

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Hiddemann

**Vergleich der Proliferationsaktivität und des Zytokinprofiles
von Blasten bei Akuter Myeloischer Leukämie bei
Primärdiagnose und im Rezidiv**

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

vorgelegt von
Michael Andreas Fiegl

aus
Radeberg

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Hiddemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. B. Emmerich

PD Dr. med. U. Wintergerst

Prof. Dr. med. R. Mocikat

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. J. Braess

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

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 12. 2002

1. EINLEITUNG 1 – 15

1.1. Epidemiologie, klinisches Erscheinungsbild und Diagnose der Akuten Myeloischen Leukämie (AML)	<u>1</u>
1.2. Molekulare Pathogenese	<u>2</u>
1.3. Therapiestrategien bei Erstdiagnose	<u>3</u>
1.4. Prognosefaktoren bei Erstdiagnose	<u>6</u>
1.5. Therapiestrategien und Prognose im Rezidiv	<u>8</u>
1.6. Das Rezidiv als Phänomen klonaler Selektion	<u>9</u>
1.7. Proliferation	<u>11</u>
1.7.1. Proliferation und die Wachstumsfaktoren IL3, G-CSF und GM-CSF	<u>11</u>
1.7.2. Korrelation von Proliferation und Prognose	<u>12</u>
1.7.3. Korrelation von Proliferation und AraC-Inkorporation	<u>13</u>
1.8. Fragestellung	<u>14</u>

2. MATERIAL UND METHODEN 16 – 22

2.1. Zytogenetik	<u>16</u>
2.2. ³ H-Thymidin-Inkorporation und ³ H-AraC-Inkorporation	<u>16</u>
2.2.1. Materialien	<u>16</u>
2.2.2. Probengewinnung und Aufarbeitung	<u>17</u>
2.2.3. Durchführung	<u>17</u>
2.3. Stimulationsversuche mit G-CSF und GM-CSF	<u>18</u>
2.3.1. Materialien	<u>18</u>
2.3.2. Probengewinnung und Aufarbeitung	<u>18</u>
2.3.3. Durchführung	<u>18</u>
2.4. Zellseparation	<u>18</u>
2.4.1. T-Zell-Depletion	<u>18</u>
2.4.1.1. Materialien	<u>18</u>
2.4.1.2. Durchführung	<u>19</u>
2.4.2. CD34-Selektion	<u>19</u>
2.4.2.1. Materialien	<u>19</u>
2.4.2.2. Durchführung	<u>19</u>
2.4.2.2.1. Anreicherung mononukleärer Zellen	<u>19</u>
2.4.2.2.2. CD34-Selektion	<u>20</u>
2.5. Zytokinmessung	<u>20</u>
2.5.1. Material	<u>20</u>
2.5.2. Durchführung	<u>20</u>

2.5.3.	IL3-ELISA	21
2.5.3.1.	Eichung und Nachweisgrenze	21
2.5.3.2.	Durchführung	21
2.5.4.	G-CSF-ELISA	21
2.5.4.1.	Eichung und Nachweisgrenze	21
2.5.4.2.	Durchführung	21
2.5.5.	GM-CSF-ELISA	22
2.5.5.1.	Eichung und Nachweisgrenze	22
2.5.5.2.	Durchführung	22
2.6.	Statistik	22
3.	PATIENTEN	23
4.	ERGEBNISSE	24 – 33
4.1.	Patienten	24
4.2.	Vergleich der Karyotypenverteilung	24
4.3.	Zellselektion	26
4.3.1.	T-Zell-Depletion	26
4.3.2.	CD34-Selektion	27
4.4.	Zellüberleben nach Inkubation	27
4.5.	Vergleich der endogenen Proliferationsaktivität von Blasten bei Primärdiagnose, im Rezidiv und von CD34+ Stammzellen	27
4.6.	Vergleich der stimulatorischen Effekte der Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF auf die Proliferationsaktivität von Blasten bei Primärdiagnose und im Rezidiv	28
4.7.	Vergleich der Zytokinproduktion beider Gruppen	30
4.8.	Vergleich der AraC-Inkorporation und Modulation in beiden Gruppen	31
5.	DISKUSSION	34 – 44
6.	ZUSAMMENFASSUNG	45 – 46
7.	ANHANG	47 – 51
8.	LITERATURVERZEICHNIS	52 – 72

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
AraC	Cytarabin
AraCTP	Cytarabintriphosphat
ATRA	All-Trans-Retinol-Säure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CR	Complete Response (Komplettes Ansprechen)
dCK	Deoxycytidinkinase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPA	Endogene Proliferationsaktivität
FAB	French-American-British Klassifikation
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FISH	Floureszenz-In-Situ-Hybridisierung
G-CSF	Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor
GM-CSF	Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating-Factor
³ H-Thymidin	Tritiummarkiertes Thymidin
³ H-AraC	Tritiummarkiertes Cytarabin
IL3	Interleukin 3
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
KMT	Knochenmarkstransplantation
LAIP	Leucemic Aberrant Immuno Phenotype
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MAP	Mitogen Activated Kinase
MDR	Multidrug Resistance
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDS-RAEB-t	Myelodysplastisches Syndrom mit refraktärer Anämie und exzessiven Blasten in Transformation
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRD	Minimal Residual Disease
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
MRP	Multidrug-resistance associated Protein
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
WHO	World Health Organisation

1. EINLEITUNG**1.1. Epidemiologie, klinisches Erscheinungsbild und Diagnose der Akuten Myeloischen Leukämie (AML)**

Die akute myeloische Leukämie ist eine Erkrankung der Myelopoese, die durch einen Anstieg der myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark sowie eine Blockade in ihrer Ausreifung charakterisiert ist. Dies führt letztendlich zu einer Insuffizienz der Hämatopoese mit Thrombozytopenie, Granulozytopenie und / oder Anämie. Die Inzidenz dieser Erkrankung beträgt etwa 2,4 – 4 Erkrankte auf 100.000 (Bishop, 1997, Löwenberg *et al.*, 1999) und ist damit beispielsweise im Vergleich zum Lungenkarzinom (29 auf 100.000) oder dem Prostatakarzinom (42 auf 100.000) eher niedrig, erreicht jedoch bei Erwachsenen über 65 Jahre eine Häufigkeit von 12,6 auf 100.000 (Löwenberg *et al.*, 1999). In diesem Alter, also zwischen 65 – 70 Jahren, liegt auch das mediane Erkrankungsalter der Patienten (Hiddemann *et al.*, 1999).

Das klinische Erscheinungsbild und die Symptome dieser Krankheit sind unspezifisch und vielfältig. Sie lassen sich jedoch hauptsächlich auf die Infiltration und die damit verbundene Insuffizienz des Knochenmarkes zurückführen. Typischerweise präsentieren sich die Patienten mit Müdigkeit, Blutungsneigung oder Fieber und Infektionen, bedingt durch Anämie, Thrombozytopenie und / oder Granulozytopenie. Ebenfalls lassen sich durch die Anämie Dyspnoe und Blässe erklären. Andere Symptome ergeben sich durch die leukämische Infiltration spezifischer Organe, so zum Beispiel die Hepato- und Splenomegalie, Lymphadenopathie oder Gingivahyperplasie. Als Besonderheit lässt sich hier auch die Infiltration der Haut, die sogenannte Leukämia cutis, einordnen. Eine Hyperleukozytose mit mehr als 100.000 Leukozyten pro μl kann zur Leukostase mit okulärer oder cerebrovaskulärer Symptomatik führen.

Die Diagnose einer AML wird zytomorphologisch durch eine Knochenmarksaspiration, vorzugsweise aus dem Beckenkamm, gestellt. Für die Diagnose einer AML ist dabei ein Anteil von mehr als 30 % blastärer Zellen im Knochenmark zu fordern (Löwenberg *et al.*, 1999). Wichtig ist hierbei die Abgrenzung von akuten Leukämien vom lymphatischen Typ einerseits sowie von myelodysplastischen Syndromen andererseits, besonders von Formen mit Blastenexzess, eventuell bereits solchen in Transformation (MDS-RAEB-t nach der FAB-Klassifikation). Diese Abgrenzung ist jedoch nicht immer einfach zu bewerkstelligen, was in der neuen WHO-Klassifikation des MDS berücksichtigt wird. Die Diagnose wird dann anhand der Morphologie und zytochemischer Befunde (Peroxidase- und Esterase-Reaktionen) spezifiziert. Mittels dieser Befunde erfolgt die Einteilung in die sogenannte French-American-British-Klassifikation (FAB) der AML. Diese unterscheidet 8 Typen. Es handelt sich dabei im einzelnen um folgende Subtypen: AML M0 (Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung), AML

M1 (Myeloblastenleukämie mit geringer Ausreifung), AML M2 (Myeloblastenleukämie mit Ausreifung), AML M3 (Promyelozytenleukämie), AML M4 (Myelomonozytäre Leukämie), AML M5 (Monozytenleukämie), AML M6 (Erythroleukämie) sowie die AML M7 (Megakaryoblastenleukämie). Zusätzlich lassen sich einzelne dieser Subtypen in weitere Untergruppen unterteilen. So existiert von der AML M3 eine hypogranuläre Variante, die als M3v bezeichnet wird, von der AML M4 eine Variante, die durch das Vorliegen von >3 % abnormen Eosinophilen gekennzeichnet ist und als M4eo bezeichnet wird. Weiterhin lässt sich die AML M5 unterscheiden in zwei Subtypen, die AML M5a (Monoblastenleukämie) und die AML M5b (ausreifende Monozytenleukämie). Die Einteilung der AML anhand dieser Klassifikation hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften ermöglicht einerseits das Abschätzen gewisser spezifischer Risiken, die mit bestimmten Subgruppen verbunden sind. Von besonderer Bedeutung in diesem Zusammenhang ist sicherlich die Promyelozytenleukämie, da mit diesem Typ häufig eine Koagulopathie assoziiert ist, welche trotz einer adäquaten Therapie für eine Frühmortalität von 10 – 15 % verantwortlich ist. Andererseits erlaubt diese Klassifikation in gewissen Grenzen eine mögliche Aussage über die Prognose der Patienten. Dies ist jedoch nur bei manchen Subtypen (siehe unter 1.4) möglich.

Die Diagnose ist jedoch nicht in jedem Fall ausschließlich durch die oben genannten Methoden sicher zu stellen, weshalb sich in letzter Zeit zwei weitere Verfahren zur Diagnostik in Ergänzung zur Morphologie bewährt haben. Es handelt sich dabei zum einen um die Immunphänotypisierung, die anhand der Expression von Oberflächenmarkern die Zuordnung der Blasten zur myeloischen oder lymphatischen Zellreihe ermöglicht. Es sind dies beispielsweise die Oberflächenantigene CD13, CD33 oder CDw65, deren Expression typisch für myeloische Blasten ist. Das zweite, heutzutage unentbehrlich gewordene diagnostische Mittel ist die Karyotypisierung der AML-Blasten. Chromosomale Veränderungen lassen sich bei circa 60 % aller AML-Fälle nachweisen (Keating *et al.*, 1988, Mrozek *et al.*, 1997, Bloomfield *et al.*, 1998) und haben sowohl bedeutsame Hinweise auf die Pathogenese als auch zutreffende prognostische Aussagen ermöglicht. Mit Hilfe der Kombination dieser drei Verfahren (Zytomorphologie, Immunphänotypisierung und Zytogenetik) lässt sich die Diagnose einer AML heutzutage zuverlässig stellen.

1.2. Molekulare Pathogenese

Die Bedeutung spezifischer zytogenetischer Veränderungen liegt nicht nur in ihrer prognostischen Bedeutung, sondern auch in ihrer Indikatorfunktion zur Analyse der molekularen Pathogenese. Seit der Entdeckung der pathogenetischen Bedeutung des PML / RAR α Fusionstranskriptes der Translokation (15;17) und der Behandlungsmöglichkeit dieser Entität mittels All-*Trans*-Retinol-Säure (Grimwade und Solomon, 1997, He *et al.*, 1998,

Grignani *et al.*, 1998, Lin *et al.*, 1998), wurden die Bemühungen verstärkt, die Rolle weiterer solcher Fusionsproteine in der Pathogenese der AML zu entschlüsseln. Die Translokation (15;17) findet sich bei dem FAB Subtyp M3, der Promyelozytenleukämie. Das PML / RAR α Fusionsprotein verhindert die myeloische Ausdifferenzierung zu Granulozyten und somit ihre natürliche Entwicklung, die letzten Endes in der Apoptose münden sollte, durch einen dominant negativen Effekt auf das *wildtype* RAR α Protein. Als Folge kommt es zur Akkumulation unzureichend ausgereifter promyelozytärer Vorläuferzellen. All-*Trans*-Retinolsäure, die mit diesem Fusionsprotein interagiert und die Blockade beheben kann, stellt die natürliche Ausreifung der Granulozyten wieder her (Warrell *et al.*, 1993).

Mittlerweile konnten weitere Fusionstranskripte und –proteine nachgewiesen werden, welche entweder DNA-bindende Transkriptionsfaktoren selbst betrafen, oder aber Proteine, die für die intrazelluläre Steuerung der Transkription verantwortlich sind (Look, 1997). Es sind dies das AML1 / ETO (oder CBF β) Fusionsprotein bei der t(8;21), das CBF β / MYH11 Fusionsprotein bei der inv(16) sowie Veränderungen der Bande q23 des Chromosoms 11. AML1 / ETO lässt sich bei ca. 40 % aller AML M2 nachweisen. CBF β / MYH11 lässt sich bei der AML M4eo nachweisen und scheint dafür spezifisch zu sein (Löwenberg *et al.*, 1999). Die detaillierten Funktionen, die diese Fusionsproteine für einen Ausreifungsblock und damit einen blastären Phänotyp bei diesen AML-Subentitäten ausüben, sind derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

1.3. Therapiestrategien bei Erstdiagnose

Die Behandlung einer AML erfolgt in der Regel ohne Verzug, da die Prognose ohne Therapie infaust ist. Jedoch kann die Behandlung dieser Erkrankung in keiner Weise als standardisiert gelten und sollte nach Möglichkeit in hämatologischen Zentren oder im Rahmen von Studien erfolgen. Dennoch gibt es gewisse Gemeinsamkeiten, die allen Therapieprotokollen zugrunde liegen: Die Ziele, die von allen Therapiestrategien verfolgt werden, sind einerseits das Erreichen einer Remission, die zytomorphologisch definiert ist als weniger als 5 % Blasten im Knochenmark sowie die Erholung des peripheren Blutbildes beinhaltet, und andererseits das Verhindern eines Rezidives. Der erste Schritt, die Remissionseinleitung, erfolgt mittels der sogenannten Induktionstherapie, die je nach verwendetem Protokoll mit unterschiedlichen Medikamenten und Dosierungen durchgeführt wird. Der zweite Schritt, die Remissionserhaltung, wird durch die Konsolidierungstherapie, für die ebenfalls unterschiedliche Modalitäten bestehen, erreicht. Als drittes Element in der AML-Behandlung erfolgt während der Therapie der Einsatz supportiver Maßnahmen. Diese umfassen die Prophylaxe von Infektionen sowie deren frühzeitige Therapie und die Therapie von Thrombozytopenien und Anämien.

Induktionstherapie: Seit seiner Einführung im Jahr 1968 (Ellison *et al.*, 1968) hat sich Cytarabin in der Behandlung der AML als unverzichtbares Medikament erwiesen. Es folgten die klinische Anwendung weiterer Chemotherapeutika, wobei der zusätzliche Einsatz von Daunorubicin sich als beste Ergänzung erwies (Omura *et al.*, 1982, Preisler *et al.*, 1987). Dieses sogenannte 3+7 Protokoll mit einer 3-tägigen Gabe eines Anthrazyklins, meistens Daunorubicin in einer Dosis von 40 – 60 mg/m², und einer 7-tägigen Gabe von Cytarabin in einer Dosis von 100 – 200 mg/m² gilt heutzutage als Standardtherapie. Dieses Protokoll ist in der Lage, in großen randomisierten Multizenterstudien komplette Remissionen (CR) in etwa 64 % der Patienten herbeizuführen (Omura *et al.*, 1982, Preisler *et al.*, 1987, Bishop *et al.*, 1990, Mayer *et al.*, 1994, Kern *et al.*, 1998). Die mediane Dauer der Remission beträgt unter dieser Therapie etwa 8 bis 12 Monate, das mediane Überleben etwa 9 bis 16 Monate (Bishop, 1997). Mittlerweile sind intensive Bemühungen unternommen worden, diese Langzeitergebnisse zu verbessern. Diese umfassten einerseits den Einsatz neuerer Medikamente, beispielsweise Amsacrin, Mitoxantron, Idarubicin und Etoposid (Smith *et al.*, 1976, Legha *et al.*, 1980, Estey *et al.*, 1983, Carella *et al.*, 1985) und andererseits eine Dosisintensivierung des Cytarabin (Hiddemann *et al.*, 1993, Bishop *et al.*, 1996). Insgesamt lassen sich mit diesen Strategien Remissionsraten von 60 – 80 % und eine 5-Jahres-Überlebensrate von 30 – 35 % erreichen (Mayer *et al.*, 1994, Appelbaum und Kopecky, 1997, Hann *et al.*, 1997, Stevens *et al.*, 1998).

Postinduktionstherapie: Die Behandlung einer AML ohne eine Postremissionstherapie zur Rezidivverhinderung gilt als inadäquat. Für jüngere Patienten stehen heutzutage drei Konsolidierungsverfahren zur Verfügung: die allogene Knochenmarkstransplantation von einem HLA-passenden verwandten oder unverwandtem Spender, die autologe Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation oder die Chemotherapie als Konsolidierungstherapie im ursprünglichen Sinne.

Die allogene Knochenmarkstransplantation hat seit ihrer Einführung vor 25 Jahren eine Heilungsrate von 50 – 60 % erreicht (Thomas *et al.*, 1979, Appelbaum *et al.*, 1984, Cassileth *et al.*, 1998) und ist somit derzeit die Therapieform mit der stärksten antileukämischen Wirkung. Diese guten Langzeitergebnisse werden jedoch durch die Toxizität der myeloablativen Radiochemotherapie und durch die Mortalität bedingt durch Immunsuppression mit opportunistischen Infektionen (z.B. Epstein-Barr-Virus oder Cytomegalie-Virus) sowie durch die graft-versus-host-Erkrankung relativiert. Die Obergrenze für eine allogene Knochenmarkstransplantation beträgt deshalb zurzeit ca. 55 Jahre. In den letzten Jahren konnten einige Studien zeigen, dass trotz der geringeren Rezidivrate bei transplantierten Patienten das Gesamtüberleben im Vergleich zu den Nicht-transplantierten nicht länger war (Cassileth *et al.*, 1998, Keating *et al.*, 1998), wobei diese Aussage sich nur auf jüngere Patienten bezieht. Des Weiteren ist die Stellung der Transplantation in den

Niedrig-Risiko-Gruppen in der ersten Remission nicht endgültig geklärt, da auch bei diesen Patienten das Rezidivrisiko mit 30 – 40 % niedriger liegt als im Durchschnitt der AML-Patienten (Grimwade *et al.*, 1998).

In Fällen, bei denen kein geeigneter Knochenmarksspender zur Verfügung steht, existiert in der autologen Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation nach myeloablativer Chemotherapie eine weitere Strategie zur Rezidivverhinderung. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass in dieser Weise behandelte Patienten ein reduziertes Rezidivrisiko besaßen, jedoch auf Kosten einer 3 – 15 % höheren Mortalität als in der Chemotherapiegruppe (Burnett *et al.*, 1998, Harousseau *et al.*, 1997, Zittoun *et al.*, 1995).

Die wichtigste und am häufigsten durchgeführte Postinduktionstherapie ist nach wie vor die Chemotherapie als Konsolidierungstherapie im eigentlichen Sinne. Hier hat sich die Gabe von Hoch-Dosis-Cytarabin (in Einzeldosen von 3 g/m² Körperoberfläche) als ein wesentliches Element der Therapie herausgestellt (Mayer *et al.*, 1994, Kern *et al.*, 1998), jedoch sind nach wie vor Fragen nach der Anzahl der zu verabreichenden Dosen pro Zyklus oder nach der Gesamtzahl der Zyklen offen und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Supportive Maßnahmen: Supportive Maßnahmen haben in der Behandlung der AML einen hohen Stellenwert und dienen im wesentlichen der Verhinderung von Komplikationen, die durch den Mangel einer oder aller drei Zellreihen hervorgerufen werden. Eine erhöhte Infektneigung durch eine Leukopenie wird einerseits prophylaktisch durch die Isolation des Patienten zum Schutz vor äußeren Keimen sowie durch prophylaktische Antibiose im Sinn einer Dekontamination angegangen. Bei Fieber erfolgt der frühzeitige Einsatz einer breiten Antibiose, evtl. kombiniert mit Antimykotika und Virusstatika. Bei Blutungsneigung oder Anämie erfolgt die Transfusion von Thrombozyten- oder Erythrozytenkonzentraten. Der klinische Einsatz von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, vorwiegend rekombinantem GM-CSF und G-CSF, in der Behandlung der AML erfolgt aus zwei Gründen: Zum einen können diese Faktoren die durch die zytostatische Therapie induzierte Leukopenie verkürzen und zum anderen besteht die theoretische Möglichkeit, stoffwechsellinaktive und somit für die Therapie schwer zu erreichende leukämische Blasten in den Zellzyklus zu rekrutieren und damit durch eine erhöhte Chemosensitivität das Therapieergebnis zu optimieren.

Aus den bisher durchgeführten Studien ließ sich in Bezug auf die Verkürzung der Neutropenie in der Tat eine schnellere Erholung der neutrophilen Granulozyten durch die Gabe von G-CSF und GM-CSF zeigen. Diese verkürzte Neutropenie ging klinisch sowohl mit einer geringeren Inzidenz als auch mit einer geringeren Schwere von Infektionen einher. Die Wahrscheinlichkeit, eine CR zu erreichen, schien tendenziell in den Gruppen besser, die Wachstumsfaktoren erhielten. Dennoch konnte keine dieser Studien einen positiven Effekt der Wachstumsfaktoren bezüglich des Langzeitüberlebens dieser Patienten zeigen (Büchner *et al.*, 1990, Ohno *et al.*, 1990, Stone *et al.*, 1995, Zittoun *et al.*, 1996).

Aufgrund von *in vitro* Daten, die zeigten, dass die Zytotoxizität von Cytarabin gegenüber klonogenen AML-Blasten durch Koinkubation mit IL-3 oder GM-CSF gesteigert werden konnte (Lista *et al.*, 1988, Hiddemann *et al.*, 1992), und dieser Effekt nicht nur durch eine erhöhte Anzahl von in S-Phase befindlichen Blasten sondern auch durch eine gesteigerte Aufnahme und Bildung von AraCTP in einzelnen Blasten erreicht wurde (Bhalla *et al.*, 1991, Hiddemann *et al.*, 1992, Braess *et al.*, 2000), bestand die Hoffnung, sich diesen Effekt auch *in vivo* nutzbar zu machen. Obwohl es bei Patienten, die zusätzlich G-CSF erhielten, eine Tendenz zu einer höheren CR-Rate gab, hat sich dieser Effekt nicht in ein signifikant längeres Überleben umgesetzt. Letzen Endes besteht auch Unklarheit darüber, ob als einzige Ursache für dieses Ergebnis wirklich die durch G-CSF erhöhte Toxizität von Cytarabin in Frage kommt (Ohno, 1998). So muss die Frage, ob den *in-vitro* Daten auch tatsächliche klinische Bedeutung zukommt, als ungeklärt gelten und ist derzeit noch immer Gegenstand der Forschung.

Unter Berücksichtigung aller heutzutage verwendeten Induktions- und Konsolidierungsprotokolle ergibt sich für die neu diagnostizierte AML die Möglichkeit, in 60 – 80 % eine CR zu induzieren. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt über 40 % (Mayer *et al.*, 1994, Appelbaum und Kopecky, 1997, Hann *et al.*, 1997, Stevens *et al.*, 1998), das mediane Überleben aller Patienten mit de-novo-AML etwa 9 – 15 Monate (Preisler *et al.*, 1987, Bishop *et al.*, 1990, Wiernik *et al.*, 1992). Jedoch ist die AML keinesfalls als homogene Gruppe anzusehen. Sie lässt sich im Gegenteil in bestimmte Untergruppen aufteilen, die hinsichtlich ihrer Prognose stark variieren.

1.4. Prognosefaktoren bei Erstdiagnose

Das Vorliegen bestimmter prognostischer Faktoren bei der AML hat bezüglich der Therapieentscheidung einen großen Einfluss. Ein wesentlicher Faktor hinsichtlich der Prognose ist das biologische Alter des Patienten. Der negative Einfluss des Alters auf die Prognose nimmt kontinuierlich von der Kindheit bis zum hohen Alter von 80 Jahren oder darüber zu. So liegt das Ansprechen auf eine Induktionstherapie bei jungen Patienten, definiert als jünger als 60 Jahre, bei ca. 75 % mit einem 5-Jahres-Überleben von ca. 35 – 40 % (Wiernik *et al.*, 1992, Mayer *et al.*, 1994, Zittoun *et al.*, 1995, Burnett *et al.*, 1998, Cassileth *et al.*, 1998), bei Patienten über 60 Jahren hingegen nur noch bei 45 – 55 % Ansprechen auf Induktionstherapie mit einem 5-Jahres-Überleben von 10 % (Löwenberg *et al.*, 1998, Hiddemann *et al.*, 1999). Gründe für diese schlechteren Ergebnisse liegen einerseits sicherlich im häufig reduzierten Allgemeinzustand der Patienten, andererseits jedoch auch im vermehrten Auftreten ungünstiger Karyotypen und sekundärer Leukämien, beispielsweise aufgrund von vorangegangenen myelodysplastischen Syndromen.

Als ein weiterer, entscheidender prognostischer Faktor hat sich in letzter Zeit der Nachweis von bestimmten zytogenetischen Anomalien oder auch molekulargenetischer Aberrationen erwiesen (siehe Abb. 1). Etwa 60 % aller AML-Patienten zeigen numerische oder strukturelle zytogenetische Abnormalitäten, von denen viele unter den derzeitigen Bedingungen der zytostatischen Therapie eine prognostische Bedeutung für den Krankheitsverlauf besitzen (Keating *et al.*, 1988, Mrozek *et al.*, 1997, Bloomfield *et al.*, 1998). So sind die Translokation (8;21) und die Inversion 16 unter einer Therapie mit Cytarabin und einem Anthrazyklin sowie die Translokation (15;17) unter einer zusätzlichen Behandlung mit ATRA mit einer generell günstigen Prognose behaftet. Zusätzlich kommen sie auch häufiger bei jüngeren Patienten vor. Im Gegenzug lassen sich jedoch auch ungünstige zytogenetische Befunde finden, die mit einer schlechteren Prognose korreliert sind. Hierzu zählen Abnormalitäten von 11q23 (MLL-Gen), Aberrationen der Chromosomen 5 und 7 (Monosomien, Deletionen) und die Gruppe der komplex aberranten Karyotypen, welche definiert sind durch die Präsenz von drei oder mehr numerischen oder strukturellen zytogenetischen Abnormalitäten. Als intermediär werden Gruppen mit normalem Karyotyp sowie mit allen Veränderungen, die von der vorherigen Einteilung nicht erfasst werden, bezeichnet. Die Prognose dieser beiden Gruppen liegt zwischen den günstigen und den ungünstigen.

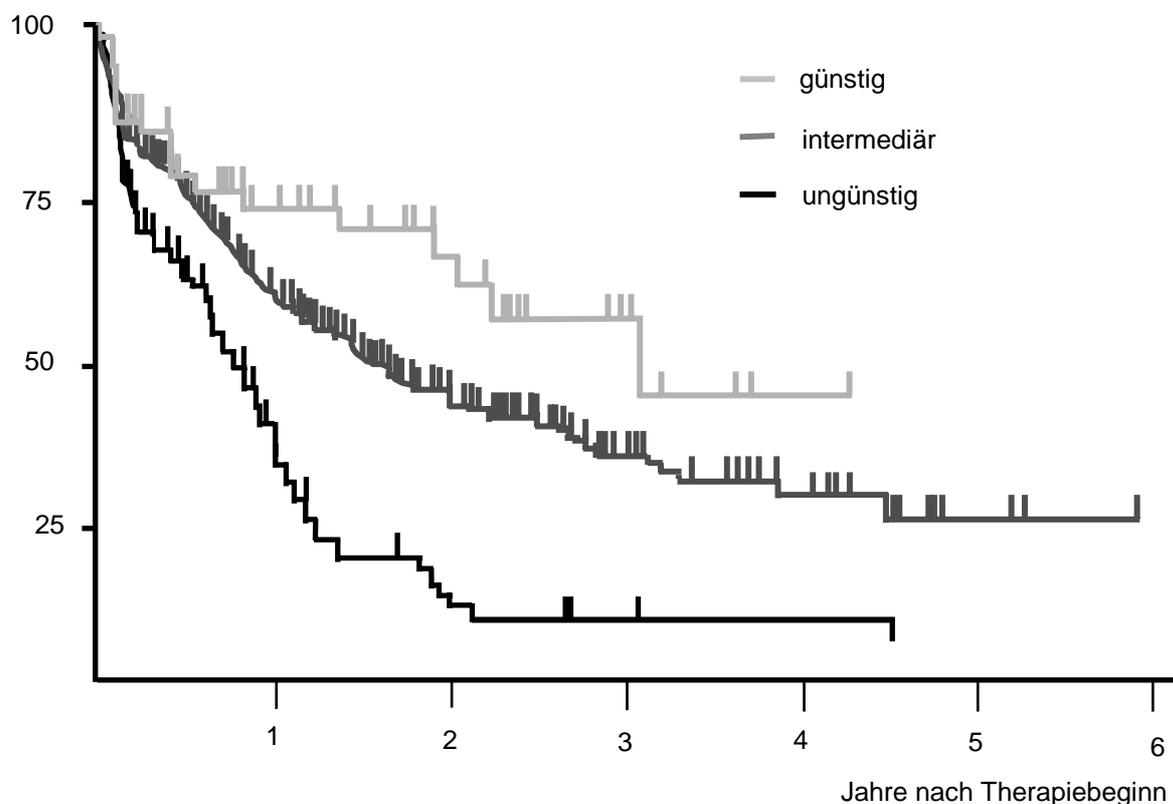


Abb. 1: Kaplan-Meier-Kurve des Überlebens bei AML, aufgeteilt nach Karyotypen (mit freundlicher Genehmigung von C. Schoch, Med. Klinik III., Klinikum Großhadern)

Eine weitere große Gruppe mit einer schlechten Prognose sind die Patienten mit sekundären Leukämien sowie im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (i. e. Rezidiv) selbst (Löwenberg *et al.*, 1999). Eine sekundäre AML ist definiert durch das Vorbestehen einer hämatologischen Erkrankung wie beispielsweise eines MDS oder kongenitaler Neutropenien, oder alternativ durch den Nachweis einer früheren Exposition mit mutagenen Substanzen oder einer Bestrahlung (i. A. im Anschluss an die Therapie eines Malignoms).

1.5. Therapiestrategien und Prognose im Rezidiv

Obwohl die Behandlung der AML in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte gemacht hat, bleibt der Hauptgrund für das Therapieversagen letztlich das Rezidiv, welches in ca. 50 % aller Fälle auftritt, die primär eine komplette Remission erreicht haben (Webb, 1999). Abzugrenzen ist das Rezidiv von der Gruppe der primär therapierefraktären Erkrankungen. Ein Rezidiv ist definiert als das Wiederauftreten leukämischer Blasten (>5 % Blasten im Knochenmark) nach primär erreichter CR, bei therapierefraktären Leukämien wird eine CR vor einem erneuten Blastenanstieg nicht erreicht. Eine erfolgreiche Reinduktion im Rezidiv ist bei 40 – 60 % dieser Patienten mit Chemotherapie oder Knochenmarkstransplantation immer noch möglich (Brown *et al.*, 1996). Chemotherapieprotokolle, die solche Ergebnisse erzielen, sind meist sehr intensiv und beinhalten ähnlich der Standardinduktion Cytarabin, in Standarddosierung oder Hochdosis, und ein Anthrazyklin, aber auch Asparaginase, Etoposid oder Purinanaloga wie Fludarabin (Capizzi *et al.*, 1984, Estey *et al.*, 1994, Kornblau *et al.*, 1996, Kern *et al.*, 1997). Dennoch beträgt die 2-Jahres-Überlebensrate bei diesen Patienten in den meisten großen Studien weniger als 20 % (Vignetti *et al.*, 1996, Steuber *et al.*, 1996, Thalhammer *et al.*, 1996, Stahnke *et al.*, 1998, Vey *et al.*, 1999, Webb *et al.*, 1999). Selbst für die Patienten, die eine CR erreichen, beträgt das mediane Überleben lediglich etwa 7 Monate (Thalhammer *et al.*, 1996, Stoiser *et al.*, 2000). Die Situation nach Knochenmarkstransplantation stellt sich nicht besser dar: Die 100-Tage-Sterblichkeit beträgt etwa 50 % nach einer zweiten Knochenmarkstransplantation, die Rezidivrate nach einer zweiten Transplantation ist sehr hoch, und das krankheitsfreie Überleben ist mit 10 – 40 % sehr niedrig (Webb, 1999). Dieses schlechte Ergebnis hat nach Faktoren suchen lassen, die eine individuellere Vorhersage erlauben und somit eine Entscheidungshilfe für die Therapieoptionen im Einzelfall geben.

Zusätzlich zu den bereits unter 1.4. genannten Prognosefaktoren bei neu diagnostizierter AML haben sich zur Vorhersage des Therapieerfolges im Rezidiv eine Reihe weiterer Parameter etabliert. Zum einen handelt es sich hierbei um die Geschwindigkeit der Zytoreduktion des Knochenmarks nach erfolgter Induktion. Die MRC AML 10 Studie ergab Gesamtüberlebensraten von 53 %, 44 % und 22 % für Patienten mit <5 %, 5 – 20 % sowie >20 % Blasten im Knochenmark nach dem ersten Zyklus Chemotherapie (Wheatley *et al.*,

1999). Als weiterer wichtiger Punkt hat sich die Dauer der ersten Remission erwiesen. Lag diese lediglich bei sechs Monaten bis zu einem Jahr, so betrug die Wahrscheinlichkeit, eine CR zu erreichen nur bei 10 – 30 %. Bei Remissionsdauer über einem Jahr betrug die CR-Rate 40 – 70 % (Thalhammer *et al.*, 1996, Stahnke *et al.*, 1998, Webb *et al.*, 1999, Estey *et al.*, 2000, Kern *et al.*, 2000). Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass 60 % aller Patienten ihr Rezidiv im ersten Jahr nach erreichter CR erleiden. Ein zusätzliches Hilfsmittel, das eine Aussage bezüglich des Therapieerfolges zulässt, ist das Erkennen einer Minimalen Resterkrankung (Minimal Residual Disease, MRD), definiert als das Vorhandensein leukämischer Blasten bei zytomorphologisch und klinisch erreichter CR (<5 % Blasten im Knochenmark und unauffälliges peripheres Blutbild). Es gibt zwei Wege, kleinste leukämischer Restpopulationen zu erfassen. Zum einen lassen sich mittels Polymerase-Kettenreaktion die unter 1.2. geschilderten Fusionstranskripte nachweisen. Zum anderen lassen sich leukämische Klone durch die aberrante Expression von Oberflächenmolekülen erkennen (Leukemic Aberrant Immunophenotype, LAIP). Beispielsweise fand sich bei Patienten, die $>5 \times 10^{-3}$ solcher residueller Blasten im Knochenmark nach Induktion aufwiesen, ein Rezidivrisiko von 67 % im Gegensatz zu einem Rezidivrisiko von 20 % bei Patienten, die unter diesem Wert lagen (San Miguel *et al.*, 1997). Die Wertigkeit dieser Untersuchungen wird in aktuellen Studien noch untersucht.

1.6. Das Rezidiv als Phänomen klonaler Selektion

Ausgehend von den klinischen Beobachtungen, die ein schlechteres Ansprechen der rezidierten Leukämie im Vergleich zum Zeitpunkt der initialen Diagnose zeigen, muss man zu dem Schluss kommen, dass es sich bei einem Rezidiv nicht einfach um das Wiederauftreten der selben leukämischen Population handelt, die bei der primären Diagnose vorhanden war. Vielmehr weist der Rezidivklon einen veränderten, therapieresistenteren Phänotyp auf. Zwei Wege sind denkbar, auf denen es zu einer Änderung des funktionellen Phänotyps gekommen sein kann. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass der initiale Zellklon durch zusätzliche Mutationen verändert wurde. Als Mutagene könnten hierbei die in der Induktion verwendeten Zytostatika mitverantwortlich sein (Nakano *et al.*, 1999, Naoe *et al.*, 2000). Zum anderen muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei der initialen Leukämie nicht um eine homogene Population vollkommen gleicher Zellen handelt. Vielmehr liegt bei jedem Patienten eine große intraleukämische Heterogenität vor (Kaufmann *et al.*, 1994, Knaust *et al.*, 2000, Naoe *et al.*, 2000). Bei soliden Tumoren gehen manche Autoren bei einem vorliegenden malignen Klon von bis zu hundert verschiedenen, in unterschiedlichem Maße therapieresistenten Klonen aus (Dexter und Leith, 1986). Während der Induktionstherapie wird nun ein starker Selektionsdruck durch die Therapie ausgeübt, welche therapiesensible Zellen abtötet, wohingegen der primären Angriff durch resistente

Zellen überlebt wird und diese sich im Anschluss weiter vermehren, was schließlich zum klinisch manifesten Rezidiv führen kann. Diese Zellen wären also einem Selektionsprozess unterworfen worden, der es ihnen ermöglicht, die Reinduktion, die in den meisten Fällen mit denselben Substanzen durchgeführt wird wie die Induktion, zu überleben.

Es sind verschiedene zelluläre Eigenschaften denkbar, die für die Resistenz leukämischer Blasten gegenüber Zytostatika verantwortlich sein können.

Veränderte Pharmakokinetik / intrazelluläre Metabolisierungswege: Als Beispiel sei hier Cytarabin als das häufigste in der Therapie der AML verwendete Medikament genannt, welches einer ausgeprägten Metabolisierung seitens der Zelle unterworfen ist. Diese beginnt beim ATP-abhängigen Transport in die Zelle sowie der dortigen Aktivierung in seinen aktiven Metaboliten Ara-CTP und die sich daran anschließende Desaktivierung. An diesen Schritten sind eine Vielzahl von Enzymen beteiligt, die somit Einfluss auf den intrazellulären Gehalt von Ara-CTP und damit seine zytotoxische Wirkung haben. Ein wichtiges Enzym innerhalb dieser Kaskade ist die Deoxycytidin-Kinase (dCK), das die Phosphorylierung von Cytarabin bewerkstelligt. Erniedrigte Mengen dieses Enzymes führen zu einer geringeren Bildung von Cytarabin und somit zu geringerer Wirkung (Kakihara *et al.*, 1998, van den Heuvel-Eibrink *et al.*, 2001).

Apoptoseinsuffizienz: Dieser Resistenzmechanismus ist auf zwei Wegen zu erreichen. A) Da zellulär vermittelte Apoptose zum Teil über das CD95 / FAS Ligand System verläuft, kann die Zelle beispielsweise durch Herunterregulierung ihrer Oberflächenexpression von CD95 dem Signal zur Apoptoseinduktion entgehen. B) Durch Veränderungen innerhalb des Apoptoseapparates kann es der Zelle unmöglich werden, selbst bei ausreichend starker zellulärer Schädigung Apoptose auszuführen. Für diesen Mechanismus gibt es zahlreiche Beispiele. So führt eine Überexpression des antiapoptotischen Proteins bcl2 zur Verhinderung von Apoptose (Karakas *et al.*, 1998). Im Falle des proapoptotischen Proteins p53 führen dagegen Mutationen oder posttranslationale Veränderungen zu einem Funktionsverlust des Proteins, welcher ebenfalls eine Insuffizienz der apoptotischen Maschinerie (Vogelstein *et al.*, 2000) induziert.

Zell-Zyklus-abhängige Faktoren: Ein Großteil der in der Therapie der AML eingesetzten Medikamente entfaltet seine höchste Effektivität in einer bestimmten Zellzyklusphase, der S-Phase. In dieser Phase werden die für die Zellteilung notwendigen Replikationsschritte der DNS vorgenommen. Cytarabin wird als Antimetabolit des Cytidin in die DNS eingebaut und führt dort zu Strangbrüchen. Diese sogenannte Primärläsion ist das wesentliche Signal zur Initiierung der Apoptose (Spriggs *et al.*, 1987). Cytarabin hemmt ebenfalls für die DNS-Replikation wichtige Enzyme, beispielsweise die Polymerase α (Chuang und Chuang, 1976). Cytarabin ist jedoch nicht das einzige in der Therapie der AML verwendete Zytostatikum, das überwiegend in der S-Phase aktiv ist. Der Topoisomerase β -Inhibitor VP16 (oder Etoposid)

gehört beispielsweise ebenfalls dazu (Markovits *et al.*, 1987, Chow und Ross, 1987). Leukämische Blasten, die eine hohe Proliferation besitzen, werden von diesen Zytostatika bevorzugt angegriffen, während Klone mit langsamerer Proliferation weniger von diesen Medikamenten inkorporieren. Sie wären somit in der Lage, die Induktionstherapie unbeschadet zu überstehen. Nicht zuletzt aus diesem Grund hat die Proliferationsaktivität als mögliche Ursache für eine differentielle Therapiesensitivität zahlreiche Untersuchungen auf sich gezogen.

1.7. Proliferation

1.7.1. Proliferation und die Wachstumsfaktoren IL3, G-CSF und GM-CSF

Die Proliferation physiologischer Progenitorzellen der hämatopoetischen Reihe wie auch die Proliferation leukämischer Zellen, unabhängig davon, ob es sich um leukämische „Stammzellen“ oder weiter ausgereifte leukämische Blasten ohne Selbsterneuerungskapazität handelt, ist ohne hämatopoetische Wachstumsfaktoren nicht möglich. Die rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren IL-3, GM-CSF und G-CSF zeigten im experimentellen Einsatz eine Aktivierung der DNS-Synthese in über 80 % der untersuchten AML-Proben (Miyachi *et al.*, 1987, Delwel *et al.*, 1988, Pebusque *et al.*, 1988), und zählen damit zu den potentesten Stimulatoren der Proliferation leukämischer Blasten. Ihre physiologischen Funktionen im Einzelnen sind folgende:

Interleukin 3: IL-3 wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen produziert und ist ein pleiotroper Faktor, der die Proliferation und Differenzierung pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen, aber auch solcher hämatopoetischer Blasten, die bereits auf myeloische oder lymphoide Entwicklung festgelegt sind, stimulieren.

GM-CSF: GM-CSF ist ein pleiotropes Zytokin, welches die Proliferation, Heranreifung und Funktion hämatopoetischer Zellen stimuliert. Es wird von einer Vielzahl von Zellen gebildet, inklusive T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Mastzellen und Endothelzellen. Die Zellen, auf die es seinen größten Effekt ausübt, sind neutrophile und eosinophile Granulozyten und Monozyten / Makrophagen, obwohl auch die Erythropoese und unreife Progenitoren der granulozytäre Zelllinie durch dieses Zytokin beeinflusst werden (Gasson, 1991). Im Unterschied zu IL-3 wirkt es nicht mehr auf pluripotente Stammzellen.

G-CSF: G-CSF, ein pleiotropes Zytokin, ist am besten durch seine Wirkung auf die neutrophile Reihe der Granulozyten charakterisiert. Seine Wirkung besteht in der Differenzierung und Aktivierung dieser Zellreihe, es wurden jedoch auch Effekte auf andere Zelllinien (z. B. Megakaryozyten) beschrieben (Gabilove, 1989). Primitive Stammzellen der Hämatopoese werden jedoch nicht mehr erfasst.

Bisherige Studien konnten zeigen, dass AML-Blasten regelmäßig Rezeptoren für diese Wachstumsfaktoren exprimieren, wenn auch in geringer Anzahl (ca. 50 – 250 Rezeptoren

pro Zelle) (Löwenberg und Touw, 1993). Im großen Unterschied zur physiologischen Hämatopoese besitzen diese Faktoren in der AML jedoch lediglich noch die Fähigkeit zur Stimulation (Salem *et al.*, 1989), das Signal zur Ausreifung der Zellen scheint hingegen verlorengegangen zu sein oder anderweitig blockiert zu werden. Ein weiterer wichtiger Punkt, der die Abhängigkeit leukämischer Zellen von Wachstumsfaktoren belegt, ist die Tatsache, dass hämatopoetische Zellen an die Anwesenheit geeigneter Wachstumsfaktoren gebunden sind. Werden diese entzogen, sterben Zellen via Apoptose (oder programmiertem Zelltod) (Williams *et al.*, 1990). Beide Befunde belegen, dass Blasten, sowohl was ihr Wachstum als auch die Verhinderung ihres programmierten Todes angeht, auf die Bereitstellung der für sie nötigen Wachstumsfaktoren angewiesen sind. Neben parakrinen Stimulationswegen besteht bei hämatopoetischen Blasten die Möglichkeit der autokrinen Bereitstellung benötigter Wachstumsfaktoren. Tatsächlich scheinen autokrine Mechanismen ebenfalls in der AML eine Rolle zu spielen, da der Nachweis erbracht wurde, dass AML-Blasten zur Produktion von GM-CSF fähig sind und auch auf dieses von ihnen selbst gebildete GM-CSF mit Proliferation reagierten (Young und Griffin, 1986). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass auch andere Wachstumsfaktoren (G-CSF, IL-3, Monozyten-CSF) von AML-Blasten gebildet werden können (Murohashi *et al.*, 1989, Braess *et al.*, 2001) und zur Stimulation der proliferativen Aktivität beitragen können.

1.7.2. Korrelation von Proliferation und Prognose

Zahlreiche Versuche sind unternommen worden, mittels der Analyse der Proliferationsaktivität Aussagen bezüglich der Pathogenese, aber auch der Prognose der AML zu machen. Ein Problem in der Beurteilung dieser Untersuchungen besteht jedoch darin, dass diese Arbeiten große Unterschiede hinsichtlich der verwandten Methodik aufweisen, und auch die Definition der proliferativen Aktivität blastärer Zellen keineswegs einheitlich ist. Die Aussagen dieser Arbeiten sind zum Teil auch aus diesen Gründen nicht einheitlich und gelegentlich sogar widersprüchlich.

Unterschiedliche Methoden sind herangezogen worden, um Aussagen über die Proliferationsaktivität zu machen. Eine der am häufigsten verwendeten Ansätze ist der klonogene Assay, eine Methode, bei der leukämische Blasten auf einer Petrischale ausgestrichen und über einen längeren Zeitraum inkubiert werden. Im Anschluss wird die Anzahl der sich aus diesen Blasten gebildeten Kolonien ermittelt (Karp *et al.*, 1987, Karp *et al.*, 1989, Nara *et al.*, 1992, Brons *et al.*, 1993, Hunter *et al.*, 1993, Nara *et al.*, 1994, Almeida *et al.*, 1995, del Canizo *et al.*, 1998). Bei vielen dieser Experimente wurde die Stimulierbarkeit der Blasten durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren mitgemessen oder das autonome Wachstum der Blasten ermittelt.

Andere Arbeitsgruppen versuchten, sich über die Bestimmung des Zellzyklus der proliferativen Aktivität von neoplastischen Zellen zu nähern. Dies geschah einerseits mittels der Bestimmung des intrazellulären Protein- oder DNS-Gehalts über FACS oder andererseits über Messungen, die den Prozentsatz der Zellen in der S-Phase im Bezug zur Gesamtpopulation bestimmten (Ffrench *et al.*, 1985, Ffrench *et al.*, 1986, Vidriales *et al.*, 1995).

Ein dritter Ansatz verfolgte eine Strategie, die Proliferationsaktivität mittels des Einbaus markierter DNS-Substrate in die Zelle zu untersuchen, unter der Annahme, dass Zellen mit einer hohen Aktivität mehr markierte Substrate einbauten als solche mit einer langsameren Proliferation. Die Markierung erfolgte entweder nicht-radioaktiv mit Farbstoffen und anschließender FACS-Messung *in vivo* (Riccardi *et al.*, 1986, Giordano *et al.*, 1993) oder aber mit radioaktiver Markierung *in vitro* (Riccardi *et al.*, 1986, Löwenberg *et al.*, 1993, Braess *et al.*, 2001). Bei einigen dieser Arbeiten wurde ebenfalls die stimulatorische Kapazität von Wachstumsfaktoren mitgemessen.

Viele dieser Untersuchungen versuchten, die *in vitro* Daten mit dem klinischen Verlauf zu korrelieren, um so Aussagen bezüglich der prognostischen Wertigkeit dieser Verfahren zu erlangen, dennoch waren die publizierten Ergebnisse keineswegs eindeutig. So erwies sich in einigen Arbeiten eine hohe Proliferation als negativer Prognosefaktor, mit geringeren Remissionen und kürzerem Überleben (Ffrench *et al.*, 1986, Vidriales *et al.*, 1995, Almeida *et al.*, 1995, del Canizo *et al.*, 1998), während dieses Ergebnis von anderen Autoren nicht bestätigt werden konnte (Riccardi *et al.*, 1986, Giordano *et al.*, 1993, Braess *et al.*, 2001). Übereinstimmung besteht jedoch hinsichtlich der Tatsache, dass leukämischen Blasten, die die Fähigkeit zum autonomen Wachstum, also Wachstum in Kultur ohne extern zugeführte Wachstumsfaktoren, besitzen, eine schlechte prognostische Bedeutung zukommt (Hunter *et al.*, 1993). Eine stärkere Proliferation des leukämischen „Bulk“ in Kurzzeitkulturen hingegen scheint stark mit der initialen Blastenreduktion und somit mit der Wahrscheinlichkeit, eine CR zu erreichen, korreliert zu sein.

1.7.3. Korrelation von Proliferation und AraC-Inkorporation

Wie bereits erwähnt, besteht zwischen der Wirksamkeit gewisser Zytostatika und dem Zellzyklus ein enger Zusammenhang. Für Cytarabin als Analogon des Cytidin sind einige Untersuchungen unternommen worden, die diesen Zusammenhang auch anhand von experimentellen Daten belegen. Abbildung 2 zeigt, dass die Inkorporation von AraCTP als Antimetabolit in die DNS streng mit der Proliferationsaktivität korreliert (Braess *et al.*, 2000, Braess *et al.*, 2001).

Dies ist insofern bedeutsam, als die durch dieses Medikament induzierte Zytotoxizität in erheblichem Maße durch das Ausmaß seiner Inkorporation in die DNS bestimmt wird (Kufe

et al., 1980, Riva und Rustum, 1985). Ebenfalls zeigte sich, dass die Proliferation mit den bereits erwähnten, nach Karyotypen eingeteilten, prognostischen Subgruppen korreliert war, wobei die günstigen Karyotypen *in vitro* eine höhere Proliferation zeigten (Braess *et al.*, 2001), und somit auch sensitiver auf AraC reagieren sollten, wie auch am Beispiel der Inversion (16) gezeigt werden konnte (Tosi *et al.*, 1998). Andere Arbeitsgruppen fanden im Rezidiv eine verringertes Vermögen zum klonogenen Wachstum als Hinweis auf eine geringere Proliferationsaktivität bei gleichzeitig erhöhter Cytarabin-Resistenz bei einigen untersuchten Patienten (Nara *et al.*, 1992). Somit scheint diesem *ex vivo* Parameter klinische Bedeutung zuzukommen.

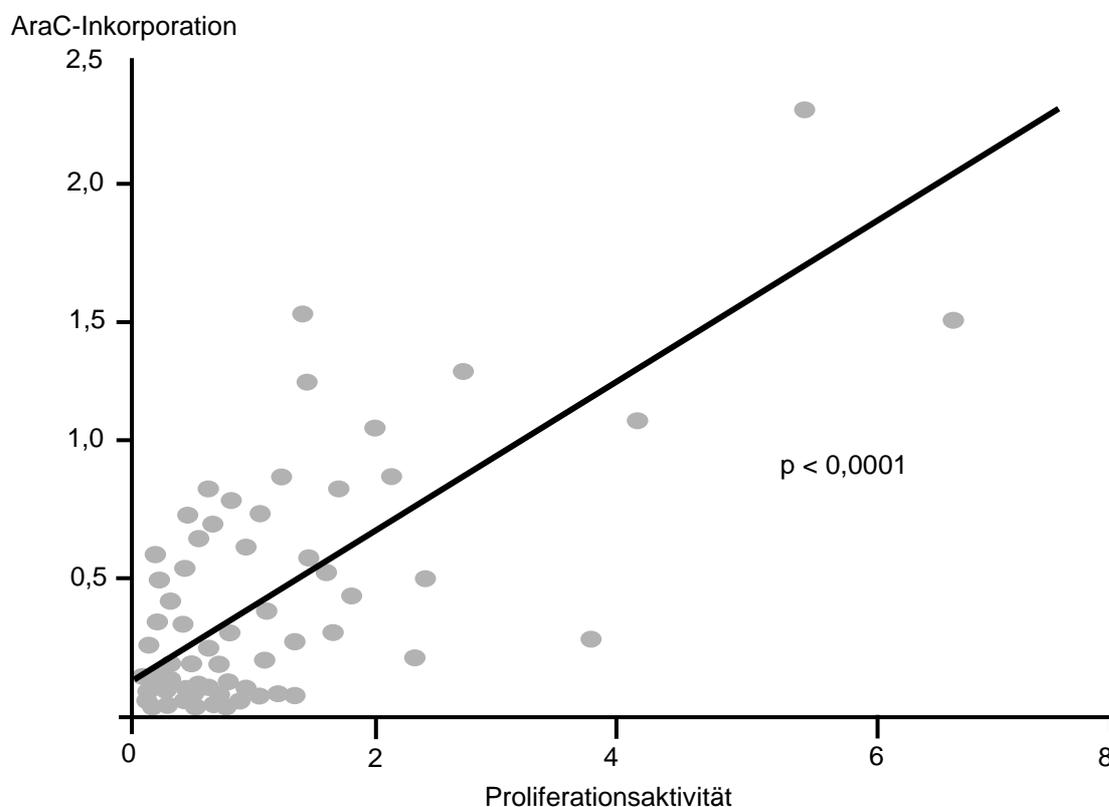


Abb. 2: Korrelation von Proliferationsaktivität und AraCTP-Inkorporation (Braess *et al.*, 2001)

1.8. Fragestellung

1. Die Proliferation leukämischer Blasten ist ein wichtiges biologisches Kriterium, dass einerseits Aussagen bezüglich des Therapieansprechens des Patienten zulässt und andererseits Einfluss auf die Aufnahme, Metabolisierung und damit die Wirksamkeit von S-Phase-spezifischen Zytostatika nimmt. Die Proliferation ist zu einem wesentlichen Teil von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren abhängig. Diese sind außerdem in der Lage, die Inkorporation des Zytostatikums Cytarabin sowie dessen Metabolisierung zu seinem aktiven

Metaboliten AraCTP und dessen Einbau in die DNS zu verstärken. Diesem Vorgang wird für die zytotoxische Rolle der Substanz eine wesentliche Rolle zugeschrieben. Diese für *de-novo*-AML nachgewiesenen Effekte sind für Rezidive der AML weitgehend ungeklärt. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang besonders die Frage, ob im Rezidiv einer AML eine geringere Proliferation vorliegt, da dieses Merkmal den Blasten einen Selektionsvorteil verschaffen könnte und somit ein evolutionärer Prozeß im Verlauf der AML eine Rolle spielt. In der hier vorliegenden Arbeit sollen daher mögliche Unterschiede in der Proliferationsaktivität und dem AraC-Einbau sowie dem Einfluss von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren auf diese beiden biologischen Eigenschaften zwischen Patienten bei Erstdiagnose und im Rezidiv einer AML untersucht werden. Dafür wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- a) Mit Hilfe des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA sollte die endogene Proliferationsaktivität von leukämischen Blasten bei Primärdiagnose und im Rezidiv sowie deren Stimulierbarkeit durch Zytokine erhoben werden.
- b) Die AraC-Inkorporation in die DNA leukämischer Blasten bei Primärdiagnose und im Rezidiv wurde ebenfalls mit und ohne Zytokinen untersucht.

2. Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit war, die Produktion der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren IL-3, GM-CSF und G-CSF durch leukämische Blasten zu messen. Dies sollte die Frage beantworten, ob sich das autokrine Zytokinprofil bei Blasten im Rezidiv von der bei Erstdiagnose unterscheidet und somit für die Pathogenese des Rezidives der AML eine Rolle spielen könnte.

2. MATERIAL UND METHODEN**2.1. Zytogenetik**

Chromosomenanalysen wurden an Metaphasen von Kurzzeitkulturen (24 h, 48 h) von Knochenmarks- und / oder peripheren Blutzellen bei Erstdiagnose oder im Rezidiv durchgeführt. Es wurde eine modifizierte Chromosomenfärbetechnik verwendet (GAG = Giemsa bands by acetic saline-Giemsa) und die Chromosomen entsprechend des ISCN (Internationales System für Humane Cytogenetische Nomenklatur) klassifiziert. Die Analysen wurden, wenn nötig, durch zusätzliche FISH-Analysen ergänzt. Die zytogenetische Analyse wurde vom Labor für Leukämiediagnostik, Medizinische Klinik III, Klinikum Grosshadern, im Rahmen der initialen oder Rezidivdiagnostik durchgeführt.

2.2. ³H Thymidin-Inkorporation und ³H AraC-Inkorporation**2.2.1. Materialien**

Zur Vermeidung bakterieller Kontamination wurden sämtliche Arbeitsschritte unter einer Laminar Air Flow (Fröbel Labor Technik, Lindau, Deutschland) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Inkubation der Zellkulturen wurde Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) von Life Science Technologies Ltd. (Paisley, Schottland) unter Zusatz von 10 ml Penicillin/Streptomycin 10000 U/10000 µg/ml und 50 ml fetales Kälberserum (FCS), beides von Biochrom KG (Berlin, Deutschland), verwendet. Inkubiert wurde unter standardisierten Bedingungen, d.h. 37°C, 5,0 % CO₂ und 97 % Luftfeuchtigkeit, in 270 ml Inkubationsflaschen mit CO₂-Filter-Schraubkappen oder in 12-Well-Platten in einem Brutschrank der Firma Cytoperm Heraeus. Zur Zentrifugation standen je nach Bedarf eine Zentrifuge der Firma Jouan GmbH (Unterhaching, Deutschland) sowie das Modell Biofuge 15 der Firma Hereaus zur Verfügung. Für unterschiedliche Arbeitsschritte wurden 10 ml, 50 ml und Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet. Zellzählung nach erfolgter Trypanblaufärbung (Sigma, Saint Luis, USA) wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Deutschland) durchgeführt. Die radioaktive Markierung erfolgte je nach Assay mit 1:10 verdünntem, Tritium-markiertem Thymidin beziehungsweise mit 1:10 verdünntem, Tritium-markiertem Cytarabin, beides bezogen von der Firma Amersham Buchler GmbH, mit einer radioaktiven Aktivität von 37 MBq pro ml in unverdünntem Zustand. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels 0,5 molarem Natriumphosphat-Puffer, 96 %em Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und bidestilliertem Wasser aus eigener Produktion mittels Filteranlage (Millipore) über einem DE81 Anionen-Austausch-Filter der Firma Whatman (Maidstone, England). Die Auswertung der Filter erfolgte in 20 ml Zählfläschchen (Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) mit Szintillationsflüssigkeit („Cytoscint“, ICN, Costa Mesa, USA) in einem Szintillationszähler von Packard (Dreiech, Deutschland).

2.2.2. Probengewinnung und Aufarbeitung

Zur Gewinnung mononukleärer Zellen wurde den Patienten entweder peripheres Blut mittels Venenpunktion oder Knochenmarksblut mittels Punktion des Beckenkammes entnommen. Dieser Vorgang erfolgte im Rahmen routinemäßiger hämatologischer Untersuchungen. Diese Proben wurden dann dem Zytogenetischen Labor der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Grosshadern zur zytogenetischen Analyse übersandt. Überschüssiges Material wurde zur experimentellen Forschung nach Anreicherung mononukleärer Zellen mittels FICOLL (siehe unter 2.3.2.) weiterverarbeitet. Zwischen Probeneingang im Zytogenetischen Labor und experimenteller Weiterverarbeitung lagen nicht mehr als 24 Stunden, welche die Proben unter oben genannten Bedingungen im Brutschrank inkubiert wurden.

2.2.3. Durchführung

Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Zellsuspension dekantiert, bei 1500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml IMDM aufgenommen und 20 µl dieser Lösung zu einer Endverdünnung von 1:100 in IMDM gelöst. 20 µl dieser Lösung wurden mit 20 µl Trypanblau versetzt. Lebendige Zellen exkludieren diesen Farbstoff, während tote Zellen sich intensiv blau anfärben. Mit diesem Gemisch wurde die Neubauer-Zählkammer gefüllt und der Anteil überlebender Zellen ermittelt. Die Probe wurde dann auf eine Konzentration von 10^7 lebenden Zellen pro ml verdünnt. 1 ml dieser Lösung wurde daraufhin mit 20 ml IMDM über 48 Stunden unter vorgenannten Bedingungen inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut gezählt (siehe oben) und in eine Konzentration von 10^6 lebenden Zellen pro ml gebracht. In einer 12-Well-Platte wurden daraufhin 4×10^5 Zellen mit 1,6 ml IMDM versetzt. Zu dieser Lösung wurden nun je nach Assay 10 µl ^3H -Thymidin oder 10 µl ^3H -Cytarabin zugegeben. Die anschließende Inkubation unter standardisierten Bedingungen erfolgte über 4 Stunden. Im Anschluss wurden die Zellen unter vorschriftsmäßigen Bedingungen auf einen DE81 Anionen-Austausch-Filter aufgegeben und vermittle 2maligen Spülens mit 5 ml Natriumphosphat-Puffers und 5 ml bidestilliertem Wasser sowie 1maligen Spülens mit Ethanol lysiert. Der Leerwert wurde durch Aufbringen von Medium mit 10 µl ^3H -Thymidin, beziehungsweise 10 µl ^3H -Cytarabin, und anschließender Spülung, der Maximalwert nach Aufbringen derselben Menge auf einen Filter ohne Spülung ermittelt. Nach Trocknung der Filter in Zählfläschchen erfolgte die Analyse nach Zugabe von 8 ml Szintillationsflüssigkeit in einem β -Counter. Alle Versuche wurden dreifach durchgeführt und der Mittelwert errechnet. Anhand der Rohdaten ließ sich dann die aufgenommene Menge Thymidin beziehungsweise Cytarabin mittels folgender Formeln errechnen: vom Mittelwert der Probe und des Maximalwertes wurde der Mittelwert des Leerwertes subtrahiert. Zur Bestimmung der Inkorporation wurde der Mittelwert des

Maximalwertes mit 4 multipliziert, und im Fall von ^3H -Thymidin die Zahl 400 durch das Ergebnis geteilt, im Fall von ^3H -Cytarabin die Zahl 357. Der so errechnete Faktor wurde mit dem jeweiligen Probenwert multipliziert und anschließend das Ergebnis durch 4 geteilt, so dass man als Endergebnis die von 10^5 Zellen in die DNA inkorporierte Menge des Agens in pmol/ml erhielt.

2.3. Stimulationsversuche mit G-CSF und GM-CSF

2.3.1. Materialien

Für diese Assays wurden die gleichen Materialien verwendet wie für die Inkorporationsversuche. Die Stimulationsexperimente wurde mit G-CSF (Neupogen® 30 FS AMGEN, Breda, Niederlande) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ respektive mit GM-CSF (Sigma, Saint Louis, USA) in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt.

2.3.2. Probengewinnung und -aufarbeitung

Die Probengewinnung und -aufarbeitung erfolgte analog der unter 2.1.2. angegebenen Arbeitsschritte.

2.3.3. Durchführung

Die anfängliche Inkubation und Zellzählung erfolgte analog den unter 2.1.3. angegeben Arbeitsmethoden. 10^7 lebende Zellen wurden mit 20 ml IMDM und 100 μl G-CSF beziehungsweise GM-CSF unter den obengenannten Bedingungen für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die weiterführenden Experimente erfolgten analog den Inkubationsversuchen.

2.4. Zellseparation

2.4.1. T-Zell-Depletion

2.4.1.1. Materialien

Inkubation und Zentrifugation erfolgten mit den selben Materialien wie unter 2.1. und 2.2.. Die T-Zell-Depletion wurde mittels magnetischer Zellauftrennung durchgeführt. Dazu wurde ein MACS®-Gerät mit passender positiver Selektionssäule Typ LS+ der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) mit entsprechenden Anti-CD3 Antikörpern derselben Firma verwendet. PBS Puffer mit EDTA und BSA wurde von der Apotheke des Klinikums Innenstadt, München, zur Verfügung gestellt.

2.4.1.2. Durchführung

10^7 Zellen wurden bei 1500 U/Min für 10 Minuten zentrifugiert und das überstehende Medium komplett abgehoben. Das Pellet wurde in 80 μ l Puffer aufgenommen, mit 20 μ l magnetischen Anti-CD3 Antikörpern versetzt und für 15 Minuten im Kühlschrank bei 6°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 900 μ l Puffer gestoppt. Die Probe wurde erneut zentrifugiert (1500 U/Min für 10 Minuten) und der Überstand komplett abgehoben und verworfen. Das Pellet wurde dann in 500 μ l Puffer aufgenommen. Eine MACS-Säule wurde in den MACS-Magneten platziert und mit 1 ml Puffer gespült, anschließend die Probe aufgegeben, mit 1 ml Puffer gespült und das Eluat aufgefangen. Nach erneutem Zentrifugieren unter oben genannten Bedingungen wurde der Überstand erneut abgehoben und das Pellet mit 10 ml IMDM ohne FCS zu einer Endkonzentration von 10^6 pro ml Zellen gelöst.

2.4.2. CD34-Selektion

2.4.2.1. Materialien

Zur Anreicherung mononukleärer Zellen wurde PSA-Puffer sowie FICOLL-Separationslösung (Biochrom Kg, Berlin, Deutschland) verwendet. Die Auftrennung der Zellpopulation von Proben von gesunden Probanden erfolgte entsprechend der Expressierung des CD34-Antigens. Analog zur T-Zell-Depletion wurde die ebenfalls die MACS[®]-Technologie verwendet. Zur Markierung diente das CD34-Selektionskit der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland).

2.4.2.2. Durchführung

2.4.2.2.1. Anreicherung mononukleärer Zellen

Zur Anreicherung mononukleärer Zellen wurde peripheres Blut oder Knochenmarksaspirat von gesunden Spendern im Verhältnis 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt. Dieselbe Menge FICOLL-Lösung wurde in ein Reagenzgefäß gegeben und die Probe langsam daraufgeschichtet, um etwaige Vermischungen zwischen Probe und Lösung zu vermeiden. Im Anschluss wurde für 20 Minuten bei 1500 U/Min zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde ohne Bremse durch Auslaufen beendet. Der buffy-coat, also die Schicht, welche sich zwischen FICOLL-Lösung und aufgeschichtetem Serum gebildet hatte, entsprach dem in dieser Probe enthaltenem Anteil an mononukleären Zellen. Dieser Buffy-coat wurde sorgfältig abgehoben und stand nach zweimaligem Waschen mit Puffer für weitere Analysen zur Verfügung.

2.4.2.2.2. CD34-Selektion

Nach Zellzählung entsprechend der angegebenen Methode erfolgte nach Abzentrifugation des Mediums die Zugabe von 300 µl Puffer pro 10^8 Zellen (gilt für alle folgenden Mengenangaben in diesem Abschnitt). Anschließend wurden zuerst 100 µl des Reagenz A1 (FcR Blockade), dann nach sorgfältigem Mischen das Reagenz A2 (monoklonale Hapten-konjugierte CD34 Antikörper) zugegeben. Danach wurde für 15 Minuten im Kühlschrank bei 6°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe des 10 bis 20fachen Volumens gestoppt, erneut abzentrifugiert (1500 U/Min für 10 Minuten) und der Überstand komplett abgehoben. Das Pellet wurde nun in 400 µl Puffer gelöst, 100 µl Reagenz B (anti-Hapten-Antikörper mit magnetischen Beads) zugegeben, gut gemischt und erneut für 15 Minuten bei 6°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte wie oben geschildert das Stoppen der Reaktion mittels Puffer, Zentrifugation und Abheben des Überstandes. Das Pellet wurde nun in 500 µl Puffer aufgenommen und auf die im Magneten steckende, mit 1 ml Puffer gespülte Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 3 mal 3 ml Puffer gewaschen. Das Eluat wurde verworfen, da es die CD34 negative Fraktion enthielt. Die Säule wurde nun aus dem Magneten genommen, auf ein passendes Gefäß plziert und mit 5 ml Puffer gespült. Das Eluat wurde aufgefangen, abzentrifugiert, gezählt und die Bestimmung der Proliferationsaktivität mittels ^3H -Thymidin-Einbau ermittelt, wie oben geschildert.

2.5. Zytokinmessungen

2.5.1. Material

Zur Messung der von AML-Blasten produzierten stimulatorischen Zytokine IL3, G-CSF und GM-CSF wurden die wie unter 2.3.1. T-Zell-depletierten Proben verwendet. Zum Einfrieren wurde eine auf -80°C eingestellte Tiefkühltruhe benützt (Colora Messtechnik GmbH, Lörch, Deutschland). Weiterhin wurden ELISAs der Firma R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland), ein 12 Kanal-Handwaschgerät, zwei 3 Liter fassende Vakuumflaschen (Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland) und eine Vakuumpumpe von Leybold Hereaus verwendet. Die photometrische Auswertung erfolgte mittels eines PC-gesteuertem Mikroplatten-Lesegerät und dazugehöriger Software von der Firma Molecular Devices (Sunnyvale, USA).

2.5.2. Durchführung

Nach erfolgter T-Zell-Depletion wurden die Blasten gezählt und auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml mit FCS-freiem Medium gebracht. 3 ml dieser Lösung wurden nun standardisierten Bedingungen 24 Stunden lang in einer 12-Well-Platte inkubiert und im Anschluss zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und bei -80°C bis zur Auswertung eingefroren.

2.5.3. IL3-ELISA

2.5.3.1. Eichung und Nachweisgrenze

Nach Anleitung wurde für jede Messung eine Standardverdünnungskurve hergestellt, die als Eichgerade für die Auswertung diente. Die untere Nachweisgrenze lag bei 31,2 pg/ml, die obere bei 2000 pg/ml. Als Leerwert diente IMDM ohne FCS.

2.5.3.2. Durchführung

Die Proben wurden aufgetaut und die Standardkurve hergestellt. 200 µl Standard beziehungsweise Probe wurden aufpipettiert. Alle Versuche erfolgten in dreifacher Ausfertigung. Die Platte wurde mit einem Klebestreifen verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde viermal mit Puffer gewaschen und IL3-Konjugat zugegeben, danach erneut für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde wieder viermal gewaschen und die Färbelösung zugegeben, 20 Minuten inkubiert und die Stop-Lösung hinzugefügt. Die photometrische Auswertung erfolgte innerhalb der nächsten 20 Minuten bei einer Absorption von 430 nm und einer optischen Korrektur von 570 nm. Anhand der Eichgerade wurde die Konzentration von IL3 in den Proben bestimmt.

2.5.4. G-CSF ELISA

2.5.4.1. Eichung und Nachweisgrenze

Nach Anleitung wurde für jede Messung eine Standardverdünnungskurve hergestellt, die als Eichgerade für die Auswertung diente. Die untere Nachweisgrenze lag bei 39,1 pg/ml, die obere bei 2500 pg/ml. Als Leerwert diente IMDM ohne FCS.

2.5.4.2. Durchführung

Die Proben wurden aufgetaut und die Standardkurve hergestellt. 100 µl Standard beziehungsweise Probe wurden aufpipettiert. Alle Versuche erfolgten in dreifacher Ausfertigung. Die Platte wurde mit einem Klebestreifen verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal mit Puffer gewaschen und G-CSF-Konjugat zugegeben, danach erneut für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde wieder dreimal gewaschen und die Färbelösung zugegeben, 20 Minuten inkubiert und die Stop-Lösung hinzugefügt. Die photometrische Auswertung erfolgte innerhalb der nächsten 20 Minuten bei einer Absorption von 430 nm und einer optischen Korrektur von 570 nm. Anhand der Eichgerade wurde die Konzentration von G-CSF in den Proben bestimmt.

2.5.5. GM-CSF ELISA

2.5.5.1. Eichung und Nachweisgrenze

Nach Anleitung wurde für jede Messung eine Standardverdünnungskurve hergestellt, die als Eichgerade für die Auswertung diene. Die untere Nachweisgrenze lag bei 7,8 pg/ml, die obere bei 500 pg/ml. Als Leerwert diene IMDM ohne FCS.

2.5.5.2. Durchführung

Die Proben wurden aufgetaut und die Standardkurve hergestellt. 100 µl Standard beziehungsweise Probe wurden aufpipettiert. Alle Versuche erfolgten in dreifacher Ausfertigung. Die Platte wurde mit einem Klebestreifen verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde viermal mit Puffer gewaschen und GM-CSF-Konjugat zugegeben, danach erneut für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde wieder viermal gewaschen und die Färbelösung zugegeben, 20 Minuten inkubiert und die Stop-Lösung hinzugefügt. Die photometrische Auswertung erfolgte innerhalb der nächsten 20 Minuten bei einer Absorption von 430 nm und einer optischen Korrektur von 570 nm. Anhand der Eichgerade wurde die Konzentration von GM-CSF in den Proben bestimmt.

2.6. Statistik

Die Datenerfassung wurde mit dem Programm EXCEL von Microsoft durchgeführt, als Statistikprogramm diene das Programm PC STATISTIK (Lizenzagentur Lambda, Graz und TopSoft, Hannover, Deutschland). Details zu den verwendeten Tests befinden sich im jeweiligen Abschnitt im Ergebnisteil.

3. PATIENTEN

Proben wurden im Rahmen der Diagnostik bei Verdacht auf Erstdiagnose einer AML oder eines Rezidives durch periphere Venenpunktion oder Beckenkammpunktion und -aspiration erhoben. Die Diagnose AML wurde anhand der Morphologie, Zytochemie und Immunphänotypisierung gestellt, die Diagnose eines Rezidives durch das Erscheinen leukämischer Blasten im peripheren Blut und / oder eine steigende Infiltration (>5 %) von Myeloblasten im Knochenmark. Sämtliche Proben wurden dem Zytogenetischen Labor des Klinikum Grosshadern zur karyotypischen Untersuchung zugeschickt und von diesem für weitere experimentelle Arbeiten zur Verfügung gestellt. Für den Einschluss in die Studie wurde eine Knochenmarksinfiltration von über 70 % oder ein Anteil an Blasten im peripheren Blutbild von über 70 % gefordert. Zum Zeitpunkt der Experimente war lediglich das Krankheitsstadium bekannt. Von allen Patienten wurde der karyotypische Befund erhoben und hinsichtlich seiner Verteilung innerhalb beider Gruppen untersucht. Die Auswahl der Patienten erfolgte konsekutiv.

Die Vorgehensweise dieser Studie befand sich in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (Anonymous, 1997) und wurde durch das örtliche Ethik-Komitee abgestimmt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Patienten

Im Zeitraum von Oktober 1998 bis Juni 2000 wurden insgesamt 58 Patienten mit AML in diese Studie aufgenommen. Das mediane Alter dieser Gruppe betrug 59 Jahre, mit einem Minimum von 16 und einem Maximum von 82 Jahren. Von diesen 58 Patienten wurden 43 Proben bei Primärdiagnose und 15 Proben im Rezidiv erworben. Diese Proben waren nicht gepaart, d. h. es wurde von keinem Patienten eine Probe sowohl bei Erstdiagnose als auch im Rezidiv untersucht. Das mediane Alter der Primärdiagnosengruppe war 61 Jahre mit einem Minimum von 17 Jahren und einem Maximum von 82 Jahren, das der Rezidivgruppe betrug 55 Jahre bei einem Minimum von 16 und einem Maximum von 78 Jahren. Die Geschlechtsverteilung war in beiden Gruppen equivalent (56% Männer in der Primärdiagnosengruppe und 40% Männer in der Rezidivgruppe). Bei 11,6 % der Initialdiagnosen handelte es sich um sekundäre AMLs. Bei der Rezidivgruppe betrug dieser Anteil nur 6,7 %. In der Rezidivgruppe befanden sich 80 % im ersten Rezidiv, 20 % im zweiten Rezidiv. In 47 Fällen wurde der FAB Subtyp bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

FAB Subtyp	Primärdiagnose	Rezidiv
M1	n = 8	n = 2
M2	n = 12	n = 2
M3	n = 3	n = 1
M4	n = 10	n = 1
M5	n = 4	n = 1
M6	n = 0	n = 0
M7	n = 0	n = 0
nicht vorhanden	n = 6	n = 8

Tabelle 1: FAB-Verteilung in beiden Gruppen

4.2. Vergleich der Karyotypenverteilung

Der Karyotyp wurde vom Labor für Leukämiediagnostik der III. Medizinischen Klinik des Klinikum Großhadern bestimmt und für diese Arbeit zur weiteren Auswertung zur Verfügung gestellt. Die Karyotypen wurden hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung in 4 Gruppen unterteilt: ein normaler Karyotyp mit einem Chromosomensatz von 46 ohne Veränderungen, eine günstige Gruppe, die einen numerisch normalen Chromosomensatz sowie die balancierten Translokationen (15;17), (8;21) oder Inversionen am Chromosomen 16 sowie andere Veränderungen dieser Genregion beinhalteten. Die dritte Gruppe umfasste die

prognostisch ungünstigen Karyotypen, die durch Verlust des Chromosoms 7 oder seines kurzen Armes sowie Verlust des Chromosoms 5 oder seines kurzen Armes charakterisiert sind, weiterhin zählen dazu Veränderungen des 11;q23 Genlokus. Dieser Einheit sind außerdem die komplex aberranten Karyotypen zuzuordnen, die durch drei oder mehr chromosomale Abberationen charakterisiert sind. Die letzte Gruppe, die sogenannten anderen Karyotypen, umfasst sämtliche Karyotypen, die durch oben genannte Einteilung nicht erfasst werden. Ihre prognostische Bedeutung ist ähnlich der Gruppe mit normalem Karyotyp intermediär.

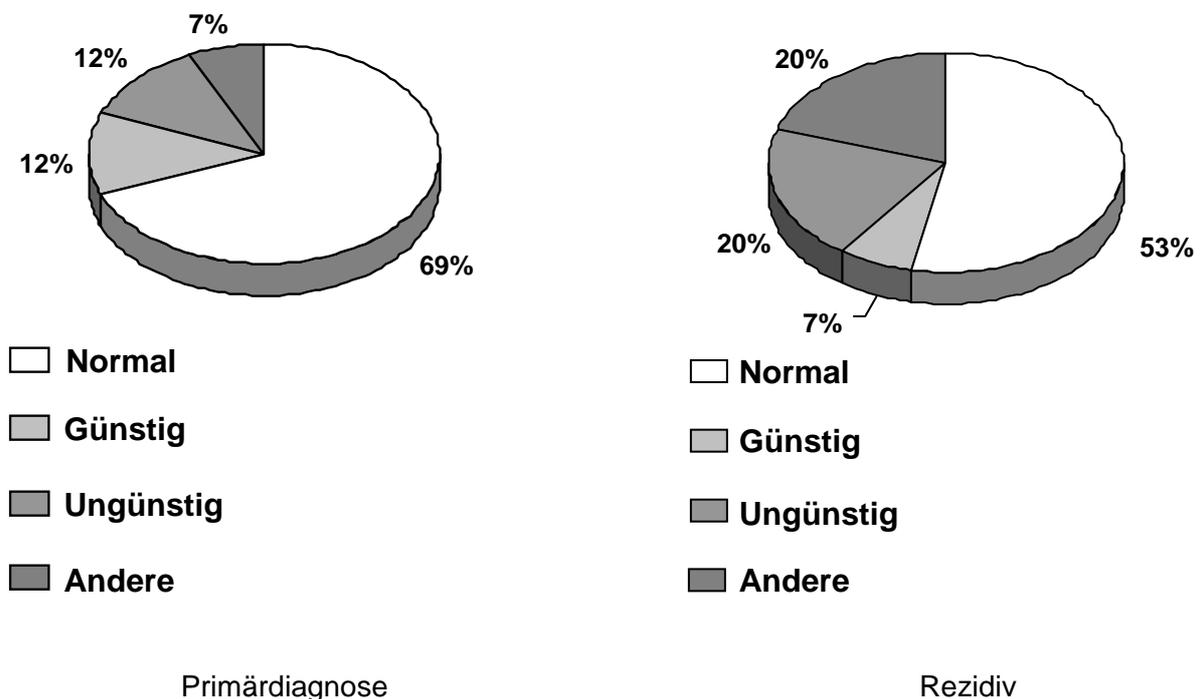


Abb. 3: Karyotypenverteilung in beiden Gruppen

Hinsichtlich der Verteilung der Karyotypen zeigte sich folgendes Bild (Abb. 3): ein normaler Karyotyp lag bei 69,8 % der Patienten bei Primärdiagnose vor und bei 53,3 % der Patienten im Rezidiv. Ein günstiger Karyotyp fand sich bei 11,6 % der Primärdiagnosen und bei 6,7 % der Rezidive, ein ungünstiger bei 11,6 % bei initialer Diagnose und bei 20 % in der rezidierten Gruppe. Ein anderer Karyotyp fand sich bei 7 % der Proben in Primärdiagnose und bei 20 % der Proben im Rezidiv. Diese Unterschiede in der Verteilung innerhalb beider Gruppen war nicht signifikant: im Fisher-Test ergaben sich für die normale Gruppe ein $p=0,2$, für die günstige Gruppe ein $p=0,51$, für die ungünstige ein $p=0,34$ und für die anderen Karyotypen ein $p=0,17$.

4.3. Selektion**4.3.1. T-Zell-Depletion**

Die für die weiteren Untersuchungen nötigen Aufreinigungsschritte per MACS wurden per FACS-Analyse vorher validiert. Hierzu wurden FACS-Analysen einer unbearbeiteten sowie einer mittels der unter Punkt 2.4.1. bearbeiteten Probe miteinander verglichen. Die Analysen wurden vom Institut für Klinische Chemie des Klinikums Grosshadern durchgeführt. Es ergaben sich folgende Werte:

Ohne T-Zell-Depletion:

Zellzahl: 2000 / μ l, grössteils Blasten (teilweise mit Granula), vereinzelt Monozyten und Lymphozyten

CD45 (+) (Blasten)	95,2%
CD14++ und CD45+ (Monozyten)	0,3%
CD45++ und CD14- (Lymphozyten)	0,5%
Debris (CD45-) Erythrozyten	4%
CD5+ (T-Zellen)	0,4%
CD16/56+ und TCR-	nicht nachweisbar
CD33+ und CD14- (Blasten)	93,4%
CD33+ und CD14+ (Monozyten)	0,3%

Nach T-Zell-Depletion:

Zellzahl: 1600 / μ l, nur Blasten (teilweise Granula), vereinzelt Normoblasten

CD45 (+) (Blasten)	95,6%
CD14++ und CD45+ (Monozyten)	0,2%
<i>CD45++ und CD14- (Lymphozyten)</i>	<i>nicht nachweisbar</i>
Debris (CD45-) Erythrozyten	4,4%
<i>CD5+ (T-Zellen)</i>	<i>nicht nachweisbar</i>
<i>CD16/56+ und TCR-</i>	<i>nicht nachweisbar</i>
CD33+ und CD14- (Blasten)	94,3%
CD33+ und CD14+ (Monozyten)	0,3%

4.3.2. CD34-Selektion

Analog der oben angegebenen Untersuchung wurde eine FACS-Analyse einer CD34+ selektionierten Probe vom Institut für Klinische Chemie des Klinikum Großhadern durchgeführt:

CD14- und CD45 (+)	nicht nachweisbar
CD14- und CD45+ (Monozyten)	< 0,5%
CD14- und CD45+ (Lymphozyten)	1,5%
<i>CD45 (+) und CD34+</i>	<i>98%</i>

4.4. Zellüberleben nach Inkubation

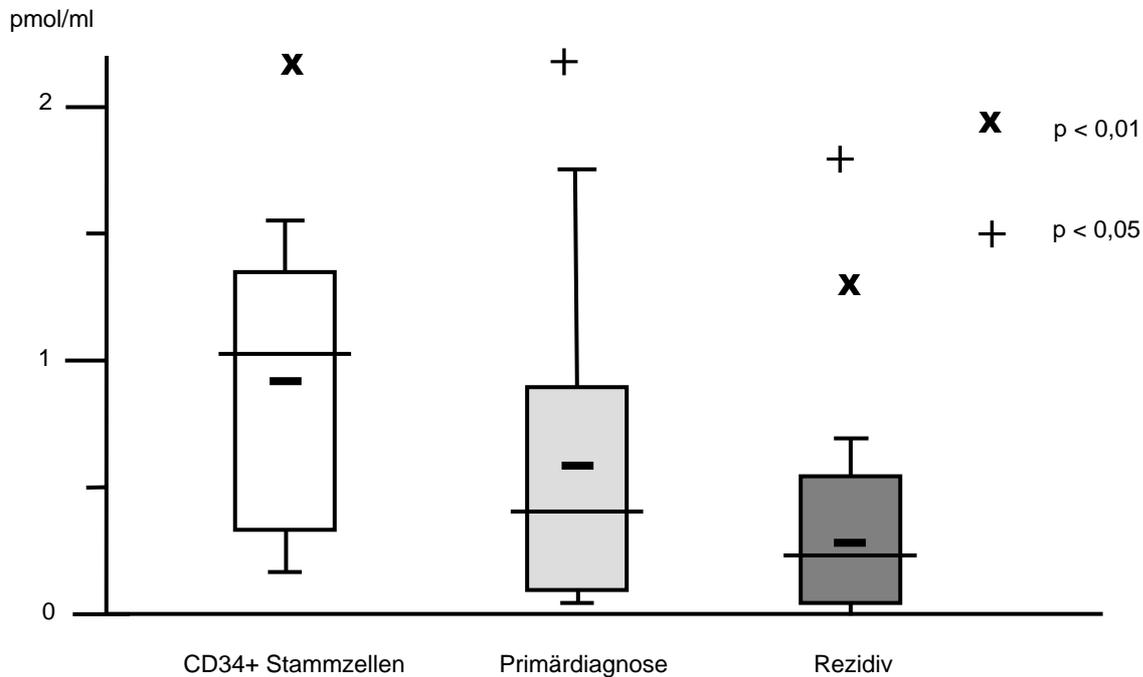
Nach 48-stündiger Inkubation wurde die Zellzahlen erneut erhoben, um einerseits die richtigen Konzentrationen für die weiterführenden Versuche herstellen und andererseits eventuelle Unterschiede im Überleben der AML-Blasten in Kultur entdecken zu können. Es zeigte sich ein endogenes medianes Überleben der AML-Blasten bei Primärdiagnose von 51 % beziehungsweise von 44 % bei Blasten im Rezidiv ($p=0,18$, nicht signifikant). Das Überleben nach Stimulation mit G-CSF erreichte einen medianen Wert von 63 % beziehungsweise von 55 % in der Rezidivgruppe, nach Stimulation mit GM-CSF betrug das mediane Überleben initial diagnostizierter Blasten 50 %, das der Blasten im Rezidiv 47 %. Die statistischen Auswertungen ergaben ein $p=0,48$ für die Versuche mit G-CSF sowie ein $p=0,84$ für die Versuche mit GM-CSF. Beide Werte lagen damit über dem Signifikanzniveau.

4.5. Vergleich der endogenen Proliferationsaktivität von Blasten bei Primärdiagnose, im Rezidiv und von CD34+ Stammzellen

43 Proben von AML Blasten bei Primärdiagnose wurden mittels ^3H Thymidin Einbaus auf ihre proliferative Aktivität untersucht und mit 15 Patientenproben, die während eines Rezidives ihrer Krankheit erhoben wurden, verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,04$ im zweiseitigen Wilcoxon-Test) hinsichtlich ihrer endogenen Proliferationsaktivität: Leukämische Blasten bei initialer Diagnose zeigten eine deutlich stärkere Proliferation (Mittelwert 0,67 pmol/ml, Median 0,41) im Vergleich mit den rezidierten Blasten (Mittelwert 0,30, Median 0,21).

Diese Ergebnisse wurden mit der Proliferationsaktivität von CD34 positiven Stammzellen von 7 gesunden Spendern verglichen. Die Proliferationsaktivität gesunder Stammzellen sollte dabei als Referenz dienen. Dabei zeigte sich folgendes Bild: Stammzellen besaßen eine mediane Proliferationsaktivität von 1,04 pmol/ml (Mittelwert: 0,97 pmol/ml), und somit keine statistisch stärkere Proliferation als Blasten bei Primärdiagnose ($p>0,05$, paarweiser Vergleich). Die Proliferationsaktivität der Stammzellen war jedoch signifikant höher (Abb. 4) als die der Blasten im Rezidiv ($p<0,01$, paarweiser Vergleich).

Abb. 4: Vergleich von AML-Blasten bei Primärdiagnose, im Rezidiv und von CD34 positiven Stammzellen



4.6. Vergleich der stimulatorischen Effekte der Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF auf die Proliferationsaktivität von Blasten bei Primärdiagnose und im Rezidiv

Nach 48-stündiger Inkubation mit den Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF wurde die Proliferationsaktivität beider Gruppen zur Untersuchung ihrer möglichen Stimulierbarkeit untersucht. Dabei ergab sich folgendes Bild: AML-Blasten bei Primärdiagnose reagierten auf die Koinkubation mit einem signifikanten Anstieg bezüglich ihrer proliferativen Aktivität sowohl durch G-CSF (Anstieg 3,84fach [Median], $p < 0,01$) als auch durch GM-CSF (Anstieg 1,19 [Median], $p < 0,01$). Im Gegensatz dazu erfolgte in der Rezidivgruppe lediglich ein Anstieg der Proliferation durch G-CSF (Zunahme 1,84 [Median], $p < 0,01$). Durch Koinkubation mit GM-CSF war kein signifikanter Anstieg der Proliferation zu beobachten (Anstieg 1,04 [Median], $p > 0,05$, nicht signifikant).

Weiterhin wurden diese unterschiedlichen Antworten auf exogen zugeführte Wachstumsfaktoren in beiden Gruppen miteinander verglichen. Während Blasten bei Primärdiagnose einen medianen Anstieg ihrer Proliferation von 3,84 (Mittelwert: 6,62fach) nach Stimulation mit G-CSF zeigten, lag der mediane Anstieg in der Rezidivgruppe mit 1,84 (Mittelwert: 3,41) wesentlich niedriger (Abb. 5). Dieser Unterschied war mit einem $p=0,03$ im

zweiseitigen Wilcoxon-Test statistisch signifikant. Ein ähnliches Bild zeigte sich im Vergleich der Stimulierbarkeit durch GM-CSF (Abb.6): bei einem medianen Anstieg der Proliferation von 1,19 (Mittelwert: 1,54) in der Primärdiagnosengruppe zeigte sich in der Rezidivgruppe lediglich ein medianer Anstieg der Proliferation von 1,04 (Mittelwert 1,75). Diese Unterschiede waren ebenfalls signifikant ($p < 0,05$).

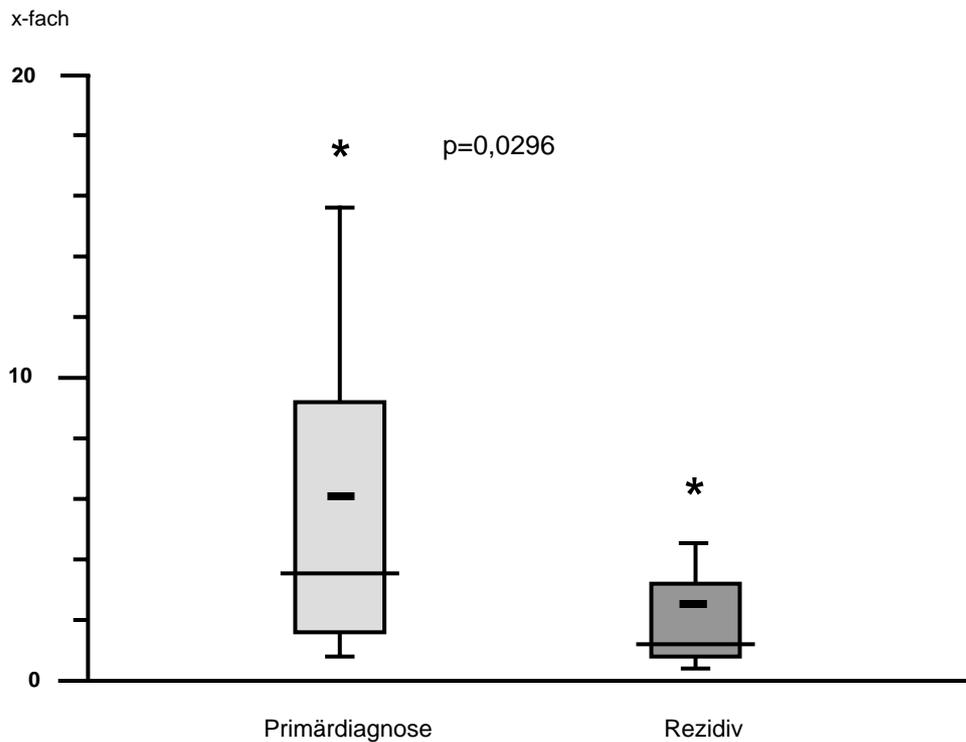


Abb. 5: Vergleich der Stimulation mit G-CSF

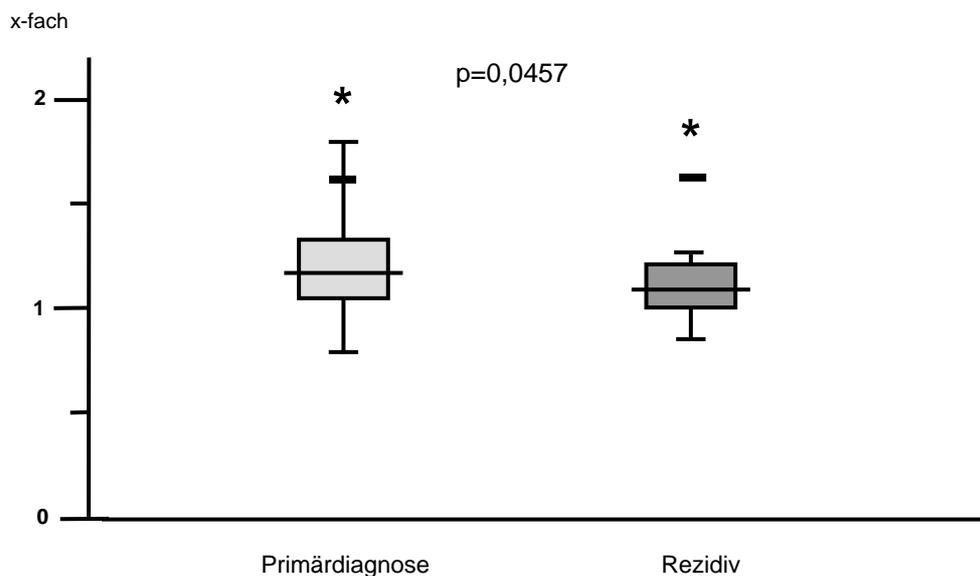


Abb. 6: Vergleich der Stimulation mit GM-CSF

4.7. Vergleich der Zytokinproduktion beider Gruppen

Eine AML-Probe wurde als Nicht-Produzierer definiert, wenn die Produktion des entsprechenden Zytokines (G-CSF, GM-CSF oder IL3) dieser Probe unter der Nachweisgrenze des entsprechenden ELISA-Tests lag. Im Vergleich der Zytokinproduktion beider Gruppen zeigte sich ein deutliches Muster. In der Gruppe der primär diagnostizierten AML-Blasten produzierten 53,5 % IL3 und 60,5 % produzierten GM-CSF. Ein equivalentes Bild zeigte sich in Rezidivgruppe, in der 73,3 % aller Blasten IL3 produzierten und 66,7 % GM-CSF. Hierbei ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Ein Unterschied hingegen ergab sich im Vergleich der Produktion von G-CSF: die Blasten, die bei Primär-diagnose untersucht worden waren, hatten einen signifikant ($p=0,004$) höheren Anteil an produzierenden Blasten (90,7 %) als die im Rezidiv untersuchten Blasten (53,3 %)(Abb. 7).

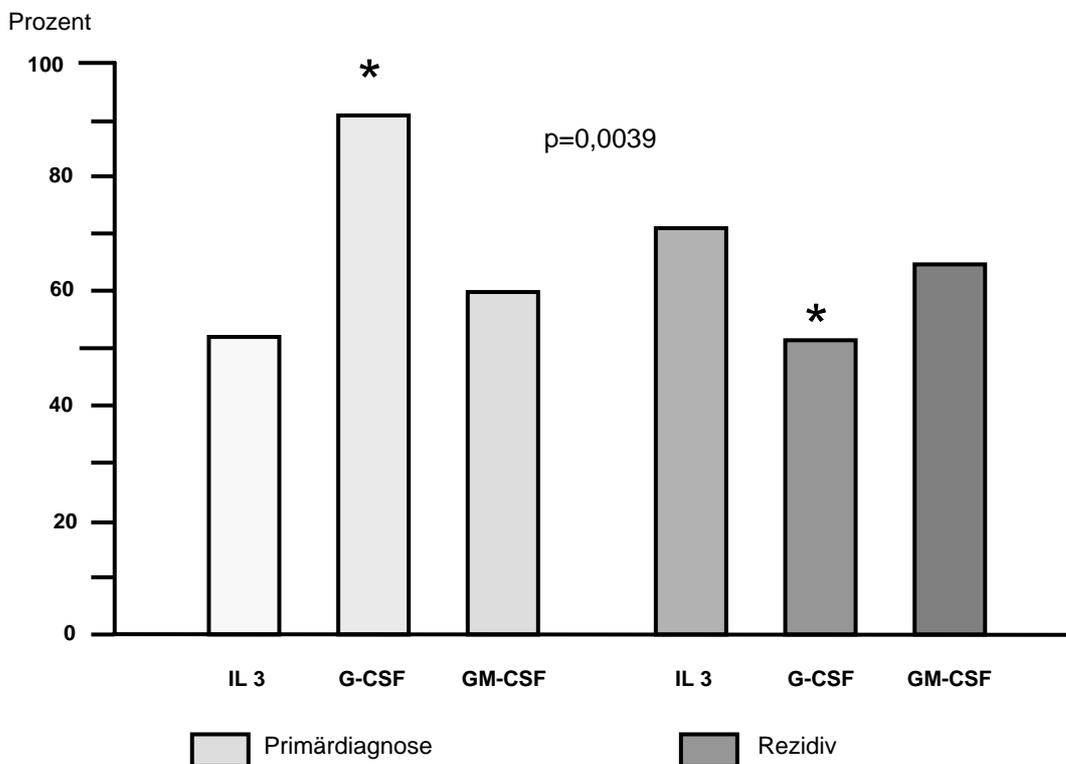


Abb. 7: Prozentuale Verteilung zytokinproduzierender Blasten

Die Zytokin-produzierenden Proben beider Gruppen (IL3: $n=23/43$ versus $11/15$, GM-CSF: $n=26/43$ versus $10/15$ und G-CSF: $n=39/43$ versus $8/15$) wurden bezüglich ihrer quantitativen Menge an produzierten Zytokinen weiter untersucht (Abb. 8). Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Produktion von IL3 (Mittelwert 183,24 pg/ml, Median 86,03 versus Mittelwert 142,53, Median 156,99, $p=0,78$) und GM-CSF (Mittelwert 118,71, Median 45,41 versus Mittelwert 94,98, Median 25,05, $p=0,26$). Bei dem Vergleich der Produktion von G-CSF hingegen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,03$). Primär

diagnostizierte Blasten produzierten eine mediane Menge von 261,30 (Mittelwert 266,02), Rezidivblasten jedoch nur eine mediane Menge von 113,57 (Mittelwert 166,05).

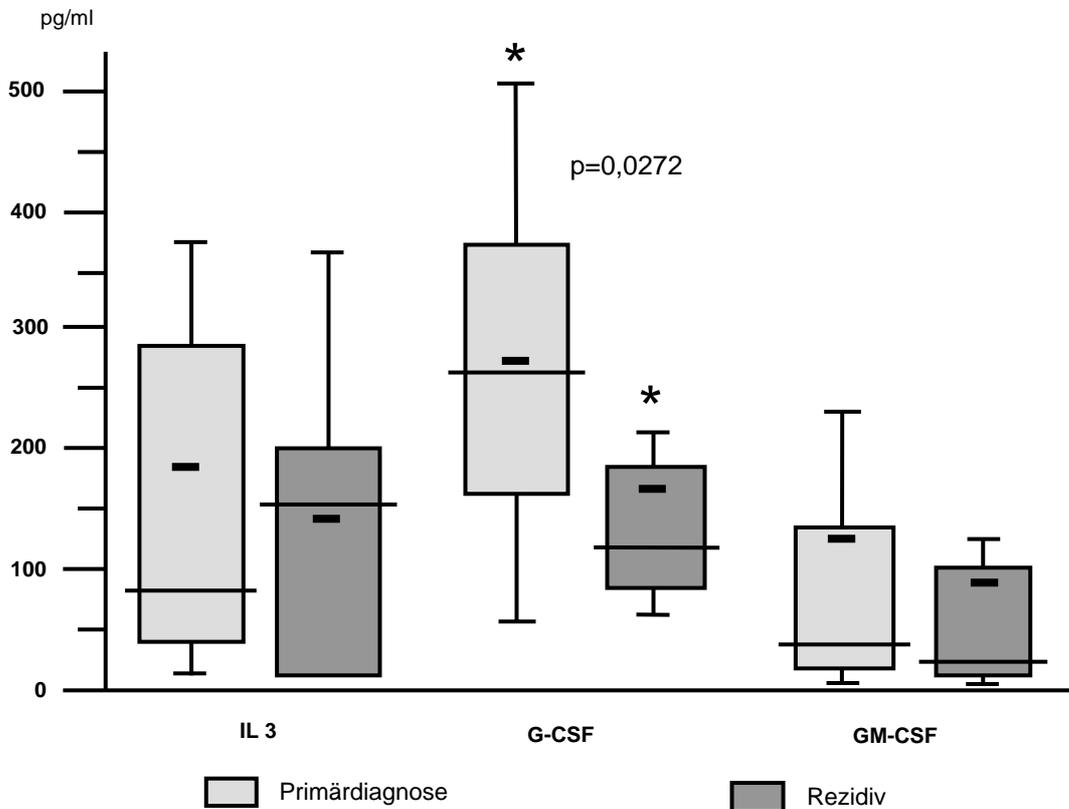


Abb. 8: Quantitative Zytokinproduktion der zytokinproduzierenden Fraktionen

4.8. Vergleich der AraC-Inkorporation und Modulation in beiden Gruppen

Analog zur Proliferationsaktivität wurden in beiden Gruppen die Inkorporation von ^3H AraC in die DNS und die Möglichkeiten zur erhöhten Aufnahme vermittelt der Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF bestimmt. Hinsichtlich der endogenen Aufnahme zeigte sich (Abb. 9), dass Blasten bei Primärdiagnose tendenziell mehr AraC inkorporierten (Median 0,02 pmol/ml, Mittelwert 0,02) als Blasten im Rezidiv (Median 0,01, Mittelwert 0,01), dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,12$ im Wilcoxon-Test [zweis.]).

Vergleich man hingegen die Stimulierbarkeit der Inkorporation von AraC durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren, so zeigte sich, dass die Aufnahme von AraC durch die Koinkubation mit G-CSF (Abb. 10) signifikant mehr gesteigert werden konnte in der Gruppe der Primärdiagnosen (Median 2,04fach, Mittelwert 3,5fach) als in der Gruppe der Rezidive (Median 1,3fach, Mittelwert 1,65fach). Der p-Wert lag im Wilcoxon-Test mit 0,0154 unterhalb des Signifikanzniveaus. Ein ähnlicher Effekt konnte mit GM-CSF nicht erreicht

werden (Abb. 11). Hier lag die Stimulierbarkeit der Blasten der Primärdiagnose mit einem Median von 1,25fach (Mittelwert 1,71fach) nicht signifikant ($p=0,18$) über dem Wert, der bei der Rezidivgruppe zu erreichen war (Median 0,9fach, Mittelwert 1,61fach).

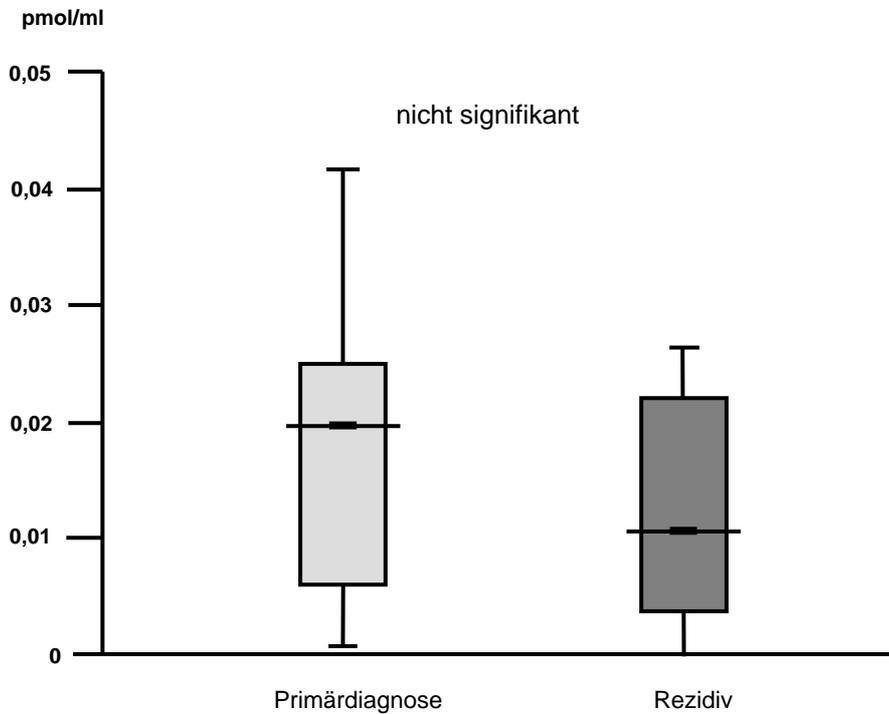


Abb. 9: Endogene AraC-Inkorporation von AML Blasten bei Primärdiagnose und im Rezidiv

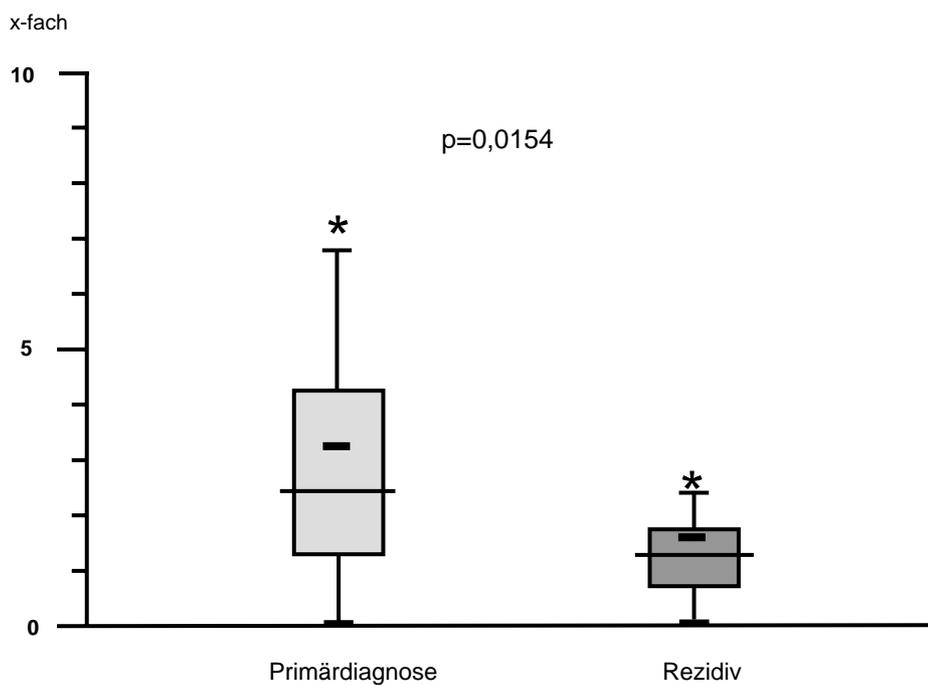
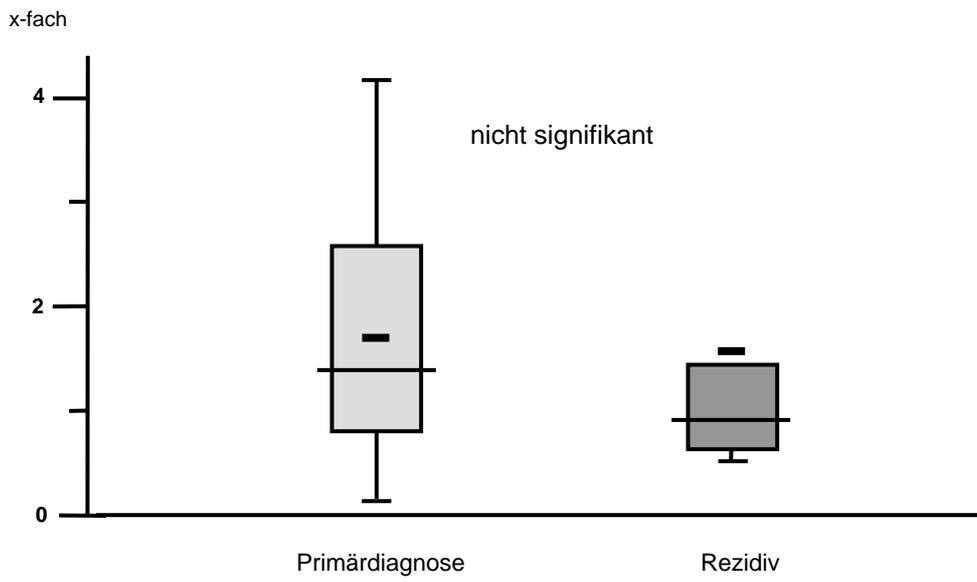


Abb. 10: Stimulation der AraC-Inkorporation durch G-CSF

Abb. 11: Stimulation der AraC-Inkorporation durch GM-CSF



5. DISKUSSION

Obwohl es sich bei einem Rezidiv einer AML per definitionem um das Wiederauftreten der ursprünglichen Erkrankung nach bereits erfolgter klinischer Remission handelt, zeigen die leukämischen Blasten, die im Rezidiv auftreten, einen funktionell anderen Phänotyp als die bei Erstdiagnose. Dies zeigt sich einerseits daran, dass trotz morphologischer Gleichheit der Blasten das Therapieansprechen im Rezidiv wesentlich schlechter ist, und andererseits weisen eine Vielzahl experimenteller Befunde darauf hin, dass leukämische Zellen im Rezidiv einer AML einen anderen Phänotyp exprimieren als solche bei initialer Erkrankung. Die klinisch wichtigste Eigenschaft ist das unterschiedliche Therapieansprechen einer AML im Rezidiv. Von einigen Autoren wird daher das Rezidiv *per se* schon als Indikator für eine schlechtere Prognose bezeichnet (Löwenberg, 2001). Die klinischen Daten für die Wahrscheinlichkeit des Erreichens einer CR und das mediane Überleben im Rezidiv sind in diesem Zusammenhang im Vergleich zur initialen Erkrankung eindeutig: Erfolgreiche Reinduktion einer CR ist in etwa 40 – 60 % aller rezidierten AMLs mittels Polychemotherapie oder KMT möglich, im Gegensatz dazu beträgt die CR-Rate bei *de-novo*-AMLs zwischen 60 – 80 % (Brown *et al.*, 1996, Webb, 1999). Selbst wenn im Rezidiv eine CR erreicht wird, ist die mediane Dauer mit etwa 7 Monaten erheblich kürzer als bei Erstdiagnose (Thalhammer *et al.*, 1996, Stoiser *et al.*, 2000). Dieses schlechte Therapieansprechen führt zu einem niedrigen medianen 2-Jahres-Überleben von 20 %. Für Patienten, die nach erfolgter Knochenmarkstransplantation ein Rezidiv erleiden, ist die Situation sogar noch schlechter.

Ausgehend von diesen klinischen Beobachtungen wurden zahlreiche Untersuchungen vorgenommen, um dieses schlechtere Therapieergebnis im Rezidiv einer AML zu erklären. Theoretisch sind zahlreiche Mechanismen von Therapieresistenz denkbar, und ebenso vielfältig waren und sind die Untersuchungen und Experimente, die durchgeführt worden sind.

Medikamenten-spezifische Resistenz: Einer der ersten Ansätze dieser Art war, die *ex vivo* Sensitivität leukämischer Blasten gegenüber AraC zu untersuchen. Während zahlreiche Versuche dieser Art an Proben vorgenommen wurden, die bei Primärdiagnose erhoben wurden, sind die Untersuchungen an rezidierten Blasten erheblich seltener. Hier ergab sich ein übereinstimmendes Bild, das die klinischen Beobachtungen bestätigte: die Blasten, die im Rezidiv untersucht wurden, zeigten höhere LC₅₀ Werte (Konzentrationen von AraC, die für das Abtöten von 50% der Blastenpopulation nötig sind) im Rezidiv als bei Primärdiagnose (te Boekhorst *et al.*, 1994). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine andere Arbeitsgruppe, die einen höheren D10 Wert (die Konzentration von AraC, die zu einer Reduktion auf 10 % der ursprünglichen Blastenmenge nötig ist) für AML Blasten im Rezidiv verglichen mit Blasten

bei Primärdiagnose nachwiesen (Nara *et al.*, 1992). Die Gründe für dieses schlechtere Ansprechen auf AraC wurden in den intrazellulären Metabolisierungswegen dieses Medikamentes gesucht. AraC unterliegt einer intrazellulären Phosphorylierung zu seinem Triphosphat, AraCTP, dem eigentlichen aktiven Metaboliten, welcher dann in die DNS eingebaut wird und über Strangbrüche letztendlich zur Apoptose führt. Ein wichtiger Schritt in dieser Kaskade ist die Phosphorylierung von AraC durch die Deoxycytidin-Kinase (cDK). Es wurde untersucht, ob sich bei rezidivierten AML-Blasten ein erhöhter Anteil von Mutationen dieses Enzyms mit Verlust der Funktion und somit einer geringeren intrazellulären Menge an AraCTP finden ließe. Dieser These ließ sich experimentell nicht bestätigen (van den Heuvel-Eibrink *et al.*, 2001). Andere, noch andauernde Studien beschäftigen sich daher mit anderen Splice-Varianten der cDK oder Hypermethylierungen der CGCG Box in der Promoter-Region des entsprechenden Genes (Veuger *et al.*, 2000, van den Heuvel-Eibrink *et al.*, 2001) mit entsprechendem Funktionsverlust oder geringerer Expressierung. Für andere, ebenfalls in der Therapie der AML verwendete Medikamente, an erster Stelle die Anthrazykline, wurden ebenfalls Untersuchungen vorgenommen, um die Resistenz rezidivierter Blasten gegenüber diesen Substanzen zu erklären. An erster Stelle der Resistenzmechanismen gegen diese Gruppe von Zytostatika steht die Expression des Multiple Drug Resistance 1 Gen (MDR1) und seines Proteins, dem p-Glycoprotein. Hierbei handelt es sich um ein ATP-abhängiges, transmembranöses Transporterprotein, das aktiv Anthrazykline, aber auch Vincaalkaloide oder Taxane, aus der Zelle befördert, und so die intrazelluläre Zytostatikakonzentration unter die Wirksamkeitsgrenze bringt (Knaust *et al.*, 2000). Dennoch ist die klinische Bedeutung dieses *in vitro* gut charakterisierten Resistenzmechanismus keineswegs eindeutig. Während einige Studien eine Expression dieses Genes als eigenständigen prognostischen Faktor werteten (Sato *et al.*, 1990, Marie *et al.*, 1991, Campos *et al.*, 1992), fanden andere Gruppen weder einen Zusammenhang zwischen Therapieansprechen noch zwischen erhöhter Expression im Rezidiv (Ito *et al.*, 1989, Kato *et al.*, 1991). Ein anderer, vielversprechender Ansatz ist die Untersuchung der Expression des *Multidrug Resistance-associated Protein* (MRP). Bei diesem Protein handelt es sich ebenfalls um ein ATP-abhängiges Transportermolekül, das *in vitro* zu einem MDR-Phänotyp beitragen kann. Hier ergab eine Studie, dass zum Zeitpunkt des Rezidives einer AML im Vergleich zur Primärdiagnose die Expression von MRP in mehr als 80 % der Patienten angestiegen war (Schneider *et al.*, 1995). Interessanterweise konnte eine andere Studie zeigen, dass in follow-up Untersuchungen die Entwicklung eines primär MRP negativen Phänotyps bei Primärdiagnose hin zu einem MRP positiven Phänotyp im Rezidiv möglich war (Karaszi *et al.*, 2001).

Inhibition des programmierten Zelltodes: Dennoch sind auch andere Mechanismen denkbar, die nicht zytostatika-spezifische Resistenz vermitteln, aber trotzdem die Induktion und

Ausführung des Zelltodes nach Chemotherapie beeinflussen. Es ist davon auszugehen, dass ein Großteil der Zytotoxizität chemotherapeutischer Substanzen über die Apoptose vermittelt wird. Veränderungen in dieser komplizierten Maschinerie könnten daher potentiell zu Störungen dieser Abläufe führen. Da diese Kaskade hochkomplex und an einigen Punkten redundant ist, wurden bislang nur entscheidende Knotenpunkte untersucht, deren Störungen nicht zu einer Kompensation durch parallele Schritte führen. Ein solcher kritischer Punkt ist das Protein bcl2, dessen Funktion in einer Verhinderung der Apoptoseinduktion liegt. Eine Überexpression dieses Proteins führt so zu einer Resistenz gegenüber Zytostatika. Tatsächlich wurde in einer Studie die Beobachtung gemacht, dass Blasten im Rezidiv einer AML eine höhere Expression von bcl2 mRNA aufwiesen als Blasten bei Primärdiagnose (Karakas *et al.*, 1998). Ein weiterer, nicht redundanter Schritt in der Apoptoseinduktion ist das Protein p53. Auch wenn Mutationen mit Verlust der Funktion dieses Proteins und damit inhibierter Apoptose bei der AML mit 10 % eher selten sind, so sind doch die Fälle, bei denen ein solcher Defekt vorliegt, mit einer signifikant schlechteren Prognose behaftet (Christiansen *et al.*, 2001). Dennoch fand sich bei diesem Protein kein signifikanter Zusammenhang mit der Entwicklung eines Rezidives (Nakano *et al.*, 1999). Proteine der STAT-Familie (Signal transducers and activators of transcriptions) spielen ebenfalls eine Rolle bezüglich der Apoptose. C-terminal-verkürzte Formen dieser Proteine (sogenannte STAT β -Formen) interagieren mit nichtmutierten α -Formen und inhibieren ihre Wirkung. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass im Rezidiv einer AML die Exprimierung dieser STAT β -Formen deutlich erhöht ist (Xia *et al.*, 2001).

Immunologische Toleranz: Bei Patienten im Rezidiv nach allogener Knochenmarkstransplantation ist davon auszugehen, dass die AML-Blasten, welche die intensive, myeloablative Konditionierungstherapie, bestehend aus Polychemotherapie und Radiatio, überlebt haben, einen besonders zytostatika-resistenten Phänotyp aufweisen müssen. Zum anderen aber zeigt sich bei diesen rezidierten Blasten ein verringertes Potential zur Stimulation antileukämischer Effektorzellen des Spenders und damit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, zytotoxischen Zellen zu entkommen. Es gibt Hinweise, dass diese Entwicklung einer immunologischen Toleranz auf zwei verschiedenen Wegen erreicht wird: Leukämische Blasten verlieren einerseits die Fähigkeit, zytotoxische Zellen zu stimulieren. Dies geschieht durch eine veränderte Expression der für die Identifikation einer Zelle als fremd wichtigen MHC Klasse I und Klasse II Moleküle, sowie der für die Erkennung weiterhin wichtigen kostimulatorischen Moleküle, in besonderem Maß des Proteins B7.1. Ein weiterer Mechanismus besteht darin, dass trotz hinreichender Erkennung des Blasten als fremd die von der zytotoxischen Zelle eingeleiteten Abwehrmechanismen nicht mehr ausreichen, den Blasten zu töten (Dermime *et al.*, 1997). Als wahrscheinliche Gründe kommen Defekte analog der Apoptosedefizienz in Frage sowie Defekte in der Exprimierung

von Rezeptoren (FAS), die bei Bindung an ihren Liganden in der Zelle den programmierten Zelltod induzieren.

Zell-Zyklus-abhängige Mechanismen: Da ein Teil der in der Therapie der AML benutzten Chemotherapeutika, insbesondere die Antimetabolite, seine überwiegende Wirkung in der S-Phase entfaltet, sind Zellzyklus und Proliferation leukämischer Blasten ebenfalls von Interesse. Der häufig verwendete klonogene Assay ist jedoch wenig hilfreich zur Beurteilung von Proliferation und Zellzyklus. Interessanter in diesem Kontext sind daher Arbeiten, die die Proliferation mittels DNS-Syntheseleistung einer Zelle oder Anzahl der S-Phasen der Gesamtpopulation der AML-Blasten erfassen. Während negative Korrelationen zwischen der Anzahl der S-Phasen und Überleben einerseits nachgewiesen wurden (Vidriales *et al.*, 1995), zeigten andere Arbeiten eine positive Korrelation zwischen hoher Syntheseleistung und höherer Wahrscheinlichkeit des Erreichens einer CR (Riccardi *et al.*, 1986, Giordano *et al.*, 1993). Eine Arbeit (Braess *et al.*, 2001) zeigt, dass günstige Karyotypen eine hohe Proliferation verglichen mit prognostisch ungünstigen Karyotypen haben und mit der Erkenntnis, dass hohe Proliferation mit einer hohen AraC-Inkorporation in die DNS korreliert ist, eine mögliche Erklärung für den initial klinisch besseren Verlauf dieser Entitäten liefert. Für die Inversion (16) wurde diese Erkenntnis mit experimentellen Daten bestätigt, die zeigten, dass Blasten mit einem solchen Karyotyp eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cytarabin *in vitro* besaßen (Tosi *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu diesen Karyotypen inkorporierten prognostisch ungünstige Karyotypen wesentlich weniger AraC, was auch mit der klinischen Beobachtung einer geringeren Effektivität der zytostatischen Therapie bei dieser Gruppe korreliert. Als eine Erklärungsmöglichkeit für eine erhöhte Resistenz gegenüber AraC im Rezidiv kommt somit eine verminderte Proliferationsaktivität in Frage. In der Tat fanden sich bei der Untersuchung der proliferativen Aktivität im Rahmen dieser Arbeit im Rezidiv eine deutlich verminderte Proliferationsaktivität verglichen mit der bei Primärdiagnose. Da unterschiedliche Karyotypen sich signifikant in ihrer EPA unterscheiden, könnte eine ungleiche Verteilung in beiden Gruppen möglicherweise schon Unterschiede in der EPA erklären. Daher ist die Tatsache wichtig, dass die Verteilung der Karyotypen in beiden Gruppen nicht statistisch signifikant unterschiedlich war. Diese Verteilung steht im Gegensatz zur klinischen Erfahrung, die ein höheres Auftreten ungünstiger Karyotypen im Rezidiv erwarten lässt. Dieser Unterschied zwischen erwartetem Ergebnis und tatsächlichem Prozentsatz ist am ehesten durch einen „Sampling bias“ bedingt. Dieser lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass bei Patienten, bei denen bereits initial ein ungünstiger Karyotyp bestand, eine neuerliche zytogenetische Untersuchung im Rezidiv für die behandelnden Ärzte nicht indiziert schien, da es unwahrscheinlich war, durch eine weitere Analyse einen relevanten Informationsgewinn zu erzielen. Ein Vergleich der beiden Kollektive hinsichtlich der Proliferationsaktivität ist somit gegeben, so dass als die

wahrscheinlichste Grundlage für die unterschiedliche EPA das Krankheitsstadium (Primärdiagnose/Rezidiv) angenommen werden muß. Auch wenn die AraC-Inkorporation bei den rezidierten Blasten nicht signifikant niedriger war, so neigten diese doch zu einer tendenziell geringeren Aufnahme, was ihre erhöhte Resistenz gegenüber AraC zumindest zum Teil erklären könnte.

Die experimentellen Daten zur Zytostatikaresistenz im Rezidiv bestätigen somit die klinische Beobachtung und erklären so zumindest zum Teil die höhere Resistenz dieser malignen Klone gegenüber der Reinduktion. Die Frage hingegen, die bisher nicht eindeutig beantwortet wurde, ist, auf welchem Weg diese Blasten die Fähigkeit zur Chemotherapieresistenz erworben haben. Es existieren verschiedene Möglichkeiten für diesen evolutionären Prozess.

Erstens ist denkbar, dass sich durch die äußeren Einflüsse, in diesem Falle die Induktionstherapie, direkt die Eigenschaften einzelner Zellen ändern. Dieser Mechanismus ist *in vitro* am Beispiel des MDR gezeigt worden. Setzt man eine Zellkultur langsam ansteigenden Konzentrationen von Zytostatika, beispielsweise Daunorubicin aus, so steigern die Zellen über mehrere Generationen hinweg die Expression von des p-Glykoproteins (Schneider *et al.*, 1995, Knaust *et al.*, 2000). Inwieweit dieser Verhalten jedoch überhaupt *in vivo* eine Rolle spielt oder ob es auch bei anderen Resistenzmechanismen vorkommt, ist noch nicht geklärt worden.

Zweitens gilt als gesichert, dass Chemotherapie einen mutagenen Effekt hat, der die bereits ohnehin bestehende chromosomale Instabilität der leukämischen Zellen weiter verstärkt. Die Induktionstherapie selbst wäre in diesem Falle ein Grund für den veränderten Karyotypen im Rezidiv (Naoe *et al.*, 2000).

Drittens besteht Übereinstimmung bezüglich der Tatsache, dass es sich bei der AML, die sich bei Primärdiagnose präsentiert, um keine einheitliche, homogene Population handelt (Kaufmann *et al.*, 1994, Knaust *et al.*, 2000). Auch wenn über die Anzahl der Subpopulationen in der AML keine genauen Angaben gemacht werden können, so werden doch bei soliden Tumoren in einem vorliegenden Malignom bis zu hundert verschiedener, therapieresistenter Klone angenommen. Im Rahmen der Induktionstherapie werden daher die für die Chemotherapie potentiell relativ empfänglicheren Blasten abgetötet, wohingegen solche Subpopulationen mit einem resistenteren Phänotyp diesen Selektionsprozeß überleben und nach einem variablen Zeitraum das Rezidiv verursachen können. Die Blastenpopulation hätte somit einen evolutionären Prozess durchlaufen, der es für sie wahrscheinlicher macht, auch eine Reinduktionstherapie zu überleben, was die bereits geschilderten klinischen Konsequenzen (erhöhte Rate therapieresistenter Erkrankungen im Rezidiv) erklären würde. Abbildung 12 gibt einen Überblick über die möglichen Relationen zwischen AML Klonen bei Erstdiagnose und im Rezidiv sowie über die zugrunde liegenden

Selektionsprozesse. Als letzter Punkt in der Abbildung aufgeführt ist die Entstehung einer sekundären AML nach der Behandlung einer de-novo AML. Dies ist zwar kein Rezidiv im eigentlichen Sinne, die Unterscheidung ist klinisch jedoch nicht immer sicher möglich.

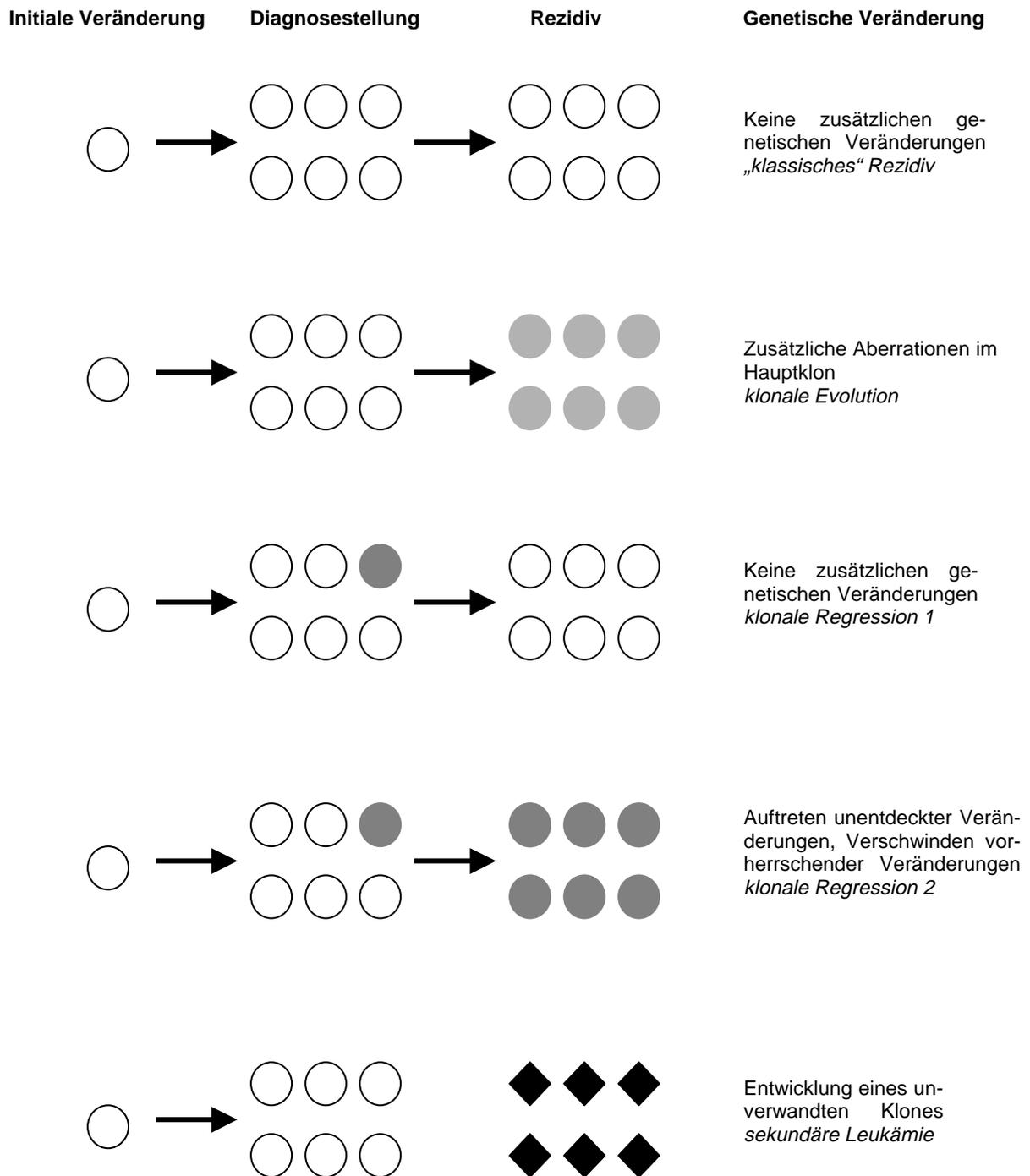


Abb. 12: Mögliche Mechanismen der Rezidiventstehung

Ob und welche dieser Ursachen überhaupt allein verantwortlich für die Rezidiventstehung ist, kann mit letzter Sicherheit nicht geklärt werden. Dennoch muss man davon ausgehen, dass einer oder mehrere dieser Mechanismen ihren Teil zur Entstehung des Rezidivs in der AML beitragen. So kann man sich also die Entstehung eines Rezidives folgendermaßen vorstellen: Unter der Zytoreduktion des leukämischen „Bulks“ überlebt ein Subklon die Induktionstherapie mit Hilfe eines oder mehrerer der oben genannten Resistenzmechanismen, die er a) durch den mutagenen Einfluss der Therapie oder aber b) schon prätherapeutisch, also a priori besessen hat und bleibt, obwohl klinisch in den allermeisten Fällen unerkant, weiterhin im Knochenmark des Patienten vorhanden. In diesem Zustand, als Minimal Residual Disease bezeichnet, ist bis auf wenige Ausnahmen, nämlich solche, bei denen sich mittels PCR ein spezifisches Transkript, beispielsweise das AML1 / ETO Fusionstranskript, oder aber ein pathologisches Expressionsmuster von Oberflächenmarkern nachweisen lässt, der Nachweis der Blastenpersistenz unmöglich. Der Patient verbleibt klinisch über einen variablen Zeitraum im Stadium der CR. So lässt sich bei manchen Patienten, obwohl sie sich in Langzeitremission befinden, die Persistenz der Translokation (8;21) oder aber die Inversion (16) nachweisen (Webb, 1999). Interessanterweise scheint diese Population, trotz der initial höheren Proliferationsrate, den diese Karyotypen aufweisen, in dieser Situation eine langsame Wachstumskinetik zu zeigen. Dieses könnte, aus bereits genannten Gründen, eine der Ursachen für ihr Überleben sein. In dieser Population leukämischer Blasten können sich nun erneut Subklone entwickeln, einerseits bedingt durch die schon primär bestehende chromosomale Instabilität und andererseits durch exogene Faktoren mit weiterem mutagenem Potential, beispielsweise durch die Konsolidierungstherapie. Sollte einer dieser Klone wieder die Fähigkeit zu stärkerer Proliferation gewinnen, wird er sich, bedingt durch den Selektionsvorteil, den dieses Merkmal ihm in dieser Situation verschafft, weiter vermehren, was dann letztendlich zum klinisch manifesten Rezidiv führt.

Das Ausmaß der Proliferation ist auch bei der AML nach wie vor einerseits von der individuellen Empfindlichkeit der Blasten gegenüber hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und andererseits von der Bereitstellung dieser Faktoren abhängig. Dies ist in früheren Arbeiten gezeigt worden (Salem *et al.*, 1989, Williams *et al.*, 1990, Löwenberg und Touw, 1993), und konnte auch in dieser Arbeit für AML-Blasten bei Primärdiagnose bestätigt werden. Eine gesteigerte Proliferation kann der Grund für ein Rezidiv werden, aber sie ist auch deshalb von Bedeutung, weil ein autonomes Wachstum *in vitro* mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Als Grund für autonome Proliferation wird meist die autokrine Stimulation der Blasten angesehen, also die suffiziente Produktion benötigter Wachstumsfaktoren durch die Blastenpopulation selbst (Reilly *et al.*, 1989, Löwenberg und Touw, 1993). Es ist jedoch noch ein anderer Mechanismus denkbar, auf dem die

Unabhängigkeit von Blasten gegenüber exogen zugeführten hämatopoetischen Wachstumsfaktoren erreicht werden kann. Prinzipiell wird die Wirkung eines Wachstumsfaktors über die Bindung an seinen spezifischen Rezeptor vermittelt, welcher nach Aktivierung intrazelluläre Signalkaskaden initiiert. Eine durch genetische Aberrationen bedingte konstitutionelle, also dauerhafte, Aktivierung eines solchen Rezeptors oder aber eines Schlüsselenzyms in der nachfolgenden, intrazellulären Signaltransduktion macht die Zelle jedoch unabhängig von der externen Aktivierung durch Rezeptorliganden wie Wachstumsfaktoren. Solche Mechanismen sind auch bei der AML beschrieben worden, beispielsweise die *flt3*-Rezeptormutationen, ein Rezeptor für ein Wachstumshormon auf Stammzellebene. Interne Tandemduplikationen in diesem Rezeptor werden bei ca. 20 % aller AML-Patienten gefunden und führen zu einer konstitutionellen Aktivierung des Rezeptors sowie der nachfolgenden Signalkaskade (STAT und MAP-Kinasen), welche unter anderen die Proliferation kontrollieren. Mit dieser Rezeptormutante transfizierte Zelllinien zeigen eine ungehemmte Proliferation (Tse *et al.*, 2000, Hayakawa *et al.*, 2000) *in vitro*. Diese Experimente belegen, dass solche Vorgänge in der Pathogenese der AML existieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Analyse der Produktion und des stimulatorischen Potentials von Wachstumsfaktoren von leukämischen Blasten bei Primärdiagnose und im Rezidiv einer AML durchgeführt. Dabei fand man bei gleichgebliebener Produktion von IL-3 und GM-CSF eine signifikant geringere Produktion von G-CSF im Rezidiv. Dieser Unterschied erstreckte sich sowohl auf die Prozentzahl der Blasten, die G-CSF in nachweisbaren Mengen herstellen, als auch auf die quantitative Menge an sezerniertem G-CSF der produzierenden Fraktion. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass G-CSF von Blasten im Rezidiv nur mehr in geringerem Ausmaß benötigt wird als von Blasten bei Primärdiagnose. Dieser Verdacht wird dadurch erhärtet, dass auch die Stimulierbarkeit durch G-CSF im Rezidiv zwar nach wie vor vorhanden war, jedoch signifikant abgenommen hatte. In der Literatur findet sich kein erhöhter Anteil an konstitutionell aktivierten Proteinen, die an G-CSF-gekoppelten Signaltransduktionswegen beteiligt sind (dies sind insbesondere die JAK-STAT-Proteine) im Rezidiv. Bemerkenswert ist jedoch die Entdeckung, dass zwar nicht die konstitutionell aktivierten STAT-Proteine im Rezidiv erhöht sind, wohl aber C-terminal verkürzte Formen (sogenannte STAT β -Formen) dieses Proteins (Xia *et al.*, 2001). Zielgene von STAT sind nicht nur in die Regulierung der Apoptose, sondern auch der Differenzierung und in erster Linie in der Proliferation involviert. Die β -Formen haben sich unter experimentellen Bedingungen in gesunden hämatopoetischen Progenitoren als Inhibitoren der Wildtyp-Formen erwiesen, so dass eine ähnliche Funktion auch bei der AML vermutet wird. Dies könnte als Erklärung der geringeren Stimulierbarkeit der Rezidiv-Blasten durch G-CSF dienen.

Obwohl die Produktion von GM-CSF im Rezidiv ebenso wie die Produktion von IL-3 gegenüber der Primärdiagnose nicht signifikant verändert war, hat die Stimulierbarkeit durch GM-CSF im Rezidiv doch ebenfalls signifikant abgenommen. Betrachtet man nochmals die physiologischen Zielzellen der drei Wachstumsfaktoren, so stellt man fest, dass die Ausdifferenzierung der Zielzellen, von IL-3 über GM-CSF und schließlich G-CSF von zuerst pluripotenten Stammzellen bis hin zu Granulozyten immer weiter zunimmt. Es drängt sich so der Verdacht auf, dass Blasten im Rezidiv einen primitiveren, funktionell näher an der Progenitorzelle gelegenen Phänotyp aufweisen. Tatsächlich war in einer Studie der Anteil der Blasten mit Selbsterneuerungskapazität, ein Merkmal, welches nur leukämische „Stammzellen“ aufweisen, erhöht (Nara *et al.*, 1992).

Die Fähigkeit der Wachstumsfaktoren, die Proliferation von AML-Blasten zu stimulieren, ist jedoch auch von großem klinischen Interesse, da Wachstumsfaktoren in der Behandlung der AML, in erster Linie zur Verkürzung der Neutropeniedauer nach Chemotherapie, eingesetzt werden. Ihre Applikation war jedoch aufgrund ihrer proliferationsfördernden Eigenschaften *in vitro* keineswegs unumstritten, da man befürchtete, durch Gabe von G-CSF oder GM-CSF ein rascheres Wachstum der Blasten, Hyperproliferation oder sogar Verkürzungen der Remissionszeiten zu induzieren (Löwenberg und Touw, 1993, Ohno, 1993). Für G-CSF ist man mittlerweile übereinstimmend der Meinung, dass die Applikation sicher ist und nicht zu den vorgenannten Komplikationen führt (Ohno, 1998). Ähnliches lässt sich auch von GM-CSF sagen, zumindest wenn es in Hefen rekombinant hergestellt wird. Jedoch zeigte eine Studie, die den Einsatz von rekombinant aus *E. coli* gewonnenem GM-CSF während der Induktionstherapie untersuchte (Zittoun *et al.*, 1996), für diesen Wachstumsfaktor ein etwas anderes Ergebnis. Diese Studie legte den Verdacht nahe, das aus *E. coli* hergestelltes GM-CSF, appliziert im Anschluss an die Chemotherapiezyklen in den hypoplastischen Phasen des Knochenmarks, eventuell doch die schnellere Erholung der AML-Blasten stimulieren könnte, da sich bei der Gruppe, die GM-CSF erhalten hatten, signifikant inferiore CR-Raten bei einem erhöhten Anteil persistierender Leukämien zeigten (Tab. 2)

Studie	Wachstumsfaktor	Patienten	CR Raten vs. Kontrolle	Überlebensvorteil
Ohno <i>et al.</i> , 1990	G-CSF	98	50 vs. 36	Nicht signifikant
Rowe <i>et al.</i> , 1995	GM-CSF	193	60 vs. 44	Signifikant
Stone <i>et al.</i> , 1995	GM-CSF	388	51 vs. 54	Nicht signifikant
Dombret <i>et al.</i> , 1995	G-CSF	172	70 vs. 47, p < 0,01	Nicht signifikant
Zittoun <i>et al.</i> , 1996	GM-CSF	53	48 vs. 79, p < 0,01	Nicht signifikant

Tabelle 2: Klinische Studien mit Wachstumsfaktoren nach Induktionstherapie

Der klinische Einsatz der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren erfolgt aber auch aus einem anderen Grund: *in vitro* konnte gezeigt werden, dass die AraC-Inkorporation durch die Gabe von G-CSF und GM-CSF gesteigert werden konnte. Hier scheinen vor allen Dingen zwei Mechanismen verantwortlich zu sein. Zum einen erhöhen G-CSF und GM-CSF die Proliferationsrate sich bereits aktiv teilender leukämischer Blasten (Jahns-Streubel *et al.*, 1997), zum anderen vermögen sie primär ruhende Zellen in die S-Phase zu überführen und somit die Toxizität des S-Phase spezifischen Zytostatikums AraC zu erhöhen (Bettelheim *et al.*, 1991, Hiddemann *et al.*, 1992). Diese experimentellen Befunde dienen als Rationale für den klinischen Einsatz dieser Wachstumsfaktoren zur Sensibilisierung leukämischer Blasten gegenüber Zytostatika, ein Vorgang, der als Priming bezeichnet wird (Büchner *et al.*, 1997). Ein dritter Mechanismus besteht darin, die intrazelluläre AraCTP-Konzentration mittels Aktivierung der dCK durch Wachstumsfaktoren zu erhöhen. Dieses Verfahren wird als Modulation bezeichnet (Braess *et al.*, 2000). Bisher konnte in keiner klinischen Studie ein signifikant positiver Effekt des Primings durch die Applikation von Wachstumsfaktoren vor und während der Induktion bezüglich des Langzeitüberlebens aufgezeigt werden (Hansen *et al.*, 1995, Zittoun *et al.*, 1996), wie in Tabelle 3 gezeigt wird.

Studie	Wachstumsfaktor	Patienten	CR Raten vs. Kontrolle	Überlebensvorteil
Ohno <i>et al.</i> , 1994	G-CSF	58	50 vs. 37	Nicht signifikant
Heil <i>et al.</i> , 1995	GM-CSF	79	81 vs. 79	Nicht signifikant
Zittoun <i>et al.</i> , 1996	GM-CSF	304	56 vs. 57	Nicht signifikant

Tabelle 3: Klinische Studien mit Wachstumsfaktoren als Priming

Auch in dieser Arbeit konnte in Übereinstimmung mit diesen früheren Arbeiten gezeigt werden, dass sich bei Primärdiagnose der Effekt der AraC-Inkorporation durch den die Koinkubation mit G-CSF und GM-CSF *in vitro* signifikant steigern ließ. Ein anderes Bild zeigte sich jedoch bei den Blasten im Rezidiv. Hier konnte die Inkorporation von AraC in die DNS durch die Wachstumsfaktoren nicht wesentlich modifiziert werden, und dieser Unterschied wurde im Vergleich mit den Blasten bei Primärdiagnose noch deutlicher. Dieser Vergleich ergab einen signifikant schlechteren Primingeffekt im Rezidiv für G-CSF. Im Bezug auf die Klinik lässt dies, unter entsprechendem Vorbehalt, folgendes erwarten: Da selbst für einen ausgeprägten *in vitro* Effekt wie die Stimulation des AraC-Einbaus in die DNS und die damit verbundene gesteigerte Zytotoxizität durch G-CSF bei de-novo AML-Blasten *sich in vivo* kein wesentlicher positiver Effekt feststellen ließ, ist im Falle des auch *in vitro* ohnehin schon abgeschwächten Effekt der Stimulation der AraC-Inkorporation in die DNS im Rezidiv

wahrscheinlich auch kein Erfolg durch die Strategie des Primings zu erwarten. Diese Aussagen müssen jedoch im Rahmen prospektiver klinischer Studien beantwortet werden. Aus klinischer Sicht erscheinen diese Befunde von Interesse, geben sie doch eine mögliche Erklärung für die geringere Wirksamkeit S-Phasen-spezifischer Zytostatika in der Behandlung der rezidierten AML. Auch wenn die AraC-Inkorporation im Rezidiv nicht signifikant erniedrigt war, so war die Tendenz dahin doch zu erkennen, und ist durch die starke Korrelation zwischen Proliferation und AraC-Einbau in die DNS hinreichend erklärt. Dass der Einbau dieses Zytostatikums in die DNS und Zelltod ebenfalls eng korrelieren, gibt eine rationale Erklärung für seine geringere Effizienz im Rezidiv. Hinzu kommt, dass über AraC hinaus fast alle anderen ebenfalls in der Induktionstherapie der AML verwendeten Zytostatika ihre größte Wirksamkeit in der S-Phase entfalten. Hierzu gehören besonders die Inhibitoren der Topoisomerase II, also beispielsweise die Anthrazykline oder Epipodophyllotoxine. Da also diese Medikamente ebenfalls proliferationsabhängig sind, ist ihre geringere Effizienz auch durch die verringerte Proliferation der rezidierten AML-Blasten zu erklären.

Als Alternative zu Zell-Zyklus-abhängigen Zytostatika bieten sich andere, in der Klinik bereits etablierte Chemotherapeutika an. Es handelt sich dabei in erster Linie um Alkylanzien wie Cyclophosphamid oder platinhaltige Präparate (Cisplatin, Carboplatin). Experimentelle Ansätze wie der AntiCD33 monoklonale Antikörper als Transporter für das Zytostatikum Calicheamicin (Gemtuzumab Ozogamicin) (Larson, 2001) scheinen ebenfalls aufgrund ihrer Unabhängigkeit vom Zellzyklus vielversprechend. Da ihr Wirkmechanismus nicht in gleicher Weise S-Phase gebunden ist, sollte ihre Wirksamkeit gegenüber AML-Blasten, besonders im Rezidiv, im Rahmen experimenteller Arbeiten überprüft werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl sich die Behandlungserfolge der AML in letzten Jahrzehnten mit Remissionsraten von 60 – 80 % und einem 5-Jahresüberleben von >35 % deutlich verbessert haben, beträgt das mediane Überleben aller *de-novo* AMLs noch immer lediglich 9 – 15 Monate. Der Hauptgrund für das Therapieversagen ist noch immer das Rezidiv, welches etwa in 50 % aller Patienten auftritt, die initial eine CR erreicht haben. Im Rezidiv sind die Remissionsraten mit 40 – 60 % ebenso wie das 2-Jahresüberleben mit 20 % deutlich geringer. Die Gründe für dieses schlechtere Therapieansprechen sind nach wie vor nicht vollständig geklärt.

Da die in der Induktionstherapie verwendeten Zytostatika - in erster Linie Cytarabin und ein Anthrazyklin - ihre größte Wirksamkeit in der S-Phase des Zellzyklus entfalten, besteht ein enger Zusammenhang zwischen Proliferation und Effektivität dieser Zytostatika. Neuere Arbeiten zeigten, dass prognostisch günstige zytogenetische Subgruppen der AML eine höhere Proliferation besaßen als ungünstige Gruppen und dass mit dieser erhöhten Proliferation auch ein verbessertes initiales Therapieansprechen verbunden war. Gleichzeitig war bei diesen Patienten auch die Inkorporation von AraC in die DNS erhöht. Da dieser Parameter in enger Weise mit dem Zelltod korreliert, gibt diese Entdeckung eine mögliche Ursache für die bessere therapeutische Effektivität der S-Phase-spezifischen Zytostatika in diesen Gruppen.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob AML-Blasten im Rezidiv eine verminderte Proliferationsaktivität aufwiesen und somit einen Selektionsvorteil gegenüber rasch proliferierenden Blasten in der Induktionstherapie besaßen. Ebenfalls wurde die Inkorporation radioaktiven Cytarabins in die DNS bestimmt. Weiterhin wurden zur besseren biologischen Charakterisierung die Stimulierbarkeit der Proliferationsaktivität und der AraC-Inkorporation mit G-CSF und GM-CSF sowie die Produktion der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren IL-3, G-CSF und GM-CSF der Blasten bei Primärdiagnose und im Rezidiv bestimmt.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit Knochenmarksaspirat und peripheres Blut von 58 Patienten untersucht, wobei sich 43 Patienten im Initialstadium ihrer Erkrankung und 15 Patienten im Rezidiv befanden. Die Blasten, die bei Primärdiagnose untersucht wurden, zeigten eine signifikant höhere endogene mediane Proliferationsaktivität (EPA) von 0,41 pmol/10⁵ Zellen als Blasten im Rezidiv mit einer EPA von 0,21 pmol/10⁵ Zellen. Die Stimulierbarkeit der PA betrug bei Primärdiagnose mit G-CSF das 3,84fache und im Rezidiv das 1,84fache, und für GM-CSF das 1,19fache sowie das 1,04fache. Beide Unterschiede waren statistisch signifikant. Die AraC-Inkorporation war im Rezidiv tendenziell niedriger, erreichte aber keine statistische Signifikanz. Sie war jedoch bei Blasten der Primärdiagnose

signifikant besser steigerbar als im Rezidiv. Bezüglich der Zytokinproduktion zeigte sich eine signifikant geringere Produktion von G-CSF der Blasten im Rezidiv.

Diese Daten decken ein unterschiedliches biologisches Verhalten von AML-Blasten im Rezidiv auf. Eine Erklärung für diesen Unterschied besteht in der möglichen Selektion resistenter Blasten während der Induktionstherapie, welche diese überleben und nach einem variablen Zeitraum das Rezidiv verursachen. Die geringere Proliferation bietet auch eine mögliche Erklärung für das schlechtere Therapieansprechen im fortgeschrittenen Krankheitsstadium mit S-Phase-spezifischen Zytostatika.

Da sich die Inkorporation von AraC auch durch Wachstumsfaktoren nicht signifikant steigern ließ, sollten weiter experimentelle Studien klären, ob weniger zellzyklusabhängige Zytostatika eine größere Effektivität im Rezidiv besitzen.

7. ANHANG

7.1. ALLGEMEINE PATIENTENDATEN

Name, Vorname	Material KM/PB	Geburtsdatum	Alter	Geschlecht m/w	Diagnosedatum	FAB Subtyp	prim/ sek Leukämie	de novo / Rezidiv	Chromosomale Veränderung
F. K.	1	12.10.24	74	1	24.11.98	M2	1	1	46,XY
M. M.	1	05.05.24	74	2	10.12.98	M2	1	1	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[16];46,XX[4]
S. B.	1	04.08.75	23	2	15.12.98	M1	1	1	46,XX
W. S.	2	02.06.63	35	1	01.01.99	M4	1	1	46,XY
A. O.	1	30.05.56	42	2	06.01.99	M2	1	1	46,XX
C. W.	1	29.09.55	43	2	05.01.99	M4	1	1	46,XX
J. P.	1	04.01.34	65	1	06.01.99	M4	1	1	46,XY
G. S.	2	14.12.29	69	1	15.01.99	M4	1	1	46,XY
R. B.	1	17.11.24	74	2	19.01.99		2	1	46,XX,del(7)(q11q33)[19], 46XX[1]
E. H.	1	29.01.21	77	2	25.01.99	M3	1	1	46,XX
M. H.	1	03.05.59	39	2	02.02.99	M4eo	1	1	46,XX,inv(16)(p13q22)[20]
M. R.	2	28.12.24	74	2	06.02.99	M1	1	1	46,XX
J. H.	1	14.01.40	59	1	09.02.99	M1	1	1	46,XY
K. M.	1	02.05.39	59	1	09.02.99	M4	1	1	46,XY
S. M.	2	01.12.43	55	2	11.02.99	M3	1	1	46,XX
M. B.	1	26.07.60	38	1	12.02.99	M2	1	1	46,XY
A. W.	2	17.12.49	49	2	18.02.99	M5b	1	1	47,XX,t(11;17)(q23;q25),+20[28] 51XX,+5+6,t(11;17)(q23;q25),+19,+20,+21[4]; 4,XX [3]
K. G.	1	06.06.28	70	1	26.02.99	M1	1	1	46,XY
G. S.	2	11.06.32	66	1	26.02.99	M1	1	1	46,XY
F. N.	2	25.08.29	69	1	11.03.99	M5	2	1	46,XY,del(11)(q23q2)[14];46,XY[11]
O. J.	2	17.09.20	78	1	13.03.99		1	1	46,XY,inv(3)(q21q26),del(7)(q22)[26]
H. T.	1	07.05.55	43	1	18.03.99		1	1	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[20]
R. M.	2	07.08.32	66	1	19.03.99	M3v	1	1	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[20]
H. W.	1	26.04.35	63	1	24.03.99	M1	1	1	46,XY
W. L.	1	28.03.62	37	1	16.04.99	M2	1	1	46,XY
H. H.	2	20.09.34	64	1	09.06.99	M2	1	1	46,XY
H. K.	1	18.12.22	76	1	22.06.99	M5b	1	1	46,XY
C. S.	1	15.04.39	60	2	22.06.99	M4	1	1	46,XX
S. W.	1	26.01.40	59	2	12.07.99		2	1	46,XX
A. B.	1	21.02.82	17	1	13.07.99	M4	1	1	47,XY,+13,der(16)ins(16;X)(p13;??)[6]; 48, idem, +13[1] 50, idem,+7,+13,+19[2]; 51, idem, +7,+13,+19,+mar [2], 46,XY[9]
J. R.	2	12.05.22	77	2	13.07.99	M4	1	1	46,XX [25]
E. E.	1	09.01.17	82	2	28.07.99	M2	1	1	49,XX,+X,der(4)t(4;18)(q24;q?),+der(4)t(4;18)(q24;q?),del(5)(q13q31), -7,+8,+10, der(12)t(4;12)(q24;p13),der(16)t(11;16)(?)?21, der(18)del(18)(p11)del(18)(q11)[15]
W. M.	1	08.07.33	66	1	03.08.99	M4	1	1	46,XY
J. S.	1	17.02.55	44	2	04.08.99	M2	1	1	46,XX
A. B.	1	20.01.38	61	1	04.08.99	M1	1	1	46,XY
G. B.	2	04.11.53	45	2	18.08.99	M1	1	1	45,XX,t(3;3)(q21;q26),t(5;17)(q31;q25),-7[10] 45, idem, del(11)(q23)[6]; 45,idem, del(1)(p34.1)[5]; 46,XX[1]
R. K.	1	21.06.31	68	2	24.08.99	M5b	1	1	46,XX
H. G.	1	30.11.36	62	1	25.08.99	M2	1	1	46,XY
E. L.	1	16.01.67	32	2	03.08.99		2	1	46,XX
W. H.	1	10.07.21	78	1	10.09.99		1	1	46,XY
G. W.	1	17.11.38	60	1	10.09.99	M2	1	1	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[1]; 46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22)[12] 45X,-Y,t(8;21)(q22;22),del(9)(q22)[4]
B. O.	1	07.04.55	44	1	15.09.99	M2	2	1	46,XY,t(3;12)(q26;p13) [25]; 46, XY
A. S.	1	18.04.56	43	2	01.10.99	M2	1	1	46,XX [25]
K. Z.	1	06.03.41	58	2	04.06.99	M5b	1	2	46,XX
G. E.	1	25.09.20	78	1	15.06.99	M3	1	2	47,XY,+8,t(15;17)(q22;q21)[15]
H. Q.	1	29.02.56	43	1	21.08.99		1	2	46,XY
W. G.	2	26.01.25	74	2	17.08.99		1	2	46,XX
K. G.	2	24.04.43	56	1	20.08.99	M2	1	2	46,XY

Name, Vorname	Material KM/PB	Geburtsdatum	Alter	Geschlecht m/w	Diagnosedatum	FAB Subtyp	prim/ sek Leukämie	de novo / Rezidiv	Chromosomale Veränderung
K. L.	2	06.06.70	29	2	12.11.99		2	2	45,XX,t(1;5)(q32;p14),-7 [7]; 46, XX [6]
M. R.	2	27.02.65	34	1	10.12.99		1	2	48,XY,der(1)t(1;6)(p36.1;p23)t(1;12)(q42;q13),t(2;21)(q27;q21),der(6)t(1;6)(p36.1;p23),t(10;11)(p13;q13),der(12)t(1;12)(q42;q13),+der(17)[20]
J. P.	2	28.04.63	36	2	27.04.00	M1	1	2	46,XX[17],46,XY [3]
T. S.	2	18.08.83	16	2	04.05.00		1	2	46,XX,t(6;7)(q37;q22)[16];46,XY[6]
H. H.	2	20.03.50	50	1	15.06.00	M2	1	2	46,XY [25]
A. K.	2	07.09.54	55	2	15.06.00		1	2	46,XX[6];46,[14]
G. A.	2	12.12.43	56	2	22.06.00		1	2	47,XX,t(5;12)(q31;p13),del(6)(q23),+i(8)(q10)[17];46,XX[3]
L. R.	1	11.03.33	67	2	05.07.00	M1	1	2	46, XX, t(4;12)(q11;p13)[7]; 46, XX [3]
E. L.	2	28.08.31	69	1	15.06.00		1	2	46, XY [21]
M. W.	2	30.05.62	38	2	22.09.00	M4	1	2	46, XX,t(1;14)(q42;q32)[12]46, XY [21] 46,XX [8]

7.2. PROLIFERATIONSDATEN VON CD34POSITIVEN STAMMZELLEN GESUNDER SPENDER

Name, Vorname	Material KM/PB	Proliferation in pmol/ml
gesunder Spender 1	1	1,46
gesunder Spender 2	1	1,42
gesunder Spender 3	2	0,21
gesunder Spender 4	1	0,69
gesunder Spender 5	1	1,04
gesunder Spender 6	1	1,62
gesunder Spender 7	2	0,36

7.3. PROLIFERATIONS DATEN, CYTARABININKORPORATION UND STIMULIERBARKEIT VON BLASTEN BEI PRIMÄRDIAGNOSE UND IM REZIDIV

Name, Vorname	Material KM/PB	Geburtsdatum	Alter bei Diagnosestellung	Geschlecht m/w	Diagnosedatum	prim/ sek Leukämie	de novo / Rezidiv	Proliferation endogen pmol/10E5 Zellen	absolute Stimulation mit GM-CSF	relative Stimulation mit GM-CSF	absolute Stimulation mit G-CSF	relative Stimulation mit G-CSF	AraC Inkorporation in pmol/ml	Steigerung der AraC Inkorporation mit GM-CSF	relative Steigerung der AraC Inkorporation mit GM-CSF	Steigerung der AraC Inkorporation mit G-CSF	relative Steigerung der AraC Inkorporation mit G-CSF
F. K.	1	12.10.24	74	1	24.11.98	1	1	0,46	0,78	1,69	0,64	1,39	0,12	0,35	2,83	0,23	1,85
M. M.	1	05.05.24	74	2	10.12.98	1	1	2,47	3,5	1,42	3,21	1,30	0,13	0,12	0,92	0,12	0,92
S. B.	1	04.08.75	23	2	15.12.98	1	1	3,57	2,96	0,83	3,79	1,06	0,034	0,02	0,62	0,04	1,15
W. S.	2	02.06.63	35	1	01.01.99	1	1	1,85	3,13	1,69	7,11	3,84	0,06	0,07	1,17	0,10	1,69
A. O.	1	30.05.56	42	2	06.01.99	1	1	0,62	0,67	1,08	3,62	5,84	0,024	0,03	1,25	0,08	3,37
C. W.	1	29.09.55	43	2	05.01.99	1	1	0,23	0,3	1,30	1,48	6,43	0,006	0,03	4,19	0,02	3,32
J. P.	1	04.01.34	65	1	06.01.99	1	1	0,15	2,44	16,27	0,12	0,80	0,055	0,06	1,13	0,01	0,22
G. S.	2	14.12.29	69	1	15.01.99	1	1	1,12	1,28	1,14	2,96	2,64	0,025	0,02	0,68	0,03	1,35
R. B.	1	17.11.24	74	2	19.01.99	2	1	0,63	0,94	1,49	3,78	6,00	0,018	0,05	3,00	0,06	3,11
E. H.	1	29.01.21	77	2	25.01.99	1	1	0,05	0,07	1,52	0,82	17,83	0,003	0,003	1,03	0,03	9,67
M. H.	1	03.05.59	39	2	02.02.99	1	1	0,56	0,78	1,39	3,71	6,63	0,018	0,05	2,61	0,098	5,44
M. R.	2	28.12.24	74	2	06.02.99	1	1	1,52	2,1	1,38	3,42	2,25	0,049	0,09	1,82	0,09	1,86
J. H.	1	14.01.40	59	1	09.02.99	1	1	0,43	0,47	1,09	3,94	9,16	0,012	0,02	1,42	0,10	8,33
K. M.	1	02.05.39	59	1	09.02.99	1	1	0,77	0,77	1,00	1,79	2,32	0,033	0,03	0,91	0,49	1,48
S. M.	2	01.12.43	55	2	11.02.99	1	1	0,1	0,1	1,04	0,46	4,79	0,001	0,004	2,77	0,014	10,77
M. B.	1	26.07.60	38	1	12.02.99	1	1	0,57	0,65	1,14	0,94	1,65	0,019	0,04	1,84	0,03	1,53
A. W.	2	17.12.49	49	2	18.02.99	1	1	1,67	2,11	1,26	3,02	1,81	0,007	0,02	3,43	0,02	2,24
K. G.	1	06.06.28	70	1	26.02.99	1	1	0,1	0,09	0,89	1,21	12,74	0,023	0,02	0,83	0,03	1,48
G. S.	2	11.06.32	66	1	26.02.99	1	1	0,07	0,07	1,07	1,49	21,59	0,003	0,003	0,93	0,02	6,90
F. N.	2	25.08.29	69	1	11.03.99	2	1	0,08	0,09	1,06	1,45	17,47	0,008	0,006	0,70	0,03	3,54
O. J.	2	17.09.20	78	1	13.03.99	1	1	0,94	1,14	1,21	0,97	1,03	0,037	0,04	1,03	0,02	0,57
H. T.	1	07.05.55	43	1	18.03.99	1	1	0,41	0,4	0,98	0,82	2,00	0,013	0,03	2,15	0,03	1,92
R. M.	2	07.08.32	66	1	19.03.99	1	1	0,07	0,07	1,09	1,80	26,87	0,002	0,01	4,59	0,04	20,59
H. W.	1	26.04.35	63	1	24.03.99	1	1	0,32	0,38	1,19	2,26	7,06	0,012	0,03	2,75	0,04	3,08
W. L.	1	28.03.62	37	1	16.04.99	1	1	0,22	0,38	1,73	2,03	9,23	0,021	0,001	0,03	0,04	2,05
H. H.	2	20.09.34	64	1	09.06.99	1	1	2,16	2,27	1,05	2,92	1,35	0,025	0,04	1,57	0,03	1,12
H. K.	1	18.12.22	76	1	22.06.99	1	1	0,71	0,96	1,36	3,25	4,59	0,025	0,02	0,65	0,03	1,31
C. S.	1	15.04.39	60	2	22.06.99	1	1	0,69	0,57	0,84	1,99	2,90	0,024	0,106	4,46	0,12	5,07
S. W.	1	26.01.40	59	2	12.07.99	2	1	0,98	1,16	1,18	2,35	2,40	0,021	0,016	0,77	0,015	0,72
A. B.	1	21.02.82	17	1	13.07.99	1	1	1,29	1,43	1,11	3,30	2,57	0,042	0,037	0,88	0,046	1,08
J. R.	2	12.05.22	77	2	13.07.99	1	1	0,13	0,18	1,39	2,23	17,58	0,008	0,015	1,96	0,04	5,22
E. E.	1	09.01.17	82	2	28.07.99	1	1	1,22	1,78	1,46	3,48	2,85	0,034	0,04	1,16	0,072	2,13
W. M.	1	08.07.33	66	1	03.08.99	1	1	0,08	0,07	0,83	1,27	15,9	0,008	0,016	2,13	0,015	2,04
J. S.	1	17.02.55	44	2	04.08.99	1	1	0,13	0,13	1,06	0,78	6,1	0,005	0,001	0,26	0,045	9,00
A. B.	1	20.01.38	61	1	04.08.99	1	1	1,12	1,36	1,22	1,42	1,26	0,02	0,016	0,80	0,02	1,05
G. B.	2	04.11.53	45	2	18.08.99	1	1	0,06	0,08	1,32	0,22	3,78	0,001	0,002	2,33	0,003	3,26
R. K.	1	21.06.31	68	2	24.08.99	1	1	0,11	0,17	1,51	0,87	7,87	0,004	0,005	1,27	0,006	1,68
H. G.	1	30.11.36	62	1	25.08.99	1	1	0,31	0,37	1,20	0,42	1,37	0,006	0,01	1,55	0,005	0,85
E. L.	1	16.01.67	32	2	03.08.99	2	1	0,05	0,04	0,83	0,06	1,15	0,001	0,001	0,88	0,001	1,73
W. H.	1	10.07.21	78	1	10.09.99	1	1	0,32	0,43	1,35	2,72	8,53	0,008	0,004	0,48	0,018	2,20
G. W.	1	17.11.38	60	1	10.09.99	1	1	0,05	0,04	0,76	0,94	17,44	0,003	0,01	3,92	0,02	7,69
B. O.	1	07.04.55	44	1	15.09.99	2	1	0,15	0,1	0,71	0,45	3,03	0,005	0,004	0,08	0,007	1,58
A. S.	1	18.04.56	43	2	01.10.99	1	1	0,36	0,45	1,24	3,64	10,1	0,01	0,029	3,02	0,041	4,27
K. Z.	1	06.03.41	58	2	04.06.99	1	2	0,57	0,49	0,87	2,55	4,50	0,026	0,024	0,91	0,063	2,44
G. E.	1	25.09.20	78	1	15.06.99	1	2	0,29	0,32	1,12	0,32	1,11	0,022	0,015	0,67	0,02	0,89
H. Q.	1	29.02.56	43	1	21.08.99	1	2	0,56	0,65	1,15	1,65	2,92	0,022	0,012	0,57	0,034	1,59
W. G.	2	26.01.25	74	2	17.08.99	1	2	0,03	0,04	1,06	0,06	1,84	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00
K. G.	2	24.04.43	56	1	20.08.99	1	2	0,73	0,64	0,87	0,66	0,89	0,023	0,013	0,56	0,013	0,59
K. L.	2	06.06.70	29	2	12.11.99	2	2	0,04	0,30	7,29	0,03	0,79	0,004	0,018	4,31	0,001	0,29
M. R.	2	27.02.65	34	1	10.12.99	1	2	0,00	0,00	6,40	0,00	1,07	0,002	0,002	0,77	0,002	0,82
J. P.	2	28.04.63	36	2	27.04.00	1	2	0,74	0,86	1,16	1,30	1,76	0,016	0,093	5,87	0,089	5,62
T. S.	2	18.08.83	16	2	04.05.00	1	2	0,01	0,02	1,11	0,27	18,09	0,004	0,003	0,63	0,006	1,49
H. H.	2	20.03.50	50	1	15.06.00	1	2	0,32	0,34	1,04	0,4	1,23	0,013	0,008	0,62	0,023	1,72

Name, Vorname	Material KM/PB	Geburtsdatum	Alter bei Diagnosestellung	Geschlecht m/w	Diagnosedatum	prim/ sek Leukämie	de novo / Rezidiv	Proliferation endogen pmol/10E5 Zellen	absolute Stimulation mit GM-CSF	relative Stimulation mit GM-CSF	absolute Stimulation mit G-CSF	relative Stimulation mit G-CSF	AraC Inkorporation in pmol/ml	Steigerung der AraC Inkorporation mit GM-CSF	relative Steigerung der AraC Inkorporation mit GM-CSF	Steigerung der AraC Inkorporation mit G-CSF	relative Steigerung der AraC Inkorporation mit G-CSF
A. K.	2	07.09.54	55	2	15.06.00	1	2	0,06	0,04	0,7	0,18	2,97	0,001	0,001	1,32	0,003	3,69
G. A.	2	12.12.43	56	2	22.06.00	1	2	0,80	0,75	0,93	0,83	1,04	0,017	0,013	0,79	0,012	0,73
L. R.	1	11.03.33	67	2	05.07.00	1	2	0,00	0,00	0,74	0,01	3,21	0,003	0,003	1,29	0,003	1,04
E. L.	2	28.08.31	69	1	15.06.00	1	2	0,10	0,08	0,82	0,24	2,45	0,006	0,006	0,90	0,008	1,30
M. W.	2	30.05.62	38	2	22.09.00	1	2	0,21	0,20	0,97	1,50	7,21	0,015	0,058	3,97	0,024	1,61

7.4. ZYTOKINPRODUKTION VON PRIMÄRDIAGNOSEN UND REZIDIVEN

Name, Vorname	Material KM/PB	Geburtsdatum	Alter bei Diagnosestellung	Geschlecht m/w	Diagnosedatum	prim/ sek Leukämie	de novo / Rezidiv	IL3 Produktion in pg/ml	G-CSF Produktion in pg/ml	GM-CSF Produktion in pg/ml
F. K.	1	12.10.24	74	1	24.11.98	1	1	15,00	298,60	4,00
M. M.	1	05.05.24	74	2	10.12.98	1	1	297,80	78,70	4,00
S. B.	1	04.08.75	23	2	15.12.98	1	1	15,00	364,20	4,00
W. S.	2	02.06.63	35	1	01.01.99	1	1	373,10	502,20	4,00
A. O.	1	30.05.56	42	2	06.01.99	1	1	675,40	503,90	4,00
C. W.	1	29.09.55	43	2	05.01.99	1	1	329,80	316,40	15,90
J. P.	1	04.01.34	65	1	06.01.99	1	1	83,50	319,70	30,00
G. S.	2	14.12.29	69	1	15.01.99	1	1	64,10	94,80	18,30
R. B.	1	17.11.24	74	2	19.01.99	2	1	15,00	431,30	16,50
E. H.	1	29.01.21	77	2	25.01.99	1	1	15,00	191,00	4,00
M. H.	1	03.05.59	39	2	02.02.99	1	1	123,60	426,30	765,30
M. R.	2	28.12.24	74	2	06.02.99	1	1	17,00	261,30	15,50
J. H.	1	14.01.40	59	1	09.02.99	1	1	15,00	247,60	24,90
K. M.	1	02.05.39	59	1	09.02.99	1	1	15,30	399,30	86,00
S. M.	2	01.12.43	55	2	11.02.99	1	1	36,10	89,50	183,40
M. B.	1	26.07.60	38	1	12.02.99	1	1	15,00	129,50	134,80
A. W.	2	17.12.49	49	2	18.02.99	1	1	119,50	297,00	44,60
K. G.	1	06.06.28	70	1	26.02.99	1	1	188,30	177,00	4,00
G. S.	2	11.06.32	66	1	26.02.99	1	1	978,40	20,00	4,00
F. N.	2	25.08.29	69	1	11.03.99	2	1	43,42	20,00	4,00
O. J.	2	17.09.20	78	1	13.03.99	1	1	69,38	183,13	765,40
H. T.	1	07.05.55	43	1	18.03.99	1	1	22,64	228,47	4,00
R. M.	2	07.08.32	66	1	19.03.99	1	1	15,00	163,77	56,50
H. W.	1	26.04.35	63	1	24.03.99	1	1	15,00	270,29	141,29
W. L.	1	28.03.62	37	1	16.04.99	1	1	15,00	99,89	25,04
H. H.	2	20.09.34	64	1	09.06.99	1	1	15,00	205,49	67,38
H. K.	1	18.12.22	76	1	22.06.99	1	1	132,73	51,34	235,94
C. S.	1	15.04.39	60	2	22.06.99	1	1	289,09	149,17	12,61
S. W.	1	26.01.40	59	2	12.07.99	2	1	123,41	106,52	4,00
A. B.	1	21.02.82	17	1	13.07.99	1	1	15,00	113,05	4,00
J. R.	2	12.05.22	77	2	13.07.99	1	1	15,00	439,72	4,00
E. E.	1	09.01.17	82	2	28.07.99	1	1	53,6	574,54	4,00
W. M.	1	08.07.33	66	1	03.08.99	1	1	15,00	581,14	4,00
J. S.	1	17.02.55	44	2	04.08.99	1	1	15,00	210,90	4,00
A. B.	1	20.01.38	61	1	04.08.99	1	1	15,00	230,04	12,24
G. B.	2	04.11.53	45	2	18.08.99	1	1	15,00	361,47	4,00
R. K.	1	21.06.31	68	2	24.08.99	1	1	33,73	269,93	37,14
H. G.	1	30.11.36	62	1	25.08.99	1	1	48,68	165,18	22,49
E. L.	1	16.01.67	32	2	03.08.99	2	1	15,00	20,00	46,21
W. H.	1	10.07.21	78	1	10.09.99	1	1	86,03	285,51	179,34

Name, Vorname	Material KM/PB	Geburtsdatum	Alter bei Diagnosestellung	Geschlecht m/w	Diagnosedatum	prim/ sek Leukämie	de novo / Rezidiv	IL3 Produktion in pg/ml	G-CSF Produktion in pg/ml	GM-CSF Produktion in pg/ml
G. W.	1	17.11.38	60	1	10.09.99	1	1	25,14	281,50	6,68
B. O.	1	07.04.55	44	1	15.09.99	2	1	15,00	275,26	50,79
A. S.	1	18.04.56	43	2	01.10.99	1	1	15,00	20,00	92,21
K. Z.	1	06.03.41	58	2	04.06.99	1	2	15,00	100,39	101,94
G. E.	1	25.09.20	78	1	15.06.99	1	2	15,00	126,74	79,16
H. Q.	1	29.02.56	43	1	21.08.99	1	2	158,83	20,00	566,56
W. G.	2	26.01.25	74	2	17.08.99	1	2	15,00	495,07	14,49
K. G.	2	24.04.43	56	1	20.08.99	1	2	15,00	158,51	10,76
K. L.	2	06.06.70	29	2	12.11.99	2	2	48,54	59,74	4,00
M. R.	2	27.02.65	34	1	10.12.99	1	2	57,15	20,00	4,00
J. P.	2	28.04.63	36	2	27.04.00	1	2	203,05	20,00	12,74
T. S.	2	18.08.83	16	2	04.05.00	1	2	156,99	20,00	10,12
H. H.	2	20.03.50	50	1	15.06.00	1	2	358,89	20,00	112,10
A. K.	2	07.09.54	55	2	15.06.00	1	2	176,66	20,00	6,31
G. A.	2	12.12.43	56	2	22.06.00	1	2	362,76	20,00	35,60
L. R.	1	11.03.33	67	2	05.07.00	1	2	15,00	79,16	4,00
E. L.	2	28.08.31	69	1	15.06.00	1	2	15,00	98,04	4,00
M. W.	2	30.05.62	38	2	22.09.00	1	2	15,00	210,77	4,00

8. LITERATURVERZEICHNIS

Anonymous (1997):

World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects

Cardiovasc Res, 35, 2-3.

Almeida, J., del Canizo, C., Orfao, A., Hernandez, J., Hernandez, D., Galende, J., Caballero, D., Garcia-Sanz, R. und San Miguel, J. F. (1995):

In vitro autonomous proliferation in ANLL: clinical and biological significance

Leuk Res, 19, 411-6.

Appelbaum, F. R. und Kopecky, K. J. (1997):

Long-term survival after chemotherapy for acute myeloid leukemia: the experience of the Southwest Oncology Group

Cancer, 80, 2199-204.

Appelbaum, F. R., Dahlberg, S., Thomas, E. D., Buckner, C. D., Cheever, M. A., Clift, R. A., Crowley, J., Deeg, H. J., Fefer, A., Greenberg, P. D. et al. (1984):

Bone marrow transplantation or chemotherapy after remission induction for adults with acute nonlymphoblastic leukemia. A prospective comparison

Ann Intern Med, 101, 581-8.

Bettelheim, P., Valent, P., Andreeff, M., Tafuri, A., Haimi, J., Gorischek, C., Muhm, M., Sillaber, C., Haas, O., Vieder, L. et al. (1991):

Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in combination with standard induction chemotherapy in de novo acute myeloid leukemia

Blood, 77, 700-11.

Bhalla, K., Holladay, C., Arlin, Z., Grant, S., Ibrado, A. M. und Jasiok, M. (1991):

Treatment with interleukin-3 plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factors improves the selectivity of Ara-C in vitro against acute myeloid leukemia blasts

Blood, 78, 2674-9.

Bishop, J. F. (1997):

The treatment of adult acute myeloid leukemia

Semin Oncol, 24, 57-69.

Bishop, J. F., Lowenthal, R. M., Joshua, D., Matthews, J. P., Todd, D., Cobcroft, R., Whiteside, M. G., Kronenberg, H., Ma, D., Dodds, A. et al. (1990):

Etoposide in acute nonlymphocytic leukemia. Australian Leukemia Study Group

Blood, 75, 27-32.

Bishop, J. F., Matthews, J. P., Young, G. A., Szer, J., Gillett, A., Joshua, D., Bradstock, K., Enno, A., Wolf, M. M., Fox, R. et al. (1996):

A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia

Blood, 87, 1710-7.

Bloomfield, C. D., Lawrence, D., Byrd, J. C., Carroll, A., Pettenati, M. J., Tantravahi, R., Patil, S. R., Davey, F. R., Berg, D. T., Schiffer, C. A., Arthur, D. C. und Mayer, R. J. (1998):

Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype

Cancer Res, 58, 4173-9.

Braess, J., Jahns-Streubel, G., Schoch, C., Haase, D., Haferlach, T., Fiegl, M., Voss, S., Kern, W., Schleyer, E. und Hiddemann, W. (2001):

Proliferative activity of leukaemic blasts and cytosine arabinoside pharmacodynamics are associated with cytogenetically defined prognostic subgroups in acute myeloid leukaemia

Br J Haematol, 113, 975-982.

Braess, J., Voss, S., Jahns-Streubel, G., Schoch, C., Haferlach, T., Kern, W., Keye, S., Schleyer, E. und Hiddemann, W. (2000):

The pharmacodynamic basis for the increased antileukaemic efficacy of cytosine arabinoside-based treatment regimens in acute myeloid leukaemia with a high proliferative activity

Br J Haematol, 110, 170-9.

Braess, J., Wiegendt, C., Jahns-Streubel, G., Kern, W., Keye, S., Unterhalt, M., Schleyer, E. und Hiddemann, W. (2000):

Successful modulation of high-dose cytosine arabinoside metabolism in acute myeloid leukaemia by haematopoietic growth factors: no effect of ribonucleotide reductase inhibitors fludarabine and gemcitabine

Br J Haematol, 109, 388-95.

Brons, P. P., Haanen, C., Boezeman, J. B., Muus, P., Holdrinet, R. S., Pennings, A. H., Wessels, H. M. und de Witte, T. (1993):

Proliferation patterns in acute myeloid leukemia: leukemic clonogenic growth and in vivo cell cycle kinetics

Ann Hematol, 66, 225-33.

Brown, R. A., Wolff, S. N., Fay, J. W., Pineiro, L., Collins, R. H., Jr., Lynch, J. P., Stevens, D., Greer, J., Herzig, R. H. und Herzig, G. P. (1996):

High-dose etoposide, cyclophosphamide and total body irradiation with allogeneic bone marrow transplantation for resistant acute myeloid leukemia: a study by the North American Marrow Transplant Group

Leuk Lymphoma, 22, 271-7.

Büchner, T., Hiddemann, W., Koenigsmann, M., Zuehlsdorf, M., Woermann, B., Boeckmann, A., Aguion Freire, E., Innig, G., Maschmeyer, G., Ludwig, W. D. et al. (1990):

Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after chemotherapy for acute leukemias at higher age or after relapse

Hamatol Bluttransfus, 33, 724-31

Büchner, T., Hiddemann, W., Wormann, B., Zuhlsdorf, M., Rottmann, R., Innig, G., Maschmeier, G., Ludwig, W. D., Sauerland, M. C. und Heinecke, A. (1997):

Hematopoietic growth factors in acute myeloid leukemia: supportive and priming effects

Semin Oncol, 24, 124-31.

Burnett, A. K., Goldstone, A. H., Stevens, R. M., Hann, I. M., Rees, J. K., Gray, R. G. und Wheatley, K. (1998):

Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. UK Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties

Lancet, 351, 700-8.

Campos, L., Guyotat, D., Archimbaud, E., Calmard-Oriol, P., Tsuruo, T., Troncy, J., Treille, D. und Fiere, D. (1992):

Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis

Blood, 79, 473-6.

Capizzi, R. L., Poole, M., Cooper, M. R., Richards, F., 2nd, Stuart, J. J., Jackson, D. V., Jr., White, D. R., Spurr, C. L., Hopkins, J. O., Muss, H. B. et al. (1984):

Treatment of poor risk acute leukemia with sequential high-dose ARA-C and asparaginase

Blood, 63, 694-700.

Carella, A. M., Santini, G., Martinengo, M., Giordano, D., Nati, S., Congiu, A., Cerri, R., Risso, M., Damasio, E., Rossi, E. et al. (1985):

4-Demethoxydaunorubicin (Idarubicin) in refractory or relapsed acute leukemias. A pilot study

Cancer, 55, 1452-4.

Cassileth, P. A., Harrington, D. P., Appelbaum, F. R., Lazarus, H. M., Rowe, J. M., Paietta, E., Willman, C., Hurd, D. D., Bennett, J. M., Blume, K. G., Head, D. R. und Wiernik, P. H. (1998):

Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission

N Engl J Med, 339, 1649-56.

Chow, K. C. und Ross, W. E. (1987):

Topoisomerase-specific drug sensitivity in relation to cell cycle progression

Mol Cell Biol, 7, 3119-23.

Christiansen, D. H., Andersen, M. K. und Pedersen-Bjergaard, J. (2001):

Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis

J Clin Oncol, 19, 1405-13.

Chuang, R. Y. und Chuang, L. F. (1976):

Inhibition of RNA polymerase as a possible anti-leukaemic action of cytosine arabinoside

Nature, 260, 549-50.

del Canizo, M. C., Brufau, A., Almeida, J., Galende, J., Garcia Marcos, M. A., Mota, A., Garcia, R., Fernandez Calvo, J., Ramos, F., Fisac, P., Orfao, A. und San Miguel, J. F. (1998):

In vitro growth in acute myeloblastic leukaemia: relationship with other clinico-biological characteristics of the disease

Br J Haematol, 103, 137-42.

Delwel, R., Salem, M., Pellens, C., Dorssers, L., Wagemaker, G., Clark, S. und Lowenberg, B. (1988):

Growth regulation of human acute myeloid leukemia: effects of five recombinant hematopoietic factors in a serum-free culture system

Blood, 72, 1944-9.

Dermime, S., Mavroudis, D., Jiang, Y. Z., Hensel, N., Molldrem, J. und Barrett, A. J. (1997):

Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation

Bone Marrow Transplant, 19, 989-99.

Dexter, D. L. und Leith, J. T. (1986):

Tumor heterogeneity and drug resistance

J Clin Oncol, 4, 244-57.

Dombret, H., Chastang C., Fenaux P., Reiffers J., Bordessoule D., Bouabdallah R., Mandelli F., Ferrant A., Auzanneau G., Tilly H., Yver A. und Degos L (1995):

A controlled study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in elderly patients after treatment for acute myelogenous leukemia (for the AML Cooperative study group).

N Engl J Med, 332, 1678-83.

Ellison, R. R., Holland, J. F., Weil, M., Jacquillat, C., Boiron, M., Bernard, J., Sawitsky, A., Rosner, F., Gussoff, B., Silver, R. T., Karanas, A., Cuttner, J., Spurr, C. L., Hayes, D. M., Blom, J., Leone, L. A., Haurani, F., Kyle, R., Hutchison, J. L., Forcier, R. J. und Moon, J. H. (1968):

Arabinosyl cytosine: a useful agent in the treatment of acute leukemia in adults

Blood, 32, 507-23.

Estey, E., Thall, P., Andreeff, M., Beran, M., Kantarjian, H., O'Brien, S., Escudier, S., Robertson, L. E., Koller, C., Kornblau, S. et al. (1994):

Use of granulocyte colony-stimulating factor before, during, and after fludarabine plus cytarabine induction therapy of newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndromes: comparison with fludarabine plus cytarabine without granulocyte colony-stimulating factor

J Clin Oncol, 12, 671-8.

Estey, E. H., Shen, Y. und Thall, P. F. (2000):

Effect of time to complete remission on subsequent survival and disease-free survival time in AML, RAEB-t, and RAEB

Blood, 95, 72-7.

Estey, E. H., Keating, M. J., McCredie, K. B., Bodey, G. P. und Freireich, E. J. (1983):

Phase II trial of mitoxantrone in refractory acute leukemia

Cancer Treat Rep, 67, 389-90.

Ffrench, M., Bryon, P. A., Fiere, D., Vu Van, H., Guyotat, D., Extra, J. M. und Viala, J. J. (1986):

Cell-cycle prognostic value in adult acute myeloid leukemia. The choice of the best variables

Leuk Res, 10, 51-7

Ffrench, M., Bryon, P. A., Fiere, D., Vu Van, H., Gentilhomme, O., Adeleine, P. und Viala, J. J. (1985):

Cell-cycle, protein content, and nuclear size in acute myeloid leukemia

Cytometry, 6, 47-53.

Gabrilove, J. L. (1989):

Introduction and overview of hematopoietic growth factors

Semin Hematol, 26, 1-4.

Gasson, J. C. (1991):

Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Blood, 77, 1131-45.

Giordano, M., Danova, M., Mazzini, G., Gobbi, P. und Riccardi, A. (1993):

Cell kinetics with in vivo bromodeoxyuridine assay, proliferating cell nuclear antigen expression, and flow cytometric analysis. Prognostic significance in acute nonlymphoblastic leukemia

Cancer, 71, 2739-45.

Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Ciocce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F. F., Zamir, I., Seiser, C., Lazar, M. A., Minucci, S. und Pelicci, P. G. (1998):

Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia

Nature, 391, 815-8.

Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A. und Goldstone, A. (1998):

The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties

Blood, 92, 2322-33.

Grimwade, D. und Solomon, E. (1997):

Characterisation of the PML/RAR alpha rearrangement associated with t(15;17) acute promyelocytic leukaemia

Curr Top Microbiol Immunol, 220, 81-112

Hann, I. M., Stevens, R. F., Goldstone, A. H., Rees, J. K., Wheatley, K., Gray, R. G. und Burnett, A. K. (1997):

Randomized comparison of DAT versus ADE as induction chemotherapy in children and younger adults with acute myeloid leukemia. Results of the Medical Research Council's 10th AML trial (MRC AML10). Adult and Childhood Leukaemia Working Parties of the Medical Research Council

Blood, 89, 2311-8.

Hansen, P. B., Johnsen, H. E., Jensen, L., Gaarsdal, E., Simonsen, K. und Ralfkiaer, E. (1995):

Priming and treatment with molgramostim (rhGM-CSF) in adult high-risk acute myeloid leukemia during induction chemotherapy: a prospective, randomized pilot study

Eur J Haematol, 54, 296-303.

Harousseau, J. L., Cahn, J. Y., Pignon, B., Witz, F., Milpied, N., Delain, M., Lioure, B., Lamy, T., Desablens, B., Guilhot, F., Caillot, D., Abgrall, J. F., Francois, S., Briere, J., Guyotat, D., Casassus, P., Audhuy, B., Tellier, Z., Hurloup, P. und Herve, P. (1997):

Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. The Groupe Ouest Est Leucemies Aigues Myeloblastiques (GOELAM)

Blood, 90, 2978-86.

Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H. und Naoe, T. (2000):

Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines

Oncogene, 19, 624-31.

He, L. Z., Guidez, F., Tribioli, C., Peruzzi, D., Ruthardt, M., Zelent, A. und Pandolfi, P. P. (1998):

Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL

Nat Genet, 18, 126-35.

Heil, G., Chadid, L., Hoelzer, D., Seipelt, G., Mitrou, P., Huber, C., Kolbe, K., Mertelsmann, R., Lindemann, A., Frisch, J. et al. (1995):

GM-CSF in a double-blind randomized, placebo controlled trial in therapy of adult patients with de novo acute myeloid leukemia (AML)

Leukemia, 9, 3-9.

Hiddemann, W., Kern, W., Schoch, C., Fonatsch, C., Heinecke, A., Wormann, B. und Buchner, T. (1999):

Management of acute myeloid leukemia in elderly patients

J Clin Oncol, 17, 3569-76.

Hiddemann, W., Aul, C., Maschmeyer, G., Schonrock-Nabulsi, R., Ludwig, W. D., Bartholomäus, A., Bettelheim, P., Becker, K., Balleisen, L., Lathan, B. et al. (1993):
High-dose versus intermediate dose cytosine arabinoside combined with mitoxantrone for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia: results of an age adjusted randomized comparison
Leuk Lymphoma, 10, 133-7.

Hiddemann, W., Kiehl, M., Zuhlsdorf, M., Busemann, C., Schleyer, E., Wormann, B. und Buchner, T. (1992):
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 enhance the incorporation of cytosine arabinoside into the DNA of leukemic blasts and the cytotoxic effect on clonogenic cells from patients with acute myeloid leukemia
Semin Oncol, 19, 31-7.

Hunter, A. E., Rogers, S. Y., Roberts, I. A., Barrett, A. J. und Russell, N. (1993):
Autonomous growth of blast cells is associated with reduced survival in acute myeloblastic leukemia
Blood, 82, 899-903.

Ito, Y., Tanimoto, M., Kumazawa, T., Okumura, M., Morishima, Y., Ohno, R. und Saito, H. (1989):
Increased P-glycoprotein expression and multidrug-resistant gene (mdr1) amplification are infrequently found in fresh acute leukemia cells. Sequential analysis of 15 cases at initial presentation and relapsed stage
Cancer, 63, 1534-8.

Jahns-Streubel, G., Reuter, C., Auf der Landwehr, U., Unterhalt, M., Schleyer, E., Wormann, B., Buchner, T. und Hiddemann, W. (1997):
Activity of thymidine kinase and of polymerase alpha as well as activity and gene expression of deoxycytidine deaminase in leukemic blasts are correlated with clinical response in the setting of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-based priming before and during TAD-9 induction therapy in acute myeloid leukemia
Blood, 90, 1968-76.

Kakahara, T., Fukuda, T., Tanaka, A., Emura, I., Kishi, K., Asami, K. und Uchiyama, M. (1998):

Expression of deoxycytidine kinase (dCK) gene in leukemic cells in childhood: decreased expression of dCK gene in relapsed leukemia

Leuk Lymphoma, 31, 405-9.

Karakas, T., Maurer, U., Weidmann, E., Miething, C. C., Hoelzer, D. und Bergmann, L. (1998):

High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia

Ann Oncol, 9, 159-65.

Karasz, E., Jakab, K., Homolya, L., Szakacs, G., Hollo, Z., Telek, B., Kiss, A., Rejto, L., Nahajevszky, S., Sarkadi, B. und Kappelmayer, J. (2001):

Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia

Br J Haematol, 112, 308-14.

Karp, J. E., Donehower, R. C. und Burke, P. J. (1987):

An in vitro model to predict clinical response in adult acute myelogenous leukemia

Semin Oncol, 14, 172-81.

Karp, J. E., Donehower, R. C., Enterline, J. P., Dole, G. B., Fox, M. G. und Burke, P. J. (1989):

In vivo cell growth and pharmacologic determinants of clinical response in acute myelogenous leukemia

Blood, 73, 24-30.

Kato, S., Ideguchi, H., Muta, K., Nishimura, J. und Nawata, H. (1991):

Absence of correlation between cytotoxicity and drug transport by P-glycoprotein in clinical leukemic cells

Eur J Haematol, 47, 146-51.

Kaufmann, S. H., Karp, J. E., Jones, R. J., Miller, C. B., Schneider, E., Zwelling, L. A., Cowan, K., Wendel, K. und Burke, P. J. (1994):

Topoisomerase II levels and drug sensitivity in adult acute myelogenous leukemia

Blood, 83, 517-30.

Keating, M. J., Smith, T. L., Kantarjian, H., Cork, A., Walters, R., Trujillo, J. M., McCredie, K. B., Gehan, E. A. und Freireich, E. J. (1988):

Cytogenetic pattern in acute myelogenous leukemia: a major reproducible determinant of outcome

Leukemia, 2, 403-12.

Keating, S., de Witte, T., Suci, S., Willemze, R., Hayat, M., Labar, B., Resegotti, L., Ferrini, P. R., Caronia, F., Dardenne, M., Solbu, G., Petti, M. C., Vegna, M. L., Mandelli, F. und Zittoun, R. A. (1998):

The influence of HLA-matched sibling donor availability on treatment outcome for patients with AML: an analysis of the AML 8A study of the EORTC Leukaemia Cooperative Group and GIMEMA. European Organization for Research and Treatment of Cancer. Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto

Br J Haematol, 102, 1344-53.

Kern, W., Schoch, C., Haferlach, T., Braess, J., Unterhalt, M., Wormann, B., Buchner, T. und Hiddemann, W. (2000):

Multivariate analysis of prognostic factors in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia undergoing sequential high-dose cytosine arabinoside and mitoxantrone (S-HAM) salvage therapy: relevance of cytogenetic abnormalities

Leukemia, 14, 226-31.

Kern, W., Aul, C., Maschmeyer, G., Schonrock-Nabulsi, R., Ludwig, W. D., Bartholomaeus, A., Bettelheim, P., Wormann, B., Buchner, T. und Hiddemann, W. (1998):

Superiority of high-dose over intermediate-dose cytosine arabinoside in the treatment of patients with high-risk acute myeloid leukemia: results of an age-adjusted prospective randomized comparison

Leukemia, 12, 1049-55.

Kern, W., Schleyer, E., Unterhalt, M., Wormann, B., Buchner, T. und Hiddemann, W. (1997):

High antileukemic activity of sequential high dose cytosine arabinoside and mitoxantrone in patients with refractory acute leukemias. Results of a clinical phase II study

Cancer, 79, 59-68.

- Knaust, E., Porwit-MacDonald, A., Gruber, A., Xu, D. und Peterson, C. (2000):
Heterogeneity of isolated mononuclear cells from patients with acute myeloid leukemia affects cellular accumulation and efflux of daunorubicin
Haematologica, 85, 124-32.
- Kornblau, S. M., Gandhi, V., Andreeff, H. M., Beran, M., Kantarjian, H. M., Koller, C. A., O'Brien, S., Plunkett, W. und Estey, E. (1996):
Clinical and laboratory studies of 2-chlorodeoxyadenosine +/- cytosine arabinoside for relapsed or refractory acute myelogenous leukemia in adults
Leukemia, 10, 1563-9.
- Kufe, D. W., Major, P. P., Egan, E. M. und Beardsley, G. P. (1980):
Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA
J Biol Chem, 255, 8997-900.
- Larson, R. A. (2001):
Current use and future development of gemtuzumab ozogamicin
Semin Hematol, 38, 24-31.
- Legha, S. S., Keating, M. J., Zander, A. R., McCredie, K. B., Bodey, G. P. und Freireich, E. J. (1980):
4'-(9-Acridinylamino) methanesulfon-m-anisidide (AMSA): a new drug effective in the treatment of adult acute leukemia
Ann Intern Med, 93, 17-21.
- Lin, R. J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W. H., Jr. und Evans, R. M. (1998):
Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia
Nature, 391, 811-4.
- Lista, P., Porcu, P., Avanzi, G. C. und Pegoraro, L. (1988):
Interleukin 3 enhances the cytotoxic activity of 1-beta-D- arabinofuranosylcytosine (ara-C) on acute myeloblastic leukaemia (AML) cells
Br J Haematol, 70, 121-3.
- Look, A. T. (1997):
Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias
Science, 278, 1059-64.

Löwenberg, B., van Putten, W. L., Touw, I. P., Delwel, R. und Santini, V. (1993):
Autonomous proliferation of leukemic cells in vitro as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia
N Engl J Med, 328, 614-9.

Löwenberg, B., Downing, J. R. und Burnett, A. (1999):
Acute myeloid leukemia
N Engl J Med, 341, 1051-62.

Löwenberg, B. und Touw, I. P. (1993):
Hematopoietic growth factors and their receptors in acute leukemia
Blood, 81, 281-92.

Löwenberg, B., Suci, S., Archimbaud, E., Haak, H., Stryckmans, P., de Cataldo, R., Dekker, A. W., Berneman, Z. N., Thyss, A., van der Lelie, J., Sonneveld, P., Visani, G., Fillet, G., Hayat, M., Hagemeyer, A., Solbu, G. und Zittoun, R. (1998):
Mitoxantrone versus daunorubicin in induction-consolidation chemotherapy--the value of low-dose cytarabine for maintenance of remission, and an assessment of prognostic factors in acute myeloid leukemia in the elderly: final report. European Organization for the Research and Treatment of Cancer and the Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Hovon Group,
J Clin Oncol, 16, 872-81.

Löwenberg, B. (2001):
Prognostic factors in acute myeloid leukaemia
Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 14, 65-75.

Marie, J. P., Zittoun, R. und Sikic, B. I. (1991):
Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity
Blood, 78, 586-92.

Markovits, J., Pommier, Y., Kerrigan, D., Covey, J. M., Tilchen, E. J. und Kohn, K. W. (1987):
Topoisomerase II-mediated DNA breaks and cytotoxicity in relation to cell proliferation and the cell cycle in NIH 3T3 fibroblasts and L1210 leukemia cells
Cancer Res, 47, 2050-5.

Mayer, R. J., Davis, R. B., Schiffer, C. A., Berg, D. T., Powell, B. L., Schulman, P., Omura, G. A., Moore, J. O., McIntyre, O. R. und Frei, E., 3rd (1994):

Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B

N Engl J Med, 331, 896-903.

Miyauchi, J., Kelleher, C. A., Yang, Y. C., Wong, G. G., Clark, S. C., Minden, M. D., Minkin, S. und McCulloch, E. A. (1987):

The effects of three recombinant growth factors, IL-3, GM-CSF, and G-CSF, on the blast cells of acute myeloblastic leukemia maintained in short-term suspension culture

Blood, 70, 657-63.

Mrozek, K., Heinonen, K., de la Chapelle, A. und Bloomfield, C. D. (1997):

Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia

Semin Oncol, 24, 17-31.

Murohashi, I., Tohda, S., Suzuki, T., Nagata, K., Yamashita, Y. und Nara, N. (1989):

Autocrine growth mechanisms of the progenitors of blast cells in acute myeloblastic leukemia

Blood, 74, 35-41.

Nakano, Y., Kiyoi, H., Miyawaki, S., Asou, N., Ohno, R., Saito, H. und Naoe, T. (1999):

Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene

Br J Haematol, 104, 659-64.

Naoe, T., Nakano, Y. und Kiyoi, H. (2000):

Leukemia relapse reconsidered from the molecular aspect

Leuk Lymphoma, 37, 527-34.

Nara, N., Kurokawa, H., Tanikawa, S., Tomiyama, J. und Nagata, K. (1994):

Prognostic significance of the blast self-renewal capacity in patients with acute myeloid leukemia

Cancer, 73, 92-7.

Nara, N., Tohda, S., Suzuki, T., Nagata, K., Tanikawa, S., Imai, Y., Tomiyama, J. und Shiina, S. (1992):

Comparison of the proliferative activity and sensitivity to cytosine arabinoside of leukemic blast progenitors in acute myeloblastic leukemia at diagnosis and in relapse

Acta Haematol, 88, 17-21

Ohno, R. (1998):

Granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor in the treatment of acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia

Leuk Res, 22, 1143-54.

Ohno, R., Tomonaga, M., Kobayashi, T., Kanamaru, A., Shirakawa, S., Masaoka, T., Omine, M., Oh, H., Nomura, T., Sakai, Y. et al. (1990):

Effect of granulocyte colony-stimulating factor after intensive induction therapy in relapsed or refractory acute leukemia

N Engl J Med, 323, 871-7.

Ohno, R. (1993):

G-CSF in the treatment of acute myeloid leukemia: is it safe?

Leuk Lymphoma, 11, 15-9.

Ohno, R., Naoe, T., Kanamaru, A., Yoshida, M., Hiraoka, A., Kobayashi, T., Ueda, T., Minami, S., Morishima, Y., Saito, Y. et al. (1994):

A double-blind controlled study of granulocyte colony-stimulating factor started two days before induction chemotherapy in refractory acute myeloid leukemia. Kohseisho Leukemia Study Group

Blood, 83, 2086-92.

Omura, G. A., Vogler, W. R., Lefante, J., Silberman, H., Knospe, W., Gordon, D. und Jarrell, R. (1982):

Treatment of acute myelogenous leukemia: influence of three induction regimens and maintenance with chemotherapy or BCG immunotherapy

Cancer, 49, 1530-6.

Pebusque, M. J., Lopez, M., Torres, H., Carotti, A., Guilbert, L. und Mannoni, P. (1988):
Growth response of human myeloid leukemia cells to colony-stimulating factors
Exp Hematol, 16, 360-6.

Preisler, H., Davis, R. B., Kirshner, J., Dupre, E., Richards, F., 3rd, Hoagland, H. C., Kopel, S., Levy, R. N., Carey, R., Schulman, P. et al. (1987):
Comparison of three remission induction regimens and two postinduction strategies for the treatment of acute nonlymphocytic leukemia: a cancer and leukemia group B study
Blood, 69, 1441-9.

Reilly, I. A., Kozlowski, R. und Russell, N. H. (1989):
Heterogeneous mechanisms of autocrine growth of AML blasts
Br J Haematol, 72, 363-9.

Riccardi, A., Danova, M., Montecucco, C., Ucci, G., Cassano, E., Giordano, M., Mazzini, G. und Giordano, P. (1986):
Adult acute non-lymphoblastic leukaemia: reliability and prognostic significance of pretreatment bone marrow S-phase size determined by flow cytofluorometry
Scand J Haematol, 36, 11-7.

Riva, C. M. und Rustum, Y. M. (1985):
1-beta-D-arabinofuranosylcytosine metabolism and incorporation into DNA as determinants of in vivo murine tumor cell response
Cancer Res, 45, 6244-9.

Rowe J. M., Andersen J. W., Mazza J. J., Bennett J. M., Paietta E., Hayes F. A., Oette D., Cassileth P. A., Stadtmauer E. A. und Wiernik P. H. (1990)
A randomized placebo-controlled phase III study of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adult patients (>55 to 70 years of age) with acute myelogenous leukemia: A study of the Eastern Cooperative Oncology Group (E1490).
Blood, 332, 457-62.

Salem, M., Delwel, R., Mahmoud, L. A., Clark, S., Elbasousy, E. M. und Lowenberg, B. (1989):

Maturation of human acute myeloid leukaemia in vitro: the response to five recombinant haematopoietic factors in a serum-free system

Br J Haematol, 71, 363-70.

San Miguel, J. F., Martinez, A., Macedo, A., Vidriales, M. B., Lopez-Berges, C., Gonzalez, M., Caballero, D., Garcia-Marcos, M. A., Ramos, F., Fernandez-Calvo, J., Calmuntia, M. J., Diaz-Mediavilla, J. und Orfao, A. (1997):

Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients

Blood, 90, 2465-70.

Sato, H., Preisler, H., Day, R., Raza, A., Larson, R., Browman, G., Goldberg, J., Vogler, R., Grunwald, H., Gottlieb, A. et al. (1990):

MDR1 transcript levels as an indication of resistant disease in acute myelogenous leukaemia

Br J Haematol, 75, 340-5.

Schneider, E., Cowan, K. H., Bader, H., Toomey, S., Schwartz, G. N., Karp, J. E., Burke, P. J. und Kaufmann, S. H. (1995):

Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed acute leukemia

Blood, 85, 186-93.

Smith, I. E., Gerken, M. E., Clink, H. M. und McElwain, T. J. (1976):

VP 16-213 in acute myelogenous leukaemia

Postgrad Med J, 52, 66-70.

Spriggs, D., Robbins, G., Ohno, Y. und Kufe, D. (1987):

Detection of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine incorporation into DNA in vivo

Cancer Res, 47, 6532-6.

Stahnke, K., Boos, J., Bender-Gotze, C., Ritter, J., Zimmermann, M. und Creutzig, U. (1998):

Duration of first remission predicts remission rates and long-term survival in children with relapsed acute myelogenous leukemia

Leukemia, 12, 1534-8.

Steuber, C. P., Krischer, J., Holbrook, T., Camitta, B., Land, V., Sexauer, C., Mahoney, D. und Weinstein, H. (1996):

Therapy of refractory or recurrent childhood acute myeloid leukemia using amsacrine and etoposide with or without azacitidine: a Pediatric Oncology Group randomized phase II study
J Clin Oncol, 14, 1521-5.

Stevens, R. F., Hann, I. M., Wheatley, K. und Gray, R. G. (1998):

Marked improvements in outcome with chemotherapy alone in paediatric acute myeloid leukemia: results of the United Kingdom Medical Research Council's 10th AML trial. MRC Childhood Leukaemia Working Party
Br J Haematol, 101, 130-40.

Stoiser, B., Knobl, P., Fonatsch, C., Haas, O. A., Mitterbauer, G., Weltermann, A., Geissler, K., Valent, P., Sperr, W., Pabinger, I., Lechner, K. und Jaeger, U. (2000):

Prognosis of patients with a second relapse of acute myeloid leukemia
Leukemia, 14, 2059-63.

Stone, R. M., Berg, D. T., George, S. L., Dodge, R. K., Paciucci, P. A., Schulman, P., Lee, E. J., Moore, J. O., Powell, B. L. und Schiffer, C. A. (1995):

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after initial chemotherapy for elderly patients with primary acute myelogenous leukemia. Cancer and Leukemia Group B
N Engl J Med, 332, 1671-7.

te Boekhorst, P. A., Lowenberg, B. und Sonneveld, P. (1994):

Hematopoietic growth factor stimulation and cytarabine cytotoxicity in vitro: effects in untreated and relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia cells
Leukemia, 8, 1480-6.

Thalhammer, F., Geissler, K., Jager, U., Kyrle, P. A., Pabinger, I., Mitterbauer, M., Gisslinger, H., Knobl, P., Laczika, K., Schneider, B., Haas, O. A. und Lechner, K. (1996):

Duration of second complete remission in patients with acute myeloid leukemia treated with chemotherapy: a retrospective single-center study
Ann Hematol, 72, 216-22.

Thomas, E. D., Sanders, J. E., Flournoy, N., Johnson, F. L., Buckner, C. D., Clift, R. A., Fefer, A., Goodell, B. W., Storb, R. und Weiden, P. L. (1979):

Marrow transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia in remission
Blood, 54, 468-76.

Tosi, P., Visani, G., Ottaviani, E., Testoni, N., Pellacani, A. und Tura, S. (1998):

Inv(16) acute myeloid leukemia cells show an increased sensitivity to cytosine arabinoside in vitro
Eur J Haematol, 60, 161-5.

Tse, K. F., Mukherjee, G. und Small, D. (2000):

Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation
Leukemia, 14, 1766-76.

van den Heuvel-Eibrink, M. M., Wiemer, E. A., Kuijpers, M., Pieters, R. und Sonneveld, P. (2001):

Absence of mutations in the deoxycytidine kinase (dCK) gene in patients with relapsed and/or refractory acute myeloid leukemia (AML)
Leukemia, 15, 855-6.

Veuger, M. J., Honders, M. W., Landegent, J. E., Willemze, R. und Barge, R. M. (2000):

High incidence of alternatively spliced forms of deoxycytidine kinase in patients with resistant acute myeloid leukemia
Blood, 96, 1517-24.

Vey, N., Keating, M., Giles, F., Cortes, J., Beran, M. und Estey, E. (1999):

Effect of complete remission on survival in patients with acute myelogenous leukemia receiving first salvage therapy
Blood, 93, 3149-50.

Vidriales, M. B., Orfao, A., Lopez-Berges, M. C., Gonzalez, M., Lopez-Macedo, A., Ciudad, J., Lopez, A., Garcia, M. A., Hernandez, J., Borrego, D. und San Miguel, J. F. (1995):

Prognostic value of S-phase cells in AML patients
Br J Haematol, 89, 342-8.

Vignetti, M., Orsini, E., Petti, M. C., Moleti, M. L., Andrizzi, C., Pinto, R. M., Amadori, S. und Meloni, G. (1996):

Probability of long-term disease-free survival for acute myeloid leukemia patients after first relapse: A single-centre experience

Ann Oncol, 7, 933-8.

Vogelstein, B., Lane, D. und Levine, A. J. (2000):

Surfing the p53 network

Nature, 408, 307-10.

Warrell, R. P., Jr., de The, H., Wang, Z. Y. und Degos, L. (1993):

Acute promyelocytic leukemia

N Engl J Med, 329, 177-89.

Webb, D. K. (1999):

Management of relapsed acute myeloid leukaemia

Br J Haematol, 106, 851-9.

Webb, D. K., Wheatley, K., Harrison, G., Stevens, R. F. und Hann, I. M. (1999):

Outcome for children with relapsed acute myeloid leukaemia following initial therapy in the Medical Research Council (MRC) AML 10 trial. MRC Childhood Leukaemia Working Party
Leukemia, 13, 25-31.

Wheatley, K., Burnett, A. K., Goldstone, A. H., Gray, R. G., Hann, I. M., Harrison, C. J., Rees, J. K., Stevens, R. F. und Walker, H. (1999):

A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties

Br J Haematol, 107, 69-79.

Wiernik, P. H., Banks, P. L., Case, D. C., Jr., Arlin, Z. A., Periman, P. O., Todd, M. B., Ritch, P. S., Enck, R. E. und Weitberg, A. B. (1992):

Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia

Blood, 79, 313-9.

Williams, G. T., Smith, C. A., Spooncer, E., Dexter, T. M. und Taylor, D. R. (1990):
Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis
Nature, 343, 76-9.

Xia, Z., Sait, S. N., Baer, M. R., Barcos, M., Donohue, K. A., Lawrence, D., Ford, L. A., Block, A. M., Baumann, H. und Wetzler, M. (2001):
Truncated STAT proteins are prevalent at relapse of acute myeloid leukemia
Leuk Res, 25, 473-82.

Young, D. C. und Griffin, J. D. (1986):
Autocrine secretion of GM-CSF in acute myeloblastic leukemia
Blood, 68, 1178-81.

Zittoun, R., Suci, S., Mandelli, F., de Witte, T., Thaler, J., Stryckmans, P., Hayat, M., Peetermans, M., Cadiou, M., Solbu, G., Petti, M. C. und Willemze, R. (1996):
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor associated with induction treatment of acute myelogenous leukemia: a randomized trial by the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Cooperative Group
J Clin Oncol, 14, 2150-9.

Zittoun, R. A., Mandelli, F., Willemze, R., de Witte, T., Labar, B., Resegotti, L., Leoni, F., Damasio, E., Visani, G., Papa, G. et al. (1995):
Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups
N Engl J Med, 332, 217-23.

Lebenslauf

Am 29. März 1973 wurde ich als 2. Kind von Ursula Voigt, geb. Schmid und Rainer Voigt in Radeberg geboren. 1979 übersiedelten wir nach München. Hier absolvierte ich die Städtische Grundschule Fromundstraße sowie das Maria-Theresia-Gymnasium, an dem ich die Allgemeine Hochschulreife erwarb.

Im Anschluss an das Abitur leistete ich meinen Zivildienst am Städtischen Krankenhaus München-Harlaching in der Urologischen Abteilung ab. Danach nahm ich mein Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin zum Sommersemester 1994 auf, wechselte jedoch zum Wintersemester an die LMU München. Hier legte ich im Frühjahr 1996 die Ärztliche Vorprüfung ab, im Frühjahr 1997 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, sowie im Frühjahr 2000 den Zweiten Abschnitt. Mein Praktisches Jahr verbrachte ich in der III. Medizinischen Klinik des Klinikum Großhadern, im Institut für Anästhesie der LMU München sowie in der Chirurgischen Klinik des Klinikum Großhadern. Im Frühjahr 2001 beendete ich das Studium der Humanmedizin mit dem Bestehen des Dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung. Seit dem August 2001 bin ich als Arzt im Praktikum in der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern tätig.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Professor Dr. W. Hiddemann für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie für sein Interesse und manche kritische Anmerkung.

Besonders sei Herrn Dr. J. Braess gedankt für seine intensive und engagierte Betreuung dieser Arbeit. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und weckte mein Interesse an der medizinischen und naturwissenschaftlichen Forschung auch jenseits der Dissertation. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenso gedankt sei Frau K. Heil, sowohl für die gute Kooperation und ihre Hilfe während der technischen Durchführung der Versuche als auch für ihre langjährige, versierte Erfahrung als MTA, von der ich profitieren durfte.

Gedankt sei ebenso meinen Mitdoktoranden, Frau I. Zimmermann und Herrn P. Schneiderat, für ihre Mithilfe. Ohne sie wäre manche lange Stunde im Labor noch viel länger gewesen.

Nicht zuletzt sei den Patienten gedankt, ohne deren Einverständnis diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre.