiv eine mögliche Korrelation zum späteren Auftreten eines Rezidivs. In der Gruppe der Patienten mit niedrigem Blastenanteil (<75%) exprimiert Patient 26 (70% Blasten im Untersuchungsmaterial), bei dem im Verlauf ein Rezidiv diagnostiziert wird, IL6. Bei Patient 14, mit einem Blastenanteil von 53%, der ebenfalls später ein Rezidiv erleidet, fehlt der Expressionsnachweis für IL6. Dies könnte wiederum auf den geringen Blastenanteil zurückzuführen sein.

Patient	Blastenanteil	Rezidiv	IL6 Expression un kultivierter Zellen
P14	53	1	0
P18	30	0	0
P26	70	1	1

Tabelle 28: IL6 Expression un kultivierter Zellen bei Patienten mit geringem Blastenanteil (<75%) im untersuchten Material. Der Nachweis von IL6 in den un kultivierten Blasten mittels RT-PCR wurde in Relation zum späteren Auftreten eines Rezidivs gesetzt. Im Gesamtkollektiv zeigt sich eine mögliche Korrelation zwischen der IL6 Expression und späterem Auftreten eines Rezidivs. P14, mit einem Blastenanteil von 53%, zeigt keine IL6 Expression, trotz späterem Auftretens eines Rezidivs und fällt damit aus dem Expressionsmuster des Gesamtkollektivs.

5.1.8. Zusammenfassung der Ergebnisse über den Zusammenhang von Expression und Rezidiv

Die Expression oder auch „Nicht-Expression“ kann mit dem rezidivfreien Überleben oder Auftreten eines Rezidivs korrelieren und damit prognostische Aussagekraft besitzen. In unseren Untersuchungen haben sich einige interessante Kandidaten herausgestellt.

In Tabelle 29 ist die prognostische Aussage der Expression, bzw. Nicht-Expression der untersuchten Marker zusammengefasst:

Prognostische Aussage der untersuchten Marker		Fisher Test
IL1 α	keine Aussage möglich	
IL1 β	Expression korreliert fraglich mit negativer Prognose	P=0,1
	Nicht-Expression korreliert fraglich mit positiver Prognose	
IL2	Expression korreliert fraglich mit positiver Prognose	P=0,19
IL4	Expression =positiv prognostisch	P=0,02
IL6	Expression =negativ prognostisch	P=0,07
IL6R	keine Aussage möglich	
IL10	Expression korreliert fraglich mit negativer Prognose	P=0,1
	Nicht-Expression korreliert fraglich mit positiver Prognose	
CD40L	keine Aussage möglich	
CD40R	keine Aussage möglich	
c-fos	keine Aussage möglich	
c-myc	keine Aussage möglich	

LIF	keine Aussage möglich
TGF β	keine Aussage möglich
TNF α	keine Aussage möglich

Tabelle 29: prognostische Aussage der untersuchten Parameter hinsichtlich des Rezidivrisikos. Die Expressionsdaten der aufgeführten Marker wurden mittels des Fisher Tests in Bezug zum klinischen Verlauf gesetzt. Expression, aber auch fehlende Expression, können mit dem Ausbleiben oder Auftreten eines Rezidivs korrelieren, d.h. positiv oder negativ prognostische Aussagekraft besitzen. Als aussagekräftig wurden Marker gewertet, bei den $p < 0,1$ im zweiseitigen Fisher Test. Für p zwischen $0,1$ und $0,2$ wurde der Zusammenhang als fragliche Korrelation ohne statistische Signifikanz beschrieben. Für $p > 0,2$ wurden die Werte nicht aufgeführt.

Die Expression von IL4, eine fehlende Expression von IL1 β (nach Ionomycin Stimulation) und von IL10 (unstimuliert kultiviert) sowie die Expression von IL2 (nach IL1 Stimulation) finden sich häufiger bei Patienten, die kein Rezidiv erleiden. Die stärkste prognostische Aussagekraft hat die spontane IL4 Expression der unkultivierten Zellen. Sie ist statistisch signifikant ($p = 0,02$ im 2-seitigen Fisher Test) mit dem rezidivfreien Überleben der Patienten assoziiert. Kein Patient der initial IL4 exprimiert erleidet später ein Rezidiv. Ebenfalls mit positiver Prognose könnten die fehlende Expression von IL1 β und IL10 assoziiert sein ($p = 0,1$ im 2-seitigen Fisher Test). Auch die Expression von IL2 ist ein Merkmal, das sich nur bei Nicht-Rezidivpatienten findet. Es lässt sich aber keine statistische Signifikanz nachweisen ($p = 0,19$ im 2-seitigen Fisher Test).

Bei Rezidivpatienten findet man häufiger die Expression von IL6 (nach IL1 und Ionomycin Stimulation), die Expression von IL1 β (nach Ionomycin Stimulation) und die Expression von IL10 (unstimuliert kultiviert). Die Expression von IL6 ist ein negativ prognostischer Marker und korreliert mit dem Auftreten eines Rezidivs ($p = 0,07$ im 2-seitigen Fisher Test). Patienten, die kein Rezidiv erleiden, exprimieren kein IL6. Auch die Expression von IL1 β und IL10 sind Proteine, die fast ausschließlich von Rezidivpatienten exprimiert werden ($p = 0,1$ im 2-seitigen Fisher Test). IL1 β und IL10 könnten für beide Patientengruppen von prognostischer Aussagekraft sein: Bei Nicht-Rezidivpatienten fehlt überwiegend die Expression; Rezidivpatienten exprimieren in der Mehrzahl IL1 β und IL10.

5.2. Expressionsmusters vor und nach Stimulation

Von 14 Patienten wurden die Blasten für 2h kultiviert, mit IL1, IL6 und Ionomycin stimuliert und anschließend das Expressionsmuster untersucht. Mit dem Mc Nemar Test wurde verifiziert, ob eine bestimmte Stimulation eine signifikante Änderung der Expressionsmuster bewirkt. In einer 2x2 Kreuztabelle wird die stimulierte der unstimulierten Expression gegenübergestellt (siehe auch Material und Methoden Tabelle 16).

5.2.1. Veränderung der IL6 Expression nach IL6 Stimulation

IL6 wirkt als autokriner Wachstumsfaktor bei verschiedenen malignen lymphatischen Erkrankungen (Preti *et al.*, 1997). IL6 könnte auch bei der ALL seine eigene Expression steigern.

		unstimulierte Expression		Gesamt
		nein	ja	
Expression nach Stimulation	nein	7	0	7
	ja	4	3	7
Gesamt		11	3	14
Im 2-seitigen Mc Nemar Test $p=0,125$				

Tabelle 30: Kreuztabelle, die Einfluss der IL6 Stimulation auf die IL6 Expression darstellt. Die Expression von IL6 in den Blasten nach IL6 Stimulation wurde mit der unstimulierten Expression verglichen. Nach IL6 Stimulation ist bei 4 Patienten eine IL6 Expression nachweisbar, die in unstimuliertem Zustand fehlte; d.h. IL6 könnte die IL6 Expression in den Blasten fördern. Im Mc Nemar Test ist diese Veränderung der Expression nach IL6 Stimulation aber nicht statistisch signifikant ($p=0,125$).

Die Anzahl der Patienten, die IL 6 exprimieren, steigt nach IL6 Stimulation an. Bei 4/11 Patienten, die unstimuliert kein IL6 exprimieren, ist nach Stimulation mit IL6 eine IL6 Expression in den Zellen nachweisbar.

In unseren Versuchen korreliert die IL6 Expression nach IL1 Stimulation mit dem Auftreten eines Rezidivs ($p=0,07$) (siehe Tabelle 20).

3/7 Rezidivpatienten exprimieren IL6, kein Patient, der rezidivfrei überlebt, exprimiert IL6. Der Anstieg der IL6 nach IL6 Stimulation könnte auf einen autokrinen Mechanismus hindeuten. Die übrigen getesteten Stimulatoren zeigen keine signifikante Änderung des Expressionsmuster.

5.2.2. Zusammenfassung der Ergebnisse der Stimulationsversuche

Der Einfluss der Stimulationen ist uneinheitlich. Für Expression protektiver Faktoren besteht für IL4 eine signifikante Korrelation zwischen Expression und rezidivfreiem Überleben in unstimuliertem Zustand, die IL2 Expression ist bei Nicht-Rezidivpatienten nach IL1 Stimulation am stärksten ausgeprägt. Auch für Faktoren mit potentiell negativem Einfluss auf das Krankheitsgeschehen lässt sich kein einheitlicher Trend nachweisen. Die IL6 Expression der späteren Rezidivpatienten ist nach IL1 Stimulation am stärksten ausgeprägt. Dieses Phänomen wurde bereits für myeloische Leukämien beschrieben (Apte and Voronov, 2002). Für die unstimulierte IL10 Expression und für die IL1 β Expression nach vorheriger Ionomycin Stimulation zeigt sich eine mögliche Korrelation zum späteren Auftreten eines Rezidivs.

6. Diskussion

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 480 Kinder unter 15 Jahren an einer ALL (Bender-Götze, 2003). Die Therapie wird risikoadaptiert mit Polychemotherapie und Schädelbestrahlung durchgeführt. Die Initialdiagnostik dient, neben der Diagnosestellung, einer möglichst präzisen Abschätzung des Rezidivrisikos und der Einteilung in die entsprechende Therapiegruppe. *Prognosefaktoren* wie Alter, initiale Leukozytenzahl, Immunphänotyp und molekulargenetische Veränderungen werden zur Entscheidung über die Intensität der Therapie herangezogen. Eine besonders gute prognostische Aussagekraft bei der ALL im Kindesalter hat das Ansprechen auf Therapie, d.h. die Blastenreduktion nach der Induktionstherapie mit Cortison und die Bestimmung der minimalen Resterkrankung im weiteren Therapieverlauf (Schrappe, 2004b). MRD (MRD =minimal residual disease) ist heute der wichtigste prognostische Parameter (Eckert *et al.*, 2001; Schrappe, 2004c; van Dongen *et al.*, 1998). Der Einfluss pharmakodynamischer und pharmakogenetischer Parameter auf das Therapieansprechen - und damit die Prognose - wird zurzeit an einem größeren Kollektiv untersucht. Lag 1960 die *Heilungsrate* noch bei 5%, werden heute bis zu 80% der Kinder dauerhaft geheilt (Eckert *et al.*, 2001; Kersey, 1997). 20%-30% aller Kinder erleiden jedoch einen Rückfall (Eckert *et al.*, 2001). Auch nach erneuter intensiver Therapie überleben von diesen Kindern nur 30% (Eckert *et al.*, 2001). Mit den insgesamt verbesserten Heilungschancen erhöht sich auch die Zahl der Überlebenden. Im Jahre 2010 wird einer von 250 jungen Erwachsenen zwischen 15 und 45 Jahren Überlebender einer Krebserkrankung im Kindes- und Jugendalter sein (Calaminus G, 2000). Damit gewinnt auch das Problem der therapieassoziierten *Spätfolgen* zunehmend an Bedeutung. Im Anschluss an eine ALL Therapie sind dies in erster Linie Hirntumoren und neuropsychologische Defizite als Folge der ZNS Bestrahlung, Kardiomyopathien durch Anthrazyklintherapie und Entwicklung einer AML (=akute myeloische Leukämie) ausgelöst durch den Einsatz von Topoisomerasehemmern (Pui and Evans, 1998; Pui and Relling, 2000).

Aktuelle Bemühungen, das Überleben der Kinder mit einer ALL weiter zu verbessern beinhalten eine möglichst präzise Risikoeinteilung, um Über- und Untertherapie zu vermeiden, d.h. angestrebt wird eine Therapiereduktion für Kinder mit niedrigem Rezidivrisiko, um Therapietoxizität und Spätfolgen zu vermeiden, ohne gleichzeitig die Heilungschancen zu verringern. In der Gruppe der Hochrisikopatienten soll das

Überleben durch frühzeitige Therapieintensivierung und neue Therapieansätze verbessert werden (Pui *et al.*, 2001).

Nicht für alle Patienten wird initial, mit Hilfe der bekannten prognostischen Parameter, das Rückfallrisiko richtig eingeschätzt. Rezidive treten sowohl bei als Hochrisiko eingestuften Patienten, als auch bei Niedrigrisiko Patienten auf. Für die Gruppe der Niedrigrisiko Patienten, die rezidivieren, ist die Suche nach neuen prognostischen Markern von besonderem Interesse. Bei diesen Patienten wurde mit den bekannten Markern das hohe Risiko nicht erkannt, sie wurden deshalb möglicherweise untertherapiert. Die Rezidivquote innerhalb der Niedrigrisiko Gruppe liegt in unserem Patientenkollektiv bei 30% (vgl. 6% COALL-92, (Harms and Janka-Schaub, 2000)), für Patienten der Hochrisikogruppe bei 38% (vgl. 30% COALL-92 (Harms and Janka-Schaub, 2000)). Das bedeutet 44% der späteren Rezidivpatienten wurden initial der Niedrigrisiko Gruppe zugeordnet (vgl. 31% COALL-92, (Harms and Janka-Schaub, 2000)). Diese Patientengruppe könnte von einer frühzeitig intensivierten Therapie, wie sie in den Hochrisiko Therapiegruppen vorgesehen ist, profitieren. Diese Zahlen verdeutlichen die Notwendigkeit, neue Parameter zur Prognoseeinschätzung heranzuziehen, um möglichst alle Patienten adäquat zu therapieren.

Zytokine können das biologische Verhalten der Blasten und der Zellen des microenvironments und Immunsystems beeinflussen, indem sie z.B. die Leukämiegenese fördern, Zellproliferation stimulieren, Apoptose unterdrücken oder die Immunantwort hin zu einer relativen Anergie gegenüber der Leukämiezelle modulieren (Kebelman-Betzing *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit haben wir analysiert, ob die Expression für die Biologie der ALL wichtiger Faktoren in Zusammenhang mit dem späteren Auftreten eines Rezidivs steht und damit prognostische Aussagekraft besitzt.

Die *Hämatopoese* ist von einer fein abgestimmten Interaktion von Faktoren abhängig, die die Balance zwischen Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren. Zytokine sind Schlüssel-moleküle in diesem Prozess (Wu *et al.*, 2005b). Bei der ALL finden sich genetische Veränderungen, die die normale Differenzierung der lymphatischen Zellen auf Ebene der Stammzellen oder der frühen lymphatischen Vorläuferzellen beeinträchtigen. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass diese transformierten lymphatischen Vorläuferzellen durch inadäquate Zytokinexpression und abnorme Aktivierung der Rezeptoren überleben und klonal

expandieren können. Das heißt genetische Aberrationen und deregulierte Zytokine wirken bei der Leukämieentstehung zusammen (Wu *et al.*, 2005b). Zytokine haben außerdem entscheidenden Einfluss auf das *Immunsystem*. Sie können die Immunüberwachung und immunkompetente Zellen schwächen und damit die Expansion maligner Zellen fördern (Wu *et al.*, 2005b). IL10 z.B. wirkt suppressiv auf die Tumorantigenpräsentation: Kostimulatorische Moleküle, wie CD40, werden auf den Tumorzellen herunterreguliert ebenso die MHC II Expression auf antigenpräsentierenden Zellen. Dadurch wird sowohl die Immunogenität der Tumorzellen als auch die antigenpräsentierende Kapazität der Immunzellen vermindert und die Elimination der malignen Zellen durch das Immunsystem gehemmt (Schulz *et al.*, 2001). Zytokine beeinflussen die *Apoptose* (Lotem and Sachs, 2002a); IL4 z.B. löst den programmierten Zelltod bei BCP ALL Zellen in Kultur aus (Manabe *et al.*, 1994). Apoptose, der programmierte Zelltod ist ein Hauptkontrollmechanismus, durch den schadhafte Zellen aus dem Körper eliminiert werden (Ghobrial *et al.*, 2005). Bei Krebserkrankungen finden sich Imbalancen zwischen pro- und antiapoptotischen Regulatoren, ein Übergewicht antiapoptotischer Proteine fördert das Überleben maligner Zellen (Reed and Pellecchia, 2005). Einige Krebsarten, wie die B CLL, sind charakterisiert durch Defekte in der Apoptose, die zur Entwicklung immortalen Zellklone führen (Ghobrial *et al.*, 2005). Ein Teil der antileukämischen Therapie, insbesondere die Glucocorticoide, basieren auf Induktion von Apoptose.

Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass bei der ALL abnorme Zytokinexpression die klonale Expansion der maligne transformierten Zellen bewirkt (Kebelmann-Betzing *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005b). In der vorliegenden Studie wurden die leukämische Blasten mit IL1, IL6 und Ionomycin stimuliert und die Änderung des Zytokinexpressionsprofils im Vergleich zum unstimulierten Zustand untersucht. Die untersuchten Knochenmarksproben zeigten mRNA Expression für ein Vielzahl von Zytokinen, Oberflächenmolekülen und Onkogenen; als besonders interessant haben sich IL4, IL6, IL10 und IL1 β herausgestellt. Die Expression von IL4 ist ein positiv prognostischer, die Expression von IL6 ein negativ prognostischer Marker. Für die Expression von IL10 und IL1 β scheint eine Korrelation mit dem Auftreten eines Rezidivs möglich.

Teilt man die Patienten in zwei Gruppen, nämlich solche, die ein Rezidiv erleiden und solche, die kein Rezidiv erleiden, ergibt sich für die jeweilige Gruppe ein

Expressionsmuster von potentiell prognostischer Relevanz. Nicht-Rezidivpatienten exprimieren IL2 und IL4; sie exprimieren kein IL1 β , kein IL6 und kein IL10. Das Expressionsmuster für IL1 α , IL2R, IL6R, CD40L, CD40R, c-fos, c-myc, LIF, TGF β und TNF α steht in keinem Zusammenhang mit dem rezidivfreien Überleben. Rezidivpatienten exprimieren IL1 β , IL10 und TGF β , sie exprimieren kein IL2. Das Expressionsmuster für IL1, IL2R, IL4, IL6, IL6R, CD40L, CD40R, c-fos, c-myc, LIF und TNF α steht in keinem Zusammenhang mit dem Auftreten eines Rezidivs.

IL4 hat sich in den Versuchen als statistisch signifikanter, positiv prognostischer Marker herausgestellt. Keiner der Patienten, dessen Knochenmarkszellen in unkultiviertem Zustand IL4 exprimieren, erleidet ein Rezidiv. IL4 ist ein pleiotropes Zytokin, welches Immunsystem, Zellwachstum und Apoptose beeinflusst. Es wird in erster Linie von den TH2 Zellen produziert (Nelms *et al.*, 1999) und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der T Zell Effektor Antwort: Es fördert die Antikörper vermittelte TH2 Immunantwort und unterdrückt die Bildung von TH1 Zellen, die u.a. auch für die antileukämische Immunantwort zuständig sind (Brown and Hural, 1997; Li-Weber and Krammer, 2003). IL 4 wurde ursprünglich als B-Zell Wachstums- und Differenzierungsfaktor entdeckt. Ob IL4 das Wachstum von BCP ALL Zellen stimuliert oder hemmt, ist noch nicht eindeutig geklärt (Kebelman-Betzing *et al.*, 2001). Bei malignen lymphatischen Erkrankungen wie der ALL, dem B-NHL und multiplem Myelom, hemmt IL4 *in vitro* die Proliferation der malignen Zellen (Akashi, 1993). Ein hemmender Effekt von IL4 auf die *in vitro* Proliferation von ALL Zellen wurde auch in anderen Arbeiten beschrieben (Ouaaz *et al.*, 1993; Pandrau *et al.*, 1992). Auf die weitere Differenzierung der unreifen ALL Zellen hin zu reifen B-Zellen hat IL4 keinen Effekt (Pandrau *et al.*, 1992). *In vitro* konnte ein irreversibel toxischer Effekt von IL4, durch Förderung der Apoptose, auf normale und leukämische BCP gezeigt werden (Manabe *et al.*, 1994). Der genaue Mechanismus Zytokin vermittelter Apoptose ist nicht bekannt (Karawajew *et al.*, 2000). Beim ALL Rezidiv war keine Expression von IL4 in den Blasten nachweisbar (Kebelman-Betzing *et al.*, 2001), was ebenfalls für einen positiven Effekt von IL4 auf den Krankheitsverlauf spricht.

Die *IL6* Expression, nach IL1 Stimulation, korreliert statistisch signifikant mit dem Auftreten eines Rezidivs ($p=0,07$) ist also ein negativer prognostischer Marker. Etwa die Hälfte der Rezidivpatienten exprimiert initial IL6, während es bei den Nicht-Rezidivpatienten die Ausnahme ist. IL6 hat ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten bei der Immunregulation und Hämatopoese, es spielt auch bei malignen

Erkrankungen eine Rolle (Hirano, 1998; Naka *et al.*, 2002). In transgenen Mäusen ist die IL6 Expression mit der Entwicklung von Lymphomen assoziiert, bei immungeschwächten Patienten korrelieren IL6 Spiegel mit dem Lymphomrisiko (Fayad *et al.*, 2001). IL6 wirkt auch auf den Progress maligner lymphatischer Erkrankungen als auto- und parakriner Wachstumsfaktor. So korreliert z.B. die IL6 Produktion von Lymphomzellen mit der Proliferationsrate und Ausbreitung der Erkrankung (Preti *et al.*, 1997). Bei der CLL fördert IL6 das Überleben und die Akkumulation der Blasten, indem es die Apoptose unterdrückt (Fayad *et al.*, 2001). Die immunsuppressive Wirkung von IL6 hat zusätzlich negativen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen. IL6 hemmt die Differenzierung von dendritischen Zellen *in vitro*, was weiteres Tumorwachstum unterstützt (Alberti *et al.*, 2004). Erhöhte IL6 Spiegel sind etablierter negativ prognostischer Faktor bei M. Hodgkin, NHL und multiplem Myelom, aber auch bei soliden Tumoren wie Nierenzell-, Prostata- und Ovarialkarzinom (Fayad *et al.*, 1998; Fayad *et al.*, 2001). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen könnte IL6 bei der kindlichen BCP ALL ebenfalls ein negativer prognostischer Marker sein. Allerdings sind, so auch in der Literatur (Fayad *et al.*, 2001; Preti *et al.*, 1997), die Daten mit Bedacht zu interpretieren. *IL6* ist Teil der Akutphasereaktion im Rahmen von Infektionen. Viele ALL Patienten werden initial mit Fieber und Infektion als Folge ihrer Abwehrschwäche im Rahmen der Grunderkrankung, aufgenommen. Es bleibt unklar, ob die IL6 Expression der Grunderkrankung zuzuschreiben und als Produkt der Blasten anzusehen ist oder ob es sich vielmehr um ein parainfektöses Geschehen handelt, bei dem periphere MNC inflammatorische Mediatoren produzieren. Die IL6 Expression ist deshalb mit Zurückhaltung zu bewerten. In den Arbeiten von Fayad *et al.* und Preti *et al.* (Fayad *et al.*, 2001; Preti *et al.*, 1997) wurden bei Lymphompatienten IL6 Serumspiegel mit klinischen Prognosefaktoren und Überleben korreliert. Auch hier blieb unklar, ob reaktive normale Lymphozyten oder maligne Lymphomzellen Quelle der Zytokinproduktion waren. Zeichen der Infektion wie Fieber wurden in der Auswertung ebenfalls nicht berücksichtigt.

Für die Expression von *IL10* lässt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachzuweisen. Es zeigt sich aber nach den von uns erhobenen Daten ein Trend für eine Korrelation von IL10 Expression und dem Auftreten eines Rezidivs. IL10 wird vorwiegend von Rezidivpatienten exprimiert (5/7). Von den rezidivfrei überlebenden Patienten exprimiert nur 1/7 Patienten IL10 ($p=0,1$). Diese Ergebnisse könnten durch

die stark immunsuppressive Wirkung von IL10 begründet werden. IL10 hemmt verschiedene immunologische Funktionen, die für eine effektive anti-Tumor Antwort wichtig sind: die T Lymphozyten Proliferation, die TH1 Zytokin Produktion, Zytotoxizität tumorreaktiver T Zellen (De Vita *et al.*, 2000). IL10 schwächt auch die spezifische anti-Tumor Immunantwort: es hemmt die MHC II Expression auf APC und reguliert die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf Tumorzellen herunter (Bohlen *et al.*, 2000; De Vita *et al.*, 1999). Durch seine immunsuppressive Wirkung ermöglicht IL10 die Akkumulation von Leukämiezellen *in vivo* (Schulz *et al.*, 2001). Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen IL10 und der Entwicklung von Lymphomen vermutet (Bohlen *et al.*, 2000). Verschiedene Studien haben einen Zusammenhang zwischen IL10 und der *Pathogenese* maligner B-Zell Proliferation und maligner Lymphome gezeigt (Khatri and Caligiuri, 1998). IL10 wurde als autokriner Wachstumsfaktor für maligne Erkrankungen der B-Zell Reihe, auch der ALL, beschrieben (Fayad *et al.*, 2001; Khatri and Caligiuri, 1998; Lauten *et al.*, 2002). Zudem fördert IL10 die bcl-2 Überexpression (Levy and Brouet, 1994) und damit die Resistenz der malignen Zellen gegenüber Apoptose. Bei der kindlichen ALL gibt es unterschiedliche Beobachtungen zur IL10 Expression in Korrelation mit dem Krankheitsverlauf. Wu *et al.* konnten beim kindlichen ALL Rezidiv zeigen, dass die IL10 Expression mit Krankheitsprogress assoziiert ist (Wu *et al.*, 2005b). IL10 induziert antiapoptotisch wirkendes bcl-2, was möglicherweise die Chemoresistenz beim Rückfall der ALL unterstützt. Zudem hemmt IL10 die antileukämische Immunantwort und kann, wie auch bei anderen malignen B-Zellerkrankungen, autokrin die Zellproliferation stimulieren (Wu *et al.*, 2005a). Das Zusammenspiel dieser Effekte führt zu einem selektiven Wachstumsvorteil der neoplastischen Zellen (Wu *et al.*, 2005a; Wu *et al.*, 2005b). Lauten *et al.* dagegen fanden einen Zusammenhang zwischen hohen IL10 Spiegeln und gutem Therapieansprechen auf Cortison, was *per se* ein positiv prognostisches Kriterium ist (Lauten *et al.*, 2002). Um den genauen Einfluss von IL10 auf die Biologie der ALL zu klären sind weitere Untersuchungen nötig.

Auch für die *IL1 β* Expression zeigte sich in unseren Untersuchungen im Trend ein möglicher Zusammenhang mit dem Auftreten eines Rezidivs gezeigt, der jedoch nicht statistisch signifikant war. IL1 β wird vorwiegend von Rezidivpatienten exprimiert (5/7), von den rezidivfrei überlebenden Patienten exprimiert nur 1/7 Patienten IL1 β (p=0,1 im zweiseitigen Fisher Test). IL1 ist ein proinflammatorisches

Zytokin und hat diverse stimulierende Effekte auf Immunzellen, u.a. T Zellen und NK Zellen (Apte and Voronov, 2002; Dinarello, 2000). IL1 wirkt auch als ein regulatorisches Zytokin im Zellzyklus, es fördert die Expression von Genen, die an Zellüberleben und -proliferation beteiligt sind (Ricote *et al.*, 2004). Eine Beteiligung von IL1 an der Entstehung von Leukämien über den Verlust von Kontrollmechanismen während Proliferation von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen wird diskutiert (Apte and Voronov, 2002). Eine konstitutive Expression von IL1 findet sich v.a. bei myeloischen Leukämien. IL1 wirkt bei diesen Leukämien als autokriner oder parakriner Wachstumsfaktor, über Induktion hämatopoetisch proliferativ wirkender Zytokine wie GM-, G-CSF und IL6 in den malignen Zellen und Knochenmarkstromazellen (Apte and Voronov, 2002; Beaupre *et al.*, 1999). Auch bei einer ALL der B-Zellreihe konnte eine autokrine Wachstumsschleife für IL1 nachgewiesen werden (Mori *et al.*, 1994). Die Expression von IL1 in den ALL Blasten könnte einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben.

Die hier erhobenen Daten erscheinen im biologischen Kontext sinnvoll. IL4 fördert die Apoptose der Leukämiezellen *in vitro* und wirkt so mit an der Elimination der malignen Zellen (Manabe *et al.*, 1994). Eine fehlende Expression von IL4 in den per se biologisch aggressiveren Blasten beim ALL Rezidiv passt in diesen Kontext (Kebelman-Betzing *et al.*, 2001). Die Expression von IL4 scheint ein positiver prognostischer Marker zu sein. IL6 ist zum Einen mit der Entwicklung maligner lymphatischer Erkrankungen assoziiert (Hirano, 1998; Naka *et al.*, 2002) und fördert die Proliferation der malignen Zellen (Preti *et al.*, 1997). Zum Anderen hemmt es die spezifische anti-Tumor Abwehr an der Elimination der entarteten Zellen (Alberti *et al.*, 2004). IL6 könnte, wie auch bei anderen malignen, lymphatischen Erkrankungen (Alberti *et al.*, 2004; Fayad *et al.*, 1998; Fayad *et al.*, 2001) ein negativer prognostischer Parameter sein. IL10 hat ein breites immunsuppressives Spektrum, insbesondere auch eine hemmende Wirkung auf die spezifische anti-Tumor Antwort (Bohlen *et al.*, 2000; De Vita *et al.*, 1999; De Vita *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2001) und könnte dadurch die Akkumulation von Leukämiezellen *in vivo* ermöglichen. Außerdem fördert IL10 die bcl-2 Überexpression (Levy and Brouet, 1994) und damit die Resistenz der malignen Zellen gegenüber Apoptose, auch gegenüber therapieinduzierter Apoptose durch Steroide und Doxorubicin (Vassilakopoulos *et al.*, 2002). Beide Effekte könnten die Korrelation der IL10 Expression mit dem Auftreten eines Rezidivs erklären.

In dieser Studie wurden Knochenmarksproben, die ein Gemisch aus ALL Blasten und MNC (=mononuclear cells) enthalten, untersucht. Unklar bleibt, ob die nachgewiesenen Zytokinexpressionen den Blasten oder kontaminierenden peripheren MNC, insbesondere den T Zellen, zuzuschreiben sind. Jedoch sind viele Arbeiten mit diesem Problem behaftet (Manabe *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2005b). Weiterführend wäre z.B. eine Immunfluoreszenzuntersuchung mit Doppelmarkierung von leukämiespezifischen Oberflächenmarkern und intrazellulären Zytokinen. Die Zytokinexpression könnte so eindeutig den Blasten zugeordnet und von der Expression kontaminierender, nicht leukämischer Zellen des peripheren Blutes unterschieden werden. Ein „Zellsorten“, d.h. eine Positivanreicherung der Blasten nach Markierung mit spezifischen Oberflächenmarkern, ist auf Grund der geringen zur Verfügung stehenden Materialmenge und dem „Stress“ für die Zellen durch diese Prozedur und damit veränderter Zytokinexpression problematisch. Im Anschluss an diese Arbeit wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt, die sich mit der Quelle der IL10 Produktion bei Patienten mit einer kindlichen BCP ALL befassen (Stachel *et al.*, 2006; Stachel *et al.*, 2004). Mit zwei unterschiedlichen Verfahren wurde nachgewiesen, dass IL10 sowohl von Leukämiezellen als auch von T und NK Zellen produziert wird, wobei der Grossteil der IL10 Produktion der T/NK Zellfraktion zuzuschreiben ist. Der Gehalt an IL10 mRNA in der T/NK Zellfraktion lag in der TaqMAN Untersuchung 33-fach höher.

Unsere Daten zeigen, dass die Expressionsanalysen von Zytokinen im Knochenmark von Leukämiepatienten das biologische Verständnis der Erkrankung vertiefen sowie potentielle prognostische Faktoren definieren können. Für eine Verifizierung der Aussage sind jedoch weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv mit spezifischeren Nachweismethoden nötig.

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

AG	Antigen
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ALL BFM	ALL Studie Berlin Frankfurt Münster
AML	Akute myeloische Leukämie
AMV-RT	Avian myeloblastosis virus reverse transkriptase
APC	Antigen präsentierende Zellen
BCP	B cell precursor, B Vorläufer Zellen
Bp	Basenpaare
cALL	common ALL
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA =komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLP	common lymphoid progenitor, gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle, die sich zu B, T, NK und dendritischen Zellen entwickeln kann.
COALL	Cooperative ALL Studie
CTL	cytotoxic T cells=zytotoxische T Zellen
cylgM	zytoplasmatisches Immunoglobulin M
DC	dendritic cells
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEXA	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen Diamin Tetra Acetat
EFS	Event free survival Zeit bis zum Auftreten von Rezidiv, Tod oder Zweitmalignom.
FCS	fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase
HR	Hohes Risiko
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
LIF	Leukemia inhibitory factor
MHC	major Histokompatibilitätskomplex
MNC	mononuclear cells
MR	mittleres Risiko
MRD	minimal residual disease
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NHL	Non Hodgkin Lymphom
NHL-BFM	NHL Studie Berlin Frankfurt Münster
NK	natural killer cells
Oligo-dt	Oligo–Desoxy-Thymidin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PRED	Prednison
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
slg	surface Ig =Oberflächenimmunglobulin

SR	Standard Risiko
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TdT	Terminale Desoxynucleotidtransferase
TGF	transforming growth factor
TH	T Helferzellen TH0, TH1, TH2
TNF	tumor necrosis factor
UV	Ultraviolett

7.2. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: klinische Merkmale der untersuchten Patienten
- Tabelle 2: untersuchtes Material
- Tabelle 3: Einteilung in Risikogruppen entsprechend den Kriterien der Therapiestudie COALL-92
- Tabelle 4: Rezidivrate innerhalb der Risikogruppen
- Tabelle 5: klinische Merkmale der Patienten, bei denen zusätzlich der Einfluss von Stimulatoren auf das Expressionsmuster untersucht wurde
- Tabelle 6: Sequenzen der primer für die RT-PCR
- Tabelle 7: Untersuchte Zytokine, Rezeptoren, Liganden und Onkogene
- Tabelle 8: verwendete Stimulantien
- Tabelle 9: Versuchsansätze
- Tabelle 10: Länge der PCR-Amplifikate (bp =Basenpaare)
- Tabelle 11: Eingruppierung der Patienten in der 2x2 Kreuztabelle nach den Merkmalen Rezidiv und Expression
- Tabelle 12: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für negativ prognostische Marker
- Tabelle 13: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für negativ prognostische Marker
- Tabelle 14: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für positiv prognostische Marker
- Tabelle 15: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für positiv prognostische Marker
- Tabelle 16: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für negativ prognostische Marker
- Tabelle 17: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle für positiv prognostische Marker
- Tabelle 18: 2x2 Kreuztabelle: Einfluss der Stimulatoren auf das Expression der Blasten
- Tabelle 19: Zusammenhang zwischen unkultivierter IL4 Expression und dem Auftreten eines Rezidivs
- Tabelle 20: Zusammenhang zwischen IL4 Expression nach IL6 Stimulation und dem Auftreten eines Rezidivs

- Tabelle 21: Zusammenhang zwischen unkultivierter IL6 Expression und dem Auftreten eines Rezidivs
- Tabelle 22: Zusammenhang zwischen der IL6 Expression nach vorheriger Stimulation mit IL1 und dem Auftreten eines Rezidivs
- Tabelle 23: Zusammenhang zwischen der IL6 Expression nach vorheriger Stimulation mit Ionomycin und dem Auftreten eines Rezidivs
- Tabelle 24: Zusammenhang zwischen der unstimulierten IL10 Expression und dem Auftreten eines Rezidivs
- Tabelle 25: Zusammenhang zwischen der IL1 β Expression nach Stimulation mit Ionomycin und dem Auftreten eines Rezidivs
- Tabelle 26: Zusammenhang zwischen der IL2 Expression nach Stimulation mit IL1 und dem Auftreten eines Rezidivs
- Tabelle 27: IL4 Expression der unkultivierten Zellen bei Patienten mit geringem Blastenanteil (<75%) im untersuchten Material
- Tabelle 28: IL6 Expression der unkultivierten Zellen bei Patienten mit geringem Blastenanteil (<75%) im untersuchten Material
- Tabelle 29: prognostische Aussage der untersuchten Parameter hinsichtlich des Rezidivrisikos
- Tabelle 30: Kreuztabelle, die Einfluss der IL6 Stimulation auf die IL6 Expression darstellt.

7.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien der B-Zell Entwicklung

Abbildung 2: Regulation der Hämatopoese durch Zytokine

Abbildung 3: Leukämiogenese und mögliche Therapieansätze

Abbildung 4: Therapieprotokoll COALL 92

Abbildung 5: Therapieprotokoll ALL-BFM 90

7.4. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Barbara Kreutzer
geboren	10. November 1967 in Würzburg
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

1974-1978	Grundschule in Würzburg
1978-1985	Sieboldgymnasium, Würzburg
1985-1986	Lycée Claude Debussy, Paris
1986-1988	Sieboldgymnasium, Würzburg

Berufsausbildung

Studium der Humanmedizin

1988-1989	Ruhruniversität Bochum
1989-1990	Julius-Maximilian-Universität Würzburg
1990-1991	Ludwig-Maximilian-Universität München
1991-1995	Technische Universität München

1997 - 1998	Ärztin im Praktikum an der Kinderklinik der Technischen Universität München, Städtisches Krankenhaus München Schwabing
-------------	--

seit 1998	Assistenzärztin an der Kinderklinik der Technischen Universität München, Städtisches Krankenhaus München Schwabing
-----------	--

7.5. Danksagung

Herrn Prof. R. Haas danke ich für die Überlassung des Themas, Herrn Dr. med. Daniel Stachel möchte ich danken für die Bereitstellung der technischen und materiellen Voraussetzungen, für seine Unterstützung bei der Arbeit im Labor, die vielfältigen Anregungen und seine andauernde Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei Claudia Kaiser, Gabi Weimer und Rita Meilbeck für ihre umfassende Unterstützung und geduldige Hilfe bei allen praktischen Arbeiten sowie bei den Ärzten und Schwestern der Kinderonkologie des Dr. von Haunerschen Kinderspitals für die stets freundliche Unterstützung und Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. P. Nelson, der die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit übernommen und mir wertvolle, kritische Anregungen geliefert hat.

Ohne die Unterstützung von Frau Dr. I. Teichert von Lüttichau wäre mir die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke ihr für die Unterstützung bei der Konzipierung und Anfertigung meiner Doktorarbeit, für ihr Engagement und ihre Geduld.

Bei Anke Moorat bedanke ich mich für ihren kompetente Beratung und kritische Durchsicht der Arbeit.

Ich danke meiner Familie für ihr Verständnis, ihre Geduld und fortwährende Unterstützung und allen, die mir den zeitlichen Freiraum ermöglicht haben.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern. Ohne sie wären das Medizinstudium und diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

7.6. Literaturverzeichnis

- Akashi K. 1993. The role of interleukin-4 in the negative regulation of leukemia cell growth. *Leuk Lymphoma* 9:205-209.
- Alberti L, Thomachot MC, Bachelot T, Menetrier-Caux C, Puisieux I, Blay JY. 2004. IL-6 as an intracrine growth factor for renal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 111:653-661.
- Alli Z, Nam EH, Beimnet K, Abdelhaleem M. 2005. The activation-induced expression of DHX32 in Jurkat T cells is specific and involves calcium and nuclear factor of activated T cells. In: *Cell Immunol.* p 141-146.
- Apte RN, Voronov E. 2002. Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Semin Cancer Biol* 12:277-290.
- Astier AL, Xu R, Svoboda M, Hinds E, Munoz O, de Beaumont R, Crean CD, Gabig T, Freedman AS. 2003. Temporal gene expression profile of human precursor B leukemia cells induced by adhesion receptor: identification of pathways regulating B-cell survival. *Blood* 101:1118-1127.
- Atkins MB. 2002. Interleukin-2: clinical applications. *Semin Oncol* 29:12-17.
- Banchereau J, Palucka AK. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5:296-306.
- Baskiewicz-Masiuk M, Machalinski B. 2004. The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells. *Eur J Haematol* 72:420-429.
- Beaupre DM, Talpaz M, Marini FC, 3rd, Cristiano RJ, Roth JA, Estrov Z, Albitar M, Freedman MH, Kurzrock R. 1999. Autocrine interleukin-1beta production in leukemia: evidence for the involvement of mutated RAS. *Cancer Res* 59:2971-2980.
- Bender-Götze. 2003. Besonderheiten der akuten Leukämien im Kindesalter. In: *Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome.* Tumorzentrum München.
- Bertrand FE, Eckfeldt CE, Fink JR, Lysholm AS, Pribyl JA, Shah N, LeBien TW. 2000. Microenvironmental influences on human B-cell development. *Immunol Rev* 175:175-186.
- Billips LG, Lassoued K, Nunez C, Wang J, Kubagawa H, Gartland GL, Burrows PD, Cooper MD. 1995. Human B-cell development. *Ann N Y Acad Sci* 764:1-8.
- Bohlen H, Kessler M, Sextro M, Diehl V, Tesch H. 2000. Poor clinical outcome of patients with Hodgkin's disease and elevated interleukin-10 serum levels. Clinical significance of interleukin-10 serum levels for Hodgkin's disease. *Ann Hematol* 79:110-113.
- Brown MA, Hural J. 1997. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol* 17:1-32.
- Calaminus G LT, Willich N, Beck JD. 2000. Lebensqualität und Spätfolgen bei Kindern und Jugendlichen mit Krebserkrankungen *Der Onkologe* 6:868-877.
- Capocasale RJ, Lamb RJ, Vonderheid EC, Fox FE, Rook AH, Nowell PC, Moore JS. 1995. Reduced surface expression of transforming growth factor beta receptor type II in mitogen-activated T cells from Sezary patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5501-5505.

- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Crabtree GR. 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243:355-361.
- Crans HN, Sakamoto KM. 2001. Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. *Leukemia* 15:313-331.
- Creutzig. 2002. Von tödlichen zu heilbaren Krankheiten. Die Erfolge der Pädiatrischen Onkologie in den letzten 25 Jahren. GPOH und Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
- D'Amico G, Marin V, Biondi A, Bonamino MH. 2004a. Potential use of CD40 ligand for immunotherapy of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 17:465-477.
- D'Amico G, Vulcano M, Bugarin C, Bianchi G, Pirovano G, Bonamino M, Marin V, Allavena P, Biagi E, Biondi A. 2004b. CD40 activation of BCP-ALL cells generates IL-10-producing, IL-12-defective APCs that induce allogeneic T-cell anergy. *Blood* 104:744-751.
- De Vita F, Orditura M, Galizia G, Romano C, Infusino S, Auriemma A, Lieto E, Catalano G. 1999. Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Cancer* 86:1936-1943.
- De Vita F, Orditura M, Galizia G, Romano C, Lieto E, Iodice P, Tuccillo C, Catalano G. 2000. Serum interleukin-10 is an independent prognostic factor in advanced solid tumors. *Oncol Rep* 7:357-361.
- Dinarello CA. 2000. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med* 343:732-734.
- Downing JR. 2004. TGF-beta signaling, tumor suppression, and acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 351:528-530.
- Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyermann B, Pogodda M, Proba J, Henze G. 2001. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 358:1239-1241.
- Fayad L, Cabanillas F, Talpaz M, McLaughlin P, Kurzrock R. 1998. High serum interleukin-6 levels correlate with a shorter failure-free survival in indolent lymphoma. *Leuk Lymphoma* 30:563-571.
- Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, Kurzrock R. 2001. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood* 97:256-263.
- Fidani L, Athanassiadou-Piperopoulou F, Goulas A, Chatzidakis K, Koliousskas D, Kotsis A. 2004. An association study of the tumor necrosis factor alpha C-850T polymorphism and childhood acute lymphoblastic leukemia in a population from northern Greece. *Leuk Res* 28:1053-1055.
- Findley HW, Gu L, Yeager AM, Zhou M. 1997. Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89:2986-2993.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 55:178-194.
- Gillis S, Watson J. 1980. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 152:1709-1719.

- Gutjahr. 2004. Krebs bei Kindern und Jugendlichen.
- Haarman EG, Kaspers GJ, Veerman AJ. 2003. Glucocorticoid resistance in childhood leukaemia: mechanisms and modulation. *Br J Haematol* 120:919-929.
- Harms DO, Gobel U, Spaar HJ, Graubner UB, Jorch N, Gutjahr P, Janka-Schaub GE. 2003. Thioguanine offers no advantage over mercaptopurine in maintenance treatment of childhood ALL: results of the randomized trial COALL-92. *Blood* 102:2736-2740.
- Harms DO, Janka-Schaub GE. 2000. Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. *Leukemia* 14:2234-2239.
- Hirano T. 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16:249-284.
- Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. 2005. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 41:2502-2512.
- Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. 2001. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells* 19:99-107.
- Janz S. 2005. Uncovering MYC's full oncogenic potential in the hematopoietic system. *Oncogene* 24:3541-3543.
- Karawajew L, Ruppert V, Wuchter C, Kosser A, Schrappe M, Dorken B, Ludwig WD. 2000. Inhibition of in vitro spontaneous apoptosis by IL-7 correlates with bcl-2 up-regulation, cortical/mature immunophenotype, and better early cytoreduction of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96:297-306.
- Kebelmann-Betzing C, Korner G, Badiali L, Buchwald D, Moricke A, Korte A, Kochling J, Wu S, Kappelmeier D, Oettel K, Henze G, Seeger K. 2001. Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor all. *Cytokine* 13:39-50.
- Kersey JH. 1997. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood* 90:4243-4251.
- Khatri VP, Caligiuri MA. 1998. A review of the association between interleukin-10 and human B-cell malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 46:239-244.
- Koehl U, Sorensen J, Esser R, Zimmermann S, Gruttner HP, Tonn T, Seidl C, Seifried E, Klingebiel T, Schwabe D. 2004. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 33:261-266.
- Krug MS, Berger SL. 1987. First-strand cDNA synthesis primed with oligo(dT). *Methods Enzymol* 152:316-325.
- Kurzrock R. 1997. Cytokine deregulation in hematological malignancies: clinical and biological implications. *Clin Cancer Res* 3:2581-2584.
- Kurzrock R. 2001. Cytokine deregulation in cancer. *Biomed Pharmacother* 55:543-547.
- Kurzrock R, Kantarjian H, Wetzler M, Estrov Z, Estey E, Troutman-Worden K, Gutterman JU, Talpaz M. 1993. Ubiquitous expression of cytokines in diverse leukemias of lymphoid and myeloid lineage. *Exp Hematol* 21:80-85.

- Lai R, O'Brien S, Maushouri T, Rogers A, Kantarjian H, Keating M, Albitar M. 2002. Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 95:1071-1075.
- Lan Q, Zheng T, Rothman N, Zhang Y, Wang SS, Shen M, Berndt SI, Zahm SH, Holford TR, Leaderer B, Yeager M, Welch R, Boyle P, Zhang B, Zou K, Zhu Y, Chanock S. 2006. Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Blood*.
- Landowski TH, Moscinski L, Burke R, Buyuksal I, Painter JS, Goldstein S, Dalton WS. 2001. CD95 antigen mutations in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* 42:835-846.
- Lauten M, Matthias T, Stanulla M, Begler C, Welte K, Schrappe M. 2002. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia* 16:1437-1442.
- LeBien TW. 2000. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96:9-23.
- Lemmers B, Arnoulet C, Fossat C, Chambost H, Sainty D, Gabert J, Schiff C. 2000. Fine characterization of childhood and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) by a proB and preB surrogate light chain-specific mAb and a proposal for a new B cell ALL classification. *Leukemia* 14:2103-2111.
- Levy Y, Brouet JC. 1994. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest* 93:424-428.
- Li-Weber M, Krammer PH. 2003. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nat Rev Immunol* 3:534-543.
- Lin HK, Bergmann S, Pandolfi PP. 2005. Deregulated TGF-beta signaling in leukemogenesis. *Oncogene* 24:5693-5700.
- Lotem J, Sachs L. 2002a. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. *Oncogene* 21:3284-3294.
- Lotem J, Sachs L. 2002b. Epigenetics wins over genetics: induction of differentiation in tumor cells. *Semin Cancer Biol* 12:339-346.
- Male D. 2005. *Immunologie auf einen Blick* Urban und Fischer.
- Malek TR, Bayer AL. 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* 4:665-674.
- Manabe A, Coustan-Smith E, Kumagai M, Behm FG, Raimondi SC, Pui CH, Campana D. 1994. Interleukin-4 induces programmed cell death (apoptosis) in cases of high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 83:1731-1737.
- Metcalf D. 2003. The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells* 21:5-14.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
- Moqattash S, Lutton JD. 2004. Leukemia cells and the cytokine network: therapeutic prospects. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:121-137.
- Mori N, Shirakawa F, Murakami S, Oda S, Eto S. 1994. Interleukin-1 alpha as an autocrine growth factor for acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Haematol* 86:386-388.
- Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. 2002. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 4 Suppl 3:S233-242.

- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17:701-738.
- Nelson BH. 2004. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol* 172:3983-3988.
- Nishigaki H, Ito C, Manabe A, Kumagai M, Coustan-Smith E, Yanishevski Y, Behm FG, Raimondi SC, Pui CH, Campana D. 1997. Prevalence and growth characteristics of malignant stem cells in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89:3735-3744.
- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. 2002. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl:S121-131.
- O'Shea JJ, Kanno Y, Chen X, Levy DE. 2005. Cell signaling. Stat acetylation--a key facet of cytokine signaling? *Science* 307:217-218.
- Okabe M, Kuni-eda Y, Sugiwura T, Tanaka M, Miyagishima T, Saiki I, Minagawa T, Kurosawa M, Itaya T, Miyazaki T. 1991. Inhibitory effect of interleukin-4 on the in vitro growth of Ph1-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 78:1574-1580.
- Okada S, Fukuda T, Inada K, Tokuhisa T. 1999. Prolonged expression of c-fos suppresses cell cycle entry of dormant hematopoietic stem cells. *Blood* 93:816-825.
- Oppenheim JJ. 2001. Cytokines: past, present, and future. *Int J Hematol* 74:3-8.
- Ouaaz F, Mentz F, Mossalayi MD, Schmitt C, Michel A, Debre P, Guillosson JJ, Merle-Beral H, Arock M. 1993. Interleukin 4 inhibits the proliferation and promotes the maturation of human leukemic early B cells. *Eur J Haematol* 51:276-281.
- Pandrau D, Saeland S, Duvert V, Durand I, Manel AM, Zobot MT, Philippe N, Banchereau J. 1992. Interleukin 4 inhibits in vitro proliferation of leukemic and normal human B cell precursors. *J Clin Invest* 90:1697-1706.
- Pelengaris S, Khan M, Evan G. 2002. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2:764-776.
- Preti HA, Cabanillas F, Talpaz M, Tucker SL, Seymour JF, Kurzrock R. 1997. Prognostic value of serum interleukin-6 in diffuse large-cell lymphoma. *Ann Intern Med* 127:186-194.
- Pui CH, Campana D, Evans WE. 2001. Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. *Lancet Oncol* 2:597-607.
- Pui CH, Evans WE. 1998. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 339:605-615.
- Pui CH, Relling MV. 2000. Topoisomerase II inhibitor-related acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 109:13-23.
- Pui CH, Relling MV, Downing JR. 2004. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350:1535-1548.
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117:1281-1283.
- Reed JC, Pellecchia M. 2005. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 106:408-418.
- Ricote M, Garcia-Tunon I, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. 2004. Interleukin-1 (IL-1alpha and IL-1beta) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma. *Cancer* 100:1388-1396.
- Rothman N, Skibola CF, Wang SS, Morgan G, Lan Q, Smith MT, Spinelli JJ, Willett E, De Sanjose S, Cocco P, Berndt SI, Brennan P, Brooks-Wilson A,

- Wacholder S, Becker N, Hartge P, Zheng T, Roman E, Holly EA, Boffetta P, Armstrong B, Cozen W, Linet M, Bosch FX, Ennas MG, Holford TR, Gallagher RP, Rollinson S, Bracci PM, Cerhan JR, Whitby D, Moore PS, Leaderer B, Lai A, Spink C, Davis S, Bosch R, Scarpa A, Zhang Y, Severson RK, Yeager M, Chanock S, Nieters A. 2006. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol* 7:27-38.
- Sauerbrey A, Stammler G, Zintl F, Volm M. 1996. Expression and prognostic value of the retinoblastoma tumour suppressor gene (RB-1) in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 94:99-104.
- Schrapppe M. 2000. ALL-BFM 2000 Studie.
- Schrapppe M. 2004a. Akute lymphatische und akute myeloische Leukämie im Kindesalter. In: <http://www.kinderkrebsinfo.de>.
- Schrapppe M. 2004b. Evolution of BFM trials for childhood ALL. *Ann Hematol* 83 Suppl 1:S121-123.
- Schrapppe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, Niemeyer C, Henze G, Feldges A, Zintl F, Kornhuber B, Ritter J, Welte K, Gadner H, Riehm H. 2000. 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* 95:3310-3322.
- Schulz U, Munker R, Ertl B, Holler E, Kolb HJ. 2001. Different types of human leukemias express the message for TNF-alpha and interleukin-10. *Eur J Med Res* 6:359-363.
- Seth A, Watson DK. 2005. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 41:2462-2478.
- Seymour JF, Talpaz M, Hagemester FB, Cabanillas F, Kurzrock R. 1997. Clinical correlates of elevated serum levels of interleukin 6 in patients with untreated Hodgkin's disease. *Am J Med* 102:21-28.
- Stachel D, Albert M, Meilbeck R, Kreutzer B, Haas RJ, Schmid I. 2006. Bone marrow Th2 cytokine expression as predictor for relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Eur J Med Res* 11:102-113.
- Stachel D, Futterer A, Haas RJ, Schmid I. 2004. Enhanced lymphocyte proliferation responses in pediatric patients early after myelosuppressive chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 43:644-650.
- Stripecke R, Levine AM, Pullarkat V, Cardoso AA. 2002. Immunotherapy with acute leukemia cells modified into antigen-presenting cells: ex vivo culture and gene transfer methods. *Leukemia* 16:1974-1983.
- van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, Stolz F, Schrapppe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. 1998. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 352:1731-1738.
- Vassalli P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10:411-452.
- Vassilakopoulos TP, Nadali G, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Dimopoulou MN, Kontopidou FN, Karkantaris C, Kokoris SI, Kyrtsonis MC, Tsaftaridis P, Pizzolo

-
- G, Pangalis GA. 2002. The prognostic significance of beta(2)-microglobulin in patients with Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 87:701-708; discussion 708.
- Velders MP, ter Horst SA, Kast WM. 2001. Prospect for immunotherapy of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 15:701-706.
- Volm M, Sauerbrey A, Zintl F, Koomagi R, Efferth T. 2002. Protein expression profile of newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in children developing relapses. *Oncol Rep* 9:965-969.
- Volm M, Zintl F, Edler L, Sauerbrey A. 1997. Prognostic value of protein kinase C, proto-oncogene products and resistance-related proteins in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 28:117-126.
- Wilson MB, Schreiner SJ, Choi HJ, Kamens J, Smithgall TE. 2002. Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis. *Oncogene* 21:8075-8088.
- Wu S, Gessner R, Taube T, von Stackelberg A, Henze G, Seeger K. 2005a. Expression of interleukin-10 splicing variants is a positive prognostic feature in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23:3038-3042.
- Wu S, Gessner R, von Stackelberg A, Kirchner R, Henze G, Seeger K. 2005b. Cytokine/cytokine receptor gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: correlation of expression and clinical outcome at first disease recurrence. *Cancer* 103:1054-1063.
- Wu S, Korte A, Kebelmann-Betzing C, Gessner R, Henze G, Seeger K. 2005c. Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of prednisolone on cytokine expression. *Leuk Res* 29:63-72.
- Yamamura M, Yamada Y, Momita S, Kamihira S, Tomonaga M. 1998. Circulating interleukin-6 levels are elevated in adult T-cell leukaemia/lymphoma patients and correlate with adverse clinical features and survival. *Br J Haematol* 100:129-134.