

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III - Klinikum Großhadern  
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Biomarker und deren prognostische Relevanz bei akuter myeloischer  
Leukämie**

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

vorgelegt von Karin Petrovici

aus Bobingen

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Michael Albert  
Prof. Dr. Dr. Torsten Haferlach

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2014

## Inhaltsverzeichnis

	Seitenzahlen
<b>1. Zusammenfassung</b>	4
<b>2. Zusammenfassung auf Englisch (Abstract)</b>	5
<b>3. Einleitung</b>	6
<b>3.1. Das Expressionsprofil der Vorläuferzellmarker CD34, CD38 und CD90 bei akuter myeloischer Leukämie und deren prognostische Bedeutung</b>	7
3.1.1. Expression von Vorläuferzellmarkern in unterschiedlichen AML-Subtypen und zytogenetischen Risikogruppen	7
3.1.2. Expression der Vorläuferzellmarker und deren prognostische Signifikanz	8
3.1.3. Beitrag der Expression von CD34, CD38 und CD90 zur Detektion einer minimalen Resterkrankung von AML	9
<b>3.2. Assoziation einer hohen HSP70-Membran Expression auf leukämischen Zellen von Patienten mit AML mit einer schlechten Prognose</b>	10
3.2.1. Die HSP70 Expression in unterschiedlichen AML-Subtypen und zytogenetischen Risikogruppen	10
3.2.2. HSP70 Expression im Krankheitsverlauf der AML und prognostische Bedeutung	10
3.2.3. Beitrag der HSP70 Expression zur Detektion einer minimalen Resterkrankung von AML	11
3.2.4. Therapeutische Perspektiven in der Zukunft	11
<b>3.3. Positivität des „Tumormarkers“ NG2 (7.1) bei AML und seine Assoziation mit einer schlechten Prognose</b>	11
3.3.1. Korrelation von NG2-Positivität und der genetischen Aberration 11q23	11
3.3.2. NG2-Positivität in unterschiedlichen AML-Subgruppen und zytogenetischen Risikogruppen	12
3.3.3. Die prognostische Bedeutung der NG2-Positivität	12
<b>3.4. Schlussfolgerung</b>	13
<b>4. Literaturverzeichnis</b>	13
<b>5. Publikationsverzeichnis</b>	19

## 1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in drei Projekten die Expression und prognostische Relevanz verschiedener „Vorläuferzellmarker“ (CD34, CD38 und CD90), des „Heatshockprotein“ HSP70 sowie des Genproduktes der 11q23 Aberration (NG2) bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurden jeweils die Anteile positiver Fälle, sowie die Anteile der positiven Zellen bzw. der Expressionsdichte (mFI) für die entsprechenden Parameter ermittelt.

Bei 56 Patienten mit neu diagnostizierter AML wurde die Expression von den Vorläuferzellmarkern auf Knochenmarkszellen betrachtet (**Methodik siehe Publikation 1, Seite 80**). CD34 war am höchsten in den undifferenzierten Leukämien (durchschnittlich 60% positive Zellen) und am niedrigsten im FAB-Typ M3 (durchschnittlich 23% positive Zellen) exprimiert. Auch der mFI-Wert war im FAB-Typ M0 am größten. CD38 war in allen FAB-Typen hoch repräsentiert (durchschnittlich 60-80% positive Zellen) bei jedoch insgesamt geringer Expressionsdichte. CD90 war in M3 am höchsten (durchschnittlich 73% positive Zellen) und am geringsten in M0 (durchschnittlich 9% positive Zellen) nachzuweisen. Die Expressionsdichte war im Vergleich zu den restlichen FAB-Typen in M3 ebenfalls am größten. Keine relevanten Unterschiede wurden in den verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen (**Einteilung siehe Publikation 1, Seite 80**), in den Therapieansprechern und -versagern auf das AML-CG-Protokoll oder in den unterschiedlichen Altersgruppen dokumentiert. „Cut-off“ Analysen für CD34 - und CD90 -Werte zeigten, dass Patienten mit mehr als 43% CD34<sup>+</sup>Zellen ( $p=0,12$ ) und weniger als 64% CD90<sup>+</sup>Zellen ( $p=0,09$ ) bei Diagnosestellung eine geringere Wahrscheinlichkeit für ein rezidivfreies Überleben zu haben schienen: nach 10 Monaten waren 45% bzw. 80% der Patienten mit mehr oder weniger als 43% CD34<sup>+</sup>Zellen noch in Remission; nach 10 Monaten hatten 50% der Patienten mit weniger als 64% CD90<sup>+</sup>Zellen ein Rezidiv, wohingegen alle Patienten mit mehr als 64% CD90<sup>+</sup>Zellen 24 Monate nach Erstdiagnose sich immer noch in Remission befanden. Wir folgern, dass Vorläuferzellmarker wie CD34, CD38 und CD90 in unterschiedlicher Ausprägung auf leukämischen Zellen in allen FAB-Typen, zytogenetischen Risikogruppen und auf Zellen von Patienten mit oder ohne Therapieansprechen auf das AML-CG-Protokoll exprimiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit evaluieren wir das Expressionsprofil und die prognostische Signifikanz von HSP 70 auf der Zelloberfläche von verschiedenen Subtypen der AML. Wir untersuchten die Membranexpression von HSP70 sowie die prognostische Signifikanz auf AML-Blasten von insgesamt 92 Patienten mit unterschiedlichen Subtypen bei Erstdiagnose, sowie von Patienten in kompletter Remission bzw. im Rezidiv und mit persistierender Erkrankung (**Methodik siehe Publikation 2, Seite 1**). Der Anteil an positiven Fällen und HSP70<sup>+</sup>Zellen in den unterschiedlichen FAB-Typen war bei M3 am niedrigsten (durchschnittlich 20% positive Fälle bei durchschnittlich 13% positiven Zellen) und bei M5 am höchsten (durchschnittlich 82% positive Fälle bei durchschnittlich 36% positiven Zellen). Ein höherer Anteil an positiven Zellen bedeutete hier auch eine in Relation gesehen höhere Expressionsdichte.

Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich in den verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen (**Einteilung siehe Publikation 2, Seite 1**). Patienten in kompletter Remission exprimierten weniger HSP70<sup>+</sup>Zellen als Patienten in einem aktiven Krankheitsstadium. Weiterhin wurde ein „Cut-off“ Wert bestimmt, der zeigen konnte, dass Patienten mit mehr als 33% HSP70<sup>+</sup>Zellen eine signifikant kürzere rezidivfreie Überlebenszeit (durchschnittlich 6,4 Monate) aufwiesen als Patienten mit weniger als 33% HSP70<sup>+</sup>Zellen (durchschnittlich 20,1 Monate;  $p=0,04$ ).

In dem Versuch einer weiteren Charakterisierung von AML-Zellen haben wir im dritten Teil dieser Arbeit die Expression von NG2 auf mononukleären Zellen von AML-Patienten mit und ohne 11q23 Aberrationen bei der Erstdiagnose untersucht (**Methodik siehe Publikation 3, Seite 5**). Expressionsprofile wurden mit FAB-Typen, zytogenetischen Untergruppen und dem Therapieansprechen korreliert. Weiterhin wurde das Ausmaß der NG2-Expression mit der Prognose in Beziehung gebracht. Wir untersuchten 70 Knochenmarksproben von Patienten mit AML auf 11q23 Abberationen und Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper NG2. Die NG2-Reaktivität korrelierte mit FAB-M5 (50% positive Fälle mit durchschnittlich 32% NG2<sup>+</sup>Zellen) - bei im Gegensatz zu den restlichen FAB-Typen hoher Expressionsdichte - als auch mit dem Vorkommen von 11q23 Aberrationen. Wir wiesen NG2<sup>+</sup>Zellen in AML-Fällen mit normalem Karyotyp, jedoch nicht in gesunden Knochenmarkszellen nach. Patienten mit mehr als 10% NG2<sup>+</sup>Zellen zeigten tendenziell eine kürzere rezidivfreie Überlebenszeit (im Mittel 7 Monate) als Patienten mit weniger als 10% NG2<sup>+</sup>Zellen (im Mittel 17 Monate,  $p=0,08$ ). Während nur durchschnittlich 31% der Patienten mit NG2<sup>+</sup>Zellen auf die Chemotherapie ansprachen, zählten durchschnittlich 58% der Patienten mit NG2<sup>+</sup>Zellen zu den „non-Respondern“ ( $p=0,47$ ). Zusammenfassend detektiert NG2 viele, wenn auch nicht alle 11q23 Aberrationen sowie andere Fälle ohne entsprechende Aberration. Da der Marker nicht auf gesunden Knochenmarkszellen vorkommt, trägt er zur Erkennung von Patienten mit schlechter Prognose bei.

## 2. Zusammenfassung auf Englisch (Abstract)

We analysed the expression and prognostic relevance of different progenitor cell markers (CD34, CD38 and CD90), the 'heatshock protein' HSP70 and the gene product of the 11q23 aberration (NG2) on patients with acute myeloic leukemia (AML) in three projects by FACS-analysis. Hereby the percentage of positive cases, of positive cells as well as the density of the expression (mFI) was determined.

In 56 AML-patients at diagnosis we studied the expression of the progenitor-cell-markers (PCM) on mononuclear bone-marrow (BM)-cells and the prognostic significance (**methods described in publication 1, page 80**). CD34 was highest expressed in undifferentiated leukemia (average of 60% positive cells) and lowest in FAB-type M3 (average of 23% positive cells). The mFI-value was also highest in FAB-type M0.

CD38 was highly expressed in all FAB-types (average of 60%-80% positive cells), but with a density of expression not that high. CD90 was highest expressed in FAB-type M3 (average of 73% positive cells as well as a high density of expression) and lowest in M0 (average of 9% positive cells). No differences in expression were found in different cytogenetic risk-groups (**as described in publication 1, page 80**), in the responder's/ non-responder's-group to AML-CG-protocol-therapy or in different age-groups. Cut-off-analysis for CD34 and CD90 showed, that patients with more than 43% CD34<sup>+</sup> (p=0.12) and less than 64% CD90<sup>+</sup>cells (p=0.09) showed a tendency to a lower probability for relapse free survival: after 10 months 45% vs. 80% of patients with more vs. less than 43% CD34<sup>+</sup>cells were still in remission; after 10 months 50% of patients with less than 64% CD90<sup>+</sup>cells had relapsed, whereas all of the patients with more than 64% CD90 cells were in remission 24 months after first diagnosis. PCM like CD34, CD38 and CD90 were variably expressed in all FAB-types, cytogenetic risk groups and on cells from patients who had or had not responded to the AML-CG-protocol.

In the second project we have studied the expression of HSP70 on mononuclear bone marrow (BM) cells of 92 patients with AML at initial diagnosis, 8 patients in complete remission, 5 patients with persisting disease and 14 patients in relapse (**methods described in publication 2, page 1**). Moreover we evaluated the prognostic significance of HSP70. The percentage of positive cases in different FAB-types was with an average of 20% lowest in the subtype M3 and with an average of 82% highest in the subtype M5, but HSP70 was almost homogeneously expressed on all FAB-types of AML considering the percentage of positive cells (average of 13-36% positive cells). The percentage of positive cells was however slightly higher in the FAB-type M5 (average of 36% positive cells) and lowest in M3 (average of 13% positive cells). Patients within the favorable cytogenetic risk group (**as described in publication 2, page 1**) showed an average expression of 14% HSP70<sup>+</sup>cells, while in patients of the poor risk group an average of 19% HSP70<sup>+</sup>cells were detected. Patients in complete remission were characterized by a lower expression of HSP70 (average of 6% positive cells) compared to patients in active stages of the disease (like initial diagnosis, persisting disease with an average of 20% and 26% positive cells). Evaluating a cut-off value we could show that patients with a higher expression of HSP70 (>33.0% HSP70<sup>+</sup>) showed a mean time of relapse-free survival of 6.4 months, while patients with less than 33.0% HSP70<sup>+</sup>cells had a significant longer progress-free survival of 20 months (p=0.04 log-rank-test). A higher percentage of positive cells also implied a higher mFI-value.

In an effort for further characterization of AML cells and to contribute new data according the prognosis, we investigated the expression of NG2 on mononuclear cells of AML patients with and without 11q23 aberrations at initial diagnosis in our third project (**methods described in publication 3, page 5**). We analyzed 70 bone marrow (BM) samples from AML patients for 11q23 aberrations and reactivity with the monoclonal antibody NG2. NG2 reactivity correlated with FAB-M5 (average of 50% positive cases with an average of 32% NG2<sup>+</sup>cells and high mFI-value), as well as with 11q23 aberrations. We detected NG2<sup>+</sup>cells in AML cases with normal karyotype, however not in healthy BM cells. That means that NG2 qualifies as a reliable AML blast tumor marker, enabling monitoring the course of AML independent of - although often associated with - 11q23-aberrations. Patients with more than 10% NG2<sup>+</sup>cells showed a tendency to a shorter progression free survival (mean: 7 months) than patients with fewer than 10% NG2<sup>+</sup>cells (mean survival: 17 months; p=0.08). While 31% of the patients with NG2<sup>+</sup>cells responded to chemotherapy, an average of 58% of the group with NG2<sup>+</sup>cells did not respond (p=0.047). In conclusion NG2 detects many, but not all 11q23 aberrations and other cases without 11q23 aberrations. However, it does not react with healthy BM cells, thereby contributing to the detection of patients with poor prognosis.

### **3.Einleitung**

AML resultiert aus einer Ansammlung von Blasten mit einem unterschiedlichen Grad an myeloischer Ausreifung. Das Wachstum und die Differenzierung von menschlichen Stammzellen werden streng durch spezifische Zytokine und Wachstumsfaktoren und deren entsprechende Rezeptoren reguliert. Bei der AML versagt diese Regulation und es kommt zur Akkumulation von Vorläuferzellen. Die phänotypische Charakterisierung dieser Zellen hinsichtlich des Phänotyps könnte möglicherweise helfen leukämische von gesunden Stammzellen zu unterscheiden und zur Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien beitragen (Sperr W, 2004; Wognum AW, 1996). Bei der ersten Arbeit untersuchten wir die Expression der Vorläuferzellmarker CD34 (sialomucin=hämatopoetisches Vorläuferzellantigen-1, HPCA-1), CD38 und CD90 (Thy-1) auf AML-Blasten. CD34 wird auf der Oberfläche von unreifen hämatopoetischen gesunden Vorläuferzellen, die ca. 1-2% umfassen, exprimiert (Katz FE, 1985). CD34 ist an der zellulären Adhäsion beteiligt und vermittelt die Resistenz zur Apoptose (Oyan AM, 2005). CD34<sup>+</sup>AML-Blasten sind mit zunehmendem Prozentsatz von CD34<sup>+</sup>Zellen sogar noch resistenter gegenüber dem programmierten Zelltod (Van Stijn A, 2003). CD38 hat vielfältige biochemische und biologische Funktionen und wird meist auf der Oberfläche von unreifen Zellen sowie unterschiedlichen hämatopoetisch aktivierte Zellen wie Lymphozyten und Myelozyten exprimiert. Außerdem konnte CD38 auch auf Myelozyten, Kardiomyozyten, Prostatazellen, Epithelzellen der Nieren und Neuronen nachgewiesen werden (Funaro A, 1990; Sieff C, 1982; Mehta K, 1996; Malavasi F, 1994). CD38 ist in der Lage die Synthese der zyklischen ADP-Ribose von NAD<sup>+</sup> zu NADP<sup>+</sup> zu induzieren und auch cADP-Ribose zu ADP-Ribose zu hydrolyseren (Mehta K, 1996; Grimaldi JC, 1995). CD38 soll eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Zellproliferation, Regulation der Apoptose und Differenzierung spielen. Weiterhin dient CD38 als Adhäsionsmolekül (Deaglio S, 1996). CD90 wird normalerweise auf unreifen hämopoetischen Zellen im Knochenmark exprimiert, jedoch auch auf neuronalen Zellen, Bindegewebs- und stromalen Zellen (Zucchini A, 2001). Die Funktion von CD90 ist noch nicht vollständig klar, aber möglicherweise ist es für die Adhäsion und Erkennung von hämopoetischen Zellen verantwortlich (Zucchini A, 2001; Low MG, 1985). Auf den meisten AML-Blasten ist CD90 nur schwach repräsentiert. Eine Expression von CD90 zeigt sich vor allen auf Blasten der sekundären AML, in Fällen mit einem komplex aberranten Karyotyp und in der de novo primären AML des älteren Patienten (Inaba T, 1997; Buccisano F, 2004).

Spezifische Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen die Apoptose. Bei der AML ist die Apoptose dereguliert und es kommt zu einer Expansion von malignen Zellen. Manche zytotoxische Medikamente induzieren die Apoptose (Lotem J 1992 und 1993; Sen S 1992). Hitze-Schock-Proteine (HSP) gehören zu einer Gruppe von konservierten Proteinen, welche v.a. bei biologisch-physiologischem Stress synthetisiert werden. Unter physiologischen Bedingungen dienen Hitze-Schock-Proteine als molekularer „Chaperon“ während der Zelldifferenzierung. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Verhinderung einer Aggregation von entfalteten Proteinen (Ellis R, 1991 und 1993; Morimoto RI, 1991; Kelley WL 1992). Bei Stress ist HSP70 stark in normalen und Tumorzellen, einschließlich leukämischer Zellen exprimiert (Volloch VZ, 1999; Chant ID, 1995). HSP70 ist bei der Inhibition der Apoptose involviert, indem es an das Genprodukt des Tumorsuppressorgens p53 bindet oder mit dem Apoptose einleitenden Faktor (AIF) interagiert (Hainaut P, 1992; Lane D, 1993; Ravagnan L, 2001; Gurbuxani S, 2003). Innerhalb der letzten Jahre wurde deutlich, dass HSP70 auch auf der Plasmamembran von Tumorzellen aber nicht auf dem korrespondierenden gesunden Gewebe vorkommt (Multhoff G, 1995; Shin B, 2003). Je nach ihrer intra- oder extrazellulären Lokalisation vermittelt HSP70 entweder schützende oder immunstimulierende Funktionen.

Akute myeloische Leukämien sind klonale Stammzellerkrankungen. Chromosomale Aberrationen haben große prognostische Signifikanz (Grimwade D, 1998). Weiterhin ermöglichen die multiparametrische Durchflusszytometrie und die Molekulargenetik nicht nur eine neue Klassifikation der AML sondern auch den Nachweis einer minimalen Resterkrankung. 11q23 Aberrationen resultieren aus einer Neuordnung des MLL-Gens (mixed lineage leukaemia-Gens), ein Gen, das in die Regulation der hämatopoetischen Zelldifferenzierung involviert ist (Wuchter C, 2000). Solche Aberrationen kommen in ca. 5-10% der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und in 5% der AML-Fälle vor und sind mit einer schlechten Prognose verbunden (Wuchter C, 2000). Der monoklonale Antikörper NG2 wurde entwickelt um unreife hämatopoetische Zellen und stromale Zellantigene zu identifizieren (Smith FO, 1996). Dieser Antikörper detektiert ein Homolog des 220-240 kDa Zelloberflächen-Chondroitinsulfats und reagiert nicht mit normalen hämatopoetischen Zellen, sondern nur mit Zellen von Patienten mit AML oder ALL mit der neugeordneten 11q23/MLL-Gen Aberration (Wuchter C, 2000; Smith FO, 1996).

## **Zielsetzung der Arbeit:**

Die AML stellt eine sehr heterogene Gruppe im Hinblick auf das Vorkommen klonaler Chromosomenaberrationen, ihres Immunphänotyps und Zellmorphologie mit daraus resultierenden unterschiedlichen Krankheitsverläufen (hinsichtlich der Prognose) dar. Patienten mit einer ungünstigen Prognose bedürfen einer aggressiveren Therapie und engmaschigeren Verlaufskontrollen als Patienten mit einer günstigen Prognose. Trotz der Verbesserung aktueller diagnostischer und therapeutischer Optionen der AML, zeigt das Langzeit-Überleben v.a. des älteren Patienten weiterhin unbefriedigende Ergebnisse (Derolf ÅR, 2009). Aufgrund der nach wie vor bestehenden beträchtlichen Nebenwirkungen der zytotoxischen Therapie wäre eine zielgerichtete Therapie gegen leukämische Zellen insbesondere bei älteren, häufig multimorbidem Patienten wünschenswert. Auch könnte eine möglichst frühzeitige Diagnose einer minimalen Resterkrankung durch eine rechtzeitige Einleitung der notwendigen Therapie zu einer weiteren Verbesserung der Prognose führen. Daher war die Zielsetzung dieser Arbeit zu prüfen, ob bestimmte „Marker“ (die Vorläuferzellmarker CD34, CD38 und CD90 sowie das Hitze-Schock-Protein 70 und der monoklonale Antikörper NG2) auf den leukämischen Zellen mit prognostischen Faktoren, der Zytogenetik, dem FAB-Subtyp und dem Therapieansprechen sowie einem rezidivfreien Überleben korrelieren bzw. selbst als Tumormarker oder „Prognosemarker“ qualifizieren und eine Differenzierung zu gesunden Zellen erlauben. Das Potential dieser Marker für die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie sowie die Diagnose einer minimalen Resterkrankung sollte geprüft werden.

### **3.1. Das Expressionsprofil der Vorläuferzellmarker CD34, CD38 und CD90 bei akuter myeloischer Leukämie und deren prognostische Bedeutung**

#### **3.1.1. Expression von Vorläuferzellmarker in unterschiedlichen AML-Subtypen und zytogenetischen Risikogruppen**

Eine leukämische Probe wurde als positiv für den jeweiligen Vorläuferzellmarker definiert, wenn >20% der Zellen den entsprechenden Vorläuferzellmarker exprimierten.

Wir untersuchten mononukleäre Zellen von 56 Patienten mit verschiedenen AML Subtypen bei Erstdiagnose (**Charakterisierung des Patientenkollektivs siehe Publikation 1, Tabelle 1**). CD34 wurde hauptsächlich in den unreifzellen Subtypen M0 und M1 exprimiert (100% und 88% positive Fälle mit 60% und 61% positive Zellen), jedoch weniger in anderen FAB-Typen, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren (29-64% positive Fälle mit 23-43% positiven Zellen; **Publikation 1, Abbildung 1**). In unserer Analyse wiesen 57% der untersuchten AML-Proben mehr als 20% CD34<sup>+</sup>Zellen auf, was gut mit den Ergebnissen anderer Studien korreliert: Legrand et al (Legrand O, 2000) detektierten 68% (CD34 HPCA2 Antikörper) und Chang et al (Chang H, 2004) detektierten 65% CD34<sup>+</sup>AML-Proben, wobei der gleiche Antikörper wie in unserer Studie verwendet wurde. Jedoch zeigte eine Metaanalyse einer anderen Studie (Basso G, 2001) eine große Heterogenität bezüglich der CD34<sup>+</sup>Fälle (25-64% positive Fälle). Dies könnte auf methodischen Unterschieden hinsichtlich der Detektion der Rezeptorexpression wie variierenden Fluorochrom-Markierungen der Antikörper, variierenden „Gates“ und unterschiedlichen Epitopspezifitäten der Antikörper, verschiedenen „Cut-off“ Grenzen für die Unterscheidung von positiven und negativen Fällen oder unterschiedlichen Zusammensetzungen der Patientenkollektiven (wie de novo oder sekundäre AML) beruhen. Die Ergebnisse weiterer Studien, die einen antiCD34 FITC monoklonalen Antikörper verwendeten und eine AML-Probe als positiv definierten wenn > 15% der Zellen CD34 exprimierten, bestätigten mit 51% CD34<sup>+</sup>Proben unsere Daten. Zudem beobachteten sie die höchste Expression von CD34 in den FAB-Typen M0 und M1 und die niedrigste Expression in M3 und M5 (Legrand O, 2000; Chang H, 2004; Basso G, 2001; Raspadori D, 1997). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Expression von CD34 von dem Reifegrad und der Linienzugehörigkeit leukämischer Zellen abhängt. CD38 war in allen AML-FAB-Subtypen ohne wesentliche Unterschiede hoch exprimiert bei jedoch eher niedrigem mFI-Wert (94-100% positive Fälle mit durchschnittlich 63-81% positive Zellen; **Publikation 1, Abbildung 1**). Ein signifikant höherer mFI-Wert war in M2 festzustellen ( $329 \pm 242$ ;  $p=0.024$ ). Dies korreliert nicht mit den Ergebnissen einer anderen Studie, in der nur 5-55% positive Zellen detektiert wurden. Hierbei wurde jedoch lysiertes Vollblut sowie eine andere Färbemethode verwendet (Keyhani A, 2000), was den höheren Prozentanteil an CD38<sup>+</sup>Lymphozyten in unseren „Gates“ erklären könnte. Sie fanden ebenfalls eine signifikant niedrigere Expression im FAB-Typ M3, was wir nicht bestätigen konnten und was möglicherweise an unseren niedrigeren Fallzahlen ( $n=56$ ) verglichen mit den Fallzahlen von Keyhani et al ( $n=304$ ) liegt. CD38 ist kein spezifischer Marker für Blasen: er weist auf einen hohen NAD+-Stoffwechsel hin, was bei einer Vielzahl von Zellformen vorkommt (z.B. auf Lymphozyten, Myelozyten und Myozyten) [Keyhani A, 2000]. Die Anteile von

CD90<sup>+</sup>Zellen war im Subtyp M3 am höchsten ( $73 \pm 26$  positive Zellen), in den übrigen Subtypen (24-41% positive Zellen) zeigte sich eine in etwa gleiche Menge positiver Zellen mit Ausnahme in M0 (9% CD90<sup>+</sup> Zellen). Der Prozentsatz an positiven Fällen variierte zwischen 0% und 81% (**Publikation 1, Abbildung 1**). In unserer Arbeit waren 66% der untersuchten 56 AML-Fälle CD90<sup>+</sup>. Buccisano F. et al (2004) detektiert nur 17% CD90<sup>+/CD34<sup>+</sup> koexprimierende Fälle bei Kombination eines FITC-konjugiertem anti-CD90 5E10 mit einem PE-markierten anti-CD34 monoklonalen Antikörper. In vorhergehenden Arbeiten wurden ebenfalls weniger CD90<sup>+</sup>Fälle dokumentiert, wobei immer die CD90-Expression (AK 5E10) an CD34<sup>+</sup>Zellen untersucht wurde (Blair A, 1997). Die höchste Expression zeigte sich in AML-M3, wohingegen in anderen Studien keine Unterschiede bezüglich der FAB-Typen festgestellt wurden, allerdings waren in dieser Studie nur 5% der Fälle CD90<sup>+</sup> bei Verwendung eines FITC-konjugierten anti-CD90 MoAb 5E10 (Wucherer C, 2001).</sup>

Insgesamt zeigte das Profil der Vorläuferzellmarker in den einzelnen Untergruppen der AML keine signifikanten Unterschiede (**Publikation 1, Abbildung 1**).

Die Patienten wurden in günstige, intermediaire und ungünstige zytogenetische Risikogruppen unterteilt. In Übereinstimmung mit einer anderen Studie (Legrand O, 2000) fanden wir ebenfalls keine Korrelation zwischen der Expression von CD34 und zytogenetischen Risikogruppen, wobei der mFI-Wert von allen drei Vorläuferzellmarker in der günstigen Risikogruppe höher als bei ungünstigen Risikogruppen war (**Publikation 1, Abbildung 2**). Es gibt kontroverse Kommentare bezüglich der Korrelation der CD90-Expression mit zytogenetischen Risikogruppen. Während eine Arbeit einen Zusammenhang der CD90-Expression mit der ungünstigen zytogenetischen Risikogruppe sah, stellte eine andere Studie - in Einklang mit den Ergebnissen unserer Arbeit - einen solchen Korrelation nicht fest (Buccisano F, 2004).

### 3.1.2. Expression der Vorläuferzellmarker und deren prognostische Signifikanz

Wir untersuchten den Einfluss der Vorläuferzellmarkerexpression auf die Remissionswahrscheinlichkeit. Hierzu verglichen wir Daten von Patienten, welche nach der Doppelinduktionstherapie mit TAD/HAM eine Remission erreichten mit den Daten von Patienten, die therapierefraktär waren. Signifikante Unterschiede der Vorläuferzellmarkerexpression in den Gruppen fanden sich nicht. Weiterhin wurde bei Patienten über und unter 65 Jahren die Wahrscheinlichkeit rezidivfreien Überlebens untersucht. Obwohl die älteren Patienten ein kürzeres rezidivfreies Überleben hatten, fand sich in den beiden Gruppen hinsichtlich der Expression der Vorläuferzellmarker kein signifikanter Unterschied. Für alle Vorläuferzellmarker wurden „Cut-off“ Werte - der Prozentsatz an positiven Zellen - ermittelt, welche den größten Unterschied zwischen Fällen mit kürzerer bzw. längerer rezidivfreier Überlebenszeit repräsentierten. Der größte Unterschied zeigte sich bei Patienten deren Knochenmarksproben mehr oder weniger als 43% CD34<sup>+</sup> ( $p=0,12$  log-rank-test), 65% CD38<sup>+</sup> ( $p=0,48$  log-rank-test) und 64% CD90<sup>+</sup> Blasen ( $p=0,09$  log-rank-test) enthielten. Hierbei war eine höhere Expression von CD34 und CD38 sowie eine weniger ausgeprägte Expression von CD90 mit einer schlechteren Prognose für diese Patienten verbunden. Nach einer Beobachtungszeit von 10 Monaten hatten nur 58% der Patienten mit mehr als 43% CD34<sup>+</sup> Zellen ein rezidivfreies Überleben, während 80% der Patienten mit weniger als 43% CD34<sup>+</sup> Zellen sich noch in Remission befanden (**Publikation 1, Abbildung 3**). In beiden Gruppen waren die Anzahl der Fälle hinsichtlich Alter und FAB-Subtyp annähernd gleich repräsentiert, während in der Gruppe mit mehr CD34<sup>+</sup> Zellen mehr Fälle mit günstigem Risiko und in der Gruppe mit weniger CD34<sup>+</sup> Zellen Fälle mit intermediarem Risiko repräsentiert waren. 60% der Patienten mit mehr als 65% CD38<sup>+</sup> Zellen zeigten nach durchschnittlich 10 Monaten ein Rezidiv. Hingegen fanden sich bei den Patienten mit weniger als 65% CD38<sup>+</sup> Zellen keine Rezidive nach einer Beobachtungszeit von 10 Monaten (bei jedoch nur 6 Patienten in dieser Gruppe, **Publikation 1, Abbildung 3**). Wir konnten zeigen, dass Patienten, die eine Remission erreichten und die > 43% CD34<sup>+</sup> Blasen exprimierten tendenziell - wenn auch nicht signifikant – eine kürzere rezidivfreie Überlebenszeit hatten, als Patienten mit einem Anteil < 43% CD34<sup>+</sup> Blasen. Eine mögliche Erklärung könnte eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose bei höherem CD34-Anteil sein, welche in einer ungünstigen Prognose resultiert (Van Stijn A, 2003). Ähnliche Daten sind über den prognostischen Wert der CD34-Expression bei AML vorhanden: Andere Gruppen beobachteten sowohl eine erniedrigte Rate an kompletter Remission als auch ein verminderter Gesamtüberleben bei Patienten mit einer CD34<sup>+</sup> AML (Raspadori D, 1997; Myint H, 1992; Solary E, 1992; Heuser M, 2005). Im Gegensatz dazu fand eine andere Arbeit, dass CD34 alleine kein unabhängiger Marker für die Prognose sein kann, da er in ihrer Studie sowohl mit günstigen (t(8;21) und inv(16), niedrige Leukozytenzahlen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose) als auch mit ungünstigen prognostischen Markern (ungünstiges zytogenetisches Risiko) assoziiert war (Legrand O, 2000; Heuser M, 2005). Daher wird empfohlen CD34 in Kombination mit anderen Markern zu verwenden. Wir fanden ähnliche Ergebnisse für die Expression von CD38, bei jedoch sehr kleinem Patientenkollektiv. Patienten mit mehr als 65% CD38<sup>+</sup> Blasen zeigten eine tendenziell kürzere rezidivfreie Überlebenszeit als Patienten mit weniger als 65% CD38<sup>+</sup> Blasen (**Publikation 1, Abbildung 3**). Andere Studien zeigten, dass Patienten mit einer höheren CD38 Expression signifikant längere und häufigere Remissionen und ein längeres rezidivfreies Überleben hatten (Keyhani A, 2000). Es sei erwähnt,

dass die Patientengruppe mit niedrigeren CD38 Anteilen nur aus 6 Patienten bestand. Weiterhin war die Beobachtungszeit der Patienten mit weniger als 65% CD38<sup>+</sup>Zellen nur 10 Monate und der Unterschied in den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz zu den anderen beiden Vorläuferzellmarkern wiesen die Patienten mit einem höheren Anteil an CD90<sup>+</sup> Zellen tendenziell eine bessere Prognose auf. Während 58% der Patienten mit weniger als 65% CD90<sup>+</sup>Zellen nach 10 Monaten ein Rezidiv hatten, waren alle Patienten mit mehr als 65% CD90<sup>+</sup>Zellen nach 24 Monaten immer noch in Remission (**Publikation 1, Abbildung 3**). Es war bemerkenswert, dass das Patientenkollektiv mit höheren CD90<sup>+</sup> Zellanteilen keine Fälle mit ungünstigem Risiko enthielt. Dies korreliert nicht mit den Ergebnissen einer anderen Arbeit, bei der hohe CD90<sup>+</sup> Zellanteile mit einer kürzeren Überlebenszeit sowie mit undifferenzierter SAML und ungünstigem Karyotyp korrelierten (Buccisano F, 2004), letzteres konnten wir bestätigen. Es muss angemerkt werden, dass die Analyse von relevanten molekularen Markern (z.B. NPM, FL-Mutationen) für unser Patientenkollektiv nicht zur Verfügung stand und dass unserem Kollektiv kein Fall mit dem prognostisch ungünstigen Subtyp M5 angehörte. Zudem bestand die Gruppe mit höheren CD90<sup>+</sup>Zellanteilen aus nur 6 Patienten. Weiterhin präsentierte 50% der 6 Patienten den FAB-Typ M3, welcher generell mit einer guten Prognose korreliert (Döhner K, 1998). Ob das Vorhandensein von M3 in dieser Gruppe Zufall ist oder ob M3 wirklich mit einem hohen CD90<sup>+</sup> Zellanteil assoziiert ist, bleibt unklar. Unsere AG konnte bereits zeigen, dass hohe Anteile an Zellen mit Vorläuferzellprofil mit einer ungünstigen Prognose korrelieren. Patienten, die in Remission gingen und einen höheren Anteil an CD135 (cut-off Wert 85,5%; [Graf M, 2004]) oder CD117 (cut-off value 45% [Graf M, 2004]) aufwiesen, hatten signifikant kürzere rezidivfreie Überlebenszeiten analog zu unseren Patienten mit hohen Anteilen an CD34 und CD38 exprimierenden Blasen.

Weitere prospektive Studien mit einer repräsentativeren Anzahl an Patienten sollten folgen um die prognostische Relevanz der Expression von Vorläuferzellmarkern weiter zu evaluieren.

Entscheidungen über eine intensivierte Therapie erfolgten hauptsächlich nach genetischen Kriterien (Funaro A, 1990; Mandelli F, 1998). Unglücklicherweise können in etwa der Hälfte der Patienten keine spezifischen Chromosomenaberrationen gefunden werden, so dass neue prognostisch relevante Marker von Nöten sind (Grimwade D, 1998). Möglicherweise könnten Patienten mit einem prognostisch ungünstigen hohen Anteil an CD34<sup>+</sup> und CD38<sup>+</sup>Zellen z.B. von einer intensiveren Konsolidierungstherapie oder einer frühen Knochenmarktransplantation profitieren.

### **3.1.3. Beitrag der Expression von CD34, CD38 und CD90 zur Detektion einer minimalen Resterkrankung von AML**

Wenngleich aufgrund der Heterogenität der AML kein einzelnes AML-spezifisches Antigen verfügbar ist, so erlaubt der Nachweis von Leukämie-assoziierten Immunophänotypen die Detektion der minimalen Resterkrankung. Die Kombination mit linienuntypischen Markern wie CD56, CD65/TdT, CD14/HLA-DR oder CD13/CD33/CD7, CD34 kommt z.B. für die Detektion der minimalen Resterkrankung in Betracht (Campana C, 1995). Auch der IL-3-Rezeptor könnte ein nützlicher Marker für die Diagnostik der minimalen Resterkrankung sein, da er nur auf CD34<sup>+</sup>leukämischen Blasen jedoch nicht auf gesunden CD34<sup>+</sup>Zellen vorkommt (Jordan CT, 2000). Weiterhin wurde beobachtet, dass AML – Stammzellen mit einem hohen Anteil an CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>Zellen bei Erstdiagnose auf eine hohe Rate an minimaler Resterkrankung und ungünstiger Prognose hindeuten (van Rhenen A, 2005). Hierbei können leukämische CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>Stammzellen von gesunden hämatopoetischen CD34+CD38<sup>+</sup>Stammzellen durch die Messung der ALDH Aktivität unterschieden werden und somit eine Aussage über ein konsekutives Rezidiv erfolgen (Gerber JM, 2012). Da die Vorläuferzellenmarker-Expression streng reguliert ist, bedarf es weiterer Studien in nicht-leukämischem Knochenmark von Patienten mit regenerativen physiologischen Prozessen (z.B. mit schwerer Anämie) und in leukämischen Knochenmark von Patienten nach einer Behandlung mittels Chemotherapie.

## **3.2. Assoziation einer hohen HSP70-Membran Expression auf leukämischen Zellen von Patienten mit AML mit einer schlechten Prognose**

### **3.2.1. Die HSP70 Expression in unterschiedlichen AML-Subtypen und zytogenetischen Risikogruppen**

In gesunden Proben wurden weniger als 5% HSP70<sup>+</sup>Zellen detektiert. In unserer Patientenkohorte wurden 55% der untersuchten AML-Proben als HSP70<sup>+</sup> definiert, wenn mehr als 10% der Zellen, die HSP70 und einen AML-spezifischen Marker koexprimierten, identifiziert wurden. Wir konnten bereits zeigen, dass 75% der AML-Proben HSP70<sup>+</sup> waren, in dem wir Proben als HSP70<sup>+</sup> definierten, wenn mehr als die Hintergrundpositivität auf gesunden Knochenmarkszellen evaluiert wurde (Gehrman M, 2003; Hantschel M, 2000).

Wir untersuchten die Expressionscharakteristik und die prognostische Bedeutung der HSP70 Expression von 92 AML-Patienten bei Erstdiagnose (**Charakterisierung des Patientenkollektivs siehe Publikation 2, Seite 1**). HSP70 wurde in allen FAB-Typen exprimiert (13-36% positive Zellen). Die höchste HSP-Expression (betrifft sowohl die Anzahl an positiven Fällen als auch die höchste Dichte) trat in Fällen mit FAB-Typ M5 auf, die niedrigste in M3. Keine Unterschiede zeigten sich zwischen den FAB-Subtypen M4eo und M4, den anderen Subtypen oder zwischen den Fällen mit primärer oder sekundärer AML (**Publikation 2, Abbildung 1**). Weniger HSP70<sup>+</sup>Zellen wurden in Fällen mit günstigem Karyotyp, entdeckt allerdings war der Unterschied nicht signifikant ( $p=0,53$ , **Publikation 2, Abbildung 2**). Dies korreliert mit Ergebnissen einer anderen Studie, in der ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der HSP70-Expression und zytogenetischen Risikogruppen detektiert werden konnte (Chen-Hsiung Y, 2010).

### **3.2.2. HSP70 Expression im Krankheitsverlauf der AML und prognostische Bedeutung**

Bei Patienten in kompletter (morphologischer) Remission fanden sich 25% positive Fälle, bei Erstdiagnose, in persistierender Erkrankung oder in Rezidiven hingegen 55%, 60% und 64%. Patienten in kompletter Remission exprimierten hierbei weniger HSP70<sup>+</sup>Zellen (6%), als Patienten bei Erstdiagnose, in persistierender Erkrankung oder im Rezidiv (20,26 und 13% positive Zellen, **Publikation 2, Abbildung 3**). Ein Vergleich der HSP70-Expression in der „Responder“ und „Non-responder“-Gruppe in Bezug auf die Chemotherapie zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Wir konnten einen „Cut-off“ Wert für den Prozentsatz an HSP70<sup>+</sup>Zellen definieren, der mit höchster Wahrscheinlichkeit für eine signifikante Unterscheidung der Gruppen mit kürzerer bzw. längerer rezidivfreier Überlebenszeit ermöglicht: so wiesen Patienten mit weniger als 33% HSP70<sup>+</sup>Blasten in Knochenmarksproben ein signifikant längeres Überleben auf als Patienten mit höheren Anteilen ( $p=0,04$  log-rank-test). Während die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit für die Patienten mit weniger als 33% HSP70<sup>+</sup>Zellen 20,1 Monate betrug, lag die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit für Patienten mit mehr als 33% HSP70<sup>+</sup>Zellen bei nur 6,4 Monaten (**Publikation 2, Abbildung 4**). In beiden Gruppen war das mittlere Alter vergleichbar. Auch in einer anderen Studie war eine signifikant kürzere Überlebenszeit mit höheren HSP70<sup>+</sup>Zellanteilen verbunden (Chen-Hsiung Y, 2010), wenngleich in dieser Studie eine andere Maßeinheit für die Höhe der HSP70<sup>+</sup>Zellanteile definiert wurde. Eine mögliche Erklärung für die Korrelation der HSP70 Expression mit der Prognose könnte sein – wie in anderen Studien bereits gezeigt (Nylandsted J, 2004; Ciocca D, 2005)–, dass die endosomale und lysosomale HSP70-Expression eine Resistenz gegen die Apoptose vermitteln kann, indem sie eine mit dem Zelltod assoziierte Membranpermeabilität inhibiert. Patienten mit einem höheren Anteil an HSP70<sup>+</sup> Blasten könnten eine kürzere rezidivfreie Überlebenszeit haben, weil ihre leukämischen Blasten resistenter gegenüber der Apoptose sind. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Gruppe mit größerem Anteil an HSP70<sup>+</sup>Zellen keinen Patienten mit einem günstigen Risiko oder dem FAB-Typ M3 enthielt, was gewöhnlich mit einer guten Prognose assoziiert ist. Insgesamt ist somit festzustellen, dass hohe Anteile an HSP70<sup>+</sup>Zellen bei Patienten mit AML ebenso bei Patienten mit soliden Tumoren wie Mamma-, Endometrium-, Zervix-, Kolorektales- und Hepatozelluläres Karzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Ciocca D, 2005; Shotar A, 2005 und Luk J, 2006). Eine höhere Remissionsrate korreliert hingegen mit einer signifikant längeren mittleren Überlebenszeit für Patienten mit niedrigeren HSP70<sup>+</sup>Zellanteilen (Thomas X, 2005; Yeh CH, 2010).

### **3.2.3. Beitrag der HSP70 Expression zur Detektion einer minimalen Resterkrankung von AML**

Die Immunphänotypisierung wird als äußerst nützlich bei der Diagnostik einer minimalen Resterkrankung bei der Verlaufskontrolle von AML-Patienten betrachtet. Verglichen zu den aktiven Stadien der Erkrankung, entdeckten wir, dass AML-Patienten in kompletter Remission niedrigere HSP70<sup>+</sup>Zellanteile zeigten. Da HSP70 nicht auf der Oberfläche von gesunden Knochenmarkszellen exprimiert wird (Hantschel M, 2000; Greiner J, 2003; Gehrmann M, 2003) qualifiziert HSP70 als Tumormarker. Da jedoch HSP70 nicht auf allen bzw. teils in nur geringer Menge auf leukämischen Zellen vorhanden ist, kann die Expression dieses Markers im klinischen Verlauf nur unter Berücksichtigung des Expressionsprofils bei Diagnosestellung verwendet werden. Ob HSP70 wirklich als ein Parameter für die Diagnostik der minimalen Resterkrankung dienen kann, muss in weiteren Studien mit einer repräsentativen Anzahl an AML-Patienten vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Erreichen der kompletten Remission und deren Verlauf bzw. im Kontext von Rezidiven evaluiert werden.

### **3.2.4. Therapeutische Perspektiven in der Zukunft**

Da die Chemotherapie nicht nur leukämische sondern auch gesunde hämatopoetischen Zellen angreift, ist die Entwicklung einer spezifischen zielgerichteten Therapie wünschenswert. In der Tat gibt es vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer gegen HSP70 gerichteten Therapie: Frühere Studien zeigten, dass HSP70 ein Ziel für natürliche Killerzellen ist, auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert wird und eine gesteigerte Sensitivität zu allogenetischen natürlichen Killerzellen vermittelt (Gehrmann M, 2003; Botzler C, 1996a und b, Multhoff G, 1997 und 1999). Natürliche Killerzellen, die mit einer niedrig dosierten Interleukin 2 Dosis und rekombinantern HSP70 aktiviert wurden, können eine zytotoxische Antwort gegen autologe HSP70<sup>+</sup>Blasten auslösen (Hantschel M, 2000; Multhoff G, 1999). In vitro wurde bereits ein anitleukämischer Effekt u.a. durch Unterbindung der zytokinabhängigen AML-Zellproliferation sowie Förderung der Apoptose mittels HSP70-Inhibitoren nachgewiesen (Reikvam H, 2013; Kaiser M, 2011). Diese Therapie könnte insbesondere für Patienten mit hoher HSP70-Expression von Bedeutung sein. Um die Effektivität einer solchen Therapie weiter zu evaluieren sind klinische Studien unerlässlich.

## **3.3. Positivität des „Tumormarkers“ NG2 (7.1) bei AML als Tumormarker und seine Assoziation mit einer schlechten Prognose**

### **3.3.1. Korrelation von NG2-Positivität und der genetischen Aberration 11q23**

In gesunden Proben wurden weniger als 5% NG2<sup>+</sup>Zellen detektiert, was wir als Hintergrundfärbung definierten. Bei dem Versuch die Positivität für NG2 Zellen bei AML näher zu charakterisieren, untersuchten wir 8 Patienten mit und 62 Patienten ohne eine 11q23 Aberration. Während NG2 in 63% der Fälle mit 11q23 Aberration korreliert waren, waren es in der Gruppe ohne 11q23 nur 29% positive Fälle. Ein ähnliches Ergebnis wurde beobachtet, wenn man den Anteil an NG2<sup>+</sup>Zellen betrachtete: Mit einem Anteil von 30% NG2<sup>+</sup>Zellen in der 11q23-Gruppe war ein signifikant höherer Prozentsatz an positiven Zellen zu vermessen, als in der Patientengruppe ohne diese Aberration (13% positive Zellen; p=0,0004; **Publikation 3, Abbildung 1**). 11q23 Aberrationen sind hauptsächlich mit der monoblastischen Leukämie und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Schoch C, 2003). Wir konnten ebenfalls eine Assoziation von NG2-Positivität und einem ungünstigen zytogenetischen Karyotyp sowie 11q23 Aberrationen - wie auch von anderen Gruppen gezeigt - nachweisen (Hilden J, 1997; Neudenberger J, 2006; Hrusak O, 2002). Unsere Daten zeigten, dass alle Fälle mit einer t(9;11q23) Translokation auch NG2<sup>+</sup> waren, aber nicht alle Fälle mit anderen chromosomal Translokationspartnern für 11q23, was ebenfalls mit den Ergebnissen anderer Studien korreliert (Mauvieux L, 1999; Hilden J, 1997). Dies bedeutet, dass NG2 kein spezifischer Marker für alle 11q23 Aberrationen ist, jedoch für bestimmte 11q23 Untergruppen, die möglicherweise mit bestimmten Bruchstellen in dem mit 11q23 assoziierten MLL-Gen verbunden sind (Mauvieux L, 1999; Hilden J, 1997). Zudem ist die Positivität von NG2 nicht immer auf 11q23 Aberrationen beschränkt und kann auch in Fällen mit normalem Karyotyp nachgewiesen werden und somit ein verlässlicher Marker zur Verlaufskontrolle von AML-Erkrankten sein.

### **3.3.2. NG2-Positivität in unterschiedlichen AML-Subgruppen und zytogenetischen Risikogruppen**

In unserer Patientenkohorte waren 31% der untersuchten AML-Proben NG2<sup>+</sup> (**Charakterisierung des Patientenkollektives siehe Publikation 3, Tabelle 1**). Hinsichtlich der Verteilung der Positivität von NG2 in den AML-Subtypen untersuchten wir die NG2-Expression und die Expressionsdichte (MFI) in unterschiedlichen FAB-Typen und zytogenetischen Risikogruppen der AML. Eine NG2-Expression kam in allen FAB-Subtypen vor (2-32% positive Zellen). Während 50% der Patienten mit dem FAB-Typ M5 NG2 exprimierten, war NG2 in M3 überhaupt nicht exprimiert. Dies korreliert mit den Ergebnissen von anderen Studien, wo die NG2-Reaktivität meist in den monoblastischen FAB-Typen M4/5 auftrat, einschließlich Fällen mit und ohne 11q23 Aberrationen (Smith FO, 1996; Mauvieux L, 1999). Kein Unterschied zeigte sich in der Expression in den Typen M4eo, M4 oder den restlichen Subtypen als auch nicht zwischen den Fällen mit primärer oder sekundärer AML. Wir zeigten, dass bei 50% der Fälle mit AML M5 durchschnittlich 32% NG2<sup>+</sup>Zellen nachgewiesen werden konnten, während sich 0-50% positive Fälle in den verbleibenden FAB-Typen mit jedoch signifikant weniger NG2<sup>+</sup>Zellen zeigten (2-8%, p=0.005; **Publikation 3, Abbildung 2**). Dies korreliert auch mit der Expressionsdichte.

Alle Patienten wurden in günstige, intermediäre oder ungünstige zytogenetische Risikogruppen unterteilt: Patienten mit einem ungünstigen Karyotyp zeigten eine höhere Expression von NG2<sup>+</sup>Zellen im Vergleich zu den Patienten mit einem günstigen Karyotyp (p=0,05): 47% der Patienten mit einem ungünstigen zytogenetischen Risiko exprimierten NG2, im Gegensatz zeigten Patienten mit einem günstigen zytogenetischen Risiko nur 24% positive Fälle. Das höchste Expressionsniveau von NG2 zeigten also Patienten mit dem FAB Typ M5 und einem ungünstigen zytogenetischen Risiko (**Publikation 3, Abbildung 3**).

### **3.3.3. Die prognostische Bedeutung der NG2-Positivität**

Wir verglichen die Expression von NG2 von Patienten, welche die Remission erreichten (n=26) mit der von Patienten die eine persistierende Erkrankung (n=12) nach der Doppelinduktionstherapie mit TAD/HAM aufwiesen. Patienten, die auf die Therapie ansprachen wiesen signifikant weniger NG2<sup>+</sup>Zellen auf (7% positive Zellen) als die Patienten, die nicht auf die Chemotherapie ansprachen (18% positive Zellen; p=0.047; **Publikation 3, Abbildung 4**). Um die prognostische Signifikanz der NG2<sup>+</sup> AML weiter zu evaluieren, bestimmten wir „Cut-off“ Werte für die relevante Differenzierung zwischen Fällen mit einer kürzeren und längeren rezidivfreien Überlebenszeit. Der Wert mit der besten Unterscheidbarkeit der Gruppen wurde für den Nachweis von 10% NG2<sup>+</sup>Zellen errechnet: für Patienten mit mehr als 10% NG2<sup>+</sup>Zellen zeigte sich eine kürzere rezidivfreie Überlebenszeit. Insgesamt wurden 31 Patienten in die Analyse eingeschlossen, davon wiesen 23 Patienten weniger oder genau 10% NG2<sup>+</sup>Zellen und 8 Patienten mehr als 10% NG2<sup>+</sup>Zellen auf. Wohingegen die Patienten in der zuerst genannten Gruppe im Mittel eine rezidivfreie Überlebenszeit von 17 Monaten aufwiesen, waren es bei den Patienten mit mehr als 10% NG2<sup>+</sup>Zellen im Mittel nur 7 Monate (**Publikation 3, Abbildung 5**). Der Unterschied war tendenziell signifikant (p=0,08). Dies deutet darauf hin, dass die NG2 Expression bei AML direkt mit der Prognose der Patienten korreliert. Ein „Cut-off“ Wert könnte für die Unterteilung in Gruppen mit günstiger und ungünstiger Prognose festgelegt werden. Andere Gruppen zeigten bereits, dass der Nachweis von NG2 - hierbei den Nachweis von 11q23 Aberrationen widerspiegeln - mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Smith FO, 1996; Hilden J, 1997; Behm F, 1996). Auch bei soliden Tumoren wie dem Weichteilsarkom korrelierte ein hoher Anteil an NG2<sup>+</sup>Zellen im Primärtumor mit einer kürzeren Zeit bis zum Auftreten von Metastasen nach initial kurativer Operation (Cattaruzza S, 2013). In unserer Studie war die NG2 Reaktivität zudem mit einem höheren Prozentsatz an „Non-respondern“ zur Chemotherapie und mit ungünstigem zytogenetischen Risikotyp verbunden. Die NG2-Positivität ist nicht auf 11q23 Aberrationen beschränkt und die Höhe an NG2<sup>+</sup>Zellen im untersuchten Material ist prädiktiv für ein rezidivfreies Überleben unabhängig von der Anwesenheit von 11q23. NG2 qualifiziert daher als Tumormarker, um den Verlauf von NG2<sup>+</sup>AML durch Immunophänotypisierung zu kontrollieren. Dies wird als besonders nützlich bezüglich der Detektion einer minimalen Resterkrankung bei AML-Patienten in Remission betrachtet (Wuchter C, 2000).

Im Tierversuch führte eine zielgerichtete Therapie gegen NG2 zu einer gesteigerten Rate an Apoptose und Nekrose bei Glioblastom- und Melanomzellen (Wang J, 2011). Dies deutet darauf hin, dass auch eine zielgerichtete Therapie gegen NG2 bei AML erfolgsversprechend sein könnte.

### **3.4. Schlussfolgerung**

Die Messung der Vorläuferzellmarker CD34, CD38 und CD90 ergab in allen FAB-Typen eine homogene Verteilung. Die Expression von HSP70 und NG2 hingegen zeigt im FAB-Typ M5 höhere und im FAB-Typ M3 niedrigere Werte. Damit sind lediglich die letztgenannten Marker als unterscheidendes Merkmal der FAB-Typen eingeschränkt geeignet.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Anteile detektierbarer rezeptorpositiver Zellen Prognosen bezüglich des Krankheitsverlaufs erlauben. In Kombination mit weiteren Oberflächenantigenen können gesunde von leukämischen Stamm- und Vorläuferzellen unterschieden werden. Auf dieser Grundlage wird die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie gegen leukämische Oberflächenantigene möglich. Besonders wirksam erscheint die Anpassung der Therapieprotokolle, wenn die folgenden Voraussetzungen in Teilen erfüllt sind: Modifikation der Signaltransduktion als Therapie, Immuntherapie oder Vorliegen eines intermediären Risikokaryotyps. Insbesondere für eine gegen HSP70 gerichtete Therapie gibt es bereits vielversprechende Daten. Unsere Studie zeigt weiterhin, dass NG2 ein passender Marker ist, um AML-Untergruppen festzulegen, die oft - wenn auch nicht nur - mit monoblastischen und 11q23 aberrierenden Untergruppen assoziiert sind. Da NG2 auf gesunden Knochenmarkszellen nicht nachzuweisen ist, kann er in NG2<sup>+</sup>AML-Fällen zum Monitoring und zur Detektion einer minimalen Resterkankung als sensitiver Tumormarker dienen. Darüber hinaus liefert die Quantifizierung der NG2<sup>+</sup>Zellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wertvolle Hinweise zum möglichen Krankheitsverlauf.

## **4. Literaturverzeichnis**

Basso G, Lanza F, Orfao A, Moretti S, Castaldi G: Clinical and biological significance of CD34 expression in acute leukaemia. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001, 15: 68-78

Behm F, Smith F, Raimondi S, Pui C, Bernstein I: Human homologue of the rat chondroitin sulfate proteoglycan, NG2, detected by monoclonal antibody NG2, identifies childhood acute lymphoblastic leukemias with t(4;11)(q21;q23) or t(11;19)(q23;p13) and MLL gene rearrangements. *Blood* 87 1996, 3: 1134-1139

Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Landsdorp PM, Sutherland HJ: Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukaemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* 1997, 89: 3104-3112

Botzler C, Issels R, Multhoff G: Heat shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother* 1996, 43: 226-230

Botzler C, Kolb H-J, Issels RD, Multhoff G: Noncytotoxic alkyl-lysophospholipid treatment increases sensitivity of leukemic K562 cells to lysis by natural killer cells (NK). *Int J Cancer* 1996, 65: 633-638

Buccisano F, Rossi FM, Venditti A, Del Poeta G, Cos MC Abruzzese E, Ruolo M, Berretta M, Degan M, Russo S, Tamburini A, Maurillo L, Del Principe MI, Postorino M, Amadori S and Gattei V: CD90/Thy-1 is preferentially expressed on blast cells of high risk acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2004, 125: 203-212

Campana C, Pui CH: Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995, 85: 1416- 1434

Cattaruzza S, Nicolosi PA, Braghetta P, Pazzaglia L, Benassi MS, Picci P, Lacrima K, Zanocco D, Rizzo E, Stallcup WB, Colombatti A and Perris R: NG2/CSPG4–collagen type VI interplays putatively involved in the microenvironmental control of tumour engraftment and local expansion. *Journal of Molecular Cell Biology* 2013, 5: 176–193

Chang H, Salma F, Yi Q, Patterson B, Brien Bill, Minden M: Prognostic relevant immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukaemia. *Leuk Res* 2004, 28: 43–48

Chant ID, Rose PE and Morris AG: Analysis of heat shock protein expression in myeloid leukaemia cells by flow cytometry. *British Journal of Haematology* 1995, 90: 163–168

Chen-Hsiung Y, Richard T, Alison H, Zeev E, Elihu E, Hagop K, Maher A: Clinical correlation of circulating heat shock protein 70 in acute leukemia. *Leukemia Research* 2010, 34: 605–609

Ciocca D, Calderwood S: Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005, 10(2): 86–103

Deaglio S, Dianzani U, Horenstein AL, Fernandez JE, van Kooten C, Bragardo M, Funaro A, Garbarino G, Di Virgilio F, Banchereau J, Malavasi F: Human CD38 ligand. A 120 KDa protein predominantly expressed on endothelial cells. *J Immunol* 1996, 156: 727

Derolf ÅR, Kristinsson SY, Andersson T, Landgren O, Dickman PW, Björkholm M: Improved patient survival for acute myeloid leukemia: a population-based study of 9729 patients diagnosed in Sweden between 1973 and 2005. *Blood* 2009, 113: 3666–3672

Döhner K, Brown J, Hehmann U, Hetzel C, Stewart J, Lowther G, Scholl C, Fröhling S, Cuneo A, Tsui LC, Lichter P, Scherer SW, Döhner H: Molecular cytogenetic characterization of a critical region in bands 7q35-q36 commonly deleted in malignant myeloid disorders. *Blood* 1998, 92(11): 4031–4035

Ellis RJ: The general concept of molecular chaperones. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 1993, 339: 257–261

Ellis RJ: Molecular chaperones. *Annual Reviews of Biochemistry* 1991, 60: 321–347

Funaro A, Spagnoli GC, Ausiello CM, Allesio M, Roggero S, Delia D, Zoccolo M, Malavasi F: Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *J Immunol* 1990, 145: 2390

**Gehrman M, Schmetzer H, Eissner G, Haferlach T, Hiddemann W, Multhoff G: Membrane-bound Hsp70 in acute myeloid leukemia: a tumor-specific recognition structure for the cytolytic activity of autologous NK cells.** *Haematologica* 2003, 88: 473–475

Gerber JM, Smith D, Ngwang B, Zhang H, Vala MS, Morsberger L, Galkin S, Collector MI, Perkins B, Levis MJ, Griffin CA, Sharkis SJ, Borowitz MJ, Karp JE and Jones RJ: A clinically relevant population of leukemic CD34+CD38- cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012, 119: 3571–3577

**Graf M, Hecht K, Reif S, Pelka-Fleischer R, Pfister K, Schmetzer H: Expression and prognostic value of hemopoietic cytokine receptors in acute myeloid leukaemia (AML): implications for future therapeutical strategies.** *Eur J Haematol* 2004, 72: 89–106

Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Hauser T, Schmitt A, Döhner H, Schmitt M: Characterization of several leukemia-associated antigens inducing humoral immune responses in acute and chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 2003, 106: 224-231

Grimaldi JC, Balasubramanian S, Kabra NH, Shanafelt A, Bazan J: CD38-mediated ribosylation of proteins. *J Immunol* 1995, 55: 811

Grimwade D, Walker H, Oliver F: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analyses of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998, 92: 2322-2333

Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C: Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 2003, 22: 6669-6678

Hainaut P, Milner J: Interactions of heat shock protein 70 (hsp70) with p53 translated in vitro: evidence for a role in the regulation of p53 conformation. *EMBO Journal* 1992, 11: 3513-3520

**Hantschel M, Pfister K, Jordan A, Scholz R, Andreesen R, Schmitz G, Schmetzer H, Hiddemann W, Multhoff G: Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients.** *Cell Stress & Chaperones* 2000, 5: 438-442

Heuser M, Wingen L, Steinemann D, Cario G, von Neuhoff N, Tauscher M, Bullinger L, Krauter J, Heil G, Döhner H, Schlegelberger B, Ganser A: Gene expression profiles and their association with drug resistance in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2005, 90: 1484-1492

Hilden J, Smith F, Frestedt J, McGlennen R, Howells W, Sorensen P, Arthur D, Woods W, Buckley J, Bernstein I and Kersey J: MLL gene rearrangement, cytogenetic 11q23 abnormalities, and expression of the NG2 molecule in infant acute myeloid leukemia. *Blood* 1997, 89 (10): 3801-3805

Hrusak O, Porwit-MacDonald A: Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002, 16: 1233-1258

Inaba T, Shimazaki C, Sumikuma T: Flow cytometric analysis of Thy-1 expression in CD34-positive acute leukaemia. *Int J Hematol* 1997, 66: 315-323

Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, Meyerrose T, Rossi R, Grimes B, Rizzieri DA, Luger SM, Phillips GL: The interleukin-3-receptor alpha chain is an unique marker for human acute myelogenous stem cells. *Leukemia* 2000, 14: 1777-1784

Kaiser M, Kühnl A, Reins J, Fischer S, Ortiz-Tanchez J, Schlee C, Mochmann LH, Heesch S, Benlasfer O, Hofman WK, Thiel E and Baldus CD: Antileukemic activity of the HSP70 inhibitor pifithrin- $\mu$  in acute leukemia. *Blood Cancer Journal* 2011, 28: 1-8

Katz FE, Tindle R, Sutherland DR, Greaves MF: Identification of a membrane glycoprotein associated with hematopoietic progenitor cells. *Leuk Res* 1985, 9: 191-198

Kelley WL, Georgopoulos C: Chaperones and protein folding. *Current Opinions in Cell Biology* 1992, 4: 984-991

Keyhani A, Yang H, Jendibora D, Pagliaro L, Cortez J, Pierce S: Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia. *Leuk Res* 2000, 24: 153-159

Lane D, Midgley C, Hupp T: Tumour suppressor genes and molecular chaperones. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 1993; 339: 369-373

Legrand O, Perrot JY, Baudard M, Cordier A, Lautier R, Simonin G, Zittoun R, Casadevall N, Marie JP: The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukaemia: proposal of a prognostic score. *Blood* 2000, 96(3): 870-877

Lotem J, Sachs L: Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor  $\beta$ 1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood* 1992, 80: 1750-1756

Lotem J, Sachs L: Regulation by bcl-2, c-myc and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation competent and defective myeloid leukemic cells. *Cell Growth and Differentiation* 1993, 4: 41-47

Low MG, Kincade PW: Phosphatydilinositol is the membrane anchoring domain of the Thy-1 glycoprotein. *Nature* 1985, 318: 62-64

Luk JM, Lam CT, Siu AF, Lam BY, Ng IO, Hu MY, Che CM, Fan ST: Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. *Proteomics* 2006, 6(3): 1049-1057

Malavasi F, Funaro M, Roggero S, Horenstein A, Calosso L, Mehta K: Human CD38: a glycoprotein in search of function. *Immunol Today* 1994, 15: 95

Mandelli F, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998, 92: 2322-2333

Mauvieux L, Delabasse E, Bourquelot P; Radford-Weiss I, Bennaceur A, Flandrin G, Valensi F and MacIntyre EA: NG2 expression in MLL rearranged acute myeloid leukaemia is restricted to monoblastic cases. *Brit. J Haematol* 1999, 107: 674-676

Mehta K, Umar S, Malavasi M: Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J* 1996, 10: 1480

Morimoto RI: Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation and differentiation. *Cancer Cells* 1991, 3: 295-301

Multhoff G, Botzler C, Jennen L, Schmidt J, Ellwart J, Issels R: Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for Natural Killer cells. *J Immunol* 1997, 158: 4341-4350

Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Eissner G, Issels R: CD3-large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kD heat-shock protein on human sarcoma cells. *Blood* 1995b, 86: 1374-1382

Multhoff G, Mizzen L, Winchester CC, Milner CM, Wenk S, Eissner G, Kampinga HH, Laumbacher B, Johnson J: Heat shock protein 70 (HSP70) stimulates proliferation and cytolytic activity of NK cells. *Exp Hematol* 1999, 27: 1627-1636

Myint H, Lucie NP: Prognostic significance of CD34 antigen in acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphom* 1992, 7: 425-429

Neudenberger J, Hotfilder M, Rosemann A, Langebrake C, Reinhardt D, Pieters R, Schrauder A, Schrappe M, Röttgers S, Harbott J, Vormoor J: Lack of expression of the chondroitin sulphate proteoglycan neuron-glia antigen 2 on candidate stem cell populations in paediatric acute myeloid leukaemia/abn(11q23) and acute lymphoblastic leukaemia/t(4;11). *Br J Haematol* 2006;133(3): 337-44

Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Høyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M, Jäättelä M: Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med* 2004, 200: 425-35

Oyan AM, Bo TH, Jonassen I, Ulvestad E, Gjertsen BT, Kalland KH, Bruserud O: CD34 Expression in native human acute myelogenous Leukaemia Blasts: Differences in CD34 membrane molecule expression are associated with different gene expression profiles. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2005, 64B: 18-27

Raspadori D, Lauria F, Ventura MA, Rondelli D, Vissani G, de Vivo A, Tura S: Incidence and prognostic relevance of CD34 expression in acute myeloid leucemia: analysis in 141 cases. *Leuk Res* 1997, 21: 603-607

Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA: Heat shock protein 70 antagonizes apoptosis- induced factor. *Nat Cell Biol.* 2001, 3: 839-843

Reikvam H, Nepstad I, Sulen A, Gjertsen BT, Hatfield KJ, Bruserud Ø: Increased antileukemic effects in human acute myeloid leukemia by combining HSP70 and HSP90 inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2013, 22:551-63

Schoch C, Schnittger S, Klaus K, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T: AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 2003, 102(7): 2395-2402

Sen S, D'Incalci F: Apoptosis. *FEBS Letters* 1992, 307: 122-127

Shin BK, Wang H, Yim AM, Le Naour F, Brichory F, Jang JH, Zhao R, Puravs E, Tra J, Michael CW, Misek DE, Hanash SM: Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *JBC* 2003, 278: 7607-7616

Shotar A: P53 and heat shock protein 70 expressions in colorectal adenocarcinoma. *Saudi Med J.* 2005, 26(10): 1602-1606

Sieff C, Bicknell D, Calne G, Robinson J, Lam G, Greaves MF: Changes in cell surface antigen expression during haemopoietic differentiation. *Blood* 1982, 60: 703

Smith FO, Rauch C, Williams D, March CJ, Arthur D, Hilden J, Lampkin BC, Buckley CV, Woods WG, Dinndorf PA, Sorensen P, Kersey J, Hammond D and Bernstein ID: The human homologue of Rat NG2, a chondroitin sulfate proteoglycan, is not expressed on the cell surface of normal hematopoietic cells but is expressed by acute myeloid leukemia blasts from poor-prognosis patients with abnormalities of chromosome band 11q23. *Blood* 1996, 87: 1123-1133

Solary E, Casanova RO, Campos L, Bene MC, Faure G, Maingon P, Falkenrodt A, Lenormand B, Genetet N: Surface markers in adult acute myeloblastic leukaemia: correlation of CD19<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>/DR<sup>-</sup> phenotypes with shorter survival. *Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL). Leukemia* 1992, 6: 393

Sperr W, Hauswirth A, Florian S, Öhler L, Geissler K and Valent P: Human leukemic stem cells: a novel target or therapy. *Eur J Clin Invest* 2004, 34 (Suppl,2): 31-40

Thomas X, Campos L, Mounier C, Cornillon J, Flandrin P, Le QH, Piselli S, Guyotat D: Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* 2005, 29: 1049-1058

Van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra A, Rombouts E, Zweegman S, van der Pol MA, Waisfisz Q, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ: High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res* 2005, 11: 6520-6527

Van Stijn A, Van der Pol M, Kok A, Bontje P, Roemen G, Beelen R, Ossenkoppele G, Schuurhuis G: Difference between CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukaemia. *Journal of Haematology* 2003, 88(05): 497-508

Volloch VZ, Sherman MY: Oncogenic potential of Hsp72. *Oncogene* 1999, 18: 3648-3651

Wang J, Svendsen A, Kmiecik J, Immervoll H, Skaftnesmo KO, Planaguma J, Reed RK, Bjerkvig R, Miletic H, Enger PØ, Rygh BC, Chekenya M: Targeting the NG2/CSPG4 Proteoglycan Retards Tumour Growth and Angiogenesis in Preclinical Models of GBM and Melanoma. *PLoS ONE* 2011, 6:1-14, e23062

Wognum AW, de Jong, Wagemaker G: Differential expression of receptors for hematopoietic, growth factors on subsets of CD34<sup>+</sup> hemopoietic cells. *Leuk Lymphoma* 1996, 24: 11-25

Wucher C, Harbott J, Schoch C, Schnittger S, Borkhardt A, Karawajew L, Ratei R, Ruppert V, Haferlach T, Creutzig U, Dörken B and Ludwig WD: Detection of acute leukemia cells with mixed lineage leukemia (MLL) gene rearrangements by flow cytometry using monoclonal antibody NG2. *Leukemia* 2000, 14: 1232-1238

Yeh CH, Tseng R, Hannah A, Estrov Z, Estey E, Kantarjian H, Albitar M: Clinical correleation of circulating heat shock protein 70 in acute leukemia. *Leuk Res* 2010, 34: 605-9

Zucchini A, Del Zotto G, Brando B, Canonico B: CD90. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001, 15: 82-85

## **5. Publikationsverzeichnis**

K. Petrovici, M.Graf, S. Reif, , K. Hecht, H. Schmetzer: Expression profile of the progenitor cell markers CD34 , CD38 and CD90 in Acute Myeloid Leukemia and their prognostic significance. J. of Cancer Molecules 5(3) 79-86 (2010)

K. Steiner, M.Graf, K. Hecht, S. Reif, L. Rossbacher, K. Pfister, H-J Kolb,G. Multhoff, H. Schmetzer: High HSP70-Membrane Expression on Leukemic Cells from Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) is associated with a worse prognosis Leukemia 1-3 (2006) (G. Multhoff and H. Schmetzer contributed equally)

K. Petrovici , M. Graf , K. Hecht ,S. Reif , K. Pfister , H. Schmetzer :Use of NG2 (7.1) in AML as a tumor marker and its association with a poor prognosis. Cancer Genomics Proteomics 7, 173-180 (2010)

S. Pordzik, K. Petrovici, C. Schmid, T. Kroell, C. Schweiger, C.H. Köhne, H. Schmetzer: Expression and Prognostic Value of FAS receptor/FAS ligand and TrailR1/TrailR2in Acute Myeloid Leukemia (AML). Hematology, 16(6)341-350 (2011).