Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

# IL-8 als Mediator im Microenvironment der akuten myeloischen Leukämie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Alexander Kütt

aus Aachen

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. med. Michael Fiegl |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. med. Christoph Salat |
| | Prof. Dr. med. Christoph Nerl |
| Dekan: | Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 07.11.2019 |

## Eidesstattliche Versicherung

Kütt Alexander

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

IL-8 als Mediator im Microenvironment der akuten myeolischen Leukämie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin 07.01.2020

Ort, Datum

Alexander Kütt

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... 6
1. Einleitung ..... 7
1.1 Prävalenz und Inzidenz der AML ..... 7
1.2 Klinik ..... 7
1.3 Diagnostik und Risikostratifizierung ..... 8
1.4 Klassifikation ..... 11
1.4.1 FAB-Klassifikation ..... 11
1.4.2 WHO-Klassifikation ..... 13
1.5 Therapie ..... 14
1.6 Prognose ..... 15
1.7 Pathogenese der AML ..... 16
1.8 Das Microenvironment ..... 18
1.8.1 Sauerstoffpartialdruck ..... 18
1.8.2 Zelluläre Komponenten ..... 20
1.8.3 Zytokine ..... 20
1.9 Fragestellung ..... 22
2. Material und Methoden ..... 23
2.1. Geräte und Verbrauchsmaterial ..... 23
2.2 Zellkultur ..... 25
2.2.1 Zellgewinnung ..... 25
2.2.2 Zellkultur ..... 26
2.3 Zellzählung ..... 26
2.3.1 Prinzip ..... 26
2.3.2 Durchführung ..... 27
2.4. Zytokin-Blot ..... 27
2.4.1. Prinzip des Antikörper Microarray ..... 27
2.4.2. Zytokin Array ..... 28
2.5 ELISA (Enzyme-linked Immonusorbent Assay) ..... 28
2.5.1Prinzip des ELISA ..... 28
2.5.2 Durchführung ..... 29
2.6. Real Time Polymerase Kettenreaktion ..... 29
2.6.1. Prinzip und Durchführung der RNA Extraktion ..... 29
2.6.2. Prinzip der cDNA-Synthese und Real Time Quantitative-PCR ..... 30
2.6.3. Durchführung der Real Time Quantitative-PCR ..... 30
2.7. RNA-Expressionsanalysen ..... 32
2.8. Statistik ..... 33
2.8.1. Zellexperimentelle Arbeiten ..... 33
2.8.2. Klinisch-epidemiologische Analysen ..... 33

3.1 Hypoxie-abhängige Expression von Zytokinen durch AML....34
3.2 IL-8 Expression von AML Blasten in Abhängigkeit von Hypoxie....35
3.3 HGF Induktion durch AML Blasten in Abhängigkeit von Hypoxie....38
3.4 Hypoxie induzierte IL-8 Produktion frischer AML Proben....39
3.4.1 IL-8 Produktion in genetisch definierten AML Subgruppen....40
3.4.2 IL-8 Produktion normaler hämatopoeitischer mononukleärer Zellen....41
3.4.3 Die Hypoxie-induzierte IL-8 Expression ist transkriptionell reguliert....42
3.5 IL-8 Expression in vivo....44
3.5.1 IL-8 Serumspiegel bei Patienten mit AML....44
3.5.2 IL-8 als prognostischer Faktor....45
4. Diskussion....48
5. Zusammenfassung....58
6. Quellenverzeichnis....60
7. Veröffentlichungen....63
8. Lebenslauf....64
9. Danksagung....64

## Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| AML: | akute myeloische Leukämie |
| APL: | akute Promyelozyten-Leukämie |
| sAML: | sekundäre akute myeloische Leukämie |
| ELISA: | Enzyme-linked Immunosorbant Assay |
| ELN: | European Leukemia Network |
| EPO: | Erythropoietin |
| FAB: | French-American-British |
| FLT-3: | fms like tyrosine kinase 3 |
| G-CSF: | granulocyte colony-stimulating factor |
| GM-CSF: | granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| HGF: | Hepatocyte growth factor |
| HSZ: | Hämatopoietische Stammzellen |
| IL-2/IL-8: | Interleukin-2, Interleukin-8 |
| JAK-STAT: | Janus kinase & Signal transducers and activators of transcription |
| LSZ: | Leukämische Stammzellen |
| MAP-Kinasen: | Mitogen-aktivierte Protein Kinase(n) |
| MDS: | Myelodysplastisches Syndrom |
| MNC: | Mononuclear cells (Mononukleäre Zellen) |
| MSZ: | mesenchymale Stromazellen |
| NPM1: | Nucleophosmin 1 |
| PI3-K: | Phosphoinositol-3 Kinase |
| PML: | Promyelocytic leukemia protein |
| RARα: | Retinoidsäurerezeptor alpha |
| Ras: | Rat Sarcoma, G-Protein Ras |
| RT-PCR: | Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion |
| SDF-1: | stroma derived factor 1 |
| t-AML: | Therapie-induzierte akute myeloische Leukämie |
| TNF-α: | Tumornekrosefaktor Alpha |
| TPO: | Thyreoperoxidase |
| WHO: | World Health Organisation |
| ZNS: | zentrales Nervensystem |

# 1. Einleitung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung der Hämatopoese, die in der Regel im Knochenmark entsteht. Sie ist charakterisiert durch die klonale Expansion genetisch mutierter hämatopoietischer Progenitor- oder Stammzellen (1). Diese proliferieren daraufhin ungehemmt und weisen neben einem Differenzierungsstopp eine verminderte Apoptoserate auf. Diese Expansion unreifer Zellen (= „Blasten“) führt innerhalb kurzer Zeit zur Verdrängung der gesunden Hämatopoese im Knochenmark, was letztendlich zur hämatopoietischen Insuffizienz mit Anämie, Thrombozytopenie und/ oder Leukozytopenie führt. Die daraus resultierenden Komplikationen (z. B. Infekt- und Blutungsneigung) führen unbehandelt rasch zum Tod des Patienten.

## 1.1 Prävalenz und Inzidenz der AML

Die Inzidenz der AML beträgt etwa 2-3/100.000. Sie ist somit zwar eine seltene hämatologische Erkrankung, jedoch die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter (2). Obwohl die AML die zweithäufigste Leukämie im Kindesalter darstellt, ist sie dennoch eher eine Erkrankung des älteren Menschen, und die meisten Neuerkrankungen werden um das 70. Lebensjahr verzeichnet (3).

## 1.2 Klinik

Die Symptomatik der AML ist unspezifisch und entsteht durch die Verdrängung der physiologischen Hämatopoese durch die malignen Zellen im Knochenmark mit konsekutiver Zytopenie. Je nach betroffener Reihe unterscheiden sich die Symptome: so äußert sich eine Anämie durch Müdigkeit, Tachykardie, Blässe und Dyspnoe. Die Granulozytopenie führt zu vermehrter Infektanfälligkeit (auch: atypische Infektionen wie Mykosen), z. B. mit Fieber bis hin zur Sepsis. Eine Blutungsneigung (wie zum Beispiel Epistaxis), ist Ausdruck der Thrombozytopenie. Aber auch andere Symptome können auftreten: so werden bei (myelo-)monozytär differenzierten AML gehäuft extramedulläre Manifestationen beobachtet, z. B. Leber- und Milzbefall (Hepatosplenomegalie), Haut- und Schleimhautinfiltrate (Gingivahyperplasie) oder auch ein Befall des zentralen Nervensystems („Meningeosis leukaemica“) (4).

Bei sehr hoher Leukozytenzahl (in der Regel ab 100.000/µl) kann es zudem zur Leukostase mit Symptomen der (Organ-)Ischämie oder auch neurologischer Symptomatik, wie Kopfschmerzen, Erbrechen oder Nervenlähmungen kommen. Mit voranschreitenden der AML verschlimmert sich die Knochenmarksinsuffizienz sowie die geschilderten Probleme, was unbehandelt, meist aufgrund von Infekten oder Blutungen, innerhalb weniger Wochen bis Monate zum Tode des Patienten führt (5).

## 1.3 Diagnostik und Risikostratifizierung

Zur Bestätigung der Diagnose werden neben dem klinischen Bild einige weitere Untersuchungen benötigt. So lässt sich im Blutbild meistens eine Leukozytose (gelegentlich aber auch eine Leukozytopenie) feststellen. Im Differenzialblutbild können Myeloblasten als Zeichen der Expansion unreifer leukämischer Zellen gesehen werden (6). Zur Diagnosestellung wird nach WHO-Klassifikation ein Blastenanteil von ≥ 20% im Knochenmark oder dem peripheren Blut gefordert. Die WHO Klassifikation erlaubt des Weiteren beim Nachweis bestimmter pathognomonischer, genetischer Mutationen auch dann die Diagnose einer AML (7), wenn der Blastenanteil unter 20% liegt.

Die AML ist eine äußerst heterogene Erkrankung. Daher ist für die Therapieplanung des individuellen Patienten ein differenziertes, risikoadaptiertes Vorgehen erforderlich. Dazu wird das individuelle Risiko des Patienten erhoben und daraus das therapeutische Vorgehen abgeleitet (8). Neben patientenspezifischen Faktoren wie Alter, Komorbidität, Patientenwille oder vorangegangener Knochenmarkserkrankung werden insbesondere leukämiespezifische Faktoren, d. h. die genetischen Veränderungen (in der Regel detektiert durch Zyto- und/oder Molekulargenetik, siehe unten) der leukämischen Blastenpopulation berücksichtigt. Solche spezialisierten Untersuchungen dienen somit nicht nur der definitiven Diagnosestellung, sondern auch der Erstellung des individuellen Risikoprofils des Patienten.

Nach der Einteilung des *European Leukemia Network* (ELN) kann der Patient dann in eine von drei Risikogruppen (favorable, intermediate I/II, unfavorable) eingeordnet werden (siehe unten) (9).

| **ELN Risikogruppe** | **Aberration** |
|---|---|
| **günstig** | t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*<br>inv(16)(p13.1q22) oder<br>t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*<br>Mutiertes *NPM1* ohne *FLT3*-ITD (normaler Karyotyp) oder mit FLT3-ITD$^{niedrig*}$<br>Biallelisch mutiertes *CEBPA* (normaler Karyotyp) |
| **intermediär** | Mutiertes *NPM1* mit *FLT3*-ITD$^{hoch*}$ (normaler Karyotyp)<br>Wildtyp-*NPM1* ohne *FLT3*-ITD (normaler Karyotyp) oder mit FLT3-ITD$^{niedrig*}$ (mit oder ohne ungünstige genetische Aberrationen)<br>t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-KMT2A*<br>Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden |
| **ungünstig** | t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*<br>t(v;11)(v;q23); *KMT2A*-Genumlagerung<br>t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*<br>inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM (*EVI1)*<br>-5 oder del(5q); -7; -17/abnl(17p)<br>komplexer Karyotyp (≥3 Aberrationen$^{†}$)<br>monosomaler Karyotyp (eine Monosomie, assoziiert mit mindestens einer weiteren Monosomie oder einer anderen strukturellen, chromosomalen Aberration (außer CBF-AML)) |

| | |
|---|---|
| | Wildtyp-*NPM1* mit *FLT3*-ITD<br>Mutiertes *RUNX1*<br>Mutiertes *ASXL*‡<br>Mutiertes *TP53* |

*FLT3-ITD$^{niedrig}$ = Mutant-Wildtyp-Allel-Quotient <0,5; FLT3-ITD$^{hoch}$ = Mutant-Wildtyp-Allel-Quotient ≥0,5. Bestimmung über semi-quantitative Messung des FLT3-ITD Allel-Quotienten mittels DNA-Fragment-Analyse als Quotient der AUC für FLT3-ITD dividiert durch die AUC für FLT3-Wildtyp in Anwesenheit seltenerer als ungünstig eingestufter Aberrationen „sticht" die t(9;11), d.h. sie gibt den Ausschlag für eine Einstufung in die intermediäre Risikogruppe nur zutreffend, wenn nicht gleichzeitig eine der WHO-definierten AML-typischen Aberrationen vorliegt (d.h. t(8;21), inv(16) oder t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) oder t(3;3); AML mit BCR-ABL1) nur als ungünstig einzustufen, wenn keine als günstig eingestuften Aberrationen vorliegen, d.h. in Anwesenheit günstiger Veränderungen geben diese den Ausschlag für eine Einstufung in die günstige Risikogruppe (10).*

Die Zugehörigkeit zu einer dieser Gruppen determiniert für den einzelnen Patienten in kurativer Intention eine spezifische Behandlung; während in palliativer Intention die Gruppenzugehörigkeit nicht von solcher Bedeutung ist, kann die Kenntnis des genetischen Risikoprofils für die Entscheidung zur kurativen oder palliativen Therapie hilfreich sein. Daher ist die ausführliche Diagnostik mit Erstellung des detaillierten (genetischen) Risikoprofils unabdingbar (11). Dazu gehören *zytogenetische* Untersuchungen, anhand derer chromosomale Aberrationen festgestellt werden (z. B. Chromosomenverluste oder -zugewinne, Translokationen, Deletionen; siehe unten), sowie *molekulargenetische* Untersuchungen, mit denen Mutationen verschiedener Gene (Tumorsupressor- oder Onkogene, Gene, die für Tyrosinkinasen kodieren) entdeckt werden können, die unabhängig von chromosomalen Aberrationen auftreten, und die ebenfalls für das Risikoprofil und damit die Prognose relevant sind (12). Die bedeutsamsten molekulargenetischen Veränderungen sind die interne Tandemduplikation von FLT-3 (FLT3-ITD), welche die häufigste Mutation (ca. 24% aller AML Patienten) eines einzelnen Gens bei der AML darstellt und aufgrund der erhöhten Rezidivrate prognostisch bedeutsam ist (13), sowie die NPM1-Mutation, deren

Vorhandensein prognostisch positiv zu werten ist (14); diese Mutation verbessert selbst dann die Prognose des Patienten, wenn gleichzeitig eine FLT-3 ITD vorhanden ist.

## 1.4 Klassifikation

Es gibt zwei Einteilungen der AML, die ältere, heute nicht mehr gebräuchliche French-American-British (FAB) Klassifikation und die neuere WHO-Einteilung (7).

### 1.4.1 FAB-Klassifikation

Diese rein morphologische Klassifikation leitet sich von dem mikroskopischen Bild der leukämischen Zellen ab. Bei der FAB-Klassifikation (Tabelle 1) werden Reifegrad sowie Differenzierung der leukämischen Zellen berücksichtigt, wie zum Beispiel die M6, die morphologisch eine erythroide Differenzierung aufweist und daher als Erythroleukämie bezeichnet wird (15).

| **Kategorie** | *Definition* |
|---|---|
| **M0** | *AML mit minimaler myeloischer Differenzierung* |
| **M1** | *AML ohne Ausreifung* |
| **M2** | *AML mit Ausreifung bzw. mit t(8;21) (AML1/ETO)* |
| **M3** | *Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)* |
| **M3V** | *M3 Variante (hypogranuliert)* |
| **M4** | *Akute myelomonozytäre Leukämie* |
| **M4Eo** | *AML mit inv16 oder t(16;16) (CBFß/MYH11)* |
| **M5A** | *Akute Monoblastenleukämie* |
| **M5B** | *Akute Monozytenleukämie* |
| **M6** | *Akute Erythroleukämie* |
| **M7** | *Akute Megalokaryoblastenleukämie* |

*Tabelle 1: FAB Klassifikation der AML hier eigens aus dem Englischen ins Deutsche übersetzt.*

### 1.4.2 WHO-Klassifikation

Die neuere WHO-Klassifikation (Tabelle 2) unterteilt die AML neben der morphologischen Charakteristika auch anhand ihrer genetischen Merkmale und ist mittlerweile die gebräuchlichere Klassifikation (6).

| **Kategorien und Leukämieformen** |
|---|
| **AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen** |
| AML mit t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 |
| AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 |
| APL mit PML-RARA (t15;17) |
| AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A |
| AML mit t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 |
| AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM |
| AML (megakaryoblastisch) mit (t1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 |
| Vorläufige Entität: AML mit BCR-ABL1 |
| AML mit NPM1 Mutation |
| AML mit biallelischen Mutationen von CEBPA |
| Vorläufige Entität: AML mit m RUNX1 Mutation |
| **AML mit myelodysplatisch-assoziierten Veränderungen** |
| **Therapieinduzierte AML und therapieinduziertes myelodysplastisches Syndrom (MDS)** |
| **Myeloproliferationen im Zusammenhang mit Down Syndrom** |
| Transiente abnormale Myelopoese |
| Myeloide Leukämie im Zusammenhang mit Down Syndrom |

*Tabelle 2: aktuelle WHO Klassifikation der AML (Version 2016) hier eigens aus dem Englischen ins Deutsche übersetzt.*

## 1.5 Therapie

Die Therapie der AML in kurativer Intention besteht aus mehreren Phasen einer intensiven Chemotherapie, ggf. gefolgt von einer allogenen Stammzelltransplantation, mit dem Ziel der kompletten Elimination der Leukämiezellpopulation und konsekutiver Wiederherstellung der normalen Hämatopoese.

Diese kurative Therapie besteht aus zwei unterschiedlichen Phasen: Zuerst wird die sogenannte Induktionstherapie durchgeführt, die eine komplette Remission (CR) zum Ziel hat. Diese ist definiert als Erholung des peripheren Blutbildes (Neutrophile > 1000/ µl, Hb > 10 g/dl und Thrombozyten > 100.000/ l) sowie < 5% Blasten im Knochenmark. Die Induktionstherapie besteht üblicherweise aus standarddosiertem Cytarabin und einem Anthrazyklin (16) und sollte möglichst schnell nach Diagnosestellung begonnen werden. Eine Verzögerung von mehr als 10 Tagen, insbesondere bei jungen Patienten, verschlechtert die Prognose deutlich, da die Rate an kompletten Remissionen von 75 % auf 49 % fällt (17). Die Induktionstherapie ist i. d. R. vom genetischen Risikoprofil unabhängig (Ausnahmen sind die akute Promyelozytenleukämie sowie evtl. die AML mit FLT3-ITD).

Nach Erreichen einer CR erfolgt die so genannte Postremissionstherapie. Ihr Ziel ist die komplette Eliminierung residueller leukämischer Blasten und damit letztendlich die Heilung des Patienten. Die Wahl der Postremissionstherapie ist vom Risikoprofil, aber auch vom Alter und der Konstitution des Patienten abhängig: bei älteren Patienten mit niedrigem Risiko erfolgt in der Regel eine Konsolidierungstherapie mit Chemotherapie, während bei Hochrisiko-Patienten (z.B. komplex-aberranter Karyotyp oder ELN Risikogruppe: unfavorable) die allogene Stammzelltransplantation bevorzugt wird (18), falls immer dies möglich ist (z. B. Vorhandensein eines passenden Spenders, Konstitution des Patienten).
Bei älteren und/oder komorbiden Patienten ist eine intensive Therapie häufig nicht durchführbar, obwohl diese aufgrund des Risikoprofils für eine Kuration eigentlich nötig wäre, z. B. aufgrund der bei diesen Patienten gehäuft auftretenden sekundären AML oder prognostisch ungünstigen zytogenetischen Veränderung (19). Solche Patienten können in der Regel nicht geheilt werden: der Therapieansatz ist somit palliativ, und

intensive Chemotherapieregime werden vermieden. Dies erklärt – unter anderem – die besonders schlechte Prognose der AML bei älteren Patienten.

## 1.6 Prognose

Unbehandelt endet die AML innerhalb kurzer Zeit (Tage – wenige Monate) letal, und auch mit Behandlung ist die Prognose ernst: 5 Jahre nach Diagnosestellung leben nur noch ca. 19,5% der Patienten (20) obwohl initial meist Remissionsraten von ca. 65% (je nach Publikation bis zu 80%) erreicht werden (21). Angesichts der schon geschilderten Heterogenität der Erkrankung sind solche pauschalen Aussagen allerdings nur mit Vorsicht zu werten; sinnvoller ist es, verschiedene Subgruppen zu unterschieden. Hier spielen, wie erwähnt, das genetische Profil, Alter und Konstitution des Patienten eine Rolle. Das Alter bei Diagnosestellung beeinflusst das 5-Jahres-Überleben erheblich: so betrug dieses (in den Jahren 2008-2010) für junge Patienten (d.h. 15-49 Jahre alt) immerhin 57,7 %, fiel bei Patienten zwischen 50-69 Jahren auf 27,6 % ab und betrug bei Patienten über 70 Jahren nur mehr 8,0 %. Diese Daten zeigen, dass die Prognose der AML vor allem durch Einführung der intensiven Induktions- und Postremissionstherapie (insbesondere die allogene Stammzelltransplantation) für die jungen Patienten verbessert wurden; bei älteren Patienten, die solchen Therapien nicht zugeführt werden können, bleibt die Chance auf eine Heilung jedoch nach wie vor gering.

Es lässt sich daher sagen, dass die Mehrzahl der Patienten heutzutage trotz Verbesserungen bestehender und Entwicklung neuer Therapieverfahren sowie individualisierter, risikoadaptierter Therapie an ihrer AML oder aber (insbesondere bei intensiven Chemotherapieregimen) durch die Therapie selbst bzw. an deren Folgen verstirbt (22). Haupttodesursache ist aber das Rezidiv der Erkrankung – also das Wiederauftreten leukämischer Blasten nach initial erreichter CR (23). Die Rezidivrate beträgt – je nach Risikoprofil – bis zu 50 % und tritt in der Regel innerhalb 0,5-3 Jahren nach der Erstdiagnose auf (20). Die einzig kurative Therapie im Rezidiv stellt die allogene Stammzelltransplantation dar, jedoch lässt sich diese nur bei deutlich weniger als der Hälfte der Patienten durchführen. Ursache des Rezidivs sind residuelle leukämische Stammzellen, welche die Chemotherapie im Knochenmark überleben, um nach einem variablen Zeitraum erneut zu proliferieren. Die genauen Gründe dafür sind

häufig unbekannt und Gegenstand intensiver Forschung (wie auch der vorliegenden Arbeit), insbesondere ist ein besseres Verständnis der Pathogenese der AML vonnöten.

## 1.7 Pathogenese der AML

Physiologische hämatopoietische Stammzellen sind in speziellen Nischen im Knochenmark (den sog. Stammzellnischen) zu finden, in denen sich aus pluripotenten Stammzellen hämatologische Progenitorzellen entwickeln. Diese Progenitoren sind dann verantwortlich für die Leuko-, Erythro- und Megakaryopoese und daher – im Gegensatz zu den hämatopoietischen Stammzellen – liniendeterminiert. Gesteuert wird diese Entwicklung unter anderem durch Wachstumsfaktoren, z. B. Erythropoeitin für die Erythropoese, TPO für die Megakaryopoese und G-CSF und GM-CSF für die Granulozyto- und Mono-/ Megakarozytopoese (24). Diese Wachstumsfaktoren aktivieren nach Bindung an ihre jeweiligen membranständigen Rezeptoren (z.B. EPO-R) intrazelluläre Signalkaskaden, z. B. den JAK-STAT *pathway*. Bei letzterem kommt es nach Aktivierung zur Phosphorylierung von Januskinasen (JAK), welche dann ihrerseits konsekutiv Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie aktivieren. In aktiviertem Zustand dimerisieren diese, treten in den Zellkern über und regulieren dann die Transkription z. B. von Genen der Apoptoseregulierung und Zellzykluskontrolle (25).

Bei der AML laufen diese Vorgänge nicht mehr geregelt ab. Ein Grund hierfür können z. B. genetische Veränderungen sein, die diese physiologischen Prozesse der Proliferationen, Differenzierung und Apoptose beeinflussen. So kommt es zum Beispiel durch Translokation genetischen Materials zur Bildung unphysiologischer Fusionsgene: Transkriptionsfaktoren mit abnormer Aktivität oder konstitutionell aktive Fusionsproteinen (z. B. Tyrosinkinasen), die zu erhöhter Proliferation bzw. verminderter Differenzierung der betroffenen Zellen führen, können die Folge sein (26). Ein prominentes Beispiel ist die akute Promyelozytenleukämie (APL, AML FAB M3), wo in 99 % aller Fälle eine Translokation t(15;17) vorliegt. Dabei kommt es zur Bildung des Fusionsproteins PML-RARα. RARα ist ein Hormonrezeptor für Retinoide (i. d. R. Vitamin A), und führt physiologischerweise bei Bindung von Vitamin A zur Transkription differenzierungsrelevanter Gene. Bei dem pathognomonischen Fusionsprotein PML-RARα werden durch den PML-Teil des Proteins Ko-Repressoren der Transkription an den Retinoidsäurerezeptor gebunden, wodurch die Transkription effizient gehemmt

wird. Dadurch kommt es zum Transkriptionsstopp, die Differenzierung erfolgt nicht mehr regelhaft und die betroffene Zelle verbleibt im Stadium des Promyelozyten. Durch unphysiologisch hohe Zufuhr von Vitamin A können die Ko-Repressoren jedoch von RARα gelöst werden, wodurch die Transkription und damit die normale Ausreifung wiederhergestellt werden (27). Dies wird therapeutisch genutzt.
Neben chromosomalen Veränderungen finden sich bei der AML zusätzliche Mutationen innerhalb von einzelnen Genabschnitten; dadurch kommt es durch einen Aminosäureaustausch z. B. zu konstitutionell aktivierten Tyrosinkinasen („gain-of-function“) oder ineffizienten Tumorsuppressoren (z. B. p53 Mutation, „loss-of-function“). In der Regel ist für die Entstehung einer AML eine einzige Mutation innerhalb einer hämatopoetischen Zelle nicht ausreichend. Entsprechend der „2-Hit“ Hypothese (28) sind daher mindestens 2 Mutationen nötig: eine Mutation führt zum Differenzierungstopp, die andere zur ungehemmten Proliferation. Ein Beispiel dafür ist die Mutation der bereits erwähnten FLT3 Rezeptortyrosinkinase, die bei 15-30% aller Patienten mit AML vorhanden ist: in physiologischem Zustand bindet diese FLT-3 Ligand, dimerisiert und aktiviert die Ras und PI3-K Signalkaskaden, welche Differenzierung und Apoptose von Progenitorzellen regulieren (13). Bei mutiertem FLT3 ist die Bindung von FLT-3 Ligand zur Aktivierung überflüssig, da der mutierte Rezeptor von selbst dimerisiert und Ras und PI3-K somit rezeptorunabhängig aktiviert. Dennoch ist normalerweise auch FLT3-ITD alleine nicht in der Lage, eine hämatopoetische Zelle im Tiermodell maligne zu transformieren und eine zweite Mutation ist vonnöten.

Während an der genetischen Ursache der AML kaum Zweifel bestehen, ist der Grund für die Entstehung solcher Mutationen weitgehend unklar. Mögliche Ursachen können die Exposition gegenüber Chemikalien sein, wobei hier besonders Benzol zu nennen ist (29). Weiterhin gelten ionisierende Strahlung (therapeutische Bestrahlung oder radioaktive Strahlung durch Atombombenabwürfe, Reaktorunfälle, etc.) und Behandlung mit Chemotherapeutika wie zum Beispiel Topoisomerase-II-Hemmer oder Alkylantien als Risikofaktoren für die Entstehung genetischer Veränderungen und damit einer AML (29). Tritt eine AML als Folge einer Chemo- oder Strahlentherapie für ein frühere Tumorerkrankung auf, wird sie als therapieassoziierte AML (t-AML) bezeichnet (30) . Häufig tritt eine AML auch als Folge einer bereits bestehenden malignen Knochenmarkserkrankung auf. Hierzu gehören insbesondere die Gruppe der

myelodysplastischen Syndrome (MDS) oder seltener auch die Fanconi-Anämie. Diese Formen der AML werden als sekundäre AML (sAML) bezeichnet (31).

## 1.8 Das Microenvironment

Während die genetische Veränderungen in den leukämischen Stammzellen eine *conditio sine qua non* darstellen, ohne die eine AML nicht entstehen kann, sind diese jedoch nicht ausschließlich für den Verlauf der Erkrankung verantwortlich: so können Unterschiede in der Rezidivhäufigkeit bzw. Remissionsdauer innerhalb einer genetisch definierten Subgruppe nicht durch den zugrundeliegenden genetischen Unterschied allein erklärt werden, da dieser ja alle leukämischen Blasten innerhalb der Subgruppe betrifft. Hier könnten Unterschiede im sog. Microenvironment eine mögliche Ursache darstellen, welche das biologische Verhalten der AML Blasten mit beeinflussen. Leukämische – wie hämatopoetische – Stammzellen sind normalerweise im Knochenmark anzutreffen (Ausnahme: Chlorome), genauer in der Stammzellnische. Hier stehen diese Zellen in engem Zusammenhang mit zahlreichen weiteren Komponenten, die in ihrer Gesamtheit als Microenvironment bezeichnet werden (32). Dieses Microenvironment beeinflusst die (leukämischen) Stammzellen, und wird umgekehrt auch von diesen beeinflusst (33). Während die genaue Zusammensetzung des Microenvironments sowie das detaillierte Zusammenspiel der einzelnen Faktoren unbekannt ist, wurden verschiedene Komponenten sowie deren Bedeutung jedoch bereits genauer identifiziert. Für die hier vorgelegte Untersuchung sind insbesondere 3 Komponenten von Bedeutung: der Sauerstoffpartialdruck, mesenchymale Stromazellen und Zytokine.

### 1.8.1 Sauerstoffpartialdruck

Ein relevanter Faktor innerhalb der Knochenmarksnische ist wahrscheinlich die dort vorherrschende Sauerstoffkonzentration. So konnte gezeigt werden, dass im Knochenmark und besonders in der Stammzellnische ein niedriger Sauerstoffpartialdruck ($pO_2$) vorliegt (34). Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) beispielsweise sind in Arealen des Knochenmarks mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck besonders häufig anzutreffen (35).

Während im arteriellen System eine Sauerstoffkonzentration von ca. 90 mmHg (~12% $O_2$) vorliegt, beträgt diese im venösen Blut ca. 4%; im sinusoiden (kapillären) Knochenmark hingegen wird eine Sauerstoffkonzentration von ca. 6% angenommen, wobei diese in der Stammzellnische noch deutlich niedriger liegen und 1% oder noch weniger betragen könnte (36). Eine genaue Messung des in diesen Regionen vorherrschenden $pO_2$ ist jedoch technisch nur schwer möglich, da die Größe der Stammzellnische die Größe von $O_2$-Meßsonden unterschreitet.

Für die Stammzellnische muss, basierend auf den bisherigen Erkenntnissen, daher ein niedriger $pO_2$ von 1-6% $O_2$ als normal, d.h. physiologisch angesehen werden (37). Dieser Wert ist im traditionellen Sinne nicht hypoxisch, da er der zur Aufrechterhaltung der physiologischen Prozesse notwendigen Sauerstoffkonzentration entspricht(38). So bestehen Hinweise, dass niedrige Sauerstoffkonzentration zu einem Differenzierungsstopp und somit zum physiologischen Erhalt der Pluripotenz der HSZ in der Stammzellnische führt(36). Da leukämische Stammzellen (LSZ) ähnliche Eigenschaften wie hämatopoetische Stammzellen aufweisen (und sich im selben Microenvironment wie normale HSZ aufhalten), muss auch beim leukämischen Microenvironment von einer niedrigen Sauerstoffkonzentration ausgegangen werden. Der in der Stammzellnische vorherrschende niedrige $pO_2$ ist somit kein simpler Nebeneffekt, sondern eine maßgebliche Stellgröße in der Biologie leukämischen Blasten und deren Verhalten im Microenvironment: So konnte eine Studie belegen, dass die Zytotoxizität durch Cytarabin (einem Standardchemotherapeutikum bei der AML) gegenüber AML Blasten bei einer Sauerstoffkonzentration von 1% niedriger als unter 21% $O_2$ war. Als Ursache fand sich u. a. ein Hypoxie-induzierten Zellzyklusarrest in den AML-Zellen, aber auch die Hochregulation antiapoptotischer Proteine, sowie eine vermehrte Aktivierung von MAP-Kinasen (39). Dies zeigt die Hypoxie als protektiven Faktor für AML-Blasten im AML-Microenvironment.

### 1.8.2 Zelluläre Komponenten

Eine weitere relevante Komponente der hämatopoetischen Stammzellnische sind mesenchymale Stromazellen (MSZ). Die multipotenten Zellen besitzen die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung zu verschiedenen Zellen des Bindegewebes, wie Chondrozyten, Fibroblasten, Endothelien, Osteoblasten etc. Diese Zellen sind unter anderem im Knochenmark vorhanden. Mehrere Untersuchungen konnten den Einfluss dieser Zellen für die physiologische Hämatopoese, als auch für das AML-Microenvironment zeigen (40): zahlreiche *in vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass bei kombinierter Kultur von MSZ mit AML Blasten die Zytotoxizität von Chemotherapeutika herabgesetzt war, also MSZ AML-Blasten vor einem zytotoxischen Insult – wie bei Induktionschemotherapie – beschützen können (41). Als mögliche Ursache fand sich die Induktion antiapoptotischer Proteinen in AML Blasten durch MSZ (42) oder eine mitochondriale Entkoppelung mit vermindertem Cytochrome C release (43). Die Interaktionen zwischen AML Blasten und MSZ sind nicht eindeutig geklärt, in Frage kommen direkte Zell-Zell-Kontakte oder parakrine Stimulation, z. B. mittels Zytokinen.

### 1.8.3 Zytokine

Unter Zytokinen werden Familien von Proteinen verstanden, die an der Zellkommunikation beteiligt sind. Es sind meist kleinere Proteine (< 30kD) (44) und können autokrin, parakrin und endokrin sezerniert werden. Zytokine vermitteln ihre Funktion über Zytokinrezeptoren, wobei einerseits die gleichen Rezeptoren von verschiedenen Zytokinen aktiviert werden können und andererseits ein bestimmtes Zytokin an verschiedene Rezeptoren binden kann (jedoch häufig mit unterschiedlicher Affinität). Relevante hämatologische Wirkbereiche von Zytokinen bestehen unter anderem im Immunsystem, mit Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-2 (IL-2) als Beispiele für Entzündungsmediatoren, die z. B. ein *Homing*, also das Einwandern von Entzündungszellen in das Zielgebiet, oder die Aktivierung von T-Zellen steuern (45). Neben der Immunmediation spielen Zytokine – wie bereits weiter oben erwähnt – bei der Differenzierung und Proliferation von hämatologischen (EPO) und myeloischen (G-CSF) Vorläuferzellen in maturierte hämatopoetische Zellen (Erythrozyten und Granulozyten) im Knochenmark eine wichtige Rolle (46). Zytokine vermitteln also

physiologische Reaktionen auf geänderte Umweltbedingungen und könnten somit eine Schnittstelle zwischen AML Blasten und dem Microenvironment darstellen.

Klinische Bedeutung haben Zytokine sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie erlangt. Diagnostisch können Serumspiegel von IL-6 und IL-2 beispielsweise bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis oder Colitis ulcerosa als Verlaufsmarker herangezogen werden (45). Therapeutisch eingesetzte Zytokine sind einerseits Wachstumsfaktoren (EPO bei Anämie, G-CSF bei Neutropenie), andererseits können auch immunmodulatorische Zytokine verabreicht werden: so ist IL-2 in Kombination mit Histamindihydrochlorid bei der AML in der Erhaltungstherapie zugelassen, während Interferon α vor der Ära der Tyrosinkinaseinhibitoren einen festen Stellenwert bei myeloproliferativen Erkrankungen hatte (8).

## 1.9 Fragestellung

Trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie ist die Prognose der AML nach wie vor für die überwiegende Mehrzahl der Patienten schlecht. Haupttodesursache ist die hohe Rate an Rezidiven nach initial erfolgreicher Chemotherapie. Ein Ansatz zur Verbesserung der Prognose von Patienten mit AML besteht daher in einer Verringerung der Rezidivhäufigkeit. Hierzu müssen jedoch die Mechanismen der Rezidiventstehung besser verstanden werden. Eine Hypothese lautet, dass Leukämie-induzierende Vorläuferzellen im Knochenmark die Chemotherapie überleben, beschützt durch das dortige Microenvironment. Während einzelne Komponenten des Microenvironments (insbesondere der erniedrigte $pO_2$ und mesenchymale Stromazellen) bereits charakterisiert worden sind, wird deren Zusammenspiel aber bislang nur unzureichend verstanden. Ziel dieser Arbeit war es daher, Faktoren zu identifizieren, die den Sauerstoffpartialdruck mit MSZ verknüpfen, wobei ein besonderes Augenmerk auf Zytokinen liegen sollte. In einem nächsten Schritt sollte dann die Art der Interaktion genauer herausgearbeitet werden.

Im Einzelnen wurden daher folgende Fragen bearbeitet:

1. Werden Zytokine durch AML Blasten unter Hypoxie vermehrt exprimiert, und wenn ja, welche?
2. Wie ist die Kinetik der Zytokinexpression und besteht eine Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck? Gibt es Unterschiede in der Expression im Vergleich zu normalen hämatopoetischen Stammzellen und zwischen unterschiedlichen, genetisch definierten Subgruppen der AML?
3. Wie ändert sich die Zytokinexpression *in vivo* bei Patienten mit AML unter der zytostatischen Behandlung?
4. Hat die Expression dieser Hypoxie-assoziierten Zytokine durch AML Blasten eine prognostische Bedeutung?

Im Rahmen dieser Dissertation wurde versucht, auf diese Fragen durch klinisch-statistische und zellexperimentelle Ansätze Antworten zu finden.

# 2. Material und Methoden

## 2.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

| **Geräte** | **Bezugsquelle** |
|---|---|
| Hypoxie Arbeitsstation INVIVO$_2$ 400 | Ruskinn Technology (Pencoed, UK) |
| Inkubator CB150 | Binder (Tuttlingen, D) |
| Neubauer-Zählkammer | LO-Labor GmbH (Friedrichsdorf, D) |
| Sterilwerkbank LaminaFlow MD14 | Camfil (Trosa, S) |
| First Strand cDNA Synthesis System | Life Technologies, Carlsbad, U.S.A. |
| Gefrierschrank Premium | Liebherr (Nussbaum, CH) |
| Gefriertruhe HERA freeze | Thermo (Waltham, US) |
| Zentrifuge Multifuge 3L | Heraeus (Hanau, D) |
| **Verbrauchsmaterialien** | **Bezugsquelle** |
| RPMI-1640-Medium | Biochrom (Berlin, D) |
| BSA (Albumin Fraktion V) | AppliChem (Darmstadt, D) |
| DMSO | Serva (Heidelberg, D) |
| FCS (fetales Kälberserum) | Biochrom (Berlin, D) |
| EDTA | AppliChem (Darmstadt, D) |
| PBS | (Instamed) Biochrom (Berlin, D) |
| L-Glutamin 200mM | Life Technologies (Darmstadt, D) |
| Penicillin (10000 U/ml) | Life Technologies (Darmstadt, D) |
| Streptomycin (1000µg/ml | Life Technologies (Darmstadt, D) |
| Trypan Blue Stain 0,4% | Invitrogen (Karlsruhe, D) |
| Aqua Dest | Delta Pharma GmbH (Pfullingen, D) |
| Eppendorf-Gefäß 1,5ml mit Deckel | Eppendorf (Hamburg, D) |
| Ethanol | Merck (Darmstadt, D) |
| Handschuhe: SemperCare | Semperit Technische Produkte GmbH (Wien, A) |
| Ficoll: Biocoll Separating Solution | Biochrom AG (Berlin, D) |
| Ery-LysePuffer | DakoCytomation Glostrup, Dänemark |

| **Verbrauchsmaterialien** | **Bezugsquelle** |
|---|---|
| Fast SYBR Green Master Mix | Applied Biosystems, Waltham, U.S.A. |
| Zellkulturplatte (96-Well) | Bio-One (Frickenhausen, D) |
| IL-8 Primer | Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland |
| ß-Aktin Primer | Eurofins Scientific Services, Luxembourg |
| Absolutely RNA Mini Pre Kit | Agilent Technologies, Santa Clara, U.S.A. |
| Microtube2ml | SARSTEDT (Nümbrecht, D) |
| Mikroskop Primovert | Zeiss (Göttingen, D) |
| Röhrchen (20, 50ml) | Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden, D) |
| Pipettenspitzen | SARSTEDT (Nümbrecht, D) |
| Pipetten (2,5,10, 25, 50 ml) | BD Falcon (Heidelberg, D) |
| Pipetboy | INTEGRA BIOSIENCE (Fernwald, D) |

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Zellgewinnung

Alle **AML Zellreihen** (Kg1a, OCI-AML3, HEL, MV4 und MOLM-13) wurden erworben vom DSMZ Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland).

**Primäre AML Zellen** stammten aus Knochenmarkaspiraten oder peripheren Blutproben von Patienten mit AML, die im Rahmen der Routinediagnostik gewonnen wurden. Eine schriftliche Einwilligung der Patienten zur wissenschaftlichen Verwendung dieser Proben lag vor, ebenso wie ein positives Votum der Ethikkommission der LMU München zur Durchführung der Studie. Mononukleäre Zellen (die im Wesentlichen leukämischen Blasten entsprechen) wurden mittels FICOLL-Dichtezentrifugation angereichert. Dazu wurde Proben nach 1:1 Verdünnung mit PBS langsam auf FICOLL-Lösung geschichtet und Vermischung zwischen beiden Phasen strengstens vermieden. Anschließend wurde 20 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert; danach lief der Rotor der Zentrifuge ohne Bremse aus. Die nun zwischen Serum und FICOLL-Lösung entstandene Schicht („buffy coat“) wurde mit einer Pipette abgenommen, und in einem neuen Röhrchen mit RPMI-Medium verdünnt. Nach erneuter Abzentrifugation (5 Minuten bei 1500 rpm wurde das Pellet (Leukozyten und Erythrozyten) in 10 ml Ery-Lysepuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 4° C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die aufgereinigte Zellkultur entweder für 5min bei 1500 rpm abzentrifugiert und das Pellet in einem 1ml Tube bei -80° C gelagert oder die Zellen sofort weiterverwendet.

Für die Experimente (Ergebnisse 3.4.2) wurden MNC-Proben (Mononukleäre Zellen) von vier gesunden, freiwilligen Probanden als Kontrollgruppe verwendet. Die Proben wurden wie oben beschrieben angereichert und verwendet.

### 2.2.2 Zellkultur

Für Standardlaborbedingungen wurden Zellen bei 37° C und 5% $CO_2$ unter Raumluft kultiviert, Experimente unter reduziertem Sauerstoffgehalt (je nach Ansatz 12, 6 oder 1% $O_2$) wurden komplett in einer Hypoxie-Arbeitsstation durchgeführt, die sowohl die Aufgabe einer Laminar Flow als auch die eines Inkubators übernimmt. Die Kulturen wurden in 75 $cm^2$ Zellkulturflaschen mit einer Dichte von ca. $2{,}5x10^5$ Zellen /ml geführt. Die Kulturen wurden regelmäßig ausgezählt und je nach Zellzahl alle 3-4 Tage im Verhältnis 1/2 bis 1/10 geteilt. Es wurde RPMI-1640-Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 Minuten), versetzt mit Glutamin 2 mM und 1% Penicillin & Streptomycin verwendet.
Zellkulturen wurden entweder unter Standardlaborbedingungen oder reduzierter Sauerstoffkonzentration unterschiedlich lange kultiviert. Für Langzeiteffekte wurden AML Zelllinien unter den angegebenen $O_2$-Konzentrationen 8 Tage konditioniert, und anschließend das Experiment nach Zugabe frischen Mediums über 48 Stunden durchgeführt. Der durch die Zellen konditionierte Überstand wurde nach Zentrifugation der Probe (10 Minuten für 10000 rpm) abgenommen und bei -20° C bis zur weiteren Verwendung (siehe unten) eingefroren.

## 2.3 Zellzählung

### 2.3.1 Prinzip

Lebende Zellen besitzen eine intakte Zellwand, wodurch Trypan Blau nicht in die Zelle aufgenommen wird. Die Zellwand toter Zellen hingegen ist für den Farbstoff durchlässig geworden, weswegen sie sich blau anfärben und ausgezählt werden können. So kann zwischen vitalen und avitalen Zellen unterschieden werden.

### 2.3.2 Durchführung

50µL einer homogenisierten Zellsuspension wurden mit 50µl einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung gemischt. Die Mischung wurde dann in eine Neubauer-Kammer pipettiert und die lebenden Zellen in allen Quadranten der Kammer gezählt. Die Zellzahl wurde anschließend anhand folgender Formel berechnet:

$$\mathbf{N \times n / 0{,}1 \times 0{,}5 \times 4}$$

*N: Zellzahl/ml Zellsuspension, n: Anzahl vitaler Zellen, 0,1: Kammerfaktor, 0,5: Verdünnung 1:2 (50µl + 50 µl), 4: Anzahl der ausgezählten Quadranten*

## 2.4. Zytokin-Blot

### 2.4.1. Prinzip des Antikörper Microarray

Mittels Antikörper Microarray kann eine biologische Probe gleichzeitig auf eine Vielzahl unterschiedlicher Proteinen semiquantitativ untersucht werden. Das Prinzip ähnelt dem ELISA: eine Membran (meist aus Nitrozellulose) wird an verschiedenen Stellen mit Antikörpern gegen unterschiedliche Proteine beschichtet. Nach Zugabe der Probe sowie Waschungen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen, wird ein sekundärer Antikörper hinzugefügt, der den Protein-Antikörperkomplex bindet. Dieser sekundäre Antikörper trägt einen Biotinrest, der Streptavidin-Meerrettichperoxidase bindet. Durch Zugabe der letzteren wird der Protein-Antikörper-Komplex fluoreszent. Diese Fluoreszenz ist proportional zur auf der Membran gebunden Proteinmenge; dadurch können (I) Aussagen über das Vorhandensein von Proteinen in der zu untersuchenden Probe gemacht werden können und (II) die Menge semiquantitativ geschätzt werden.

### 2.4.2. Zytokin Array

Es wurde der Human Cytokine Antibody Array C5 (RayBiotech Inc. Norcross USA) verwendet. Damit können 80 Zytokine gleichzeitig innerhalb einer Probe untersucht werden. Als Proben wurden von der AML Zelllinie Kg1a konditioniertes Medium verwendet. Hierzu wurden Überstände von Zellkulturen nach einer 48-stündiger Kultivierung unter Raumluft bzw. 6% $O_2$ gewonnen. Der Assay wurde dann entsprechend der Angabe des Herstellers bearbeitet.

## 2.5 ELISA (Enzyme-linked Immonusorbent Assay)

### 2.5.1Prinzip des ELISA

ELISA ist eine etablierte Nachweismethode zur quantitativen Bestimmung spezifischer Moleküle (z. B. Zytokine). Die Methode basiert auf folgendem Prinzip: eine Oberfläche wird mit monoklonalen Antikörpern gegen ein zu untersuchendes Molekül („XY“) beschichtet. Hierauf wird Flüssigmaterial (z. B. Serum oder Medium) gegeben, und die auf die Oberfläche beschichteten Antikörper binden das entsprechende Antigen „XY“. Durch mehrere Waschvorgänge werden in der Probe ebenfalls vorhandene, aber nicht gebundene Antigene entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines zweiten, ebenfalls gegen „XY“ gerichteten Antikörpers; dieser bindet nun an den Antigen-Antikörper-Komplex. Durch erneutes Waschen werden überschüssige, nicht gebundene Antikörper entfernt. Nun erfolgt die Zugabe einer Farblösung. Da an den 2. Antikörper ein Enzym (in der Regel Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt ist, welches eine Farbumschlagsreaktion katalysiert, fällt der Farbumschlag umso intensiver aus, je mehr Antikörper gebunden wurde, also je mehr Molekül „XY“ vorhanden ist. Dieser Farbumschlag wird mittel Absorption quantifiziert, und mithilfe eines Photometers gemessen und ist proportional zur Konzentration von “XY“. Durch eine Verdünnungsreihe, deren Konzentrationen bekannt ist, kann dann die Konzentration des zu untersuchenden Moleküls in der Probe quantitativ bestimmt werden.

### 2.5.2 Durchführung

Serumproben von Patienten mit AML wurden zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Untersuchungen abgenommen, bei 20000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, das Serum abgenommen und bei – 80°C gelagert.
Es wurden die Zytokine IL-8 (Human ELISA Kit IL-8, BD Biosciences, San Jose, USA) und HGF (Human HGF Quantikinine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, USA) gemessen. Die Durchführung erfolgte gemäß der Gebrauchsanleitung des Herstellers. Es wurde 1 ml konditioniertes Medium pro Ansatz verwendet; Proben mit sehr hoher, den Messbereich überschreitender, IL-8 Konzentration wurden jeweils mit ELISA-Lösung verdünnt (1:1, 1:5 oder 1:10), um innerhalb des durch die Verdünnungsreihe definierten Messbereichs zu bleiben. Die Verdünnung wurde anschließend durch den entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert.

## 2.6. Real Time Polymerase Kettenreaktion

### 2.6.1. Prinzip und Durchführung der RNA Extraktion

Um RNA von biologischen Proben zu untersuchen, müssen diese aus dem Zellkern extrahiert und isoliert werden. Es gibt zahlreiche Methoden der RNA Extraktion. Bei dem von uns verwendeten Kit (Absolutely RNA Mini Pre Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, U.S.A. ) werden die Zellen durch Zugabe eines Lyse-induzierenden Reagenz lysiert, wobei gleichzeitig durch einen RN-ase inhibierenden Effekt des Reagenz (in unserem Fall Guanidin-Thiocyanat) die Lyse der zu untersuchenden RNA verhindert wird. Die Lösung wird in einem speziellen Röhrchen geführt, die eine Matrix enthält, welche RNA bindet. Durch Waschvorgänge werden andere Zellinhalte und Proteine (Beispielsweise DNA) aus der Lösung entfernt, sodass eine möglichst reine RNA-Probenlösung entsteht (für detaillierte Angaben siehe Anleitung des Herstellers.)

### 2.6.2. Prinzip der cDNA-Synthese und Real Time Quantitative-PCR

Die quantitative *real time* Polymerase Kettenreaktion (qPCR) ist eine Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Genen (DNA oder RNA); mit ihr können daher relative Unterschiede zwischen den Nukleinsäurekonzentrationen verschiedener Proben erkannt werden. Dabei beruht die Vervielfältigung des zu untersuchenden Gens auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR), bei der DNA Sequenzen mithilfe von einer DNA-Polymerase und Einsatz eines spezifischen Primers gezielt vervielfältigt werden. Da bei der qPCR nur DNA untersucht werden kann, muss im Fall von RNA (wie im vorliegenden Projekt) zuerst durch Reverse Transkriptase PCR RNA in sogenannte *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Anders als bei der rein qualitativen PCR ermöglicht qPCR den Vergleich der Konzentration von mRNA in biologischen Proben über die Bestimmung der sogenannter $C_T$ (*cycle threshold*) Werte. Hierzu wird der Probe zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green®) beigegeben, der in doppelsträngige DNA eingebaut wird. Da bei jedem Amplifikationszyklus die Anzahl an doppelsträngiger DNA zunimmt, steigt die (photometrisch gemessene) Fluoreszenz mit jedem Zyklus ebenfalls weiter an. Der gewählte Grenzwert („*Threshold*“) definiert, wann bei einer Probe ein bestimmter Fluoreszenzwert überschritten wird. In Proben mit einer hohen Ausgangskonzentration von mRNA wird der Grenzwert schneller erreicht, da weniger Amplifikationszyklen nötig sind. Diese Grenzwerte müssen anschließend normalisiert werden, um auszuschließen, dass mögliche Unterschiede durch abweichende Zellzahlen in den Proben hervorgerufen werden, anstelle durch biologische Effekte. Dazu wird ein Referenzgen bestimmt, welches in aller Regel durch das experimentelle Set-up nicht beeinflusst wird. Hierzu eignen sich konstitutiv transkribierte Gene zur Aufrechterhaltung der basalen Zellfunktionen („*housekeeping genes*“), z.B. ß-Aktin.

### 2.6.3. Durchführung der Real Time Quantitative-PCR

Es wurden die Zelllinien Kg1a und OCI-AML3 bei den Sauerstoffkonzentrationen von 21% $O_2$ und 1% $O_2$ in Kultur genommen. Nach 48h wurde entsprechend des experimentellen Ansatzes die Extraktion der kompletten RNA mittels Absolutely RNA Mini Pre Kit nach Angaben des Herstellers vorgenommen. Für die cDNA-Synthese wurde

ein First Strand cDNA Synthesis System mit beiliegendem oligo(dT)20 Primer verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll und Angaben des Herstellers.

Für IL-8 und ß-Aktin cDNA Amplifikation wurden kommerzielle Primer verwendet (Sequenz IL-8 5'-TAGCAAAATTGAGGCCAAGC-3', revers 5'-AGCAGACTAGGGTTGCCAGA-3', Sequenz ß-Aktin 5'- CGAGCACTTTGATTGCACA-3', revers 5'-AGTGGGGTGGCTTTTAGGAT-3'). Die PCR wurde initial bei 95°C für 15 Minuten, danach 40 Zyklen bei 95°C für 15 sec, 60°C für 30 sec und 72°C für 30 sec durchgeführt. Quantitative PCR Amplifikationen wurden mittel Fast SYBR Green Master Mix und des 7900HT Fast Real Time PCR Systems desselben Herstellers gemäß der Anleitung durchgeführt. IL-8 mRNA wurde bei 21% $O_2$ als Standard, gegenüber hypoxischen Konditionen bei 1% $O_2$ untersucht. Als endogene Kontrolle wurde ß-Aktin verwendet. Um die Unterschiede der vorhandenen RNA festzustellen, wurde somit zuerst die IL-8 Amplifikation gegenüber ß-Aktin bei 21%, sowie 1% als Standard untersucht:

$\Delta Ct\ (21\%O_2)=Ct(\text{IL-8}\ 21\%O_2) - Ct(\text{ß-Aktin}\ 21\%O_2)$

bzw.

$\Delta Ct\ (1\%O_2)=Ct(\text{IL-8}\ 1\%O_2) - Ct(\text{ß-Aktin}\ 1\%O_2)$

Die Induktion der IL-8 RNA bei 1% $O_2$ ($\Delta\Delta Ct$ Werte) wurde dann relativ zu normoxischen Konditionen bei 21% $O_2$ als Mittelwert berechnet. ($2e\Delta\Delta Ct$ von n = 4 unabhängigen Experimenten):

$\Delta\Delta Ct=\Delta Ct(1\%O_2) - \Delta Ct(21\%O_2)$

## 2.7. RNA-Expressionsanalysen

Die AMLCG-99 Studie ist eine kooperative Studie der deutschen Forschungsgruppe AML Cooperative Group, die 1999 begonnen wurde. Im Rahmen dieser Studie wurde die antileukämische Effektivität einer Doppelinduktion mit Hochdosis-AraC und Mitoxantron (Patienten > 60 Jahre mit Blasten 5% im Knochenmark erhielten nur 1 Zyklus mit 1 g/m$^2$ KOF (Körperoberfläche)) im Vergleich zur damaligen Standardtherapie mit TAD (Thioguanin, AraC und Daunorubicin) mit einem darauffolgenden Zyklus HAM (Hochdosis AraC, Mitoxantron) untersucht. Bezüglich der Postremissionstherapie wurde die zyklische Erhaltungstherapie mit einer myeloablativen Hochdosisbehandlung und nachfolgender autologer Stammzelltransplantation verglichen. Keine der experimentellen Arme war der Standardtherapie hinsichtlich des Gesamtüberlebens, des rezidivfreien Überlebens und der Remissionsdauer überlegen (16). Neben den epidemiologischen Daten wurden im Rahmen dieser Studie Knochenmarksproben von insgesamt 562 Patienten mittels Affymetrix U133A + B und Affymetrix U133 Plus 2.0 Microarrays (Affymetrix, Santa Clara, USA) untersucht. Diese Daten wurden publiziert (47) und sind im Gene Expression Omnibus unter der Zugangsnummer GSE37642 hinterlegt. Die für das vorliegende Projekt notwendigen Daten wurden von Herrn PD Dr. T. Herold, Medizinische Klinik III, Klinikum der Universität München, zur Verfügung gestellt.

## 2.8. Statistik

### 2.8.1. Zellexperimentelle Arbeiten

Alle Experimente wurden mindestens 3fach wiederholt; falls für die Analysen Daten aus mehr Ansätzen verwendet wurden, wird diese jeweils angegeben. Die erhobenen Daten wurden mit Microsoft Excel erfasst, und entweder mit Excel oder mit SPSS Statistics® (IBM, USA) ausgewertet. Falls nicht gesondert beschrieben, wird der Mittelwert mit Standardabweichungen angeben. Für die Analysen wurde, falls nicht anders angegeben, ein zweiseitiger (je nach Fragestellung verbundener oder unverbundener) t-Test durchgeführt. Bei speziellen Fragestellungen (im Text vermerkt) kam der Mann-Whitney Test zum Einsatz. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 2.8.2. Klinisch-epidemiologische Analysen

Zur Abschätzung des prognostischen Einflusses der mRNA Expression leukämischer Blasten wurden Überlebensanalysen (*overall survival* [OS], *relapse free survival* [RFS]) mittels der Methode von Kaplan-Meier sowie der COX Regression analysiert. Dazu wurden die RNA Expressionsprofile (RNA Microarrays mit dem kompletten Expressionsprofil von 47.000 Genen (Affymetrix U133A + B und Affymetrix U133 Plus 2.0 Microarrays (Affymetrix, Santa Clara, USA)) von 562 Patienten, die einheitlich im Rahmen der AMLCG1999 Studie behandelt worden waren, analysiert (47). Das mittlere Alter der Patienten betrug 55,2 Jahre, und 50,3% der Patienten waren männlich. Während 26,5% der günstigen Risikogruppe angehörten (nach Klassifikation des European Leukemia Net), waren 20,8% der Gruppe „intermediär I“ und 20,1% der Gruppe „intermediär II“ zuzuordnen. 25,1% galten als prognostisch ungünstig, und 7,5% konnten keiner dieser Gruppen zugeordnet werden. Bei 23,6% wurde eine FLT-ITD Mutation nachgewiesen. 54,0% der Patienten (n=289) erreichten eine komplette Remission (CR). Teil dieses Datensatzes war das RNA Expressionsprofil und klinische Daten von 29 Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie (APL). Das mediane Alter dieser Kohorte betrug 51 Jahre, 12 Patienten waren männlich, und die CR Rate betrug 81%.

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Hypoxie-abhängige Expression von Zytokinen durch AML

Um durch Hypoxie induzierte Zytokine zu identifizieren, wurde ein *Screening Assay* für 80 Zytokine durchgeführt. Dazu wurde von der AML Zelllinie Kg1a über 48 Stunden unter Raumluft oder unter Hypoxie (6% $O_2$) konditioniertes Medium untersucht. In der semiquantitativen Auswertung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Sekretion von insbesondere IL-8 und auch HGF (Hepatocyte growth factor) unter 6% $O_2$ (Abbildung 1), weswegen sich die weiteren Untersuchungen auf diese beiden Zytokine konzentrierten.

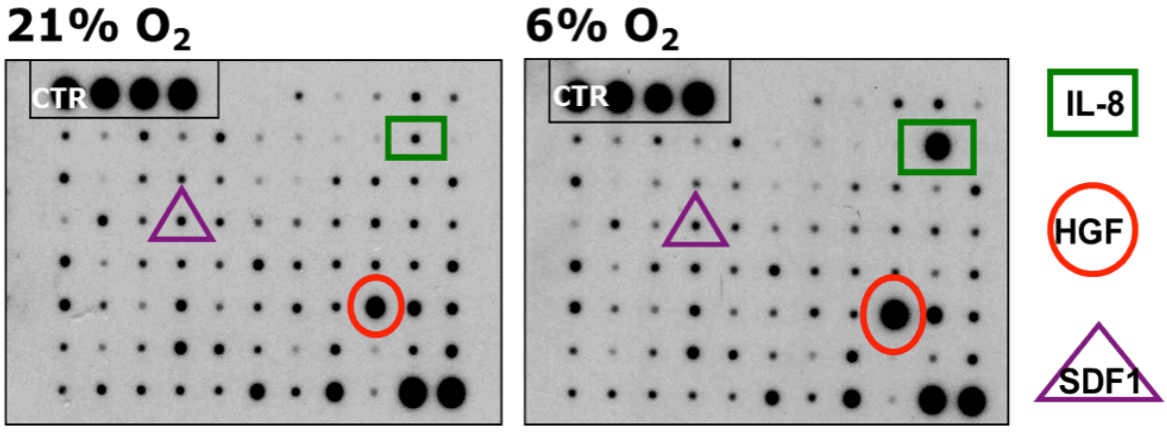


*Abbildung 1. Zytokinblot der Zelllinie Kg1a bei 21% bzw. 6% $O_2$ (nach 48h).*

## 3.2 IL-8 Expression von AML Blasten in Abhängigkeit von Hypoxie

Zur weiteren Charakterisierung der Hypoxie-induzierten IL-8 Expression wurden zunächst 3 AML-Zelllinien (Kg1a, OCI-AML-3, HEL) untersucht. Zwar zeigten alle Zelllinien eine messbare Sekretion von IL-8 unter Raumluft, es waren jedoch hohe, konstitutive Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien nachweisbar. So produzierte OCI-AML-3 65fach höhere Mengen an IL-8 als Kg1a und 8fach höhere Mengen als HEL (21% O2 für OCI-AML-3: 197 pg/ml, für Kg1a: 3 pg/ml, HEL: 24 pg/ml).
Die Viabilität der Zellkulturen wurde durch Trypanblaufärbung bestimmt, erwartungsgemäß kam es nach 48 Stunden Inkubation unter Hypoxie zu einer Verminderung der Zellzahl (OCI-AML-3: 11,8 x 105 viable Zellen/ ml bei 21% O2 versus 7,2 x 105 viable Zellen/ ml bei 1% O2, $p<0,01$, Kg1a: 9,3 x 105 viable Zellen/ ml bei 21% O2 versus 6,8 x 105 viable Zellen/ ml bei 1% O2, $p<0,05$ und HEL: 9,7 x 105 viable Zellen/ ml bei 21% O2 versus 4,0 x 105 viable Zellen/ ml bei 1% O2, $p<0,01$). Daher wurde die Konzentration von IL-8 auf die Anzahl viabler Zellen (105 /ml) normalisiert. Da OCI-AML3 und KG1a die höchste IL-8 Induktion unter Hypoxie aufwiesen (siehe unten), wurden die weiteren Experimente zur genaueren Charakterisierung der Hypoxie-induzierten IL-8 Produktion an ihnen durchgeführt.
Als erstes wurde die Kinetik der IL-8 Produktion untersucht. Hier zeigte sich, dass es bereits nach 48 Stunden zu einer signifikanten Induktion der IL-8 Produktion durch Hypoxie von 1% O2 kam (Kg1a: 2,61fach [Mittelwert, $p<0,05$], OCI-AML3: 8,62fach [Mittelwert, $p<0,01$]). Im nächsten Schritt wurde nun – im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Kurve – das Ausmaß der IL-8 Sekretion in Abhängigkeit von der Tiefe der Hypoxie untersucht. Für beide Zelllinien zeigte sich, dass erst ab einer Sauerstoffkonzentration von 1% eine signifikante Induktion von IL-8 beobachtet werden konnte (Abb. 2A und 2B).

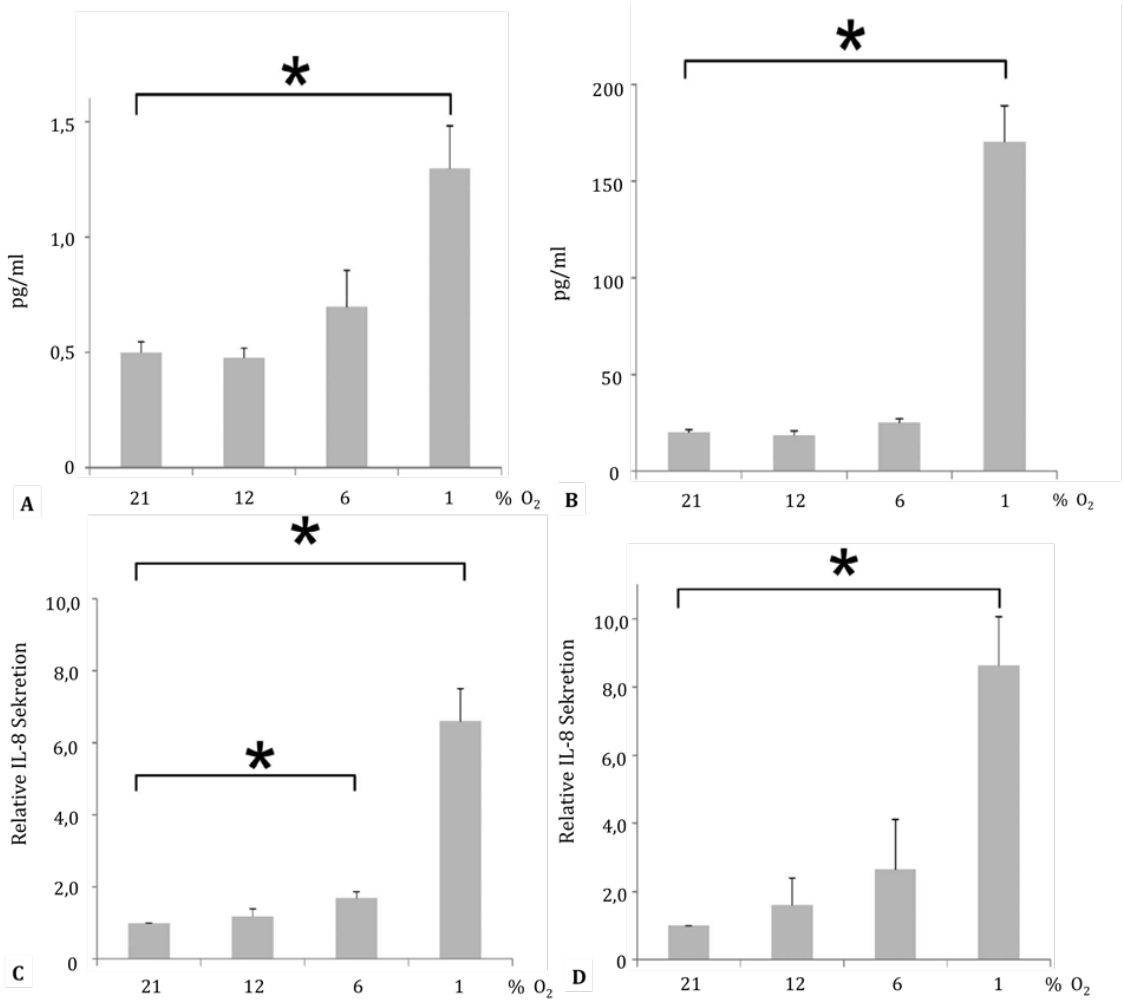


*Abbildung 2.* ***(A)*** *Bei Kg1a führt nur starke Hypoxie von 1% zu einem Anstieg von IL-8 bei Kultivierung von 48h.* ***(B)*** *Vergleichbare Ergebnisse fanden sich für OCI-AML3 Zellen.* ***(C)*** *Kg1a Zellen produzieren auch bei Adaption mit Hypoxie vermehrt IL-8.* ***(D)*** *IL-8 Sekretion bei Hypoxie adaptierten OCI-AML3 Zellen.*

So kam es zu einer hochsignifikanten 2,61fachen Steigerung der IL-8 Sekretion nur bei 1% $O_2$ für Kg1a ($p<0,05$), jedoch nicht bei 12% $O_2$ (0,96fach) oder unter 6% $O_2$ (1,48fach, jeweils nicht signifikant). Für OCI-AML3 kam es zu einer 8,62fachen Induktion durch 1% $O_2$ gegenüber dem Ausgangswert ($p<0,01$), während unter 12% (0,92fache Induktion) und 6% (1,27fach) keine signifikanten Änderungen beobachtet wurden. Sämtliche weiterführende Experimente wurden daher unter Raumluft und unter 1% $O_2$ durchgeführt.

Um eine akute, unspezifische zelluläre Stressreaktion auszuschließen (IL-8 ist in erster Linie als Entzündungsmediator bekannt, s.u.), wurde die Expression von IL-8 auch an Zelllinien untersucht, die bereits für bis zu 10 Tage unter hypoxischen Bedingungen

kultiviert und daher an Hypoxie adaptiert waren. Interessanterweise ließ sich die erhöhte Sekretion von IL-8 auch dann an den beiden Zelllinien beobachten, nachdem diese bis zu 10 Tagen unter Hypoxie kultiviert worden waren (Kg1a: 8,64fache Induktion unter 1% $O_2$ [Abb. 2C, $p<0,05$], OCI-AML3: 6,60fache Induktion unter 1% $O_2$ [Abb. 2D, $p<0,01$]). Interessanterweise fand sich außerdem, dass die verlängerte Exposition von 10 Tagen auch bereits bei 6% $O_2$ zu einer Induktion von IL-8 führte (1,70fache Induktion bei 6% $O_2$ nach 10 Tagen, Abb. 2C). Diese Daten implizieren eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit, bei der eine Verringerung der „Dosis“ (in diesem Fall der Sauerstoffkonzentration) durch eine Verlängerung der Expositionsdauer ausgeglichen werden kann.

## 3.3 HGF Induktion durch AML Blasten in Abhängigkeit von Hypoxie

Da beim initialen Screening (siehe Abb. 1) neben IL-8 auch eine Induktion von HGF beobachtet wurde, wurde bei den o.g. Experimente ebenfalls analog zu IL-8 auch HGF im konditionierten Medium bestimmt (hinsichtlich der Sauerstoffkonzentrationen wurde nur 21% mit 6% und 1% $O_2$ verglichen. Während auch hier Unterschiede in der konstitutionellen Sekretion von HGF (OCI-AML3: 27,2 pg/ml Kg1a: 266,4 pg/ml [Mittelwert, normalisiert auf $10^5$ Zellen, nach 48 Stunden Konditionierung]) beobachtet wurden, ließ sich eine signifikante Induktion unter Hypoxie nicht mehr bestätigen: es fand sich eine 1,13fache Induktion nach 48 Stunden unter 6% $O_2$, (1,34fache nach 1% $O_2$) für OCI-AML3, bzw. 1,31fach (6% $O_2$) und 1,07fach (1% $O_2$) für Kg1a (Mittelwerte, alle Werte nicht signifikant, Abb. 3). Auch nach Adaption von 10 Tagen 1%iger Hypoxie fand sich keine signifikante Induktion von HGF (OCI-AML3: 1,63fach, Kg1a: 0,58fach, $p>0,05$).

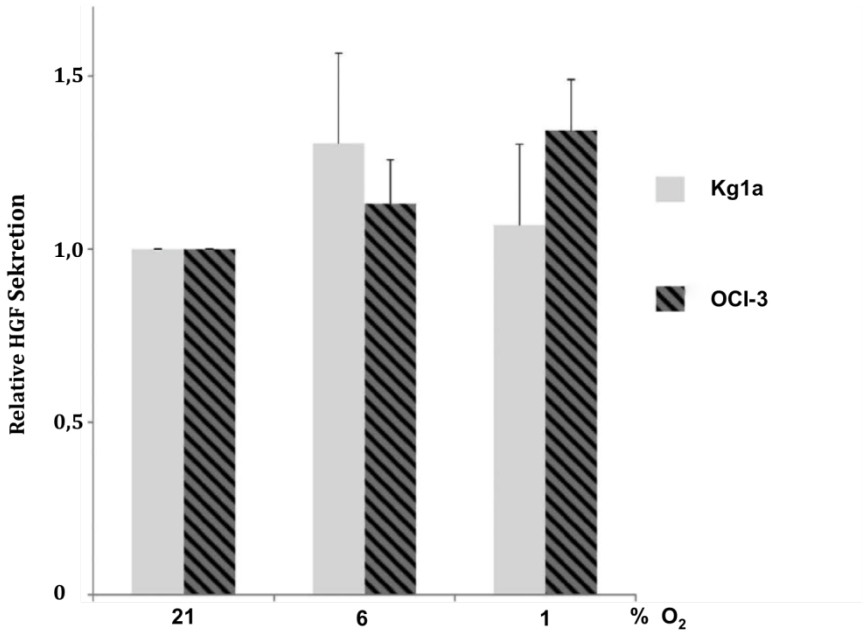


*Abbildung 3. Relative HGF Sekretion nach 48h bei 6% bzw. 1% in Bezug auf 21% für Kg1a und OCI-AML-3.*

## 3.4 Hypoxie induzierte IL-8 Produktion frischer AML Proben

Als nächstes wurden diese Ergebnisse aus AML-Zelllinien in leukämischen Blasten von primären AML-Proben bestätigt. Dazu standen AML Blasten aus Proben von 22 Patienten mit neu diagnostizierter AML zur Verfügung. Die Charakteristika dieser Patienten sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

| | |
|---|---|
| **Durchschnittsalter** | 63,81 Jahre |
| **Geschlecht** | Männlich: 10<br>Weiblich: 12 |
| **FAB Klassifikation** | M1: 5<br>M2: 5<br>M3: 0<br>M4: 5<br>M5: 1<br>M6: 1<br>N/A: 5 |

*Tabelle 3. Patientencharakteristika der Primärproben (n=22). N/A = nicht zuzuordnen*

Interessanterweise war die IL-8 Sekretion primärer Zellen signifikant höher als die der AML-Zelllinien, wobei sich allerdings eine hohe Varianz zwischen einzelnen Proben zeigte. (1% $O_2$, 48 Stunden: Mittelwert 7,8 ± 9,1 SD in pg/ml [Kg1a und OCI-AML3 kombiniert] gegenüber: Mittelwert 459,1 ± 644,4 SD in pg/ml, $p < 0,01$). Diese konstitutionell an sich schon höhere IL-8 Produktion ließ sich auch in frischen AML Proben durch Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen steigern (Abb. 4): so fand sich nach 48 Stunden Exposition von 1% $O_2$ eine signifikante Verdoppelung der IL-8 Konzentration im Medium ($p < 0,01$).

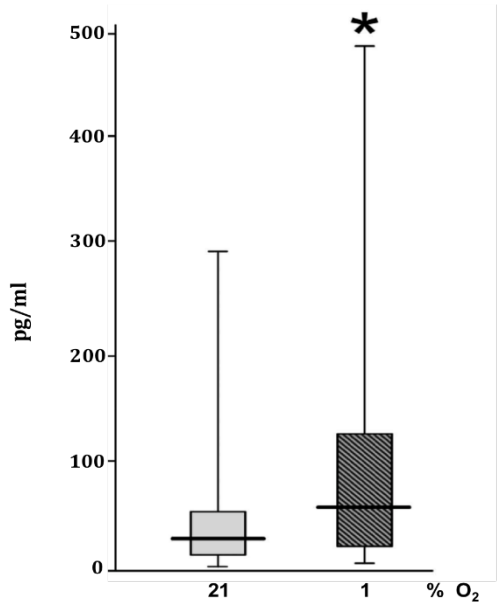


*Abbildung 4. Hypoxie von 1% $O_2$ führt auch in frischen AML Blasten zu einer Verdoppelung der IL-8 Sekretion.*

### 3.4.1 IL-8 Produktion in genetisch definierten AML Subgruppen

Aufgrund der beobachteten hohen interindividuellen Variabilität der IL-8 Produktion sollte geprüft werden, ob sich verschiedene, genetisch definierte Subgruppen hinsichtlich ihrer konstitutionellen und Hypoxie-induzierten IL-8 Produktion unterscheiden. Es wurde daher untersucht, ob der Mutationsstatus der prognostisch relevanten Gene FLT3 und NPM1 einen Einfluss auf die IL-8 Sekretion hat.

Überraschenderweise fand sich jedoch kein Einfluss des Mutationsstatus auf die IL-8 Sekretion (Abbildung 5): weder unterschied sich die Spontansekretion von IL-8 unter 21% $O_2$ zwischen den beiden Subtypen (FLT3 Wildtyp (n=11): 258,5 pg/ml versus 300,1 pg/ml FLT3-ITD (n=11), $p>0,05$), noch gab es einen Unterschied hinsichtlich der Induktion der IL-8 Sekretion unter 1% $O_2$ in der Gruppe mit FLT3 ITD (2,3fach FLT3 Wildtyp versus 1,7fache Induktion für FLT3 ITD, $p>0,05$).

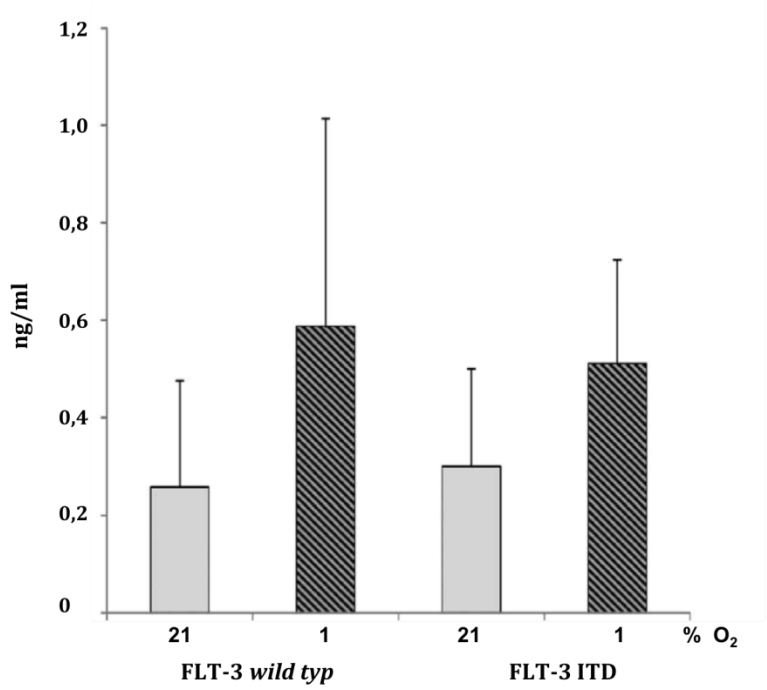


*Abbildung 5. IL-8-Konzentrationen in ng/ml bei 21% und 1% $O_2$ bei FLT3 ITD/WT- Zellen.*

Auch hinsichtlich des NPM1 Mutationsstatus ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich spontaner und Hypoxie-induzierter IL-8 Sekretion (2,9fache Induktion unter Hypoxie, nicht signifikant).

### 3.4.2 IL-8 Produktion normaler hämatopoeitischer mononukleärer Zellen

Das „gesunde“ Gegenstück leukämischer Blasten sind physiologische, aber undifferenzierte myeloische Zellen. Diese Fraktion macht den Großteil der mononukleären Zellen (MNC) des Knochenmarks aus, wenn diese via FICOLL Dichtegradient angereichert werden. Um zu untersuchen, ob die Hypoxie-induzierte IL-8 Produktion eine AML-spezifische Eigenschaft oder eine generelle Eigenschaft unreifer hämatopoeitischer Zellen ist, wurde die IL-8 Sekretion gesunder MNC bestimmt (n=4). Interessanterweise zeigte sich bei den AML Blasten eine signifikant höhere IL-8 Produktion im Vergleich zu den nicht-malignen Zellen unter 1% $O_2$ (548,0 pg/ml versus 62,8 pg/ml, $p<0,01$, Abbildung 6A).

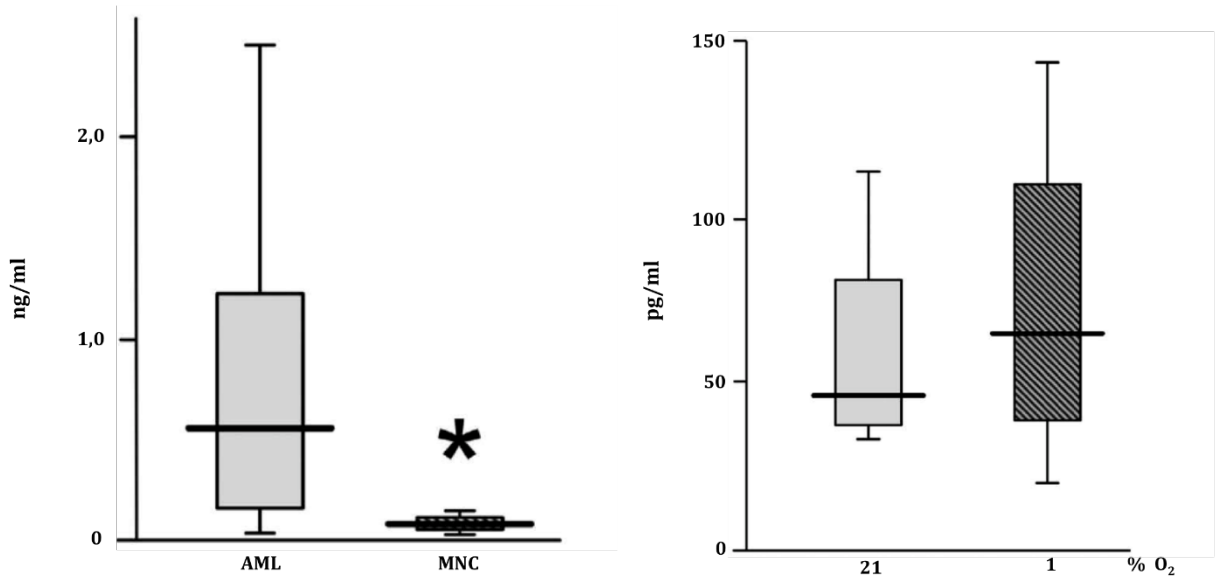


*Abbildung 6.* ***A)*** *AML Blasten weisen unter reduziertem Sauerstoffgehalt eine signifikant höhere IL-8 Produktion als physiologische MNC.* ***B)*** *In physiologischen MNC wird IL-8 nicht durch Hypoxie induziert.*

Ein weiterer Unterschied zwischen maligner und physiologischer Hämatopoese in der IL-8 Produktion fand sich in der Reaktion auf Hypoxie: physiologische MNC ließen sich – im Gegensatz zu AML Blasten - durch hypoxischen Bedingungen nicht zu einer vermehrten Expression von IL-8 anregen (43,6 pg/ml bei 21% $O_2$ versus 62,8 pg/ml bei 1% $O_2$, p=0,17, Abbildung 6B).

Zusammengefasst implizieren diese Daten, dass die maligne Transformation myeloischer Progenitoren in leukämische Blasten die Produktion und Regulation von IL-8 grundlegend beeinflusst.

### 3.4.3 Die Hypoxie-induzierte IL-8 Expression ist transkriptionell reguliert

Die bisher erhobenen Daten belegen, dass es zu einer vermehrten Sekretion von IL-8 unter Hypoxie kommt. Dies beantwortet hingegen nicht die Frage, ob dies entweder durch vermehrte Sezernierung bereits intrazellulär vorhandenen IL-8 zustande kommt oder Folge einer vermehrten (a. e. transkriptionell vermittelten) Produktion von IL-8 in AML Blasten ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurde IL-8 mRNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Abbildung 7 zeigt, dass in beiden untersuchten Zelllinien OCI-AML3 und Kg1a ein signifikanter Anstieg der IL-8 mRNA unter 1% $O_2$ (normalisiert gegenüber *ß*

*Aktin* mRNA) beobachtet wurde (ΔΔCT 3,50 für OCI-AML-3 und 1,95 für Kg1a, $p < 0,01$). Dies bedeutet eine 3,86fache Steigerung der mRNA Expression von IL-8 für Kg1a und 11,31fache Steigerung für OCI-AML3 bei Hypoxie gegenüber Standardlaborbedingungen.

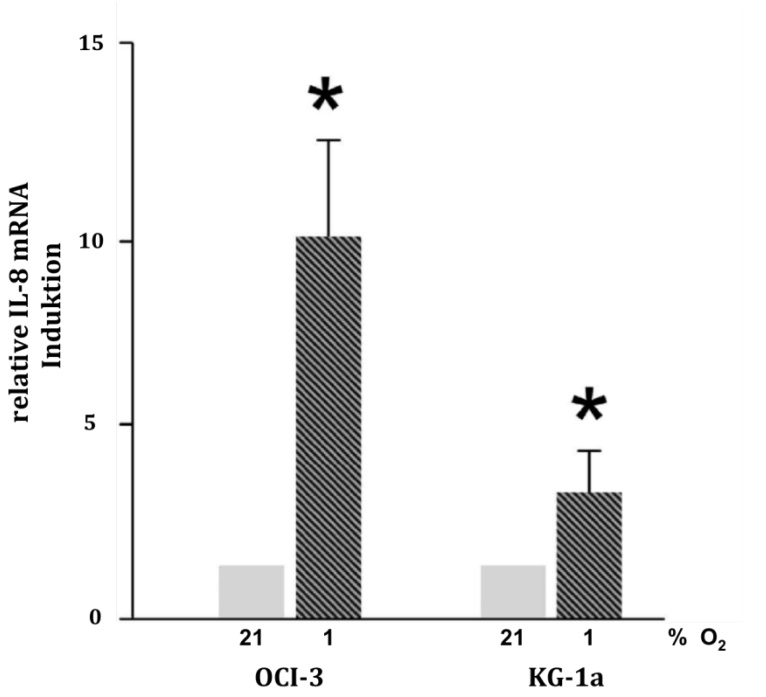


*Abbildung 7. Relative IL-8 mRNA Expression bei Zelllinien OCI-AML-3 und Kg1a unter Hypoxie. Bei beiden Zelllinien ist unter 1% $O_2$ eine signifikante Steigerung der Expression zu beobachten.*

## 3.5 IL-8 Expression in vivo

### 3.5.1 IL-8 Serumspiegel bei Patienten mit AML

Nachdem somit die Hypoxie-induzierte Überexpression von IL-8 durch AML Blasten *in vitro* anhand der bisherigen Daten nachgewiesen wurde, stellt sich nun die Frage der IL-8 Produktion von AML Zellen *in vivo*. Dazu wurden IL-8 Serumspiegel von neudiagnostizierten Patienten mit AML (n=4) in wöchentlichen Abständen von Diagnosestellung bis maximal 5 Wochen später (umfasst die Phase der Chemotherapie-induzierten Aplasie) bestimmt. Alle Patienten erhielten eine intensive Induktionschemotherapie. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt (Mediane mit SD): Während bei Diagnosestellung mit hoher Leukämielast die IL-8 Serumspiegel mit 40 pg/ml am niedrigsten waren, stiegen die Werte im Verlauf auf bis zu 210 pg/ml an, um dann im Verlauf der hämatopoeitischen Regeneration wieder auf einen Median von 88 pg/ml abzufallen.

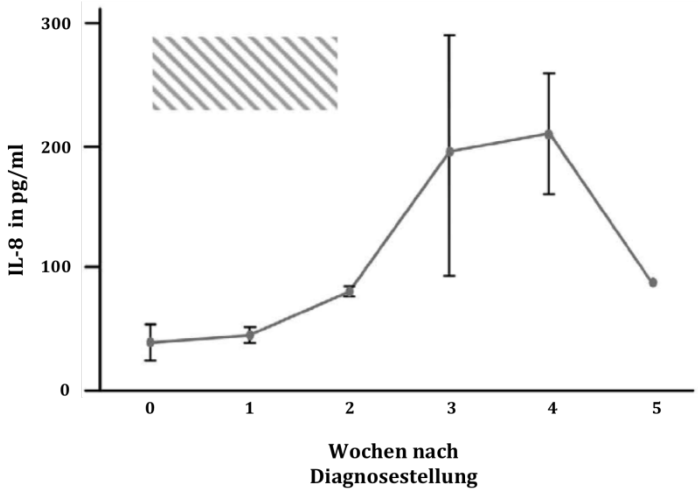


*Abbildung 8. Serum IL-8 Spiegel von Patienten mit AML während Therapie. Graue schraffierte Fläche symbolisiert die Zeit der Induktionschemotherapie.*

Anders als erwartet zeigt sich also keine direkte Korrelation zwischen IL-8 Serumspiegeln und Blastenzahl. IL-8 ist daher also nicht als „Tumormarker" geeignet, da während der Diagnose (= höchste Tumorlast) die niedrigsten, während der Knochenmarksaplasie aber das Maximum erreicht wird. Insofern sind hier offensichtlich andere Faktoren für die Regulation von IL-8 verantwortlich. Darauf wird im Rahmen der Diskussion näher eingegangen.

### 3.5.2 IL-8 als prognostischer Faktor

Dennoch legt die hohe spontane und durch Hypoxie verstärkte Produktion durch AML Blasten eine relevante biologische Rolle von IL-8 nahe. Daher sollte die eventuelle prognostische Bedeutung von IL-8 in der AML untersucht werden. Dazu wurde die mRNA Expression von IL-8 in AML-Blasten bei 562 Patienten untersucht, die innerhalb der AMLCG1999 Studie behandelt worden waren und bei denen neben den klinischen Daten zusätzlich RNA Microarrays durchgeführt worden waren.

Es zeigte sich, dass in der gesamten AML Kohorte die IL-8 mRNA Expression einen erheblichen Einfluss auf das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) und rezidivfreie Überleben (*relapse free survival*, RFS) hatte. Das Risiko, an einer AML zu versterben, erhöhte sich um 11% für Patienten, deren IL-8 mRNA über dem Median der Gesamtgruppe lag, im Vergleich zu Patienten mit einer IL-8 Produktion unterhalb des Medians (Hazard Ratio [HR] 1,11 (1,03–1,20), $p < 0,01$)), das Risiko eines Rezidivs erhöhte sich um 13% (HR 1,13 (1,02–1,26), $p < 0,05$). Dieser Effekt ist jedoch auf die Patienten mit einer APL zurückzuführen, die in diese Analyse miteingeschlossen wurden: Diese wiesen eine signifikant niedrigere Expression von IL-8 auf (Mittelwert 11,87±1,21 versus 10,03±1,59, $p<0,01$, Abb. 9), und die Prognose von Patienten mit APL ist deutlich besser als die von Patienten mit Non APL-AML.

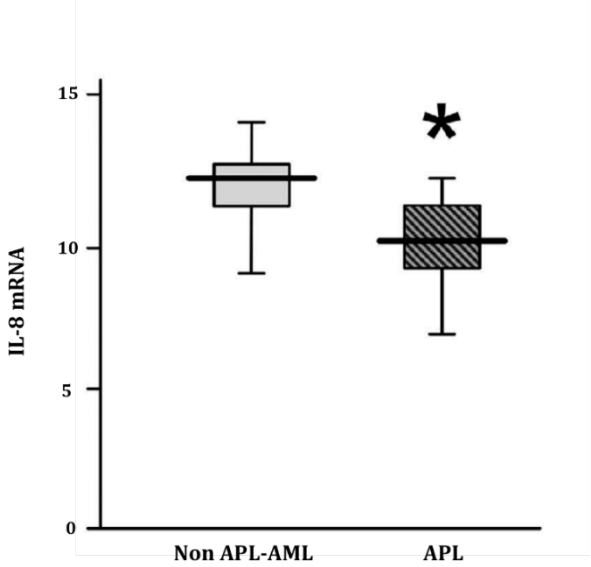


*Abbildung 9. IL-8 mRNA Expression bei Patienten mit APL versus non APL AML Patienten.*

Wurden nur die Patienten mit non APL-AML untersucht (n=533), fand sich keine prognostische Bedeutung der IL-8 Expression mehr, wenn als Grenzwert der Median herangezogen wurde.

Wurde als *cut-off* jedoch nicht der Median, sondern die 90% Perzentile herangezogen, so zeigte sich, dass die 10% Patienten mit der höchsten IL-8 mRNA Expression ein signifikant kürzeres OS aufwiesen (Abb. 10). Auf das RFS bei Non-APL-AML Patienten hatte die IL-8 Expression keinen Einfluss (HR: 1,03 [0,93-1,16], nicht signifikant).

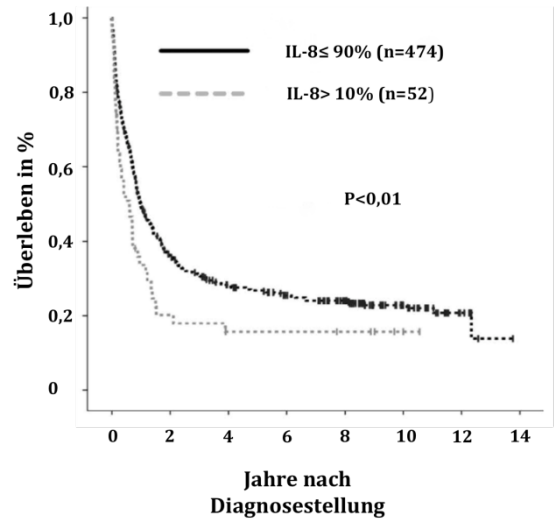


*Abbildung 10. Hohe IL-8 mRNA Expression in AML Blasten ist mit einer schlechten Prognose assoziiert.*

Obwohl die IL-8 Serumspiegel keine direkte Korrelation mit der „Tumorlast" (= Anzahl der leukämischen Blasen) aufwiesen (siehe Abschnitt 3.5.1.), wurde untersucht, ob die IL-8 mRNA mit der peripheren Leukozytenzahl bei Erstdiagnose (entspricht i. d. R. der leukämischen Blastenzahl) korreliert. Hier zeigte sich tatsächlich eine signifikante Korrelation zwischen beiden Parametern (r=0,11, p<0,05, Abb. 11).

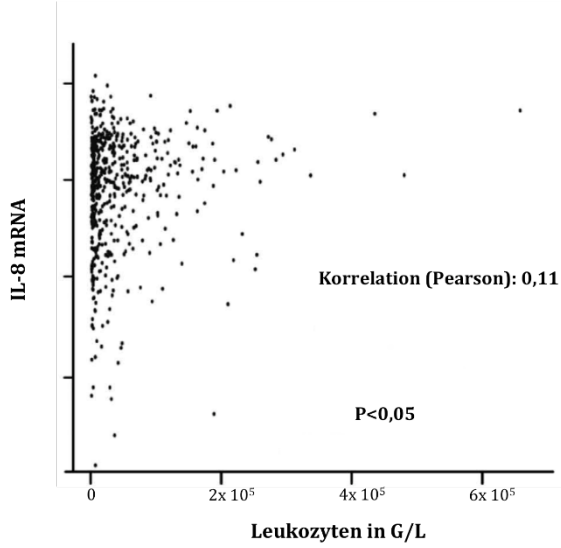


*Abbildung 11. IL-8 mRNA korreliert mit der Leukozytenzahl im peripheren Blut.*

Eine hohe Leukozytenzahl ist ein seit langem bekannter, gut etablierter Prognosefaktor in der AML, daher könnte diese Beobachtung den negativen prognostischen Effekt der IL-8 mRNA Expression zumindest teilweise erklären.

Aufgrund der Heterogenität der AML sollte der prognostische Einfluss der IL-8 mRNA Expression in genetisch definierten und daher homogeneren Subgruppen untersucht werden. Hier bot sich erneut FLT3 als Parameter an (siehe Kapitel 3.4.1.). Interessanterweise zeigte sich, dass bei Patienten mit Nachweis einer FLT3-ITD (n=124) die IL-8 mRNA Expression tatsächlich einen signifikant negativen Einfluss auf das OS (HR 1,34 [1,01–1,78], p < 0,05) und das RFS hat (HR 1,49 [1,02–2,19], p < 0,05), und das in dieser Subgruppe die Kohorte, die den Median der IL-8 Produktion überschreitet, ein grenzwertig signifikant schlechteres OS (p=0,05) und ein signifikant schlechteres RS (p< 0,05) aufwiesen (Abb. 12). Interessanterweise wiesen AML Blasten mit Nachweis einer FLT-3-ITD im Median eine signifikant höhere IL-8 mRNA Expression auf als AML mit FLT-3 Wildtyp (FLT-3-ITD (n=126) 12,1±1,0 versus FLT-3 Wildtyp 11,8±1,3 (n=396), p<0,05).

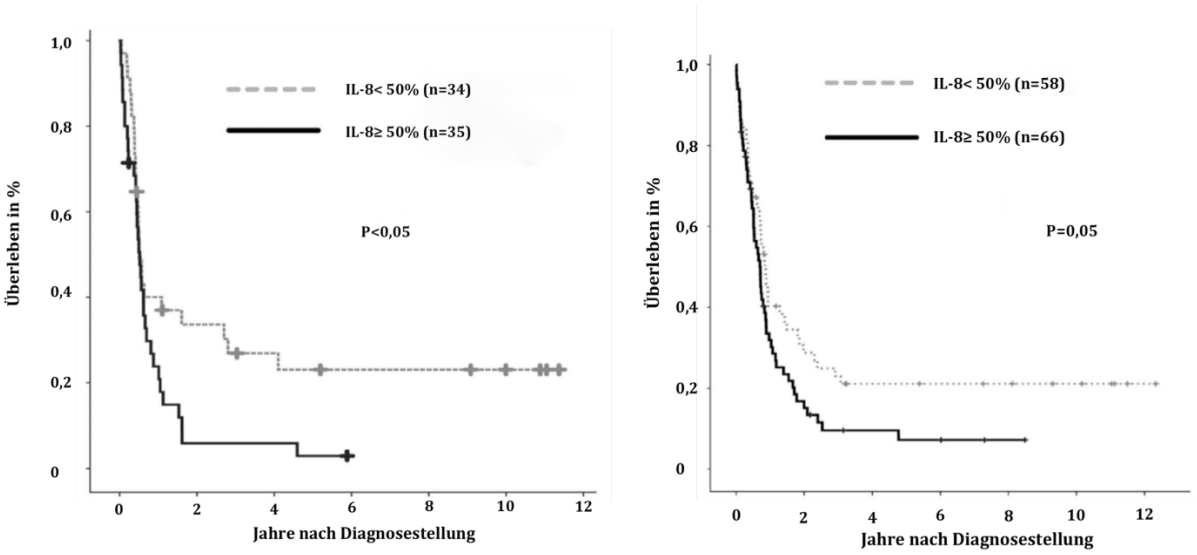


*Abbildung 12. In FLT3-ITD positiven Patienten weist eine hohe IL-8 mRNA Expression auf eine eher ungünstige Prognose hin (links overall survival, rechts für relapse free survival).*

Insgesamt implizieren diese Daten eine moderate prognostische Bedeutung der IL-8 mRNA Expression bei der AML, zumindest in einzelnen Subgruppen. Auf weitere Subgruppenanalysen wurde jedoch verzichtet, da diese Subgruppen sehr klein wären und die notwendige statistische Power dann nicht mehr erreicht würde.

# 4. Diskussion

Die AML bleibt trotz zahlreicher Fortschritte in Diagnostik, Therapie und auch dem Verständnis der Pathogenese für viele Patienten eine tödliche Krankheit – insbesondere für ältere Betroffene (18). Während durch intensive Chemotherapieprotokolle die Mehrzahl der intensiv behandelbaren Erkrankten eine CR erreicht (bis zu 80%), erleidet – je nach Risikoprofil – ein substantieller Anteil dieser Patienten ein Rezidiv ihrer Erkrankung (21). Eine rezidivierte AML lässt sich häufig nur schwer behandeln, da die leukämischen Blasten weniger sensibel gegenüber Chemotherapie sind und daher (1) bei diesen Patienten seltener eine komplette Remission erreicht wird als bei Erstdiagnose und (2) diese Remission zudem in der Regel nicht von Dauer ist (48). Die einzig kurative Option im Rezidiv stellt damit die allogene Stammzelltransplantation dar (49).

Ein Rezidiv entsteht, wenn leukämie-induzierende (Stamm-)Zellen (LSZ) die Chemotherapie überleben, um dann (nach einem variablen Zeitraum) erneut zu proliferieren und damit das klinisch manifeste Rezidiv verursachen (26). Welche Mechanismen das Überleben der LSZ gewährleisten, ist nicht zufriedenstellend geklärt. Eine viel diskutierte Theorie besagt, dass die AML aus zahlreichen Subpopulationen besteht. Sofern eine dieser Subpopulationen zum Beispiel eine Mutation besitzt, die eine Chemoresistenz vermittelt, könnte dieser Subklon die Chemotherapie überleben, während die sensibleren Zellen eliminiert werden (50). Die Chemotherapie dient somit als Selektionsdruck: klinisch erreicht der Patient dann zwar initial eine CR, die resistenten LSZ führen jedoch letztendlich zum Rezidiv, wobei sich dies phänotypisch und genetisch von der Erstdiagnose unterscheidet (sog. klonale Evolution). Andere Theorien besagen, dass die Chemotherapie selbst als mutagene Substanz genetische Mutationen in AML Blasten induziert; so wurde in einer Arbeit beispielsweise eine erhöhte Anzahl an karyotypischen Veränderungen bei Rezidiverkrankungen gefunden, die möglicherweise durch die Chemotherapie selbst ausgelöst wurden (51).

Eine weitere Hypothese zur Rezidiventstehung bzw. wie LSZ eine Chemotherapie überleben können, sieht hier eine Rolle für das Knochenmark-Microenvironment. Verschiedene Arbeiten haben bereits für solide Neoplasien (z. B. für das Glioblastom und das kolorektale Karzinom) gezeigt (52, 53), dass Tumore ein spezielles Microenvironment besitzen, welches durch verschiedenste Interaktionen zwischen den

malignen Zellen und dem nicht-malignen (i.e. physiologischem) Microenvironment zum Überleben der Tumorzellen beiträgt. Auch bei hämatologischen Tumoren gibt es Hinweise darauf, dass das Tumormicroenvironment direkt zur Malignität beitragen kann (54).

Während bei soliden Tumoren das Microenvironment relativ offensichtlich im Stroma angesiedelt ist, ist dies bei einer hämatologischen Neoplasie wie der AML nicht so einfach zu fassen. Hier ist dieses Microenvironment im Ursprungsgewebe der Erkrankung, bei der AML also im Knochenmark bzw. in der Stammzellnische, zu suchen. Als relevante Komponenten des Microenvironments im Knochenmark wurden mesenchymale Stromazellen sowie der Sauerstoffpartialdruck identifiziert (55), wobei sicherlich noch weitere, weniger gut charakterisierte Komponenten bestehen. Dass das Microenvironment auch bei der AML eine pathophysiologische Rolle spielt zeigt zum Beispiel, dass Kokulturen von MSZ und AML Zellen eine verminderte Chemotherapie induzierte Apoptose zeigten (56). Das Zusammenspiel dieser Komponenten untereinander sowie mit der AML ist noch weitgehend unbekannt, aber falls man eine Rolle des Microenvironment in der Rezidiventstehung bzw. der Pathogenese der AML postuliert, dann können solche Interaktionen relevant seien.

Als mögliche Mediatoren solcher Interaktion kommen prinzipiell Zytokine in Frage. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind Zytokine an einer Vielzahl physiologischer interzellulärer Prozesse beteiligt und können daher auch bei malignen Erkrankungen eine Rolle spielen. Ein potentieller Kandidat sollte im Falle des AML-Microenvironments verschiedene Kriterien erfüllen: er sollte (1) von einer Fraktion der beteiligten Microenvironment-Komponenten exprimiert und (2) durch Hypoxie reguliert werden, sowie (3) einen biologischen Effekt auf eine andere Zellfraktion ausüben. Die Kriterien (1) und (2) wurden – in einem ersten Screening – von 80 untersuchten Zytokinen nur von IL-8 und HGF erfüllt, so dass dieser weiter untersucht wurden. Beide Zytokine besitzen darüber hinaus Eigenschaften, die sie als potentielle Mediatoren interessant machen.

IL-8 gehört zu der Familie der CXC-Chemokine, welches auf Zielzellen an zwei Rezeptoren binden kann: CXCR1 und CXCR2. Bei Bindung an diese Rezeptoren werden mittels G-Protein-Aktivierung konsekutiv zahlreiche weitere, intrazelluläre Signalwege aktiviert, darunter zum Beispiel PI3-K, MAP-K und STAT. IL-8 wird physiologischerweise von Phagozyten als Antwort auf inflammatorische Reize (wie

Stimulation durch TNF-alpha oder IL-1) sekretiert, aber auch von Fibroblasten, Endothelzellen und neutrophile Granulozyten (57). IL-8 führt u. a. zur Chemotaxis, Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. IL-8 wird daher in erster Linie als proinflammatorisches Zytokin gesehen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass verschiedene Stressoren (NO-Freisetzung, Azidose, Hypoxie) die IL-8 Produktion in soliden Tumorzelllinien stimulieren können (58). Neben diesen Funktionen scheint IL-8 aber darüber hinaus noch weitere Funktionen zu besitzen, da erhöhte IL-8 Serumspiegel auch bei PatientInnen mit malignen Melanom, Brustkrebs und Pankreaskarzinom beobachtet wurden (59). Diese produzieren *in vitro* konstitutiv IL-8, wobei eine angiogene, mitogene und motogene Wirkungen von IL-8 vermutet wird (60). So konnte beispielsweise *in vitro* an Kulturen mit Mammakarzinom-Zelllinien gezeigt werden, dass IL-8 besonders bei Zelllinien mit hohem Metastasierungspotential erhöht war. Ebenso konnte durch Inhibition von CXCR1/2 spontane Metastasierung dieser Zellen unterbunden werden(61). Auch bei Kolonkarzinomzellen wurde *in vitro* beobachtet, dass eine erhöhte IL-8 Konzentration mit vermehrter Tumorzellproliferation, der Migration von Tumorzellen und Angiogenese vergesellschaftet ist (62). Diese Daten implizieren, dass IL-8 an verschiedenen Grundeigenschaften von malignen Tumoren, wie Proliferation, Angiogenese und Metastasierung, beteiligt ist, ohne dass es ähnliche Daten für hämatologische Neoplasien gibt.

Der *hepatocyte growth factor* (HGF, *scatter factor*) ist ein Polypeptid, welches zur Plasminogenfamilie gehört. Er wird vor allem mit embryonaler Reifung und Organentwicklung (vor allem der Leber) in Zusammenhang gebracht. Sezerniert wird er von mesenchymalen Zellen, so auch von MSZ im Knochenmark(63) und wirkt auf Endothelzellen, die den entsprechenden Rezeptor (cMet) besitzen, proliferativ und mobilitätsfördernd (64). Bei bösartigen Tumoren scheint Hypoxie-induziertes HGF ebenfalls relevant zu sein: unter hypoxischen Bedingungen konnte beispielsweise auf Parotiskarzinomzellen eine vermehrte cMet Expression beobachtet werden (65). HGF wurde aber auch auf seine Rolle im Microenvironment bei bösartigen Erkrankungen untersucht: hier zeigte sich, dass bei Brustkrebs HGF am Aufbau des Microenvironment durch Rekrutierung von mesenchymalen Stromazellen beteiligt ist (61).

Zusammengefasst erschienen somit beide Zytokine als geeignete Kandidaten für die Rolle als Mediatoren im AML-Microenvironment, da sie alle drei eingangs formulierten Anforderungen erfüllen: sie werden von AML Blasten exprimiert, sie scheinen durch Hypoxie reguliert zu werden und in der Literatur sind Effekte auf Microenvironment-

assoziierte Zellen, wie mesenchymale Stromazellen, beschrieben. Allerdings ließen sich in den weiterführenden Experimenten die Hypoxie-induzierte Regulation nur noch für IL-8 bestätigen; während sich keine Regulation mehr von HGF durch einen reduzierten Sauerstoffgehalt in verschiedenen experimentellen Untersuchungen mehr fand. Vermutlich handelte es sich bei dem Ergebnis der Voruntersuchungen somit a. e. um ein Artefakt oder eine Fehlmessung. HGF wurde daraufhin nicht mehr weiter untersucht.

Für IL-8 konnte die Hypoxie-induzierte Regulation in der AML hingegen verifiziert werden, und zwar sowohl in Zell-Linien als auch in primären AML Blasten von Patienten. In AML Zelllinien ließ sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen IL-8 Expression und Hypoxie zeigen: eine niedrigere Dosis, in diesem Fall eine höhere Sauerstoffkonzentration, konnte durch eine längere Wirkungsdauer ausgeglichen werden. Interessanterweise fand sich die Hypoxie-induzierte IL-8 Expression auch in an Hypoxie adaptierten AML Zelllinien, was, zusammen mit der Dosis-Wirkungs-Beziehung und der fehlenden Induktion von HGF durch Hypoxie, eine unspezifische Stressreaktion der leukämischen Zellen auf Hypoxie unwahrscheinlich macht.

Auch primäre Blasten von Patienten mit AML zeigten die Hypoxie-induzierte IL-8 Produktion. Diese war signifikant höher war als die der AML Zelllinien, und zeigte – nicht überraschend – eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität. Leider fand sich in dieser Analyse kein Zusammenhang zwischen IL-8 Produktion und genetischen Subgruppen (FLT3-ITD und NPM1 Mutation). Im Vergleich mit gesunden myeloischen Progenitoren war die Expression von IL-8 bei leukämische Blasten deutlich höher, und nur die malignen Zellen wiesen eine IL-8 Induktion durch Hypoxie auf. Während ersteres (konstitutionell erhöhte IL-8 Spiegel) bei der AML schon länger bekannt sind (66), ist Letzteres eine hier erstmals gemachte Beobachtung. Die erhöhten IL-8 Spiegel können durch die hier präsentierten Daten also direkt mit dem hypoxischen, malignen Microenvironment der AML assoziiert werden und sind kein zufälliger Befund.

Im nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass die Hypoxie-induzierte IL-8 Expression durch AML Zellen Folge gesteigerter Transkription ist, und nicht durch Zelllyse oder der vermehrten Sekretion von bereits produziertem IL-8 aus intrazellulären Speichern unter Hypoxie hervorgerufen wird. Auch dies impliziert eine spezifische IL-8 Antwort der AML-Zellen auf die hypoxische Umgebung. Möglicherweise ist die vermehrte Transkription von IL-8 Folge der HIF-1α Aktivierung unter Hypoxie. HIF-1α ist ein bekannter Transkriptionsfaktor, der Sauerstoffversorgung der Zelle reguliert und vor allem bei hypoxischem Stress eine Reihe anderer Signalkaskaden bzw. Transkriptionen

fördert. So konnte HIF-1α auch in einigen Arbeiten mit IL-8 in Verbindung gebracht werden(67) . Einerseits wird davon ausgegangen, dass die durch IL-8 aktivierten Signalwege die Expression von HIF-1α induziert werden kann, (68) andererseits konnte beispielsweise in hypoxischen Tumorzellen im Prostatakarzinom eine HIF-1α abhängige Induktion der IL-8 Rezeptoren CXCR1/2 beobachtet werden (69). Zudem konnte bei Endothelzellen eine vermehrte HIF-1α aktivierende Bindung an die IL-8 Promotorregion gezeigt werden, ebenso wie Angiogenese in HIF-1α mutierten KolonCa Zellen durch IL-8 Inhibition aufgehoben werden konnte(70). Wie ein genaueres Zusammenspiel von IL-8 und HIF-1α bei der AML aussehen könnte, ist bisher jedoch unklar und muss durch weitere Untersuchungen unter Berücksichtigung des speziellen Microenvironments der AML weiterverfolgt werden.

Neben der *in vitro* Charakterisierung wurde IL-8 auch *in vivo* untersucht, insbesondere die Hypothese, ob die IL-8 Serumkonzentrationen direkt mit der Leukämielast korrelierten. Interessanterweise zeigten sich hier aber ein völlig unerwartetes Phänomen: während bei Diagnosestellung mit der höchsten Tumorlast die niedrigste IL-8 Konzentrationen gemessen wurden, stiegen diese während der Leukozytopenie signifikant an, um nach Regeneration der normalen Leukopoese wieder abzufallen. Diese Diskrepanz ist eventuell dadurch erklärbar, dass Serumkonzentrationen von IL-8 nicht direkt mit den für die AML relevanten IL-8 Konzentrationen im Knochenmark bzw. den hypoxischen Stammzellnischen korrelieren. Eine andere Erklärungen für die erhöhten IL-8 Serumkonzentrationen während der Leukozytopenie könnte in der erhöhten Rate an bakteriellen Infektionen liegen, da IL-8 als proinflammatorisches Zytokin natürlich während Phasen der Infektion erhöht ist (71). Zusammengefasst erscheint dieser Ansatz zur Untersuchung von IL-8 bei der AML *in vivo* nicht als zielführend. Es wurde daher an einem deutlich größeren Patientenkollektiv die mRNA Expression von IL-8 durch AML Blasten auf ihre prognostische Relevanz hin untersucht. Während in der Gesamtgruppe eine deutliche Assoziation zwischen hoher IL-8 Expression und schlechterer Prognose gefunden wurde, zeigte sich in der detaillierteren Analyse, dass dieser Unterschied fast ausschließlich auf die Patienten mit APL zurückzuführen war. Patienten mit APL weisen eine deutlich bessere Prognose auf als Patienten mit einer non-APL AML und einen deutlich niedrigere IL-8 mRNA Expression (der Grund dafür ist unklar). Wurden die Patienten mit APL aus der Analyse ausgeschlossen, war die prognostische Bedeutung von IL-8 deutlich geringer - nur noch eine sehr hohe IL-8 Expression war mit einem schlechten Überleben assoziiert.

Als mögliche Ursachen können angeführt werden, dass einerseits diese Patienten mit der hohen IL-8 Expression auch eine höhere Leukozytenzahl aufwiesen, was ein bekannter prognostisch ungünstiger Parameter ist. Andererseits zeigte sich, dass AML mit prognostisch ungünstiger FLT3-ITD ebenfalls eine signifikant höhere IL-8 mRNA Expression aufwiesen. Zwar steht dies im Widerspruch zu den eigenen vorherigen Ergebnissen, bei denen die IL-8 Proteinexpression via ELISA gemessen wurde, dies lässt sich am wahrscheinlich auf die niedrigere Fallzahl zurückführen sowie auf die unterschiedliche Methodik. Die aus diesen Daten hervorgehende geringe Eignung von IL-8 als Verlaufsparameter oder prognostischen Marker (unter Einbeziehung der verschiedenen Subgruppen der AML) ist eine erstmalige Beobachtung. Bisherige Bestrebungen IL-8 oder CXCR1/2 als prognostischen Marker oder Verlaufsparameter zu nutzen bestanden bereits, da die erhöhte Expression von IL-8 bei AML schon länger bekannt ist. Konkrete Untersuchungen beschränkten sich jedoch bisher auf die Expression von CXCR2 mRNA., wobei hier eine ungünstige prognostische Assoziation gefunden wurde. Hierzu wurden in einer Studie 200 AML mRNA Proben ausgewertet (72). Direkte Rückschlüsse können jedoch hier auf IL-8 bei der bekannten Redundanz des CXCR2 Rezeptors nur bedingt gezogen werden. In unserer Arbeit wurden direkte IL-8 mRNA Expressionen eines deutlich größeren Kollektivs untersucht( n=562). Zusammengefasst scheint die prognostische Bedeutung der IL-8 Expression bei der AML also nur gering zu sein.

Die erhobenen *in vivo* und *in vitro* Daten lassen sich aber auch dahingehend interpretieren, dass die Hypoxie-induzierte IL-8 Produktion ein für alle nicht-APL AML gleichermaßen relevantes Phänomen darstellt, dessen Funktion in seiner Rolle als Mediator im Microenvironment besteht. Die hier präsentierten Daten haben die zwei der drei eingangs formulierten Kriterien für einen Mediator solchen erfüllt, und eigene publizierte, hier nicht gesondert präsentierte Daten haben bestätigen können, dass (1) MSZ gegenüber IL-8 migrieren, und (2) im AML Knochenmark *in vivo* tatsächlich mehr MSZ zu finden sind (73), also auch das dritte Kriterium (Wirkung auf eine am Microenvironment beteiligte Zellfraktion) erfüllt. Daraus lässt sich nun folgende Hypothese generieren: Leukämieinduzierende Stammzellen befinden sich in Stammzellnische im Knochenmark. Die dort vorherrschende Hypoxie führt zu einer vermehrten Expression/ Sekretion von IL-8 durch AML Zellen (nicht durch aber physiologischen hämatologischen Progenitoren). Mesenchymale Stromazellen migrieren

nun in Richtung IL-8 und reichern sich dann am Ort der höchsten Konzentration – also in der Nische im Umfeld der leukämischen Blasten – an. Die nun in der Stammzellnische vermehrt vorhandenen MSZ schaffen so ein protektives Umfeld und schützen AML Blasten vor Chemotherapie durch verschiedene Mechanismen wie vermehrte Expression antiapototischer Proteine oder metabolische Änderungen in dem AML Zellen (74). So geschützte AML Zellen verursachen dann das Rezidiv. Diese Hypothese wird in Abbildung 13 nochmals verdeutlicht.

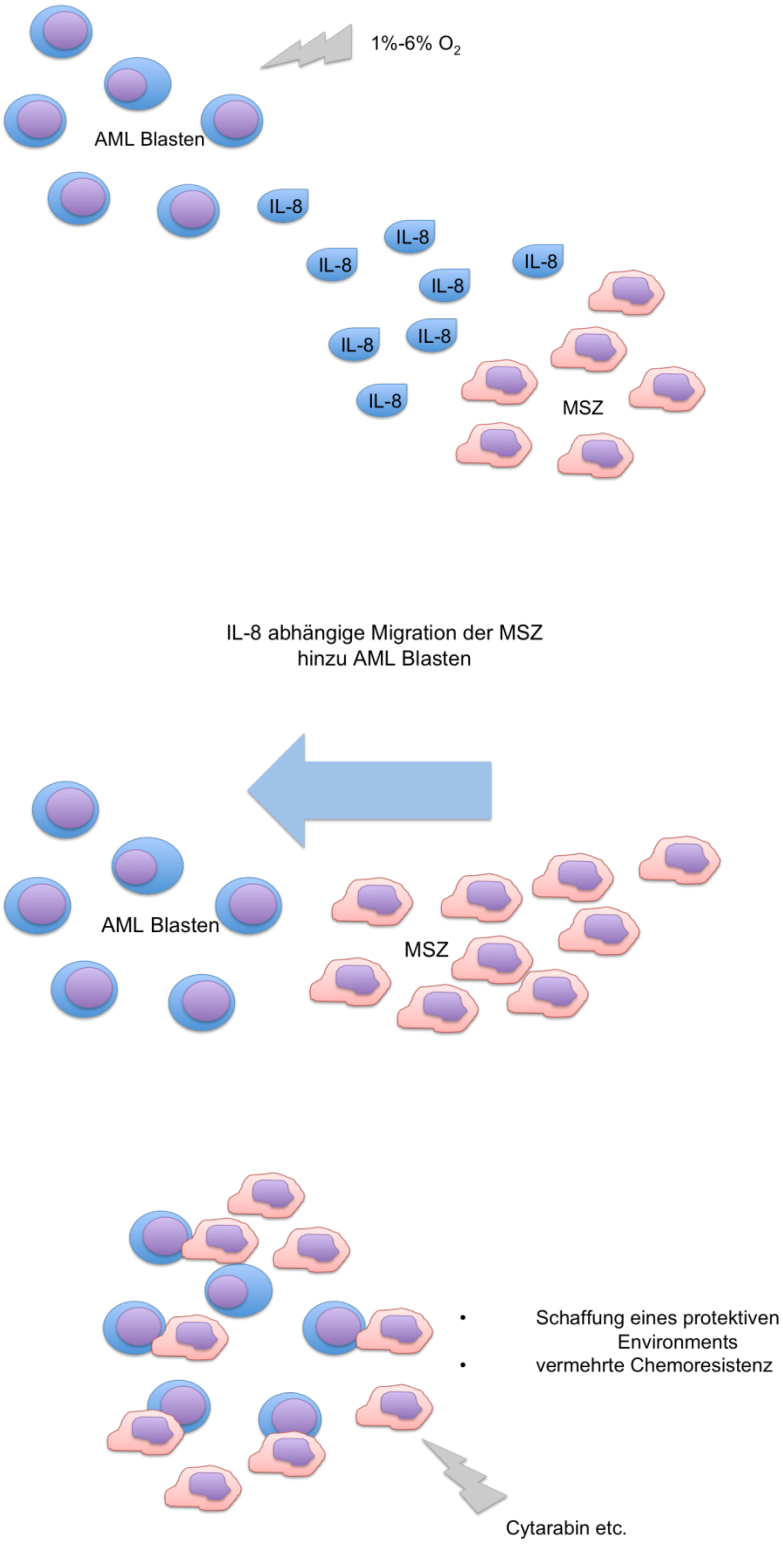


*Abbildung 13. Hypothese zur Rolle von IL-8 bei der Bildung des protektiven Microenvironment .*

Damit käme IL-8 eine fundamentale Rolle in der Rezidiventstehung der AML durch Bildung einer protektiven Nische zu, und dies ließe sich dann möglicherweise auch therapeutisch nutzen. Durch Inhibierung der Wirkung von IL-8 auf MSZ könnte eventuell das Risiko für die Rezidiventstehung minimiert werden. Attraktiv wäre hierbei, dass es sich um einen universellen Ansatz handelt, der einen fundamentalen Prozess in der Pathophysiologie der AML angreift und damit für alle AML – unabhängig von der individuell vorliegenden Subgruppe – gleichermaßen hilfreich sein könnte. In den letzten Jahren lag der wissenschaftliche Fokus ganz überwiegend auf individuellen Mutationen in der AML und der damit verbundenen Hoffnung, zielgerichtete Therapien zu entwickeln. Dies gelang in der AML nur bei der APL sowie bei Patienten mit einer FLT3-ITD. Während hier für einzelne Subgruppen Verbesserungen erreicht werden können, ist dies für das Gros der Patienten mit AML damit nicht möglich, insbesondere für Patienten ohne therapeutisch nutzbare Mutation. Gerade für letztere sind dringend neue Therapieansätze nötig.

Die therapeutische Inhibierung von IL-8 ist klinisch teilweise bereits weit gediehen, jedoch teilweise in einem völlig anderen Zusammenhang. Aufgrund seiner bekannten Rolle als proinflammatorisches Molekül sind IL-8 Inhibitoren als antiinflammatorische Medikamente entwickelt worden. Verschiedene Mechanismen der Inhibition wurden entwickelt.
So wurde bereits publiziert, dass der IL-8 neutralisierende Antikörper HuMab-10F8 die klinische Aktivität palmoplantarer Pustolosis reduzieren konnte (75, 76). In dieser Studie zeigte das Medikament wenig Nebenwirkungen: es wurde nur über einige wenige Fälle von Übelkeit, Kopfschmerzen und nasopharyngealen Infekten berichtet. Weiterhin kann die Wirkungsvermittlung von IL-8 dadurch unterbrochen werden, dass die IL-8 Rezeptoren CXCR1 und 2 inhibiert werden. So konnte der CXCR1/2 Inhibitor Reparixin bereits in Kombination mit Docetaxel (einem gängigen Chemotherapeutikum in der Behandlung von Mammakarzinomen) Tumormasse und malignen Stammzellen *in vitro* reduzieren (77). Reparixin ist ein *small molecule*, welcher als allosterischer Antagonist an CXCR1/2 bindet (wobei eine höhere Affinität für CXCR1 besteht). Weiterhin kann mittels small interfering RNA die IL-8 Translation und damit Sekretion inhibiert werden. Im Mausmodell für Ovarialkarzinomen zeigte sich eine Reduktion der Tumormasse in Mäusen, deren IL-8 Produktion mittels siRNA induziertem *Gen-Silencing* reduziert wurde (78).

Während klinische Studien somit die Verträglichkeit einiger IL-8 Inhibitoren nachgewiesen haben und präklinische Studien eine Effektivität bei anderen Tumorentitäten, gibt es noch aktuell noch keine klinischen Daten für den Einsatz von IL-8 Inhibitoren bei der AML – allerdings gab es dafür bislang auch keine wissenschaftlich fundierte Rationale. Die hier präsentierten Daten sind jedoch ein Argument für weiterführende klinische Untersuchung von IL-8 Inhibitoren bei der AML und könnten eine neue Perspektive in der Behandlung dieser schweren Erkrankung darstellen.

# 5. Zusammenfassung

Die AML ist eine maligne hämatologische Erkrankung, die durch die Expansion unreifer myeloischer Blasten im Knochenmark entsteht. Trotz intensiver Forschung und Verbesserung individueller Therapiemaßnahmen bleibt die Prognose der Erkrankung schlecht. Zwar erreichen mittlerweile viele Patienten initial durch eine intensive Polychemotherapie eine komplette Remission, je nach Subgruppe erleiden jedoch bis zu über 50% der Patienten im Verlauf ein Rezidiv. Diese Rezidive zeichnen sich dann durch eine noch schlechtere Prognose aus.

Rezidive entstehen, wenn leukämische Blasten die Chemotherapie überleben. Neben genetischen Mutationen, welche Chemoresistenz vermitteln, kann auch das Tumormicroenvironment im Knochenmark AML Blasten vor Chemotherapie schützen. Das Microenvironment besteht aus zellulären (z.B. mesenchymale Stromazellen) und nicht zellulären (z.B. Hypoxie) Bestandteilen. Ziel dieser Arbeit war es, einen Mediator zu finden, der alle 3 Komponenten (AML Blasten, MSZ und Hypoxie) miteinander verbindet. Als möglicher Mediator erschienen Zytokine wahrscheinlich.

In einem ersten Schritt wurde ein Screening auf die Expression von 80 Zytokinen in AML Zelllinien durchgeführt; hier zeigte sich bei 6% $O_2$ (der mittleren Sauerstoffkonzentration im Knochenmark) eine vermehrte Expression von IL-8 und HGF im Vergleich zu Standardlaborbedingungen. Eine detaillierte Charakterisierung in AML Zelllinien (Kg1a, OCI-AML3) mittels Messung dieser Zytokine im konditionierten Medium via ELISA bestätige die Hypoxie-abhängige Induktion (hier 1% $O_2$) von IL-8 sowohl nach Kurzzeitkultur (Kg1a: 2,61fach [$p<0,05$], OCI-AML3: 8,62fach [$p<0,01$], jeweils nach 48h Inkubation) als auch nach Langzeitkultivierung (Kg1a: 6,57fach [$p<0,05$], OCI-AML3: 99,37fach [$p<0,01$]). Hingegen ließen sich die Ergebnisse für HGF nicht bestätigen, weswegen dieses nicht weiter untersucht wurde.

Die Hypoxie-induzierte IL-8 Sekretion wurde nicht nur bei AML Zelllinien, sondern auch bei frischen AML Blasten (n=22) beobachtet (2fache Induktion unter 1% $O_2$ [$p<0,05$]). Es fanden sich keine Unterschiede zwischen genetisch definierten Subgruppen (FLT3-ITD, NPM1 Mutation). Interessanterweise zeigten unreife physiologische Progenitoren des Knochenmarks (n=4 Probanden) *erstens* eine deutliche geringere IL-8 Produktion *in vitro* als auch *zweitens* keine Steigerung der IL-8 Expression durch Hypoxie.

Mittels qtPCR Untersuchung zeigte sich, dass die vermehrte Expression Folge einer vermehrten Translation ist, da IL-8 mRNA unter Hypoxie im Vergleich zu 21% $O_2$ vermehrt war (ΔΔCT: 3,50 [OCI-AML3], 1,95 [KG1a], $p<0,01$).
In einem nächsten Schritt wurde IL-8 *in vivo* untersucht. Dazu wurden IL-8 Serumspiegeln bei Patienten mit AML (n=4), die eine intensive Polychemotherapie erhielten, gemessen. Während des Untersuchungszeitraums von 5 Wochen war die IL-8 Serumkonzentration bei Diagnosestellung am niedrigsten (40 pg/ml), um während der Zytopeniephase ihr Maximum (210 pg/ml) zu erreichen und nach Erreichen der Remission wieder abzufallen.
In mRNA Expressionsanalysen von AML Patienten (n=562) der AML-CG99 Therapieoptimierungsstudie konnte eine prognostische Relevanz für IL-8 Expression gefunden werden. Insbesondere die 10% der Patienten mit der höchsten IL-8 Produktion wiesen das geringste Überleben auf. Als mögliche Ursache fand sich eine erhöhte IL-8 mRNA Expression in Patienten mit einer prognostisch ungünstigen FLT-3 ITD.

Zusätzlich konnte in weiteren veröffentlichten Daten dieser Arbeitsgruppe eine chemotaktische Wirkung von IL-8 auf Stromazellen, sowie eine prinzipiell höhere Dichte von MSZ im Knochenmark von AML Proben gefunden werden. In Zusammenschau mit den Daten dieser Arbeit ist eine mediatorische Rolle von IL-8 zwischen MSZ und gegebenenfalls AML Blasten und/oder weiteren Komponenten des AML-Tumormicroenvironments wahrscheinlich. IL-8 wäre somit integraler Bestandteil des protektiven Tumorenvironments der AML, welches für verringerte Chemosensitivität und letztendlich für die hohe Rezidivrate und infauste Prognose der AML mitverantwortlich ist. IL-8 würde sich somit als ideales therapeutisches Target anbieten. Heute existieren bereits Möglichkeiten der Inhibierung, entweder durch direkt neutralisierende Antikörper oder indirekt durch Inhibierung der CXCR1/2 Rezeptoren (der beiden Rezeptoren von IL-8).
Interessanterweise befinden sich hier bereits Medikamente – zur Behandlung chronischer inflammatorischer Prozesse – in klinischer Erprobung. Zusammenfassend erscheint IL-8 als neuer, aussichtsreicher Anhaltspunkt um die Pathogenese des AML-Microenvironments besser zu verstehen. Weitere Untersuchungen, vor allem mit dem Ausblick zur therapeutischen Anwendung von IL-8 Inhibitoren sind notwendig.

# 6. Quellenverzeichnis


1. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. The Lancet. 2006;368(9550):1894-907.
2. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. Blood. 2010;116(19):3724-34.
3. Thein MS, Ershler WB, Jemal A, Yates JW, Baer MR. Outcome of older patients with acute myeloid leukemia: an analysis of SEER data over 3 decades. Cancer. 2013;119(15):2720-7.
4. Abdul G. Acute Leukemia Clinical Presentation. 2013.
5. Christoph Röllig GE. How I treat hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia. Blood. 2017;125(21).
6. Hasserjian RP. Acute myeloid leukemia: advances in diagnosis and classification. Int J Lab Hematol. 2013;35(3):358-66.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405.
8. Fiegl M, Hiddemann W. [Risk-adapted therapy in acute myeloid leukemia]. Internist (Berl). 2012;53(4):392, 4-9.
9. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2010;115(3):453-74.
10. Christoph Röllig DWB, Jan Braess, Richard Greil, Dietger Niederwieser, Jakob Passweg, Dirk Reinhardt, Richard F. Schlenk, Vorherige Autoren: Thomas Büchner MS. Akute Myeloische Leukämie (AML). 2018.
11. Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. J Clin Oncol. 2011;29(5):475-86.
12. Conway O'Brien E, Prideaux S, Chevassut T. The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. Adv Hematol. 2014;2014:103175.
13. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood. 2002;100(5):1532-42.
14. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hugens W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. Blood. 2005;106(12):3747-54.
15. J M Bennet DCM-TDGFDAGGHRGCSTFABFCG. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukemias. Clinical Pathology. 1989;42:567-84.
16. Buchner T, Berdel WE, Schoch C, Haferlach T, Serve HL, Kienast J, et al. Double induction containing either two courses or one course of high-dose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by either autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2006;24(16):2480-9.
17. Sekeres MA, Elson P, Kalaycio ME, Advani AS, Copelan EA, Faderl S, et al. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. Blood. 2009;113(1):28-36.
18. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. Am J Hematol. 2013;88(4):318-27.
19. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. Blood. 2006;107(9):3481-5.
20. Maynadie M, De Angelis R, Marcos-Gragera R, Visser O, Allemani C, Tereanu C, et al. Survival of European patients diagnosed with myeloid malignancies: a HAEMACARE study. Haematologica. 2013;98(2):230-8.
21. Pulte D, Gondos A, Brenner H. Improvements in survival of adults diagnosed with acute myeloblastic leukemia in the early 21st century. Haematologica. 2008;93(4):594-600.

22. Showel MM, Levis M. Advances in treating acute myeloid leukemia. F1000Prime Reports. 2014;6:96.
23. Ramos NR, Mo CC, Karp JE, Hourigan CS. Current Approaches in the Treatment of Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia. J Clin Med. 2015;4(4):665-95.
24. Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription Factors, Normal Myeloid Development, and Leukemia. Blood. 1997;90(2):489-519.
25. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. Leukemia. 2008;22(5):915-31.
26. Shlush LI, Mitchell A. AML evolution from preleukemia to leukemia and relapse. Best Pract Res Clin Haematol. 2015;28(2-3):81-9.
27. Nassiri JAM. Acute Promyelozytic Leukemia A Review and Discussion of Variant Translocations. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 2013.
28. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. Nat Rev Cancer. 2001;1(2):157-62.
29. Snyder R. Leukemia and benzene. Int J Environ Res Public Health. 2012;9(8):2875-93.
30. Sabine Kayser KDh, 1 Ju¨ rgen Krauter,2 Claus-Henning Ko¨ hne,3 Heinz A. Horst,4 Gerhard Held,5, Marie von Lilienfeld-Toal SW, 7 Andrea Ku¨ndgen,8 Katharina Go¨tze,9 Mathias Rummel,10 David Nachbaur,11 Brigitte Schlegelberger,12 Gudrun Go¨hring,12 Daniela Spa¨th,1 Carina Morlok,1 Manuela Zucknick,13 Arnold Ganser,2 Hartmut Do¨ hner,1 and Richard F. Schlenk,1 for the German-Austrian AMLSG. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. Blood. 2011;117.
31. Livio Pagano AP, Maria Elena Tosti, Giuseppe Avvisati, Luca Mele, Alfonso Mele, Bruno Martino, Giuseppe Visani, Raffaella Cerri, Eros Di Bona, Rosangela Invernizzi, Annamaria Nosari, Marino Clavio, Bernardino Allione, Paolo Coser, Anna Candoni, Alessandro Levis, Andrea Camera, Lorella Melillo, Giuseppe Leone and Franco Mandelli for the Gimema (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto). Clinical and biological features of acute myeloid leukemia occurring as second malignancy: GIMEMA archive of adult acute leukemia. British Journal of Haematology. 2001(112):109-17.
32. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. Nature. 2014;505(7483):327-34.
33. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. Leukemia. 2009;23(12):2233-41.
34. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. Nature. 2014;508(7495):269-73.
35. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(13):5431-6.
36. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. J Cell Physiol. 2009;219(2):271-5.
37. Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell Stem Cell. 2010;7(2):150-61.
38. Chen J, Kang JG, Keyvanfar K, Young NS, Hwang PM. Long-term adaptation to hypoxia preserves hematopoietic stem cell function. Exp Hematol. 2016;44(9):866-73 e4.
39. Drolle H, Wagner M, Vasold J, Kutt A, Deniffel C, Sotlar K, et al. Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy. Leuk Res. 2015;39(7):779-85.
40. Zhou HS, Carter BZ, Andreeff M. Bone marrow niche-mediated survival of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia: Yin and Yang. Cancer Biol Med. 2016;13(2):248-59.
41. Zeng Z, Samudio IJ, Munsell M, An J, Huang Z, Estey E, et al. Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. Mol Cancer Ther. 2006;5(12):3113-21.

42. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev BV, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. Leukemia. 2002;16(9):1713-24.
43. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. J Clin Invest. 2010;120(1):142-56.
44. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2003;111(2):S460-S75.
45. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Biochim Biophys Acta. 2014;1843(11):2563-82.
46. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. Blood. 2008;111(2):485-91.
47. Li Z, Herold T, He C, Valk PJ, Chen P, Jurinovic V, et al. Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study. J Clin Oncol. 2013;31(9):1172-81.
48. Thol F, Schlenk RF, Heuser M, Ganser A. How I treat refractory and early relapsed acute myeloid leukemia. Blood. 2015;126(3):319-27.
49. Hatzimichael E, Tuthill M. Hematopoietic stem cell transplantation. Stem Cells Cloning. 2010;3:105-17.
50. Bhola PD, Mar BG, Lindsley RC, Ryan JA, Hogdal LJ, Vo TT, et al. Functionally identifiable apoptosis-insensitive subpopulations determine chemoresistance in acute myeloid leukemia. J Clin Invest. 2016;126(10):3827-36.
51. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. Nature. 2012;481(7382):506-10.
52. Borovski T, De Sousa EMF, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. Cancer Res. 2011;71(3):634-9.
53. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. Cancer Cell. 2012;21(3):309-22.
54. Korn C, Mendez-Ferrer S. Myeloid malignancies and the microenvironment. Blood. 2017;129(7):811-22.
55. Anastasiou D. Tumour microenvironment factors shaping the cancer metabolism landscape. Br J Cancer. 2017;116(3):277-86.
56. Sara M. Garrido FRA, Cheryl L. Willman, and Deborah E. Banker. Acute myeloid leukemia cells are protected
from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). Experimental Hematology. 2001;29:448–57.
57. Clark-Lewis MBI. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. 1992;307.
58. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. Clin Cancer Res. 2008;14(21):6735-41.
59. Sanmamed MF, Carranza-Rua O, Alfaro C, Onate C, Martin-Algarra S, Perez G, et al. Serum interleukin-8 reflects tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins. Clin Cancer Res. 2014;20(22):5697-707.
60. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. Cytokine Growth Factor Rev. 2001;12(4):375-91.
61. Tyan SW, Kuo WH, Huang CK, Pan CC, Shew JY, Chang KJ, et al. Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis. PLoS One. 2011;6(1):e15313.
62. Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. Int J Cancer. 2011;128(9):2038-49.
63. Takai K. Hepatocyte Growth Factor is Constitutively Produced by Human Bone Marrow Stromal Cells and Indirectly Promotes Hematopoiesis. Blood. 1997;89(5).
64. Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. J Gastroenterol Hepatol. 2011;26 Suppl 1:188-202.

65. Hara S, Nakashiro K, Klosek SK, Ishikawa T, Shintani S, Hamakawa H. Hypoxia enhances c-Met/HGF receptor expression and signaling by activating HIF-1alpha in human salivary gland cancer cells. Oral Oncol. 2006;42(6):593-8.
66. Denizot Y. Serum interleukin-8 (IL-8) and IL-6 concentrations in patients with hematologic malignancies. Blood. 1996.
67. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. Cell Death Differ. 2008;15(4):621-7.
68. Campbell LM, Maxwell PJ, Waugh DJ. Rationale and Means to Target Pro-Inflammatory Interleukin-8 (CXCL8) Signaling in Cancer. Pharmaceuticals (Basel). 2013;6(8):929-59.
69. Maxwell PJ, Gallagher R, Seaton A, Wilson C, Scullin P, Pettigrew J, et al. HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. Oncogene. 2007;26(52):7333-45.
70. Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, Gala M, Li J, Zhang X, et al. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. Nat Med. 2005;11(9):992-7.
71. Ferra C, de Sanjose S, Gallardo D, Berlanga JJ, Rueda F, Marin D, et al. IL-6 and IL-8 levels in plasma during hematopoietic progenitor transplantation. Haematologica. 1998;83(12):1082-7.
72. Schinke C, Giricz O, Li W, Shastri A, Gordon S, Barreyro L, et al. IL8-CXCR2 pathway inhibition as a therapeutic strategy against MDS and AML stem cells. Blood. 2015;125(20):3144-52.
73. Kuett A, Rieger C, Perathoner D, Herold T, Wagner M, Sironi S, et al. IL-8 as mediator in the microenvironment-leukaemia network in acute myeloid leukaemia. Sci Rep. 2015;5:18411.
74. Becker PS. Dependence of acute myeloid leukemia on adhesion within the bone marrow microenvironment. ScientificWorldJournal. 2012;2012:856467.
75. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. Expert Rev Clin Immunol. 2014;10(5):593-619.
76. Skov L, Beurskens FJ, Zachariae COC, Reitamo S, Teeling J, Satijn D, et al. IL-8 as Antibody Therapeutic Target in Inflammatory Diseases: Reduction of Clinical Activity in Palmoplantar Pustulosis. The Journal of Immunology. 2008;181(1):669-79.
77. Brandolini LC, L..; Fidomore, A. Targeting CXCR1 on breast cancer stem cells: signaling pathways and clinical application medelling. Oncotarget. 2015;6:41.
78. Merritt WM, Lin YG, Spannuth WA, Fletcher MS, Kamat AA, Han LY, et al. Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth. J Natl Cancer Inst. 2008;100(5):359-72.

## 7. Veröffentlichungen

Kuett, A., Rieger, C., Perathoner, D., Herold, T., Wagner, M., Sironi, S., … Fiegl, M. (2015). IL-8 as mediator in the microenvironment-leukaemia network in acute myeloid leukaemia. *Scientific Reports*, *5*(November), 18411. http://doi.org/10.1038/srep18411

Sironi, S., Wagner, M., Kuett, A., Drolle, H., Polzer, H., Spiekermann, K., … Fiegl, M. (2015). Microenvironmental Hypoxia regulates FLT3 expression and biology in AML. *Scientific Reports*, *5*, 17550. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/srep17550

Einige dieser Daten wurden auf der ACUTE LEUKEMIAS XV 2015 (22.02.15-25.02.15) in München, Deutschland vorgestellt.

## 8. Lebenslauf

Ich wurde am 14. Juli 1991 in Aachen geboren. 1997 zog meine Familie nach Brüssel. Dort wurde ich im selben Jahr an der europäischen Schule Brüssel II eingeschult, wo ich 2009 mein europäisches Bakkalaureat (Hochschulreife) absolvierte. Ich begann mein Hochschulstudium der Humanmedizin im Herbst 2009 an der Ludwig-Maximilian-Universität München. Hier absolvierte ich alle Abschnitte der ärztlichen Prüfung, sowie zuletzt am 20. Mai 2016 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Vom 06. März 2017 bis 31. Juli 2017 war ich als Assistenzarzt in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie im Vivantes Klinikum Kaulsdorf tätig. Seitdem bin ich als Assistenzarzt in Weiterbildung für Kinderheilkunde und Jugendmedizin in der Kinderklinik HELIOS Buch tätig.

## 9. Danksagung

Meiner Betreuerin Michaela Wagner und Silvia Sironi, die mir nicht nur mit großer Geduld verschiedene Labormethoden erklärt und gezeigt haben, sondern auch dafür gesorgt haben, dass die Arbeit im Labor immer Spaß gemacht hat und auch bei Rückschlägen oder gescheiterten Versuchen mir immer eine große Unterstützung waren. Jochen Vasold, dessen Ratschläge als fortgeschrittener Mitdoktorand extrem hilfreich waren. Meinem Doktorvater Prof. Michael Fiegl, der mir immer eine Motivationsquelle war, durch den ich viel lernen durfte und nicht zuletzt größte Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit gezeigt hat. Vor allem möchte ich meiner Familie und meiner Partnerin danken, die mich vor allem gegen Ende des Prozesses immer wieder motiviert und unterstützt haben.