

**Universität Regensburg  
Naturwissenschaftliche Fakultät IV- Chemie und Pharmazie  
Institut für Pharmazie**

**Inaugural-Dissertation**

Thema:

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN  
ZUR EXPRESSION DES HITZESCHOCKPROTEINS Hsp70 AUF DER ZELLOBERFLÄCHE  
VON  
KOLOREKTALEN PRIMÄRTUMOREN UND HEPATISCHEN METASTASEN,  
MAGENKARZINOMEN, BRONCHIALKARZINOMEN, KOPF-HALS-TUMOREN UND  
AKUTEN MYELOISCHEN LEUKÄMIEN

vorgelegt von  
Markus Hantschel

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Buschauer

Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Multhoff

Regensburg, 2004



Mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV-  
Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg

Die Arbeit wurde eingeleitet von: Prof. Dr. G. Multhoff

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 13. Mai 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2004

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. S. Elz (Vorsitzender)

Prof. Dr. A. Buschauer (Erstgutachter)

Prof. Dr. G. Multhoff (Zweitgutachter)

Prof. Dr. G. Franz (3. Prüfer)

## **Danksagung**

Mein großer Dank gilt Frau Prof. Dr. Gabriele Multhoff für die Überlassung des Themas.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Buschauer, Herrn Prof. Dr. Gerhard Franz und Herrn Prof. Dr. Sigurd Elz dafür, eine externe pharmazeutische Promotion anzufertigen zu können.

Mein großer Dank gilt den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe für die angenehme menschliche Atmosphäre: Catherina Groß, Gerald Thonigs, Lydia Rossbacher, Dr. Michael Hafner, Matthias Gehrmann. Ebenso den „Nachbaren“ im Carreras-Forschungsbau: Karin Fischer, Monika Laumer, Sandra Vogl, Jana Heymann und Prof. Dr. Andreas Mackensen.

Mein großer Dank gilt den Ärzten für die Überlassung von Gewebeproben:

Prof. Dr. Olaf Arndt, Dr. Tobias Kleinjung, Dr. Karin Pfister, PD Dr. Helga Schmetzer, PD Dr. Ulrich Rothe, PD Dr. Thomas Freitag, Dr. Friedrich Zimmermann.

Mein großer Dank gilt meinen promotionsstudentischen Kollegen Christin Schmidbauer und Christian Moser für die noch folgende Auswertung der Resultate nach weiteren klinischen Kriterien.

Mein großer Dank gilt Dr. Renate Hiefinger-Schindlbeck und Dr. Jürgen Hallbach für die Erlaubnis, am Institut für Klinische Chemie im KMB am FACSCalibur Messresultate auszuwerten.

Mein großer Dank gilt meinen Chefs Dr. Heike Alz, Zentralapotheke der Medizinischen Hochschule Hannover und Dr. Hugo Krämer, Apotheke des Städt. Krankenhauses München-Bogenhausen.

Mein großer Dank gilt meiner Familie für die in dieser Zeit von ihr erhaltene Unterstützung.

*Für  
Maximilian Hantschel*

Der erste Schluck aus dem Becher der Natur  
führt zum Atheismus,  
aber auf dem Grund wartet Gott.

*Werner Heisenberg*

---

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG</b>  | <b>11</b> |
| <b>1.1</b> | <b>PATHOLOGISCHE RELEVANZ DER HITZESCHOCKPROTEINE</b>                | <b>13</b> |
| 1.1.1      | Intrazelluläre Funktionen der Hitzeschockproteine                    | 13        |
| 1.1.2      | Dysregulation von Hitzeschockproteinen in malignen Zellen            | 14        |
| 1.1.3      | Expression von Hsp70 auf der Oberfläche humaner Tumorzelllinien      | 14        |
| <b>1.2</b> | <b>IMMUNOLOGISCHE BEDEUTUNG VON HSP70</b>                            | <b>16</b> |
| 1.2.1      | Hsp70 auf Tumorzellen als Erkennungsstruktur für NK-Zellen           | 16        |
| 1.2.2      | Modulation der Zytotoxizität natürlicher Killerzellen durch Hsp70    | 16        |
| 1.2.3      | Als Ligand für NK-Zellen agierendes Epitop des Molekül Hsp70         | 18        |
| 1.2.4      | Mögliche therapeutische Anwendungen des Hsp70-Peptid-Fragments       | 20        |
| <b>1.3</b> | <b>KLINISCHER HINTERGRUND DER UNTERSUCHTEN MALIGNEN ERKRANKUNGEN</b> | <b>21</b> |
| 1.3.1      | Kolorektales Karzinom  | 21        |
| 1.3.1.1    | Definition   | 21        |
| 1.3.1.2    | Epidemiologie  | 21        |
| 1.3.1.3    | Histologie   | 21        |
| 1.3.1.4    | Lokalisation kolorektaler Karzinome                                  | 21        |
| 1.3.1.5    | Tumorstadien des kolorektalen Karzinoms                              | 22        |
| 1.3.1.6    | Ätiologie kolorektaler Karzinome                                     | 22        |
| 1.3.1.7    | Hereditäre Formen kolorektaler Karzinome                             | 23        |
| 1.3.1.8    | Prognose des kolorektalen Karzinoms                                  | 24        |
| 1.3.1.9    | Klinisch eingesetzte Tumormarker für das kolorektale Karzinom        | 25        |
| 1.3.2      | Hepatische Metastasen nach kolorektalen Karzinomen                   | 25        |
| 1.3.3      | Magenkarzinom  | 26        |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1.3.3.1 | Definition und Häufigkeit des Magenkarzinoms                     | 26 |
| 1.3.3.2 | Ätiologie  | 26 |
| 1.3.3.3 | Histologische Klassifikation                                     | 26 |
| 1.3.3.4 | Prognose des Magenkarzinoms                                      | 27 |
| 1.3.3.5 | Klinisch relevante Tumormarker                                   | 28 |
| 1.3.3.6 | Molekulare Marker bei Magenkarzinomen                            | 28 |
| 1.3.4   | Bronchialkarzinom  | 30 |
| 1.3.4.1 | Definition   | 30 |
| 1.3.4.2 | Epidemiologie  | 30 |
| 1.3.4.3 | Klassifikationen bronchialer Tumore                              | 31 |
| 1.3.4.4 | Prognose des kleinzelligen Bronchialkarzinoms                    | 34 |
| 1.3.4.5 | Prognose des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms               | 34 |
| 1.3.4.6 | Klinisch relevante Tumormarker für bronchiale Tumore             | 34 |
| 1.3.4.7 | Molekular-onkologische Marker für Bronchialtumore                | 35 |
| 1.3.5   | Kopf-Hals-Tumore   | 38 |
| 1.3.5.1 | Mundhöhlenkarzinom   | 38 |
| 1.3.5.2 | Oropharynxkarzinom   | 38 |
| 1.3.5.3 | Hypopharynxkarzinom  | 39 |
| 1.3.5.4 | Larynxkarzinom   | 40 |
| 1.3.5.5 | Molekulare Marker für Kopf-Hals-Tumore                           | 41 |
| 1.3.6   | Makropathologische Einteilung der Tumore                         | 42 |
| 1.3.7   | Akute myeloische Leukämie  | 43 |
| 1.3.7.1 | Definition der akuten myeloischen Leukämie                       | 43 |
| 1.3.7.2 | Einteilung der akuten myeloischen Leukämie nach WHO              | 43 |
| 1.3.7.3 | Häufigkeit der AML   | 44 |
| 1.3.7.4 | Ätiologie  | 44 |
| 1.3.7.5 | Zytologische Definition der AML                                  | 45 |
| 1.3.7.6 | Häufigkeit der Subtypen der akuten myeloischen Leukämie          | 47 |
| 1.3.7.7 | Molekulare Marker der akuten myeloischen Leukämie                | 47 |
| 1.3.7.8 | Klinischer Stellenwert der wiederkehrenden genetischen Anomalien | 49 |
| 1.3.7.9 | Immunzytochemische Marker der akuten myeloischen Leukämie        | 50 |

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1.4</b> | <b>UNTERSUCHUNG DES VORKOMMENS VON HSP70 AUF<br/>HUMANEN TUMOREN</b>                  | <b>53</b> |
| 1.4.1      | Mögliche analytische Verfahren  | 53        |
| 1.4.1.1    | Messprinzip der Durchflusszytometrie  | 54        |
| 1.4.1.2    | Pathologische Anwendungen der Durchflusszytometrie                                    | 54        |
| 1.4.1.3    | Voraussetzungen für die Durchflusszytometrie an Gewebeproben                          | 55        |
| 1.4.1.4    | Erfordernisse an die immunphänotypische Bestimmung von Hsp70 als<br>Oberflächenmarker | 55        |
| <b>2</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>57</b> |
| <b>2.1</b> | <b>PATHOLOGISCHE DATEN DER UNTERSUCHTEN<br/>TUMORBIOPSien</b>                         | <b>58</b> |
| 2.1.1      | Biopsien kolorektaler Karzinome und kolorektaler Normalmucosa                         | 58        |
| 2.1.1.1    | Stichprobenumfang bei kolorektalen Karzinomen und Normalgeweben                       | 58        |
| 2.1.1.2    | Tumorlokalisation der untersuchten kolorektalen Karzinome                             | 58        |
| 2.1.2      | Biopsien hepatischer Metastasen   | 59        |
| 2.1.3      | Magenkarzinome  | 59        |
| 2.1.4      | Bronchiale Tumorbiopsien  | 59        |
| 2.1.5      | Kopf-Hals-Tumore und Normalgewebebiopsien   | 60        |
| 2.1.6      | Tumorbiopsien für die Evaluation der Disaggregation                                   | 60        |
| <b>2.2</b> | <b>KLINISCHE VORGABEN DER AKUTEN MYELOISCHEN<br/>LEUKÄMIE</b>                         | <b>61</b> |
| 2.2.1      | Vergleichsgruppe nicht-leukämischen Knochenmarks                                      | 61        |
| 2.2.2      | Patienten mit <i>de novo</i> akuter myeloischer Leukämie                              | 61        |
| 2.2.3      | Patienten mit <i>sekundärer</i> akuter myeloischer Leukämie                           | 62        |
| 2.2.4      | Patienten mit <i>rezidivierter</i> akuter myeloischer Leukämie                        | 62        |
| 2.2.5      | Knochenmarksaspirate von Patienten mit einer AML <i>in Persistenz</i>                 | 62        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.2.6      | Zytogenetische Merkmale der akuten myeloischen Leukämie                         | 63        |
| 2.2.6.1    | <i>de novo</i> akute myeloische Leukämie  | 63        |
| 2.2.6.2    | <i>Sekundäre</i> akute myeloischer Leukämien                                    | 63        |
| 2.2.6.3    | <i>Rezidivierende</i> akute myeloische Leukämie                                 | 64        |
| 2.2.6.4    | <i>Persistente</i> akute myeloische Leukämie                                    | 64        |
| <b>2.3</b> | <b>EINZELZELLPRÄPARATION</b>  | <b>65</b> |
| 2.3.1      | Knochenmarksaspirate und periphere Blutproben                                   | 65        |
| 2.3.1.1    | Isolation der mononukleären Zellen  | 65        |
| 2.3.1.2    | Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung   | 65        |
| 2.3.1.3    | Übernacht-Recovery  | 66        |
| 2.3.1.4    | Einfrieren von kultivierten mononukleären Zellen aus Knochenmarksaspiraten      | 66        |
| 2.3.2      | Analyse solider Gewebebiopsien  | 66        |
| 2.3.2.1    | Makroskopische Konsistenzbestimmung solider Gewebebiopsien                      | 66        |
| 2.3.2.2    | Gewebedisaggregation  | 67        |
| 2.3.2.3    | Vitalitätsbestimmung  | 67        |
| <b>2.4</b> | <b>DURCHFLUSSZYTOMETRIE</b>   | <b>68</b> |
| 2.4.1      | Technische Voraussetzungen für die Durchflusszytometrie                         | 68        |
| 2.4.2      | Antikörperspektrum  | 69        |
| 2.4.2.1    | Leukämische und nicht-leukämische Knochenmarksaspirate und periphere Blutproben | 69        |
| 2.4.2.2    | Antikörperspektrum für solide Tumore und nicht-maligne Vergleichsgewebe         | 71        |
| 2.4.3      | Immunphänotypisierung von Knochenmarksaspiraten und peripheren Blutproben       | 73        |
| 2.4.3.1    | Anpassung der probenindividuelle Geräteeinstellungen                            | 73        |
| 2.4.3.2    | Aufzeichnung der durchflusszytometrischen Messung                               | 76        |
| 2.4.3.3    | Auswertung der Immunphänotypisierung  | 77        |
| 2.4.4      | Immunphänotypisierung von Einzelzellen aus soliden Gewebebiopsien               | 77        |
| 2.4.4.1    | Anpassung der Geräteeinstellungen   | 77        |

---

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.4.4.2    | Aufzeichnung der durchflusszytometrischen Analyse  | 79        |
| 2.4.4.3    | Auswertung der Analysen von Einzelzellen aus den Gewebebiopsien  | 79        |
| <b>2.5</b> | <b>STATISTISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>   | <b>81</b> |
| 2.5.1      | Vergleiche zwischen klinisch distinkten Subtypen   | 81        |
| 2.5.2      | Gruppenvergleiche zwischen Tumorbiopsien und nicht-malignen Kontrollgeweben  | 81        |
| 2.5.3      | Individualvergleiche zwischen Tumorbiopsie und normalem Gewebe   | 81        |
| 2.5.4      | Relative Häufigkeiten Hsp70-positiver Aspirate und Biopsien  | 82        |
| 2.5.5      | Berechnungen zur Validität der Hsp70-Bestimmung  | 82        |
| <b>3</b>   | <b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>   | <b>83</b> |
| <b>3.1</b> | <b>BASISEXPERIMENTE ZUR MANUELLEN DISAGGREGATION VON SOLIDEN GEWEBEBIOPSien</b>  | <b>85</b> |
| 3.1.1      | Lichtmikroskopische Untersuchung der Zellsuspension  | 86        |
| 3.1.2      | Optimierung der manuellen Disaggregation   | 87        |
| 3.1.2.1    | Gesamtzellzahl   | 87        |
| 3.1.2.2    | Bestimmung der Vitalität   | 88        |
| 3.1.3      | Durchflusszytometrische Analyse der Vitalität  | 89        |
| <b>3.2</b> | <b>KOLOREKTALES KARZINOM</b>   | <b>90</b> |
| 3.2.1      | Makropathologische Untersuchung der Gewebebiopsien   | 90        |
| 3.2.2      | Multiparametrische Analyse von vitalen Einzelzellen aus kolorektalen Biopsien  | 90        |
| 3.2.2.1    | Durchflusszytometrische Analyse einer Normalschleimhautbiopsie   | 91        |
| 3.2.2.2    | Durchflusszytometrische Analyse der Tumorbiopsie   | 97        |
| 3.2.3      | Quantitative Untersuchungen zum Einfluss der makroskopischen Konsistenz kolorektaler Karzinome auf die Immunphänotypisierung | 102       |
| 3.2.3.1    | Vitalität  | 102       |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 3.2.3.2 | Expression von MHC-Klasse I auf vitalen Einzelzellen kolorektaler Tumore  | 103 |
| 3.2.3.3 | Immunzytometrische Erfassung bindegewebiger Zellen  | 104 |
| 3.2.3.4 | Quantifikation von tumorinfiltrierenden Leukozyten  | 105 |
| 3.2.3.5 | Immunzytometrische quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von Hsp70 auf Einzelzellen kolorektaler Tumore | 106 |
| 3.2.4   | Immunzytometrischer Vergleich von kolorektaler Normalschleimhaut und Tumor  | 07  |
| 3.2.4.1 | Vitalität   | 107 |
| 3.2.4.2 | MHC Klasse I -Expression  | 108 |
| 3.2.4.3 | AS02-Expression   | 108 |
| 3.2.4.4 | Immunphänotypische Quantifizierung der Lymphozyten  | 108 |
| 3.2.4.5 | Oberflächenexpression von Hsp70   | 109 |
| 3.2.5   | Qualitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse von Hsp70   | 110 |
| 3.2.5.1 | Gegenüberstellung von Tumor-und Normalgeweben   | 110 |
| 3.2.5.2 | Validität der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenexpression von Hsp70                                  | 111 |
| 3.2.5.3 | Lokalisation der Hsp70-positiven kolorektalen Tumore  | 111 |

### **3.3 HEPATISCHE METASTASEN KOLOREKTALER KARZINOME** 113

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 3.3.1   | Makropathologische Bestimmung der Konsistenz der Metastasen                 | 113 |
| 3.3.2   | Exemplarische durchflusszytometrische Analyse                               | 114 |
| 3.3.2.1 | Eingrenzen vitaler Populationen der Metastasen-Biopsie                      | 114 |
| 3.3.2.2 | Immunphänotypisierung vitaler Zellpopulationen                              | 114 |
| 3.3.3   | Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Resultate              | 117 |
| 3.3.3.1 | Vitalität   | 117 |
| 3.3.3.2 | MHC Klasse I - Expression   | 118 |
| 3.3.3.3 | Expression des Bindegewebemarkers AS02                                      | 118 |
| 3.3.3.4 | Leukozytäre Infiltration  | 119 |
| 3.3.3.5 | Expression von Hsp70  | 120 |
| 3.3.4   | Häufigkeit der Merkmalsexpression von Hsp70 bei resektablen Lebermetastasen | 120 |
| 3.3.5   | Potenzielle klinische Bedeutung   | 120 |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>3.4 MAGENKARZINOM</b>  | <b>122</b> |
| 3.4.1 Makroskopische Beurteilung der Gewebekonsistenz   | 122        |
| 3.4.2 Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse einer Magenkarzinobiopsie                          | 123        |
| 3.4.2.1 Detektion vitaler Zellpopulationen  | 123        |
| 3.4.2.2 Immunphänotypisierung vitaler Zellpopulationen  | 124        |
| 3.4.3 Quantitative Vergleiche der Immunphänotypisierung   | 128        |
| 3.4.3.1 Vitalität   | 128        |
| 3.4.3.2 MHC-Klasse I-Expression   | 129        |
| 3.4.3.3 AS02-Expression   | 130        |
| 3.4.3.4 Immunphänotypische Quantifikation der leukozytären Infiltration   | 131        |
| 3.4.3.5 Hsp70-Expression auf vitalen Einzelzellen   | 133        |
| 3.4.3.6 Qualitative Wertung der oberflächenständigen Expression von Hsp70   | 134        |
| 3.4.4 Potenzielle klinische Relevanz des Hsp70-Befunds  | 135        |
| <b>3.5 NICHTKLEINZELLIGES BRONCHIALKARZINOM</b>   | <b>136</b> |
| 3.5.1 Makropathologische Einstufung der bronchialen Tumorbiopsien   | 136        |
| 3.5.2 Durchflusszytometrische Analysen der Tumorbiopsien  | 138        |
| 3.5.2.1 Bestimmung der Vitalität  | 138        |
| 3.5.2.2 Vergleich der Immunphänotypisierung der vitalen Zellpopulationen  | 139        |
| 3.5.3 Quantitative Analyse der Resultate nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome  | 142        |
| 3.5.3.1 Viabilität  | 142        |
| 3.5.3.2 MHC-Klasse I-Expression   | 143        |
| 3.5.3.3 Immunphänotypisierung des Bindegewebsmarkers AS02   | 144        |
| 3.5.3.4 Quantifikation der Leukozytenfraktion   | 145        |
| 3.5.3.5 Hsp70-Expression vitaler Einzelzellen nichtkleinzelliger bronchialer Tumore                                     | 146        |
| 3.5.3.6 Qualitative Auswertung der Messresultate zur Hsp70-Expression nichtkleinzelliger Bronchialtumore                | 147        |
| 3.5.3.7 Quantitative Ausprägung der Hsp70-Expression histologisch unterschiedener nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome | 148        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 3.5.3.8    | Qualitative Bewertung der Hsp70-Expression auf nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen unterschieden nach ihrer Histologie | 149        |
| 3.5.4      | Potenzielle klinischen Relevanz der durchflusszytometrischen Resultate zur Hsp70-Expression                               | 150        |
| <b>3.6</b> | <b>KOPF-HALS-TUMOREN UND NASOPHARYNGEALE NORMALSCHLEIMHAUT</b>  | <b>153</b> |
| 3.6.1      | Analyse von nicht-malignen Schleimhautbiopsien  | 153        |
| 3.6.1.1    | Repräsentative durchflusszytometrische Analyse vitaler Einzelzellen aus nasopharyngealer Normalschleimhaut                | 153        |
| 3.6.1.2    | Quantitative Auswertung der Untersuchungen an makroskopisch unauffälliger Mundschleimhaut                                 | 155        |
| 3.6.2      | Repräsentative durchflusszytometrische Analyse einer Kopf-Hals-Tumorbiopsie   | 160        |
| 3.6.3      | Vergleich der Immunphänotypisierung von gepaarten Tumor- und Normalgewebebiopsien   | 164        |
| 3.6.3.1    | Quantitativer Vergleich der Hsp70-Expression  | 165        |
| 3.6.3.2    | Berechnungen zur Validität der durchflusszytometrischen Analyse an Kopf-Hals-Tumor- und Normalgeweben                     | 167        |
| 3.6.3.3    | Qualitative Bewertung der durchflusszytometrischen Resultate der Hsp70-Expression auf Kopf-Hals-Tumorbiopsien             | 169        |
| 3.6.4      | Potenzielle klinische Relevanz  | 170        |
| <b>3.7</b> | <b>AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE</b>  | <b>171</b> |
| 3.7.1      | Analyse von Knochenmarksaspiraten mit hämatologisch unauffälliger Hämatopoese   | 171        |
| 3.7.1.1    | Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von nicht-leukämischem Knochenmark   | 171        |
| 3.7.1.2    | Quantitative Auswertung der Analyse von nicht-leukämischem Knochenmark  | 177        |
| 3.7.2      | Analysen von leukämischen Aspiraten   | 180        |
| 3.7.2.1    | Repräsentative multiparametrische durchflusszytometrische Analysen zur Hsp70-Expression von akuten myeloischen Leukämien  | 180        |
| 3.7.2.2    | Exemplarische Darstellung einer leukämischen Analyse in Zweifachfärbung   | 195        |

---

|                              |   |            |
|------------------------------|---|------------|
| 3.7.3                        | Quantitative durchflusszytometrische Untersuchungen akuter myeloischer Leukämien  | 197        |
| 3.7.3.1                      | De novo akute myeloische Leukämie   | 197        |
| 3.7.3.2                      | Sekundäre akute myeloische Leukämie   | 206        |
| 3.7.3.3                      | Rezidivierende akute myeloische Leukämie  | 208        |
| 3.7.3.4                      | Persistente akute myeloische Leukämie   | 210        |
| 3.7.3.5                      | Vergleich der Markerexpression zwischen klinisch distinkten Subtypen  | 212        |
| 3.7.3.6                      | Vergleich der Expression von Hsp70 bei der akuten myeloischen Leukämie und bei nicht-leukämischen Knochenmarksaspiraten | 213        |
| 3.7.3.7                      | Validität der durchflusszytometrischen Hsp70-Analyse bei akuten myeloischen Leukämien                                   | 215        |
| 3.7.4                        | Potenzielle klinische Relevanz  | 216        |
| <b>4</b>                     | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>219</b> |
| <b>Bibliographie</b>         |   | <b>223</b> |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> |   | <b>245</b> |
| <b>Anhang</b>                |   | <b>247</b> |



# 1 Einleitung

Die diagnostische Unterscheidung maligner Tumore von nicht-malignem Gewebe auf molekularer Ebene stellt eine große Herausforderung dar:

Bisher bekannte Tumormarker umfassen Onkogene, Protein-, Lipid- oder Kohlenhydratverbindungen in oder auf Tumorzellen (Lamerz et al., 2001). Ausgehend von Primärtumoren konnten auch Lymphknoten, Knochenmark oder Blutserum auf biologische Tumormarker untersucht werden, um Tumore anzuseigen.

Die Tumormarker können als frei zirkulierende Antigene im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten vorliegen. Die Präsenz von Tumormarkern liefert wichtige Hinweise für die Diagnose, den Verlauf und für die Prognose einer malignen Erkrankung (Böcker et al., 2001).

Von besonderem experimentellen Interesse sind Strukturen, die auf der Zelloberfläche und möglichst spezifisch auf malignen Zellen exprimiert werden. Diese eignen sich nicht nur für die Kontrolle eines klinischen Verlaufs, sondern auch, um neue therapeutische Strategien zu entwickeln.



## 1.1 Pathologische Relevanz der Hitzeschockproteine

### 1.1.1 Intrazelluläre Funktionen der Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (Hsp) sind hochkonservierte Proteine, die sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten vorkommen. Nach Homologien und ihrem Molekulargewicht unterscheidet man vier Proteinfamilien: Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90. Vertreter aus der Familie der Hitzeschockproteine mit 70 kDa zählen zu den häufigsten Proteinen in der Zelle. Sie können bis zu 5% Prozent des zellulären Proteingehalts ausmachen (Feige und Polla, 1994).

Eines der häufigsten intrazellulären Hitzeschockproteine ist das konstitutiv exprimierte Hitzeschockprotein Hsc70, auch Hsc73 benannt. Eine Isoform stellt das induzierbare Hsp70 dar, das auch als Hsp72 bezeichnet (Zylicz et al., 2001) wird und deren Transkription durch Zellzykluskontrolle, Proliferation oder Zelldifferenzierung induziert wird (Lindquist und Craig, 1988). Vertreter der Hitzeschockproteine mit einem Molekulargewicht von 70kDa finden sich im Nukleus, im Zytosol und am endoplasmatischen Retikulum (Feige und Polla, 1994).

Unter physiologischen Bedingungen besitzen Hitzeschockproteine vielfältige Funktionen als molekulare Chaperone. Sie haben Anteil an der zellulären Proteinhomöostase: Bei der Neusynthese von Proteinen lagern sich Hitzeschockproteine an die gebildeten Peptidketten an und ermöglichen die Verknüpfung und deren korrekte Proteinfaltung (Hartl, 1996; Hartl und Hayer-Hartl, 2002).

Hitzeschockproteine sind involviert in den Transport von Peptiden innerhalb der Zelle sowie am Abbau von Proteinen (Wickner et al., 1999). Hsp70-Proteine können auch reife, falsch gefaltete Proteine in der Zelle erkennen, an diese binden und deren korrekte Proteinfaltung wiederherstellen (Boorstein et al., 1994).

Sie wirken mit an der Aktivierung von speziellen Regulatorproteinen, von Transkriptionsfaktoren oder Kinassen, die den Zellzyklus beeinflussen können (Helmbrecht et al., 2000; Song et al., 2001), ferner an der von Steroidhormonen ausgehenden intrazellulären Signaltransduktion.

Verschiedene Stresskonditionen wie eine toxische Einwirkung von ultravioletter Strahlung, Schwermetallen, Infektionen, Fieber, Entzündungen oder Autoimmunreaktionen, induzieren eine verstärkte Synthese von Hitzeschockproteinen (Lindquist und Craig, 1988).

### **1.1.2 Dysregulation von Hitzeschockproteinen in malignen Zellen**

Nicht nur unter dem Einfluß äußerer Stressfaktoren, sondern auch bei maligne entarteten Zellen konnte ein veränderter intrazellulärer Gehalt an Hitzeschockproteinen, insbesondere Hsp70 gezeigt werden:

An Mammakarzinomen konnte die verstärkte zytosolische Expression von Hsp70 mit einer verstärkten Neigung zur Metastasierung und mit einem ungünstigen Verlauf der Tumorerkrankung korreliert werden (Ciocca et al., 1993; Vargas-Roig, 1998). Bei Zelllysaten von resektablen nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen wurde gleichfalls eine verstärkte Expression von Hsp70 festgestellt (Michils et al., 2001). Für Magenkarzinome konnte ebenso eine Überexpression von Hsp70 in den Zellkernen und im Zytosol von Tumorzellen ermittelt werden, wenngleich keine Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern bestand (Maehara et al., 2000).

Für die Expression von Hitzeschockproteinen in Leukämiezellen existieren unterschiedliche Darstellungen: Die Arbeiten von Xiao et al. (1996) ergaben eine Abnahme der Expression von Hsp70 auf der Ebene der RNA bei akuter myeloischer Leukämie.

Chant et al. (1995) beobachteten hingegen eine Erhöhung der intrazellulären Proteinmenge von Hsp70 bei akuter myeloischer Leukämie (AML), als deren durchflusszytometrische Analyse an permeabilisierten Zellen den malignen Zellen der chronischen myeloischen Leukämie (CML) und den peripheren Blutzellen gesunder Spender gegenübergestellt wurde. Die Resultate der Untersuchungen zur oberflächlichen Hsp70-Expression bei der akuten myeloischen Leukämie bedürfen weiterer Abklärung.

### **1.1.3 Expression von Hsp70 auf der Oberfläche humaner Tumorzelllinien**

Hitzeschockproteine auf der Zelloberfläche wurden erstmals von Ferrarini et al. (1992) beschrieben.

Bei ihren Untersuchungen zu den zellulären Veränderungen, die bei einer antitumoralen Hyperthermie-Therapie auftreten können, stießen Multhoff et al. (1995) auf das induzierbare Hitzeschock Hsp70 (Synonym: Hsp72). Nach nicht-letalem Hitzeschock von 41,8°C über zwei Stunden und einer anschließenden Regenerationszeit von zwölf Stunden wurde das Hitzeschockprotein auf der Zelloberfläche der humanen Ewing-Sarkom-Zelllinie ES detektiert, während nicht-maligne Zellen, d.h. Lymphozyten oder Fibroblasten, nach dieser Behandlung kein Hitzeschockprotein Hsp70 auf ihrer Zelloberfläche exprimierten (Multhoff et al., 1995).

---

Es gelang der Forschungsgruppe im folgenden zu zeigen, dass sich bei der humanen Bronchialtumor-Zelllinie LX nicht nur im durch die Hitzeschockbehandlung von 39°C Hsp70 an die Zelloberfläche nachweisen ließ, sondern Hsp70 auch oberflächenständig lokalisiert ist, ohne dass eine Hyperthermiebehandlung erforderlich wäre (Botzler et al., 1996).

Dennoch schien eine Oberflächenexpression nicht generell für maligne Tumorzellen zuzutreffen, die humane Mammakarzinomzelllinie MX beispielsweise wies kein Hsp70 an der Zelloberfläche auf (Botzler et al., 1996).

Auf Zellen der humanen Leukämiezelllinie K562 wurde eine Expression von Hsp70 detektiert. Die Inkubation der Tumorzellen mit Actinomycin D oder Cycloheximid ließ deren Hsp70-Expression von Hsp70 nach Hitzeschock ausbleiben. Es wurde gefolgert, dass für die Oberflächenlokalisierung des Hitzeschockproteins Hsp70 die de novo-Proteinsynthese erforderlich ist (Multhoff, 1997a).

Die humane kolorektale Tumorzelllinie CX-2 wurde von Multhoff et al. (1997b) anhand ihrer unterschiedlich ausgeprägten Oberflächenexpression von Hsp70 in zwei Tochterzelllinien subkultiviert. Während das Expressionsmuster von MHC-Klasse I-Molekülen und andere Adhäsiomsmolekülen (ICAM, NCAM, VCAM) beider Tochterzelllinien identisch war, betrug der Anteil Hsp70-positiver Zellen bei der Tochterzelllinie CX+ über 90% und bei CX- weniger als 20% (Multhoff et al., 1997b).

Mit Hilfe der subklonierten Tumorzelllinie CX+ und CX- gelang es Multhoff et al. (1997b), ein experimentelles System zur Untersuchung der möglichen immunologischen Relevanz des detektierten Oberflächenmoleküls zu generieren.

Shin et al. (2003) bestätigten den Befund von einer Reihe von Chaperonen im Proteom von Zelloberflächenproteinen.

Gehrman et al. (2002) berichteten über die verstärkte zytosolische und membranäre Expression von Hsp70 auf humanen Tumorzelllinien nach Taxan-Einwirkung, nicht jedoch nach Anthrazyklinen. Ein Zusammenhang der Hsp70-Expression mit dem intrazellulären mikrotubulären Transportsystem wurde postuliert.

## 1.2 Immunologische Bedeutung von Hsp70

### 1.2.1 Hsp70 auf Tumorzellen als Erkennungsstruktur für NK-Zellen

Eine Lokalisation an der Oberfläche von Tumorzellen macht das Hitzeschockprotein Hsp70 nicht nur tumorpathologisch interessant, zugleich wurde die immunologische Relevanz von Hsp70 geprüft. Während CD3-positive T-Zellen keine verstärkte Zytotoxizität gegenüber Hsp70-positiven Sarkomzellen zeigten, konnten CD3-negative Lymphozyten, die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Hsp70-positive Sarkomzellen *in vitro* lysieren (Multhoff et al., 1995).

Eine Beteiligung von MHC-Klasse I-Molekülen wurde durch Blockade von MHC-Klasse I-Molekülen ausgeschlossen, welche die Zytotoxizität durch die NK-Zellen nicht verringerte (Multhoff et al., 1995).

Experimentell erfasst wurde die Zytotoxizität von Lymphozyten mit Hilfe des Cellular mediated lysis-Assays (MacDonald et al., 1974), bei dem radioaktiv markierte Targetzellen bei Koinkubation mit Effektorzellen, zum Beispiel natürlichen Killerzellen inkubiert werden. Eine Lyse der Targetzellen setzt das radioaktive Isotop  $^{51}\text{Cr}$  in aus den Targetzellen frei und führt zu einem messbaren Anstieg der Radioaktivität im Überstand.

Um die Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen zu steigern, wurden NK-Zellen wie allgemein üblich vor der Untersuchung mit Interleukin-2 (IL-2) behandelt. In diesem Falle wurde eine ausgeprägte Zytotoxizität gegenüber den humanen Bronchialtumorzellen LX mit hoher Oberflächenexpression von Hsp70 beobachtet, während die humane Mammakarzinomzelllinie MX mit fehlender Oberflächenexpression nicht durch NK-Zellen angegriffen werden konnte (Multhoff et al. 1996).

Multhoff (1996b) konnte ihre Beobachtung zur NK-Zell-vermittelten Lyse von Tumorzellen an den humanen Erythroleukämiezellen K562 und den Ewing Sarkom-Zelllinien ES bestätigen.

Dass die Erkennung und sukzessive stattfindende Lyse von Tumorzellen mit deren Umfang der Expression von Hsp70 auf der Tumorzelloberfläche korrelierte, ergaben Vergleiche der NK-vermittelten Lysierung der humanen kolorektalen Tumorzelllinien CX+ und CX- (Multhoff et al., 1997b).

### 1.2.2 Modulation der Zytotoxizität natürlicher Killerzellen durch Hsp70

Die beobachtete Auflösung (Lyse) von Tumorzellen mit einer membranären Expression von Hsp70 durch die natürlichen Killerzellen ließ Multhoff und Mitarbeiter auf die Wechselwirkung mit dem Hitzeschockprotein Hsp70 eingehen.

Rekombinant hergestelltes Hsp70 vermochte zusammen mit Interleukin-2 (IL-2, 100 I.E./ml) die Proliferation von natürlichen Killerzellen *in vitro* steigern (Multhoff et al.,

1999), wie im Einbau von Tritium ( $^3\text{H}$ )-markiertem Thymidin in die Zellen (nach Stong et al., 1973) abgelesen werden konnte. Dem induzierbaren Hsp70 verwandte Hitzeschockproteine Hsc70, DnaK oder denaturiertes Protein Hsp70 zeigten keinen ausgeprägten Anstieg der Proliferation der NK-Zellen. Die verstärkte Proliferation durch exogen zugeführtes Hsp70 blieb auf die NK-Zellen limitiert, CD3-positive T-Lymphozyten zeigten keine verstärkte Proliferation nach Zugabe von Hsp70 (Multhoff et al., 1999).

Die Bedeutung des induzierbaren Hsp70 für die Zytotoxizität wurde deutlich durch Koinkubation der NK-Zellen mit den Hitzeschockproteinen Hsc70, DnaK und Hsp70. Letzteres Protein führte zu einer Inhibition der Zytotoxizität gegenüber Hsp70-positiven CX $^+$ -Tumorzellen, während die Proteine Hsc70 und DnaK keine inhibitorischen Eigenschaften zeigten (Multhoff et al., 1999).

Im Hinblick auf die Zunahme der Proliferation und die Beeinflussung der Zytotoxizität der NK-Zellen führte der rekombinant hergestellte C-Terminus, der aus die Aminosäuren 384-561 des Hsp70 umfasste, zu vergleichbaren Resultaten wie das vollständige Protein Hsp70.

Die Inkubation der natürlichen Killerzellen mit IL-2 und dem Hitzeschockprotein Hsp70 hatte einen Anstieg der Synthese von IFN- $\gamma$  zur Folge, welches sich gegenüber der alleinigen Inkubation mit Interleukin-2 bei 100 I.E. um mehr als die Hälfte steigern ließ. Die Synthese von TNF $\alpha$  konnte die Zugabe von Hsp70 nicht beeinflussen (Multhoff et al., 1999).

Beide Beobachtungen lieferten wichtige Hinweise für den Wirkmechanismus der Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen gegenüber Hsp70-positiven Tumorzellen.

Es wird vermutet, dass ein Rezeptor die Erkennung von Hsp70 auf der Zelloberfläche maligner Zellen bewerkstelligt und die Zytotoxizität induziert. Durchflusszytometrische Untersuchungen von Multhoff et al. (1999) lieferten Hinweise auf Veränderungen der Oberflächenmoleküle von NK-Zellen nach Hsp70-Inkubation: Die Dichte des NK-Zell-assoziierten Markers CD16 schien nach Hsp70-Stimulation abgenommen zu haben, während das Antigen CD57 und der Lektin-Rezeptor vom Typ C, CD94, vermehrt nachweisbar waren (Multhoff et al., 1999; Multhoff, 2002).

Durch Bindungsstudien an NK-Zelllinien konnte die Relevanz der CD94-Moleküle für die Erkennung von rekombinantem Hsp70 und seinem C-Terminus bestätigt werden. Die Bindung von Hitzeschockprotein Hsp70 an die Oberfläche und seine sukzessive Internalisation waren unmöglich geworden, wenn eine Vorinkubation mit anti-CD94-Antikörper stattgefunden hatte (Gross et al., 2003a).

Gross et al. (2003b) zeigten ferner, dass Hsp70 in vitro eine Bindungsstelle für das 32kDa große Granzym B darstellt, das von NK-Zellen sezerniert zu einer Induktion von Apoptose der Tumorzellen führen kann, die an ihrer Oberfläche Hsp70 tragen.

Die Suche nach möglichst effizienten Liganden als Stimuli für Proliferation und Zytotoxizität der NK-Zellen gegen das Hitzeschockprotein Hsp70 auf der Oberfläche maligner Zellen bleibt eine zentrale wissenschaftliche Frage für die immunologische Grundlagenforschung.

### 1.2.3 Als Ligand für NK-Zellen agierendes Epitop des Moleküls Hsp70

Im Hinblick auf die Interaktion von NK-Zellen mit dem Hitzeschockprotein Hsp70 ist ebenfalls von Bedeutung, welche(r) Abschnitt(e) des Liganden eine zytotoxische Immunantwort auslösen kann, wenn er auf der zellulären Oberfläche maligner Tumorzellen in direkten Kontakt mit den NK-Lymphozyten tritt.

Zu diesem Zweck wurde die Bindung verschiedener monoklonaler spezifischer Antikörper gegen Hsp70 an den kolorektalen Tumorzellen CX+ untersucht

Diejenigen Hsp70-spezifischen Antikörper, die an der Zellmembran der Tumorzelle lokalisiertes Hsp70 erkannten, zeigten auch eine Bindung an das Hsp70-Peptid mit einer Deletion des N-Terminus. Zugleich ließ sich die Zytotoxizität der NK-Zellen bei Koinkubation mit den betreffenden Antikörpern blockieren. Demnach war der an der Zelloberfläche lokalisierte C-Terminus als Ligand für NK-Zellen und für die Induktion zytotoxischer Reaktionen verantwortlich (Botzler et al., 1998).

Bei dem Epitop, das von dem Hsp70-spezifischen Antikörper cmHsp70.1 erkannt wird, handelt es sich innerhalb des 640 Aminosäuren großen Moleküls um einen Teilabschnitt im C-Terminus mit den Aminosäuren 428–640 (Botzler et al., 1998). Dieser liegt innerhalb der substratbindenden Domäne, die von einer proteasesensitiven Bindungsstelle von der ATPase-Domäne am N-Terminus getrennt wird. Der interessierende Bereich des Proteins enthält eine  $\alpha$ -Helix (Aminosäuren 512-536), der extrazellulär lokalisiert und für die Immunerkennung durch NK-Zellen bedeutsam sein könnte, zumal eine Antikörpermarkierung der Tumorzellen CX+ die Cytotoxizität der NK-Zellen inhibierte (Botzler et al., 1998).

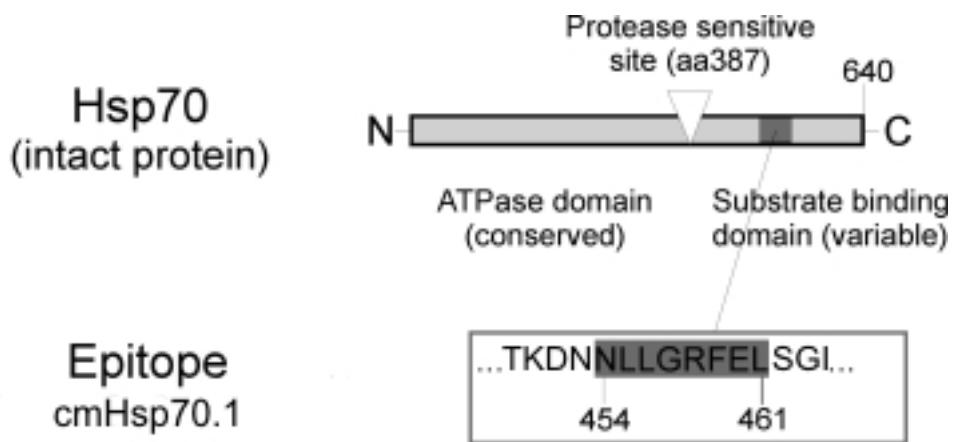


Abb.1: Schematischer Aufbau des Hitzeschockproteins Hsp70 mit Angabe des Epitops des in der Durchfluszytometrie eingesetzten Antikörpers cmHsp70.1, modifiziert nach Botzler et al., 1998; Multhoff et al., 2001)

Die Aminosäuresequenz des Epitops, an welches der Hsp70-spezifische Antikörper cmHsp70.1 bindet, wurde durch Peptid-Scanning-Analysen weiter charakterisiert. Hierzu wurden Oligopeptide mit einer Kettenlänge von 11 Aminosäuren synthetisch hergestellt, die sich in ihrer Aminosäuresequenz überlappten und den

Aminosäurebereich von 444 bis 471 des Hitzeschockproteins Hsp70 abdeckten. Nach Auftragen der synthetischen Peptide auf eine Zellulosemembran wurde geprüft, an welche Peptide der Hsp70-spezifische Antikörper cmHsp70.1 band. Es handelt sich dabei um ein Peptid, die Partialsequenz NLLGRFEL enthielten, welche den Aminosäuren 454 bis 461 des Hitzeschockproteins 70kDa entsprachen (Abb.1) (Multhoff et al., 2001).

In vitro wurden diese Hsp70-Peptide auf ihre Fähigkeit hin untersucht, als peptische Agonisten zusammen mit Interleukin-2 die Proliferation und die Zytotoxizität natürlicher Killerzellen gegen Hsp70-positive Tumorzellen zu stimulieren. Für die Wechselwirkung mit NK-Zellen wurde herausgefunden, dass ausschließlich das 14mer-Peptid TKDNLLGRFELSG („TKD“), das in der Aminosäuresequenz mit den Aminosäuren 450-463 des Proteins Hsp70 übereinstimmte, kombiniert mit IL-2 eine gesteigerte Proliferation der NK-Zellen bewirkte (Multhoff et al., 2001). Bezuglich der Zytotoxizität gegenüber Hsp70-exprimierenden Tumorzellen war das Peptid „TKD“ in zweifacher Hinsicht aktiv: Einerseits wurde die zytotoxische Potenz gegenüber der alleinigen Gabe von IL-2 verstärkt, andererseits kam es zu einer verminderten Zellyse, wenn das Peptid den Tumorzellen vor der Lyse zugesetzt wurde und eine Erkennung der NK-Zellen kupierte (Multhoff et al., 2001).

Im Mausmodell konnte eine Vorstimulation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut gesunder humaner Spender mit Interleukin-2 und dem oben beschriebenen Hsp70-Peptid TKD nach adoptiven Transfer die Proliferation von Hsp70-positiven humanen Tumorzellen CX+ inhibieren (Moser et al., 2002).

### 1.2.4 Mögliche therapeutische Anwendungen des Hsp70-Peptid-Fragments

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen, die in der Oberflächenpräsenz von Hsp70 ein Erkennungsmolekül für natürliche Killerzellen ergeben haben, das mit einer direkten zellulären Zytotoxizität verknüpft war, bildeten den Ausgangspunkt für die Forschungsgruppe von Frau Prof. Multhoff, einen immunologischen Ansatz zur Tumortherapie zu entwickeln. Dieser umfasst sowohl die Stimulation der natürlichen Killerzellen im Hinblick auf eine optimale Proliferation und Zytotoxizität, deren adoptive Applikation an Tumorpatienten, als auch die Evaluation der Oberflächenexpression von Hsp70 auf humanen Tumoren *in vivo*.

Grundsätzlich kommen mehrere Alternativen für die therapeutische Applikation in Frage. Experimentell verfolgt wurde die aktive Immunisierung durch die Stimulation von NK-Zellen *in vitro* und eine anschließende Reinfusion der immunologischen Effektorzellen am Patienten.

Diese Methode erscheint sehr aufwendig und muss zusätzlich sicherstellen, dass die reinfundierten Zellen viabel und immunologisch aktiv bleiben. Der Vorteil liegt in der Möglichkeit des Monitorings der Effizienz der als Stimuli eingesetzten Agenzien und Zytokine.

Weniger aufwendig in der Applikation wäre eine direkte intravenöse Gabe von Hsp70-Fragment als *in vivo*-Therapeutikum in Kombination mit Interleukin-2. Immunologische und pharmakokinetische Parameter wären in klinischen Studien zu ermitteln ebenso wie die Optimierung der therapeutisch eingesetzten Interleukine und ihre Dosierungsschemata.

In den vergangenen Jahren verstärkt an Bedeutung gewonnen haben in der onkologischen Pharmakotherapie monoklonale Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene, beispielsweise der Antikörper Trastuzumab, dessen Paratop sich gegen den mutierten epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor II (Her-2/neu) richtet und der für das fortgeschrittene Mammakarzinom zugelassen ist. Eine mögliche Option wäre auch ein therapeutisch eingesetzter Antikörper gegen oberflächenständiges Hsp70.

Für jede der genannten immunologisch-therapeutischen Prinzipien bildet die Detektion von Hsp70 an der Oberfläche humaner Tumorzellen mit einem validen Verfahren die Voraussetzung.

---

## 1.3 Klinischer Hintergrund der untersuchten malignen Erkrankungen

### 1.3.1 Kolorektales Karzinom

#### 1.3.1.1 Definition

Als Kolonkarzinome werden maligne Tumore der Dickdarmschleimhaut bezeichnet, deren aboraler Rand mehr als 16 cm von der Anocutanlinie entfernt ist. Rektumkarzinome sind Tumore im Dickdarm, deren aboraler Rand bei Messung mit starrem Rektoskop weniger als 16 cm von der Anokutanlinie entfernt liegt (Fielding et al., 1991; Schalhorn et al., 2001a).

#### 1.3.1.2 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten Tumoren in den westlichen Ländern. 1995 verstarben in Deutschland 30.561 Menschen an den Folgen eines kolorektalen Karzinoms. Kolorektale Karzinome liegen mit einem Anteil von 14,35% an zweiter Stelle tumorbedingter Todesfälle hinter Bronchialkarzinomen bei Männern und Mamma-Karzinomen bei Frauen. Der Häufigkeitsgipfel bei dem kolorektalen Karzinom liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr (Becker und Wahrendorf, 1998; Senn et al., 1998).

Für das Kolonkarzinom beträgt die Mortalität für Männer 18,0 und für Frauen 25,3 pro 100.000 Einwohner und Jahr. Die Inzidenz des Kolonkarzinoms liegt zwar geringer als die des Rektumkarzinoms, doch repräsentiert das Kolonkarzinom mit mehr als zwanzigtausend Todesfällen ein Drittel der krebsbedingten Todesfälle innerhalb der gastrointestinalen Tumore und zirka 10% aller tumorbedingten Todesfälle (Schmidt und Porschen, 1999).

Es wird geschätzt, dass jährlich in Deutschland mehr als 80.000 Personen an Dickdarmkrebs erkranken (Schalhorn et al., 2001a).

#### 1.3.1.3 Histologie

Histologisch handelt es sich bei dem kolorektalen Karzinom zu 85-90% um ein Adenokarzinom. Seltener angetroffen werden Siegelringzellkarzinome, muzinöse Adenokarzinome, kleinzellige oder undifferenzierte Karzinome (Schalhorn et al., 2001a).

#### 1.3.1.4 Lokalisation kolorektaler Karzinome

Nach ihrer Lokalisation werden zirka 40% der kolorektalen Karzinome im Bereich des Rektums gefunden, 20% der kolorektalen Karzinome entfallen auf das Colon sigmoideum. Insgesamt 15% der kolorektalen Karzinome betreffen Colon descendens,

linke Flexur, Colon transversum und rechte Flexur. Zu etwa 25 % betrifft das CRC das Colon ascendens (Lagiader, 1998).

Die Metastasierung des Kolonkarzinoms kann sowohl lymphogen als auch hämatogen verlaufen (Senn et al., 1998): Der Lymphabfluß von Kolonkarzinomen erfolgt entlang der V. rectalis superior zu mesenterialen und lumbalen Lymphknotenstationen. Die Venen des Colons und des oberen Drittels des Rektums drainieren über die V. portae zur Leber, die als erster Kapillarfilter des portalen Stromgebiets für den Befall von Filiae kolorektaler Karzinome besonders anfällig ist. Venöse Abflüsse des mittleren und unteren Rektumabschnittes gelangen über die V. iliaca interna zur V. cava. Im Falle einer hämatogenen Tumordissemination kommt es auf diesem Wege auch zu pulmonalen Metastasen (Schalhorn et al., 2001a).

### 1.3.1.5 Tumorstadien des kolorektalen Karzinoms

Die Stadien kolorektaler Karzinome umschreiben den tumoralen Befall tieferliegender Gewebeschichten der Colomucosa, die Ausstreuung von Tumorzellen in abführende Lymphknoten sowie das Vorliegen von Fernmetastasen.

Gemäß der TNM-Klassifikation wird ein intraepithelialer Tumor ohne Überschreiten der Basalmembran als *Carcinoma in situ* (Tis) eingestuft. Das Tumorstadium T1 liegt vor, wenn der Tumor die Submucosa infiltriert, bei T2 zusätzlich die Muscularis propria, bei T3 auch die Subserosa oder Gewebe außerhalb des Peritoneums oder der Perianalregion. Im Tumorstadium T4 hat der Tumor das viszerale Peritoneum perforiert oder infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen. Der Lymphknotenbefall wird mit N1 klassifiziert, wenn in ein bis drei untersuchten Lymphknoten Metastasen gefunden werden, und als N2, wenn vier oder mehr Lymphknoten betroffen sind. Um einen Tumor als frei von Lymphknotenbefall (N0) einzustufen zu können, muß dieser Befund an mindestens zwölf resezierte Lymphknoten erhoben werden. Vorliegende Fernmetastasen werden nach TNM-Klassifikation als M1 bezeichnet (Hermanek et al., 1997; Wittekind et al., 2001).

Seitens der Pathologie wird der Entdifferenzierungsgrad des Tumors bewertet und von gut differenziert (G1) über mäßig differenziert (G2), schlecht differenziert (G3) und undifferenziert (G4) klassifiziert (Schmid und Porschen, 1999).

### 1.3.1.6 Ätiologie kolorektaler Karzinome

Die Ätiologie von kolorektalen Tumoren ist nicht geklärt. Es werden familiäre, hereditäre Karzinome mit einem Anteil von 15% von den sporadischen Tumoren mit einem Anteil von 85% unterschieden (Schalhorn et al., 2001a).

Die Entwicklung eines Karzinoms von Kolon oder Rektum verläuft in mehreren Etappen über einen Zeitraum von mehr als zehn Jahren hinweg. Die Mehrzahl der kolorektalen Karzinome geht aus dem normalen Epithel über die gutartige Vorstufe, des Adenoms hervor (Fenoglio et al., 1977; Thomas, 1998; Harrison, 1999).

Als Ausgangspunkte für Adenome und zugleich als früh messbare Zeichen für ein gestörtes Zellgleichgewicht in der Dickdarmschleimhaut gelten die „*aberrant crypt foci*“ (ACF). Durch eine Überproduktion von Zellen kommt es zu einer Ausdehnung, Teilung oder Vergrößerung von Krypten, aus denen ein hyperplastischer Polyp hervorgehen kann. Diese Unregelmässigkeit an der Oberfläche der Mucosa kann mikroskopisch erfasst werden. (Roncussi et al., 1991; 1993).

Fearon und Vogelstein (1990) entwickelten ein Modell zur Entstehung von kolorektalen Karzinomen auf der Basis der Akkumulation genetischer Schäden. Diese können eine Mutation oder einen Genverlust des APC-Gens umfassen, sowie eine Hypomethylierung von DNA, die ihrerseits zu einer Aktivierung der Oncogene k-ras und n-ras führen kann. Die diesen molekularen Veränderungen zugeordnete Adenom-Karzinom-Sequenz umfasst im weiteren Verlauf der malignen Entartung den Genverlust oder die Mutation der Tumorsuppressorgene DCC und p53. Über die zunehmende genetische Instabilität wird die maligne Entartung vorangetrieben, die zu einer Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms führen kann (Fearon und Voglstein, 1990; Strachan und Read, 1996).

### 1.3.1.7 Hereditäre Formen kolorektaler Karzinome

Zu den hereditären Formen kolorektaler Karzinome zählt die familiäre adenomatöse Polyposis Coli (FAP), bei der sich eine Vielzahl von gleichzeitig auftretenden Adenomen ( $>100$ ) bereits in jungen Jahren entwickelt. Man sagt, dass alle FAP-Patienten, bei denen eine Proktokolektomie unterbleibt, im Alter von 37 Jahren zu 50% und im Alter von 50 Jahren zu 100% ein kolorektales Karzinom entwickeln (Sugarbaker et al., 1985). Der FAP-Erkrankung liegt eine Mutation auf Chromosom 5q21 zugrunde, die autosomal dominant vererbt wird (Bodmer et al., 1987).

Eine zweite erbliche Form ist das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), bei dem die Anzahl an Adenomen mit zirka 5 bis 10 angegeben wird. Es tritt etwa zehnmal häufiger auf als die FAP. Für diese auch als Lynch-Syndrom bezeichnete HNPCC-Erkrankung konnten Keimbahnmutationen identifiziert werden, die DNA-Mismatch-Repair-Proteine wie MLH1 (Moisio et al., 1996), MSH2 (Möslein et al., 1996), PMS1, PMS2 oder MSH6 (Miyaki et al., 1997) betreffen können. Mutationen an Genen für DNA-Mismatch-Repair-Proteinen haben keinen direkten Einfluß auf das onkogene Geschehen, sie erhöhen jedoch die Gesamtmutationsrate und erleichtern somit maligne Ereignisse (Strachan und Read, 1996).

Um das Vorliegen eines HNPCC zu überprüfen, wurden die sogenannten *Amsterdam-Kriterien* erarbeitet: Sie umfassen mindestens drei familiär aufgetretene kolorektale Karzinome, von denen mindestens zwei aufeinanderfolgende Generationen betroffen sein müssen, ein Betroffener mit den beiden anderen erstgradig verwandt ist und ein CRC-Betroffener vor dem 50. Lebensjahr erkrankt war (Vasen et al., 1991).

1997 wurden diese Merkmale mit den *Bethesda-Kriterien* ergänzt, die u.a. zusätzlich extrakolische Karzinome mit eingeschlossen, etwa Endometrium-, Ovarial-, Magen-Dünndarm oder Übergangsepithelkarzinome von Nierenbecken und Urether, alternativ Diagnosestellungen früher als im 45. Lebensjahr oder Adenom bei Patienten jünger als

40 Jahre. Die genannten Konstellationen erhärten den Verdacht auf ein hereditäres HNPCC-assoziiertes Karzinom (Rodriguez-Bigas et al., 1997) und bilden die Einschlusskriterien für molekulare Untersuchungen, die eine genetische Instabilität der DNA-Repairproteine des Probanden evaluieren. Die Penetranz bei den Genmutationen am MMR-Protein beträgt 80 bis 90 % und macht deutlich, wie wichtig das Erkennen von Risikopersonen ist.

Bei HNPCC-Betroffenen können Malignome in Frühstadium erkannt und reseziert werden (Lynch und de la Chapelle, 1999).

### 1.3.1.8 Prognose des kolorektalen Karzinoms

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms hängt ab von der Tiefeninvasion des Tumors in die Darmwand und dem tumoralen Befall der Lymphknoten.

Die Fünfjahresüberlebensraten kolorektaler Karzinome nach alleiniger Operation betragen 40 bis 50% bezogen auf das Gesamtkollektiv der Patienten mit operablen kolorektalen Karzinomen (Senn et al., 1998).

In Abhängigkeit vom vorliegenden Tumorstadium wurden nach Operation als alleiniger Therapie folgende Überlebensraten beobachtet (Tab.1):

| <b>TNM-Stadium</b> | <b>5-Jahres-Überlebensrate</b> |
|--------------------|--------------------------------|
| <i>T1 N0</i>       | 97-100%                        |
| <i>T2 N0</i>       | 90-100 %                       |
| <i>T3 N0</i>       | 78-80 %                        |
| <i>T4 N0</i>       | 63-87 %                        |
| <i>jedes T, N1</i> | 73%                            |
| <i>jedes T, N2</i> | 45%                            |

Tab.1: 5-Jahresüberlebensraten nach Kolonkarzinom nach alleiniger Operation in Abhängigkeit vom Tumorstadium (nach Schmidt und Porschen, 1999)

Während bei fehlender Lymphknotenmetastasierung stadienabhängig zwischen 97-100% der Patienten nach Operation im Tumorstadium T1N0M0 am Leben waren, so sank die Fünfjahresüberlebensrate auf 63-87% im Tumorstadium T4N0M0 (Tab.25). Lagen zum Zeitpunkt der Operation bereits Lymphknotenmetastasen vor, so verringerte sich die 5-Jahresüberlebensrate auf 73%, im Stadium N2 auf 45% (Schmidt und Porschen, 1999).

Liegen bereits Fernmetastasen vor, am häufigsten in Leber oder Lunge, so beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate zirka 6% (Graeven und Schmiegel, 2000).

Auf molekularer Ebene zählen zu den prognostisch ungünstigen Faktoren erhöhte präoperative CEA-Spiegel, Mutationen des Tumorsuppressors p53, der Verlust eines Allels des langen Abschnitts von Chromosom 18 (18q) und das Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität. Als weitere Faktoren kommen eine submuköse oder extramurale Gefäßinvasion des Tumors in Betracht (Preiß et al., 2002).

### 1.3.1.9 Klinisch eingesetzte Tumormarker für das kolorektale Karzinom

Klinische Bedeutung als Tumormarker besitzt das karzinoembryonale Antigen (CEA), dessen Sensitivität zwischen 40 und 70% angegeben wird. Erhöhte Serumspiegel ( $> 15\text{-}20 \text{ ng/ml}$ ) zeigen eine 95%ige Spezifität gegenüber Nicht-Tumorkranken.

Als zweiter klinisch relevanter Tumormarker ist das Glykolipid CA19-9 mit einer Sensitivität von 20-60% in klinischem Gebrauch (Lamerz et al., 2001).

Die genannten Moleküle werden in Verlaufs- und Therapiekontrollen eingesetzt. Ein Wiederanstieg nach Absetzen einer Therapie deutet ein Rezidiv oder eine Tumorprogression an (Posner und Mayer; 1994). Reiter et al. (1997) konnten zeigen, dass präoperativ erhöhte Serumspiegel von CEA und CA19-9 mit einer ungünstigen Prognose korrelierten.

Obwohl das Glykoprotein CEA auf der Zelloberfläche von malignen kolorektalen Zellen lokalisiert sein kann, eignet es sich als Zielstruktur für therapeutische Ansätze kaum, vor allem wegen seiner mangelnden Spezifität, d.h. seiner Expression auch auf *normalen* intestinalen Epithelzellen (Lamerz et al., 2001).

### 1.3.2 Hepatische Metastasen nach kolorektalen Karzinomen

Aufgrund des portal-venösen Blutabflusses metastasieren kolorektale Karzinome hämatogen in die Leber.

Etwa 10 bis 25 % der an einem kolorektalen Karzinom Operierten weisen bei Primärtumorresektion bereits Lebermetastasen auf (Otto und Englhardt, 2002).

Selbst bei zirka einem Drittel der lokal im Gesunden resezierten Dickdarmkrebs-Patienten kommt es im Verlauf der Erkrankung zur Bildung von hepatischen Filiae (Gerbes et al., 2001). Für Patienten, deren Lebermetastasen nicht resezierbar sind, beträgt die mediane Überlebenszeit weniger als ein halbes Jahr (Senn et al., 1998).

Primär wird bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung und hepatischer Metastasierung geprüft, ob eine operative Entfernung der Metastasen durchführbar ist. Eine diffuse Metastasierung, ein Befall regionärer Lymphknoten oder zusätzliche extrahepatische Metastasen gelten als Kontraindikation für eine Operation, die dann lediglich palliativen Charakter hätte. Solitäre Metastasen bilden die günstigste Konstellation für eine operative Resektion. Bis zu vier einzelne Metastasen können operativ aus der Leber entfernt werden, je kleiner deren Durchmesser, umso prognostisch günstiger.

Eine mehrfache Entfernung von zeitlich versetzt voneinander auftretenden Metastasen ist ebenso möglich (Gerbes et al., 2001).

Auch in den Fällen operabler Metastasen bleibt die Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von zirka 30% ungünstig, sie sinkt bei inoperablen Lebermetastasen auf 2% ab (Otto und Engelhardt, 2002).

### 1.3.3 Magenkarzinom

#### 1.3.3.1 Definition und Häufigkeit des Magenkarzinoms

Das Magenkarzinom als bösartiger Tumor des Magens (Heiss et al., 2001) zählt weltweit zu den häufigen tumorbedingten Todesursachen (Meyer et al., 1999). Noch in den dreißiger Jahren galt das Magenmalignom in den USA bei Männern als zweithäufigste Todesursache und bei Frauen als dritthäufigste Todesursache nach Tumoren von Zervix und Brust (Harrison, 1999). Aus nicht geklärten Gründen nahmen Inzidenz und Mortalität des Magenmalignoms seither ab. In Westdeutschland führte das Magenkarzinom im Jahr 1995 insgesamt zu 15389 Todesfällen und lag an vierter Stelle der krebsbedingten Todesfälle (Schalhorn et al., 2001b). Innerhalb Westeuropas beträgt die Inzidenz derzeit 12 bis 15 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr. Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Der Häufigkeitsgipfel liegt in der sechsten und siebten Lebensdekade (Senn et al., 1998).

#### 1.3.3.2 Ätiologie

Gegenwärtig geht man von einer in mehreren Schritten ablaufenden Karzinogenese des Magenkarzinoms aus, an deren Anfang eine oberflächliche Gastritis steht, die über verschiedene Dysplasiegrade in ein Karzinom übergehen kann (Bokemeyer et al., 2001). Die Ätiologie des Magenkarzinoms ist nach wie vor unklar. Zu Risikofaktoren zählen u.a. eine fettreiche, ballaststoff- und vitaminarme Ernährung sowie eine hohe Nitrat- und Nitrosamin-Zufuhr aus gepökelten und geräucherten Nahrungsmitteln (Schalhorn et al., 2001b). Ähnlich karzinogene Bedeutung scheint auch N-Nitroso-Verbindungen zuzukommen (Palli et al., 2001).

Weitere Risikofaktoren stellen atrophische Gastritis und eine frühere stattgehabte Magenteilresektion dar, die länger als 15 Jahre zurückliegt (Harrison, 1999).

Uemura et al. (2001) berichteten über ein erhöhtes Karzinomrisiko für dyspeptische Patienten, bei denen eine Infektion der Magenmucosa mit *Helicobacter pylori* vorlag.

#### 1.3.3.3 Histologische Klassifikation

Histologisch handelt es sich bei Magenkarzinomen zu 70% um Adenokarzinome, zu 10% um Siegelringzellkarzinome und zu 20% um undifferenzierte Karzinome (Becker K. et al., 1997). Nach Laurén (1965) werden Magenkarzinome nach ihrem Wachstum unterschieden in *intestinale* Karzinome, die zirka 50% der Magenkarzinome ausmachen, ferner *diffuse* Magenkarzinome zirka mit einem Anteil von etwa 30% und schließlich Mischformen mit einer Häufigkeit von zirka 20% (Schalhorn, 2001b).

Bei dem *intestinalen* Typ herrschen Drüsen mit Muzinproduktion vor, die Zellen haben enterozytenähnliche Morphologie mit schwach eosinophilem Zytoplasma und basal gelagertem Zellkern (Geneser, 1990). In seltenen Fällen kommt es ausschließlich zur gastralen Muzinproduktion (gastrale Differenzierung, 5%), in zirka 30% ausschließlich zur Bildung intestinaler Muzine. Am häufigsten finden sich im Sinne einer Mischdifferenzierung beide Muzinarten (Senn et al., 1998). Das auch als *endemische*

Form des Magenkarzinoms bezeichnete *diffuse* Magenkarzinom blieb in den vergangenen Jahren etwa gleich häufig und wird mit endogenen Faktoren assoziiert. Bei der *epidemischen* Form des *intestinalen* Wuchstyps scheinen Umweltfaktoren bedeutsam zu sein. Bei diesen Tumoren wurde eine abnehmende Häufigkeit beobachtet (Bokemeyer et al., 2001). Häufig und früh treten Lungenmetastasen nach diffusen Magenkarzinomen auf. Der intestinale Typ tendiert eher zur hepatischen Metastasierung (Schalhorn et al., 2001b; Becker K. et al., 1997; Gerbes et al., 2001).

Bei dem Magenfrühkarzinom ist der Tumor beschränkt auf Mucosa (Typ M) und Submucosa (Typ SM), während er bei einem fortgeschrittenen Karzinom die Muscularis propria erreicht hat oder sie durchbricht (Meyer et al., 1999).

Im Gegensatz zum *Carcinoma in situ*, das einen intraepithelialen oder auf die Lamina propria beschränkten Tumor darstellt, infiltriert ein Magenfrühkarzinom in tieferliegende Gewebeschichten der Mucosa und Submucosa. Histologisch wird bei dem Magenfrühkarzinom meist ein Siegelringzellkarzinom gesehen (Thomas, 1998).

Den überwiegenden Teil repräsentieren fortgeschrittene Magenkarzinome, histologisch gekennzeichnet durch eine Infiltration oder Durchbrechung der Muskelwand (Thomas, 1998).

Makroskopisch wachsen Magenkarzinome des *intestinalen* Typs (nach Laurén) polypös oder mit einem Ringwall. Der diffuse Typ umschreibt solide entdifferenzierte Adenokarzinome, Siegelringzellkarzinome und Tumore mit Zelldissoziation. Der Verlust von Zell-Zell-Kontakten macht sich histologisch durch eine unscharfe Abgrenzung des Tumors von normaler Magenmucosa und einer diffusen Infiltration von Tumorzellen in umliegende Gewebeschichten bemerkbar (Senn et al., 1998; Bokemeyer et al., 2001).

#### 1.3.3.4 Prognose des Magenkarzinoms

In prognostischer Hinsicht bedeutsam sind die Einteilung der TNM-Stadien nach UICC (Wittekind und Wagner, 1997; Wittekind et al., 2001) und die Differenzierung der Magenkarzinome zwischen Magenfrühkarzinomen und fortgeschrittenen Karzinomen:

Mit Lymphknotenbefall ist bei Magenfrühkarzinomen in 10 bis 30% der Fälle zu rechnen (Thomas, 1998). Dennoch weist das Magenfrühkarzinom eine günstigere Prognose als das fortgeschrittene auf, bei letzterem liegt die Heilungsrate bei 80%. In Japan werden Magenfrühkarzinome durch groß angelegte Früherkennungsuntersuchungen erfasst und frühzeitig operiert (Harrison, 1999).

Als Magenfrühkarzinome werden in Deutschland lediglich 10% der Magenkarzinome diagnostiziert (Senn et al., 1998). Diesbezüglich wünschenswert wäre eine frühzeitigere und umfangreichere Diagnostik, um Magenkarzinome als Frühkarzinome diagnostizieren und behandeln zu können (Schalhorn, 2001b).

Das Stadium fortgeschrittenes Magenkarzinome nimmt wichtigen Einfluss auf die Prognose: Die Fünfjahresüberlebensrate beträgt bei Patienten mit Primärtumoren ohne lymphogene Streuung oder Fernmetastasen (T1-T4, N0, M0) 66%.

Bei Lymphknotenbefall in höchstens sechs untersuchten Lymphknoten (Bezeichnung N1) sinkt die 5-Jahresüberlebensrate auf 33% ab.

Bei mehr als sechs tumorbefallenen Lymphknoten, d.h. im Tumorstadium T1-4, N2-3, M0, beträgt die Überlebensrate nach 5 Jahren 20% (Hölzl et al., 1996; Bokemeyer et al., 2001).

Liegen Metastasen von Magenkarzinomen vor, so sinkt die Fünfjahresüberlebensrate auf unter 5%.

### 1.3.3.5 Klinisch relevante Tumormarker

Als Tumormarker bei Magenkarzinomen haben verschiedene Glykoproteine klinische Bedeutung: Als Tumormarker der ersten Wahl gilt das Tumorassoziierte Glykoprotein 72 (TAG 72, CA72-4), dessen erhöhter Serumspiegel mit einer Sensitivität von 28-80% bei Magenkarzinompatienten gefunden wurde (Lamerz et al., 2001).

Erhöhte Serumspiegel des muzinartigen Glykoproteins CA19-9 wurden mit einer Sensitivität von 30-50% bei Magenkarzinomen festgestellt. Ein ähnliches Resultat konnte für das karzinoembryonale Antigen (CEA) mit einer Sensitivität von 30-50% ermittelt werden. CA19-9 und CEA gelten als „Zweitmarker“, um bei Präsenz erhöhter Serumspiegel den klinischen Verlauf zuverfolgen (Lamerz et al., 2001).

Die Serumspiegel der Glykoproteine Ca72-4, CEA und Ca19-9 haben als Tumormarker beim Magenkarzinom wie bei anderen gastrointestinalen Tumoren fakultative Bedeutung im Rahmen der Verlaufskontrolle (Senn; 1998), sie eignen sich jedoch nicht für die Früherkennung (Bokemeyer et al., 2001).

Bislang leitete sich aus genannten Tumormarkern keine Möglichkeit für eine spezifische therapeutische Intervention ab.

### 1.3.3.6 Molekulare Marker bei Magenkarzinomen

In jüngster Vergangenheit konnten auf molekularer Ebene bei dem Magenkarzinom eine Reihe von tumorassoziierten Veränderungen definiert werden.

Als mögliche genetische Mechanismen der Karzinogenese werden Mutationen, Störungen in der Genregulation von Tumorsuppressorgenen sowie eine Umwandlung von Protoonkogenen in Onkogene diskutiert.

Eine Akkumulation des Tumorsuppressorproteins tp53 wurde in der Mehrheit der untersuchten Magenkarzinobiopsien detektiert. Sie korrelierte mit einer frühen Metastasierung und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (Monig et al., 1997; Baldus et al., 2001; Ji et al., 2002) und bei diffusen Magenkarzinomen mit einer ungünstiger Prognose (Liu et al., 2001).

Eine mutationsbedingte Funktionseinbuße des Tumorsuppressors p53 verringerte bei Magenkarzinomen zusätzlich die vorhandene Menge an p21, einem weiteren Tumorsuppressor (Baldus et al., 2001).

Im Vergleich zu normaler Magenschleimhaut wurde bei Magenkarzinomen auch das Tumorsuppressorprotein p16 vermehrt nachgewiesen. Mit zunehmender Entdifferenzierung des Tumors schien dieses Protein abzunehmen (Rocco et al., 2002). Als Ursache hierfür wird eine Genaktivierung über eine Hypermethylierung in der Promotorregion des p16-Gens diskutiert (Ficarella et al., 2003). Von experimentellem Interesse sind bei dem Magenkarzinom Onkogene wie k-ras, das APC-Gen und c-met (Bokemeyer et al., 2001).

Ein möglicher Mechanismus der Resistenz gegenüber der Induktion von Apoptose der malignen Zellen wurde bei dem Magenkarzinom unter anderem belegt durch den Nachweis einer verstärkten Expression von Fas-Ligand (FasL) von Magenkarzinomzellen (Koyama et al., 2001), wobei die Expression von FasL auf Tumorzellen den Angriff von immunkompetenten Effektorzellen erschwert. Zusätzlich wird die Sekretion eines löslichen „Köder-Rezeptors“ für FAS diskutiert, der die Wirkung von FasL aus tumorinfiltrierenden Leukozyten abschwächt (Takahama Y., 2002).

Bei malignen Magentumoren verstärkt induziert schienen auch die Antigene Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) und nm23, die beide mit Zellproliferation assoziiert sind (Ji et al., 2002; Lim, 2002). Eine Überexpression der induzierbaren Cyclooxygenase 2 (COX-2) konnte mit der Tumorgröße, der Tumorausbreitung und dem Lymphknotenbefall korreliert werden (Ji et al., 2002).

Weitere molekulare Merkmale umfassen die Mikrosatelliten-Instabilität und den Verlust der Heterozygotie (LOH), die bei Magenkarzinomen gezeigt wurden (Keller et al., 1998; Lee et al., 2002). Bei diffusen Magenkarzinomen wurde eine Mikrosatelliteninstabilität kaum angetroffen, ebenso wenig Mutationen von p53, dafür jedoch Veränderungen des E-Cadherin-Gens (Rüschoff et al., 1999), was auf eine veränderte Zell-Zell-Kommunikation des Tumors deutet.

Eine Überexpression des membranständigen humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors II (C-erbB2) wurde von Wu et al. (1998) bei 35% der untersuchten Magenkarzinome vorgefunden, wobei der Rezeptor häufiger bei intestinalen Karzinomen und fortgeschrittenen Stadien als bei diffusen Karzinomen und früheren Stadien anzutreffen war. Eine prognostische Relevanz für die Expression von C-erbB-2 konnte von Danesi et al. (2000) sowie von Allgayer et al. (2000) ermittelt werden.

Im Sinne einer minimalen Resterkrankung konnten disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Tumorpatienten anhand des epithelialen Markers Zytokeratin 18 in Kombination mit u-PA identifiziert werden (Allgayer und Heiss, 2001).

Als unabhängiger prognostisch ungünstiger molekularer Marker wurde ein überexprimierter Urokinase-Rezeptors (u-PA) beschrieben, welcher mit einer erhöhten Tendenz zur Metastasierung assoziiert war (Heiss et al., 2002).

Bezogen auf die Expression von Hitzeschockproteinen wurde immunhistochemisch eine Überexpression von Hsp27 in malignen Zellen festgestellt, insbesondere bei fortgeschrittenen und metastasierten Magenkarzinomen (Kapranos et al., 2002). Liu et al. (1999) wiesen eine verstärkte Expression von Hsp90 nach, wobei die Häufigkeit von Tumorbiopsien mit immunhistochemischem Befund der verstärkten Hsp70-Expression mit dem Grad der Entdifferenzierung zunahm.

Maehara et al. (2000) zeigten, dass das Hitzeschockprotein Hsp70 im Nukleus und/oder im Zytosol von Magenkarzinomzellen überexprimiert wurde. Sie stellten einen Zusammenhang zwischen einer verstärkten Hsp70-Expression und einer guten Differenzierung des Tumors her. Korrelationen zwischen Hsp70- und p53-Überexpressionen wurden nicht gesehen.

Die geschilderten Arbeiten zu Hitzeschockproteinen bei Magenkarzinomen wendeten immunhistochemische Färbetechniken an, die eine zytosolische Expression anzeigen vermochten. Für die von Multhoff et al. (2001) vorgesehene zelluläre Immuntherapie ist eine Untersuchung der Zelloberfläche unabdingbar, weshalb Magenkarzinobiopsien im Rahmen dieses Projekts untersucht wurden.

### **1.3.4 Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom**

#### **1.3.4.1 Definition**

Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome leiten sich als maligne epitheliale Tumore vom Lungenparenchym ab (Thomas, 1998). Im Gegensatz hierzu stehen die kleinzelligen Bronchialkarzinome, welche neuroendokrinen Ursprungs sind (Berger et al., 2002).

#### **1.3.4.2 Epidemiologie**

Das Bronchialkarzinom stellt derzeit bei Männern den häufigsten und bei Frauen nach Mammakarzinomen den zweithäufigsten Tumor dar (Hermann, 2001). Jährlich ist mit zirka 45.000 Neuerkrankungen in Deutschland zu rechnen. Die Inzidenz beträgt bei Männern jährlich 75 Fälle pro 100.000 Einwohner, bei Frauen 35 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Havemann et al., 1999).

Bedingt durch die nur begrenzt erfolgreichen Behandlungsaussichten steht das Bronchialkarzinom bei Männern wie auch bei Frauen an erster Stelle der tumorbedingten Todesfälle (Hermann, 2001).

Ätiologisch bedeutsam ist vor allem die Inhalation von Tabakrauch. Feinstein et al. (1974) zeigten in ihrer Untersuchung an über tausend Bronchialkarzinopatienten, dass nur 5% der Betroffenen Nichtraucher waren: 43% der Befragten gaben an, bis zu 20 Zigaretten täglich, 45% mehr als zwanzig Zigaretten geraucht zu haben. 85 % der Befragten hatten über 20 Jahre lang geraucht. Allgemeine Umwelteinflüsse, Asbestexposition, Chemikalien oder Uran besitzen eine zahlenmäßig geringe Bedeutung.

Das durchschnittliche Alter der Erkrankten liegt bei 60 Jahren. Männer sind fünfmal so häufig betroffen wie Frauen. Der schnellere Erkrankungsanstieg bei Frauen verschob dieses Verhältnis in den letzten Jahren zu Ungunsten der Frauen (Niederle et al., 1999).

### 1.3.4.3 Klassifikationen bronchialer Tumore

#### 1.3.4.3.1 Histologische Einteilung

Nach dem histologischen Erscheinungsbild werden bronchiale Tumore in sieben Gruppen unterteilt. Die Weltgesundheitsorganisation WHO unterscheidet nach ihrem histologischen Erscheinungsbild vier Hauptformen epithelialer bronchialer Neoplasien: Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, großzellige Karzinome und kleinzellige Karzinome (Tab.2). Seltene Formen bronchialer Tumore stellen das adenosquamöse Karzinom, das Karzinoid und die Bronchialdrüsenerkarzinome dar (Hermann, 2001).

Mit zirka 40% am häufigsten treten Plattenepithelkarzinome auf. Histologisch bedeutsam für Plattenepithelkarzinome sind die Zeichen einer Verhornung und interzelluläre Brücken, die von Keratin und Zytokeratin gebildet werden und eine nur vereinzelt auftretende Schleimbildung (Thomas, 1998). Plattenepithelkarzinome sind in der Lunge bevorzugt zentral lokalisiert.

|   | <i>Histologie</i> | <i>Häufigkeit</i> |
|---|-------------------|-------------------|
| <b>Plattenepithelkarzinom</b>                         |                   | 40%               |
| Variante: Spindelzellform des Plattenepithelkarzinoms |                   |                   |
| <b>Adenokarzinom</b>                                  |                   | 10%               |
| a) azinäres Adenokarzinom                             |                   |                   |
| b) papilläres Adenokarzinom                           |                   |                   |
| c) bronchiolo-alveoläres (Adeno-)Karzinom             |                   |                   |
| d) solides (Adeno-)Karzinom mit Schleimbildung        |                   |                   |
| <b>Großzellkarzinom</b>                               |                   | 20%               |
| Varianten:  |                   |                   |
| a) Riesenzellkarzinom                                 |                   |                   |
| b) Klarzellkarzinom                                   |                   |                   |
| <b>Adeno-Plattenepithelkarzinom</b>                   |                   | (selten)          |
| Adenosquamöses Karzinom                               |                   |                   |
| <b>Karzinoid</b>                                      |                   | (selten)          |
| <b>Bronchialdrüsenerkarzinom</b>                      |                   | (selten)          |
| a) Adenoid-zystisches Karzinom                        |                   |                   |
| b) mukopidermoides Karzinom                           |                   |                   |
| <b>Kleinzeliges Karzinom</b>                          |                   | 30%               |
| a) Oat-cell-Karzinom                                  |                   |                   |
| b) intermediäres kleinzeliges Karzinom                |                   |                   |
| c) kombiniertes Oat-cell-Karzinom                     |                   |                   |

Tab.2: Histologische Einteilung der Bronchialkarzinome nach WHO (Hermann, 2001)

Adenokarzinome, die zirka 20% der bronchialen Tumore ausmachen, enthalten drüsige, papilläre oder azinäre Strukturen. Die Schleimbildung der Tumorzellen in bronchialen Adenokarzinomen wird mit Perjod-Schiffs-Reagenz und Muzin-Karminblau histologisch nachgewiesen. Pulmonale Adenokarzinome finden sich vorwiegend peripher nahe zur Pleura (Thomas, 1998).

Eine Sonderform des Adenokarzinoms stellt das bronchiolo-alveolare Karzinom dar. Es macht zirka 2 % der malignen bronchialen Neoplasien aus. Histologisch imponieren Alveolen, die von Zylinderepithelien ausgekleidet werden. Die Tumorzellen zeigen eine apikale Verschleimung. Die Tumorzellen des bronchiolo-alveolären Karzinoms leiten sich wahrscheinlich von Pneumozyten vom Typ II ab (Thomas, 1998), den sogenannten "Nischenzellen" des Alveolarepithels, deren physiologische Aufgabe in der Sekretion des Antiatelektasefaktors, d.h. Surfactant, besteht. Makroskopisch kann ein bronchiolo-alveoläres Karzinom eine Herdentzündung der Lunge imitieren. Pleurale oder lymphogene Metastasen bronchiolo-alveolärer Karzinome werden erst spät gesehen.

Bei dem großzellig-anaplastischen Bronchialkarzinom handelt es sich um ein entdifferenziertes Karzinom. Zell- und Kernpolymorphie treten häufig auf, doch bleibt der histologische Nachweis von Keratin, das eine epitheliale Zelle anzeigen würde, negativ. Gleiches gilt für den Nachweis von Muzin über die Periodsäure-Schiff-Reaktion. Immunhistochemisch kann das karzinoembryonale Antigen (CEA) angetroffen werden, das auch bei intestinalen Tumoren als Marker in Frage kommt (Lamerz et al., 2000).

Seltene Sonderformen bronchialer Tumore stellen das Riesenzellkarzinom dar, dessen Zellen Erythrozyten phagozytieren können, das klarzellige Karzinom, das histologische Ähnlichkeit mit dem Nierenzellkarzinom besitzt, und die Mischform des adenosquamösen Karzinoms dar. Bei letzterer Subgruppe sind drüsige und plattenepithelialtige Differenzierungen nebeneinander sichtbar.

Bei den sogenannten kleinzelligen Bronchialkarzinomen (SCLC) werden histologisch drei Typen unterschieden: Der Oatcell-Typ weist kleine, fast nacktkernige Zellen auf. Vermehrt sind Mitosen sichtbar, Nukleolen sind spärlich ausgebildet oder fehlen völlig. Bei dem intermediären Typ des kleinzelligen Bronchialkarzinoms sind die Zellen reicher an Zytoplasma und die Zellkerne häufig polygonal (Thomas, 1998).

Die kleinzelligen Bronchialkarzinome unterscheiden sich im Krankheitsverlauf, der Behandlungsstrategie und der Prognose. Aus diesem Grunde werden Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und großzelligen Karzinome als nichtkleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC) zusammengefasst und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) gegenübergestellt (Wittekind und Wagner, 1997).

#### 1.3.4.3.2 Stadieneinteilung des Bronchialkarzinoms nach der TNM-Klassifikation

Die Tumorstadien werden bei Bronchialkarzinomen nach dem TNM-System beschrieben, das in Tab.2 dargestellt ist (Wittekind und Wagner, 1997; Wittekind et al., 2002).

Vom American Joint Committee on Cancer (AJCC) wurde eine Einteilung von Tumorstadien vorgeschlagen, welche die Lokalisation, die Ausdehnung des Primärtumors, des möglichen Befalles von Lymphknoten oder der Metastasierung in andere Organe heranzieht, um Stadien zu unterscheiden (Mountain, 1986; Abrams et al., 1988). Es findet vorzugsweise Anwendung bei Patienten mit nichtkleinzelligen

Bronchialtumoren (NSCLC), jedoch bei dem kleinzelligem Bronchialtumor nur, wenn eine Operabilität des Tumors gegeben ist, an die sich eine Chemo- oder Radiochemotherapie anschließen kann (Niederle et al., 1999).

Die Stadieneinteilung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms korrelierte mit der Prognose: In den Tumorstadien T1/T2 ohne Metastasierung (N0 M0) betrug die Fünfjahresüberlebensrate 65%. Bei lokal fortgeschrittener Tumorausbreitung oder Lymphknotenbefall sinkt sie auf 42,9% ab, bei vorliegenden Fernmetastasen auf unter 8% (Naruke et al., 1988).

| <b>Primärtumor</b>                    |  |  |  |                                    |                                   |  |  |  |  |  |
|---------------------------------------|--|--|--|------------------------------------|-----------------------------------|--|--|--|--|--|
| Tumorstadium des Primärtumors         | Größe  | intrapulmonale Tumorexpansion                                | extrapulmonale Tumorexpansion  | Atelektase, Obstruktion, Pneumonie | Pleurabefall oder -erguß          |  |  |  |  |  |
| Tx                                    | n.n.   | okkultes Karzinom, Zytologie positiv                         | keine  | keine                              | kein Befall der Pleura visceralis |  |  |  |  |  |
| T1                                    | <3cm   | keine Infiltration des Lappenbronchus                        | keine  | keine                              | kein Befall der Pleura visceralis |  |  |  |  |  |
| T2                                    | >3cm   | > 2 cm Abstand zur Carina                                    | keine  | weniger als 1 Lungenflügel         | Pleura visceralis befallen        |  |  |  |  |  |
| T3                                    |  | < 2 cm Abstand zur Carina                                    | Brustwand, der mediastinalen Pleura, Zwerchfell oder parietales Pericard | ein ganzer Lungenflügel            | Pleura visceralis befallen        |  |  |  |  |  |
| T4                                    |  | Carina befallen, separate Tumorknoten im selben Lungenlappen | Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Ösophagus oder Wirbelsäule     |                                    | maligner Pleuraerguß              |  |  |  |  |  |
| <b>Lymphknotenstatus</b>              |  |  |  |                                    |                                   |  |  |  |  |  |
| <b>Lymphknoten von Tumor befallen</b> |  |  |  |                                    |                                   |  |  |  |  |  |
| N0                                    | keine Lymphknoten betroffen  |  |  |                                    |                                   |  |  |  |  |  |
| N1                                    | peribronchiale oder ipsilaterale hiläre Lymphknoten                          |  |  |                                    |                                   |  |  |  |  |  |
| N2                                    | ipsilaterale mediastinale oder subcarinale Lymphknoten                       |  |  |                                    |                                   |  |  |  |  |  |
| N3                                    | kontralaterale mediastinale oder Skalenus- oder supraklavikuläre Lymphknoten |  |  |                                    |                                   |  |  |  |  |  |
| <b>M-Status</b>                       |  |  |  |                                    |                                   |  |  |  |  |  |
| <b>Vorliegen von Metastasen</b>       |  |  |  |                                    |                                   |  |  |  |  |  |
| M0                                    | keine Fernmetastasen   |  |  |                                    |                                   |  |  |  |  |  |
| M1                                    | Fernmetastasen vorhanden   |  |  |                                    |                                   |  |  |  |  |  |

Tab.3: TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms nach UICC (Wittekind und Wagner, 1997)

#### 1.3.4.3.3 Klassifikation des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Im Rahmen der klinischen Routine hat sich für die kleinzelligen Bronchialtumore eine Unterscheidung in "limited disease" (LD) und "extensive disease" (ED) nach dem Vorschlag der International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) durchgesetzt (Abrams et al., 1988): Das "limited disease" (LD) beschreibt kleinzellige Bronchialtumore, deren Ausdehnung auf einen Hemithorax beschränkt ist, wobei das Mediastinum und ipsilaterale supraklavikuläre Lymphknoten mitbetroffen sein können. Im Stadium "extensive disease" (ED), das bei etwa 60 - 70 % der Patienten zum

Zeitpunkt der Diagnosestellung vorliegt, werden diese Grenzen überschritten. Im Stadium ED-I greift der Lymphknotenbefall auf kontralaterale hiläre und supraklavikuläre Lymphknoten über. Weitere tumorbedingte Komplikationen sind Vena-cava-superior-Syndrom, Lymphangiosis carcinomatosa oder Pleuritis carcinomatosa mit malignem Pleuraerguß. Im Stadium II werden bereits hämatogene Metastasen in der kontralateralen Lunge oder in der Leber gesehen, ferner im Skelettsystem oder im Zentralnervensystem (Niederle et al., 1999).

#### 1.3.4.4 Prognose des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Charakteristische Kennzeichen kleinzelliger Bronchialkarzinome (SCLC) sind deren rasche Tumorverdopplungszeit, ihr schnelles Wachstum und die frühzeitige Bildung von Metastasen. Unbehandelt beträgt die mittlere Überlebenszeit im limited disease 11-14 Wochen, bei dem fortgeschrittenen SCLC im ED 5 bis 7 Wochen (Hermann, 2001). Das kleinzellige Bronchialkarzinom birgt das Risiko einer frühen Metastasierung. Weder Bestrahlung noch Chemotherapie können die Überlebenszeit bei einem Auftreten von zerebralen Metastasen, das 30-50% der Patienten mit SCLC betrifft, günstig beeinflussen (Niederle et al., 1999).

Eine operative Resektion des Tumors kommt in dem Stadium T1-2 N0-1 in Betracht, das lediglich 5% der Patienten betrifft (Preiß et al., 2002).

#### 1.3.4.5 Prognose des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms

Zirka 30% der Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom können mit einem chirurgischen Eingriff kurativ behandelt werden (Senn et al., 1998).

Trotz vielfältiger Behandlungsansätze, die Zytostatika und Bestrahlungen umfassen können, lassen sich nur partielle und kurzfristige Tumorremissionen erzielen. Kommt es zum Ansprechen auf die Therapie, so kann mit einer Verlängerung des Überlebens auf 12 bis 15 Monate gerechnet werden. Falls weder Lymphknoten- noch Fernmetastasen vorliegen (Stadium T1-2 N0 M0), liegt die Fünfjahresüberlebensrate zwischen 60 und 80%, bei Lymphknotenbefall im Stadium T1-2 N1 M0 beträgt sie 40 bis 60 % und in den Stadien T1-2 N2 M0 und T3 N0-2 M0 jeweils zwischen 20 und 40% (Hermann, 2001). Bei Voranschreiten des nichtkleinzelligen Bronchialtumors beträgt die mittlere Überlebensdauer 3-4 Monate (Senn et al., 1998).

#### 1.3.4.6 Klinisch relevante Tumormarker für bronchiale Tumore

Aus der umfangreichen Gruppe von Strukturen, Antigenen, Genmutationen, für die eine Assoziation mit dem Bronchialkarzinom belegt wurde, spielen klinisch vor allem zwei Moleküle eine Rolle als Tumormarker:

Bei dem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom konnte für das Cytokeratinfragment Cyfra 21-1 eine klinische Relevanz ermittelt werden, welches ein lösliches Produkt aus Zytoskelettproteinen des Zytokeratins 19 darstellt (Lamerz et al., 2000). Für die Bestimmung von Cyfra 21-1 im Serum von Tumorpatienten wurde eine Sensitivität von 52% errechnet. Untersuchungen an einer gesunden Vergleichsgruppe ergaben eine Spezifität von 92% (Karnak et al., 2001).

Bei dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) kommt der neuronenspezifischen Enolase (NSE) eine Bedeutung als Tumormarker im Serum zu (Abrams et al., 1988; Yamaguchi et al., 1995). Die Sensitivität der NSE-Bestimmung wird mit 77% angegeben (Lamerz et al., 2000).

Die Serumspiegel der genannten Tumormarker bronchialer Karzinome dienen zur Verlaufskontrolle der Erkrankung, wobei ein Wiederanstieg der Serumspiegel ein Rezidiv andeuten kann, während sich das Ansprechen auf eine Therapie über einen Abfall der Serumspiegel des Tumormarkers abschätzen lässt (Lamerz et al., 2000).

#### 1.3.4.7 Molekular-onkologische Marker für Bronchialtumore

Nicht nur bei der feingeweblichen Untersuchung, sondern auch auf der molekularen Ebene lassen sich ausgeprägte Unterschiede finden zwischen den Subtypen maligner bronchialer Tumore. Sie könnten Anhaltspunkte liefern für die Ätiologie des Bronchialkarzinoms und die maligne Entartung, die Entdifferenzierung, die abnorme Proliferation und die Destruktion gesunden Gewebes durch maligne entartete Zellen.

##### 1.3.4.7.1 Autokrine Wachstumsfaktoren

Sowohl bei dem nichtkleinzelligen als auch dem kleinzelligen Bronchialkarzinom konnte die Synthese von autokrinen Wachstumsfaktoren wie Gastrin-freisetzendes Peptid (Gastrin releasing peptide, GRP) beschrieben werden (Richardson et al., 1993). Der langlebige Vorläufer Pro-Gastrin releasing Peptide (Pro-GRP) wird als Serummarker für das kleinzellige Bronchialkarzinom diskutiert (Lamy et al., 2000). Bedingt durch eine Überexpression der Peptidhormone scheint ein autokriner Loop von Gastrin-freisetzendem Peptid (GRP) zu existieren. Sowohl bei kleinzelligen als auch nichtkleinzelligen bronchialen Tumorzelllinien konnten Rezeptoren für GRP detektiert werden (Fathi et al., 1996).

Im normalen Lungenparenchym spielen dieses Peptidhormone eine Rolle bei der Organentwicklung und der Rekonstitution geschädigten Gewebes, während sie als Genprodukte von Protoonkogenen den Einfluß von Onkogenen in malignen Geweben verstärken können (Viallet et al., 1996).

#### 1.3.4.7.2 Tyrosinkinasen

Ein Signal zur Proliferation kann bei bronchialen Karzinomen über den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und seine membranständigen Rezeptoren EGFR I (Synonym: erbB-1) und EGFR II (Synonyme: erbB-2, HER2-neu) vermittelt werden, die als Tyrosinkinasen fungieren. Bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) häufig (Brabender et al., 2001), nicht aber bei kleinzelligen Lungentumoren (SCLC) wurden Überexpression von EGFR-II und Genmutationen nachgewiesen (Richardson et al., 1993).

Kleinzellige Bronchialkarzinome indes exprimieren eine weitere transmembranäre Tyrosinkinase, c-KIT (CD117), den Rezeptor für den Stammzellfaktor (SCF), der im nicht-malignem Fall auf myeloischen Vorläuferzellen beherbergt ist, jedoch bei Tumoren ein Protoonkogen darstellen kann. Seine Stimulation begünstigt die Proliferation der Tumorzellen (Krystal et al., 1996).

Parakrine Wachstumssignale können über den Insulin-like Growth factor 1 (IGF 1), -2 (IGF 2) und dem Platelet-derived Growth Factor (PDGF) verstärkt werden, die ebenfalls bei dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) nachgewiesen werden konnten (Sekido et al., 1998).

#### 1.3.4.7.3 Protoonkogene

In die molekulare Pathogenese bronchialer Karzinome involviert scheint das nukleäre Protoonkogen myc zu sein, das in kleinzelligen und nichtkleinzelligen bronchialen Tumoren aktiviert gefunden wurde. Eine transkriptionale Dysregulation oder eine Genamplifikation von myc können zur Überexpression von Proteinen der MYC-Familie führen. Sie treten bei dem SCLC häufiger auf als bei dem NSCLC, sowie bei Metastasen häufiger als bei Primärtumoren (Krystal et al., 1988).

Von Mutationen des RAS-Oncogens schien das kleinzellige Bronchialkarzinom praktisch nicht betroffen zu sein, während nichtkleinzellige Vertreter zu etwa 20% ein mutiertes RAS-Oncogen enthalten können (Wistuba et al., 2001).

#### 1.3.4.7.4 Apoptoseresistenz

Das schlechte initiale Ansprechen nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome auf die angewandte Polychemotherapie und die rasche Resistenzinduktion kleinzelliger Bronchialkarzinome kann zumindest teilweise auf eine gestörte Apoptoseinduktion zurückgeführt werden (Hermann, 2001).

Protektiv gegenüber Apoptose wirkt sich unter anderem das Protoonkogenprodukt Bcl-2 aus. Eine Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 wurden bei dem kleinzelligen Bronchialkarzinom häufig (Kaiser et al., 1996), bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen nur vereinzelt nachgewiesen (Pezzela et al., 1993). Die Ergebnisse zur Bcl-2-Expression stehen im Gegensatz zur klinisch beobachteten Ansprechbarkeit kleinzelliger bronchialer Tumore gegenüber Chemotherapie, so dass weitere proapoptotische Mechanismen bei der genannten Tumorentität zur Wirksamkeit

der Chemotherapie beitragen (Wistuba et al., 2001). Auf das Überleben von Patienten mit SCLC schien eine Überexpression von Bcl-2 keinen relevanten Einfluss auszuüben (Maitra et al., 1999).

Als Oberflächenmoleküle, die mit der Einleitung der Apoptose assoziiert sein können, wurden die TNF-Rezeptoren untersucht. Auf mRNA-Ebene wurden bei normalen Lungenzellen beide TNF-Rezeptoren mit 55 kDa und 75 kDa nachgewiesen, bei Tumorzellenlinien auch der TNF-Rezeptor mit 55 kDa, der 75 kDa-TNF-Rezeptor jedoch nur bei 40% der Karzinome, was mit einer verminderten Ansprechbarkeit proapoptotischer Signale einhergehen kann (Shimomoto, 1995).

#### 1.3.4.7.5 Tumorsuppressorgene

Auch bei dem Bronchialkarzinom besitzt das Tumorsuppressorgen tp53 eine wichtige Bedeutung (Sekido et al., 1998). Funktionsverluste des Tumorsuppressors p53 wurden bei dem Bronchialkarzinom auf Missense-Mutationen und konsekutiver Akkumulation mutierten p53-Proteins zurückgeführt (Wistuba et al., 2001). Bei dem kleinzelligen Bronchialkarzinom wurden häufige hemizygote Deletionen des Chromosomenabschnitts 17p13 nachgewiesen, auf dem das p53-Gen liegt (Wistuba et al., 2000). Weitere Mutationen am verbleibenden Allel bergen das Risiko der p53-Inaktivierung, insbesondere bei dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (Takahashi et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer p53-Mutation mit der Dauer und der Intensität der Exposition von Zigarettenrauch und seinen Karzinogenen korreliert (Harris, 1996).

Neben dem bekannten Tumorsuppressor p53 wurden auch Mutationen bei anderen Tumorsuppressoren, etwa p16, beschrieben, das in mutierter Form bei "Kleinzellern" selten, dafür häufig bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen angetroffen werden konnte (Sekido et al., 1998). Mutationen, Deletionen, alternatives Splicing können auch bei dem Bronchialkarzinom zu einer Dysfunktion des p16-CyclinD1-CDK4-Retinoblastom-Signalweges führen, zu einem Kontrollverlust der Blockade des Eintritts der Zelle in die Synthese-Phase (S-Phase) und zur Proliferation einer maligne entarteten Zelle (Harris, 1996).

#### 1.3.4.7.6 Immuntherapeutischer Stellenwert bisheriger Tumormarker

Bei den beschriebenen Tumormarkern für bronchiale Karzinome handelt es sich um Produkte aus dem Metabolismus der Tumorzelle, die überexprimiert werden, freigesetzt werden und frei zirkulieren. Sie eignen sich nur bedingt als therapeutische Zielstrukturen. Eine ausschließlich zytosolische Lokalisation des Antigens schließt zummindest eine Erkennung des Immunsystems durch Antikörper oder immunkompetente Zellen aus.

Eine Ausnahme stellt der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor II (HER-2/neu) dar, der sich als Oberflächenmolekül nicht nur auf Mammakarzinomzellen, sondern auch bei dem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom, am häufigsten bei

Adenokarzinomen, angetroffen werden konnte. Eine Überexpressionen von HER-2/neu konnte mit einer Neigung zu frühzeitiger Metastasierung und damit zu einer ungünstigen Prognose in Verbindung gebracht werden. Es wird diskutiert, ob bei einer Prävalenz von 29% für die Überexpression von HER-2/neu bei noch nicht metastasierten NSCLC-Tumoren eine therapeutische Anwendung des Trastuzumabs in Betracht kommt (Brabender et al., 2001; Han et al., 2002).

Andere, an der Oberfläche lokalisierte Moleküle wie das Adhäsionsmolekül NCAM oder die Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie IGF-1 sind möglicherweise nicht tumorspezifisch, sondern werden auch auf nicht-tumoralen somatischen Zellen exprimiert. Als Erkennungsstrukturen für eine aktive oder passive antitumorale Immuntherapie wären an der Zelloberfläche tumorspezifisch exprimierte Antigene wünschenswert.

### **1.3.5 Kopf-Hals-Tumore**

Nach ihrer Lokalisation werden maligne Tumore der Kopf-Hals-Region in vier Untergruppen unterschieden: Mundhöhlen-, Oropharynx-, Hypopharynx- und Larynxkarzinome (Bier et al., 1999a; 1999b; Lentrodt et al., 1999; Hartenstein, 2001).

#### **1.3.5.1 Mundhöhlenkarzinom**

Maligne Tumore aus dem Kopf-Hals-Bereich, die in der Mundschleimhaut, dem oberen und unteren Alveolarfortsatz, einschließlich der Gingiva, dem harten Gaumen, den vorderen zwei Dritteln der Zunge und des Mundbodens lokalisiert sind, werden als Mundhöhlenkarzinome bezeichnet (Bier et al., 1999a).

Das Mundhöhlenkarzinom wird als sehr bösartig eingestuft, es führt unbehandelt innerhalb von vier Jahren zum Tode. Trotz operativer Entfernung des Primärtumors beträgt die Fünfjahresüberlebensrate 40%. Die Heilungsrate für ein Mundhöhlenkarzinom im Stadium T1 beträgt 74%, sie sinkt bei Tumoren im Stadium T4 auf 30% ab. Ursächlich hierfür sind vor allem lokale Rezidive und die begrenzten Aussichten der derzeitigen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten. Die operative Entfernung eines Mundhöhlenkarzinoms bedeutet für den Patienten eine schwerwiegende funktionelle Beeinträchtigung beim Schlucken und Sprechen, sowie eine entstellende Veränderung der Fazies (Lentrodt et al., 1999).

#### **1.3.5.2 Oropharynxkarzinom**

Dorsal geht die Mundhöhle in den Oropharynx über. Er liegt kranial vom Nasopharynx und kaudal vom Hypopharynx. Maligne Tumore des Oropharynx umfassen ihrer anatomischen Lokalisation nach die Valleculae glossoepiglotticae ohne die linguale Epiglottisfläche, den Zungengrund bis zu den Papillae circumvallatae, die laterale Pharynxwand oberhalb der Plica pharyngoepiglottica, die Tonsillen, die Gaumenbögen,

die Vorderfläche des weichen Gaumens inklusive Gaumenzäpfchen (Uvula) und die Rachenhinterwand vom weichen Gaumen abwärts bis zum Kehlkopfberrand (Bier et al., 1999a).

Oropharynxkarzinome liegen häufig im Bereich der Gaumenmandeln. Karzinome des Oropharynx greifen auf benachbarte Strukturen wie den Zungengrund sowie den Hypopharynx, die Rachenwand oder den weichen Gaumen über. Zungengrundkarzinome breiten sich ulzerierend und infiltrierend aus. Werden sie diagnostiziert, haben sie sich häufig bereits tief in die Zungenwurzel ausgebreitet, die Mittellinie erreicht und überschritten. Ein Tumorwachstum wurde auch unter einer makroskopisch unauffälligen Schleimhaut festgestellt (Bier et al., 1999a).

Bei Diagnosestellung sind bei Karzinomen des weichen Gaumens und der Pharynxwand in knapp 50% der Fälle bereits regionäre Lymphknoten befallen, bei bösartigen Zungengrund- und Tonsillentumoren in 75%. Etwa 15% der Patienten mit Oropharynxkarzinom zeigen bei Diagnosestellung bereits bilateral befallene Lymphknoten (Bier et al., 1999a).

Fernmetastasen treten bei 10 bis 20% der Patienten auf. Sie betreffen häufig die Leber, Knochen und das Gehirn. Scheitert die lokoregionäre Tumorkontrolle, ist in über 60% mit Fernmetastasen zu rechnen.

Ein hoher Anteil fortgeschrittenener Tumorstadien bedingt eine insgesamt schlechte Prognose des Oropharynxkarzinoms. Die Fünfjahresüberlebensrate liegt insgesamt bei 33% (Senn et al., 1998). Lediglich bei einem im Stadium T1 N0 diagnostizierten Tumor besteht eine 70%ige Heilungsrate. Bei regionärer Metastasierung liegt die Heilungsaussicht bei 20 bis 50%, wohingegen ausgedehnte Oropharynxkarzinome trotz Operation, Nachbestrahlung oder Radiochemotherapie nur zu 10 bis 20% geheilt werden können. Ebenso prognostisch ungünstig wirkt sich der Befund von Halslymphknotenmetastasen aus. Er reduziert die Heilungsrate um 30 bis 60% (Bier et al., 1999a).

### 1.3.5.3 Hypopharynxkarzinom

Maligne epitheliale Tumore des Rachens, die in der Schleimhaut zwischen Oropharynx und Speiseröhre lokalisiert sind, werden als Hypopharynxkarzinome bezeichnet. Der Hypopharynx umgibt die Hinter- und Seitenwände des Kehlkopfes. Unterbezirke des Hypopharynx sind die Sinus piriformes, die Postkrikoidregion und die Hypopharynhinterwand (Bier et al., 1999b).

Hypopharynxkarzinome imponieren fast ausschließlich als mäßig oder schlecht differenzierte Plattenepithelkarzinome. Sehr selten leiten sich die malignen Zellen von den Speicheldrüsenzellen ab (Bier et al., 1999b).

Hypopharynxkarzinome entstehen zu etwa 90% im Sinus piriformis. Sie gehen von der medialen Sinuswand aus. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Übergreifen auf den Larynx, die Taschenfalten, die Stimmklappen sowie zu einem Umwachsen des Aryknorpels. Die hervorgerufene Stimmbandfixation macht sich unter anderem durch eine nur mehr hauchige Stimme bemerkbar. Die Ausbreitung des Karzinoms führt häufig zu einer Aushöhlung des Kehlkopfskeletts. Mitbefallen werden auch die

Schilddrüse oder die prälaryngeale Muskulatur. Karzinome, die an der Hypopharynxhinterwand und an der Postkrikoidregion lokalisiert sind, treten seltener auf. Hypopharynxkarzinome neigen auch zu submukösem Wachstum und zu perineuraler Infiltration (Bier et al., 1999b).

Der Lymphknotenstatus bei Hypopharynxkarzinomen wird analog den Mundhöhlenkarzinomen erhoben. Aufgrund der dichten Versorgung des Hypopharynx mit Lymphgefäßen treten Lymphknotenmetastasen bei 70% der diagnostizierten Karzinome auf. Bei Karzinomen am Sinus piriformis besteht eine 10%ige Risiko für einen bilateralen Lymphknotenbefall. Tumore an der Pharynxhinterwand bergen ein 60%iges Risiko für eine bilaterale Absiedlung. Bei zirka 20 bis 30% der Patienten mit Hypopharynxkarzinom bilden sich trotz regionärer Tumorkontrolle hämatogene Metastasen. Sie besiedeln bevorzugt Lunge, Leber und Gehirn (Bier et al., 1999b).

Bei weniger als 5% der Patienten liegt ein frühes Stadium ohne Lymphknotenbefall vor. Bei diesen kleinen Läsionen ohne Metastasen in den regionären Lymphknoten beträgt die Fünfjahresüberlebensrate 70% (Senn et al., 1998). Die Mehrzahl der Hypopharynxkarzinome liegt in weit fortgeschrittenem Stadium vor und weist Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen auf. Insgesamt ergibt sich für die Tumorentität der Hypopharynxkarzinome eine Fünfjahresüberlebensrate von lediglich 20 bis 25% (Bier et al., 1999b).

#### 1.3.5.4 Larynxkarzinom

Bösartige Neubildungen des Kehlkopfes können von supraglottischen, glottischen und subglottischen Bezirken ausgehen. Zu den supraglottischen zählen der Kehldeckel (Epiglottis), der mediale Anteil der aryepiglottischen Falten, die Arytanoidregion und die Taschenfalten (Plicae vestibulares). Supraglottisch lokalisierte Karzinome machen 30 bis 35% der bösartigen Larynxtumore aus. Die glottischen Anteile betreffen die Stimmlippen (Plicae vocales). Glottische Karzinome stellen mit 60 bis 65 Prozent die Mehrheit der Larynxkarzinome. Der subglottische Bezirk des Larynx beginnt drei bis fünf Millimeter unterhalb der freien Stimmlippenkante. Er reicht bis zur Unterkante des Ringknorpels (Cartilago cricoidea) des Kehlkopfes. Der Anteil subglottischer Larynxkarzinome beträgt zirka 5% (Haas et al., 1999).

Larynxkarzinome weisen je nach ihrer Lokalisation, Tumorgröße, Metastasen und Behandlung eine unterschiedliche Prognose auf. Die Fünfjahresüberlebensrate beträgt bei supraglottischen und glottischen Karzinomen im Stadium T1 zirka 90% und fällt auf zirka 40% bei supraglottischen und 50% bei glottischen Karzinomen im Stadium T4 ab. Bei subglottisch angesiedelten Larynxkarzinomen zeigt sich eine Fünfjahres-Überlebensrate von lediglich 40% (Senn et al., 1998; Haas et al., 1999).

Aufgrund der massiven Beeinträchtigung beim Sprechen auch bei kehlkopferhaltenden Behandlungen, der Erfordernis mehrfacher Operationen, die nach vollständiger Laryngektomie die Schluckfunktion zu rekonstituieren versuchen, und der Erfordernis, eine Ersatzstimme zu lernen, bedeutet ein Larynxkarzinom auch nach seiner Behandlung eine massive Einbuße in der verbleibenden Lebensqualität. Gegenwärtig sind weder eine Transplantation des Larynx verfügbar, die eine physiologische Schluck-

und Sprechfunktion nach Laryngektomie wiederherstellen könnte, noch Therapien, die aufgrund tumorassozierter oder tumorspezifischer Strukturen eine selektive Bekämpfung von malignen Zellen des Larynxkarzinoms ermöglichen würden (Haas et al., 1999).

### 1.3.5.5 Molekulare Marker für Kopf-Hals-Tumore

Die bei anderen Entitäten üblichen Tumormarker CEA und CA19-9 erwiesen sich für Kopf-Hals-Tumore mit 15% beziehungsweise 12% als zu wenig sensitiv (Walther et al., 1993). Hinzu kam, dass die erhöhten Serumspiegel genannter Moleküle weder eindeutig mit dem klinischen Verlauf korrelierten, noch, dass sie sich als direkte therapeutische Zielstrukturen anbieten.

Zwar wurde in der gleichen Arbeit auch das Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCC) mit einer Sensitivität von 46% detektiert, doch eignet sich dieses Antigen wegen seiner geringen Tumorspezifität derzeit lediglich, um Lymphknoten auf das Vorhandensein von Metastasen epithelialer Kopf-Hals-Tumore zu analysieren (Hamakawa et al., 1999). Ähnlich auch das Epitheliale Membran-Antigen (EMA). Es erwies sich als zu wenig tumorspezifisch, um als Kontrolle für den Verlauf der Erkrankung eingesetzt werden zu können (Nakashima et al., 1992).

Die experimentelle onkologische Forschung sucht auch für die Entität der Kopf-Hals-Tumore nach Strukturen, in denen sich maligne oder benigne entartete Zellen unterscheiden. Aus dem ätiologisch möglicherweise bedeutsamen Befund von viralen Infektionen, beispielsweise von Papillomaviren in Mundhöhlenkarzinomen (Sisk et al., 2000; Almadori et al., 2002) ließ sich bislang keine therapeutische Intervention ableiten.

Bei den Kopf-Hals-Tumoren wurde eine Assoziation der Dichte von oberflächenständigen Fas-Rezeptoren (CD95) auf Tumorzellen und der leukozytären Infiltration gezeigt (Jäckel et al., 2001), die eine immunologische Bedeutung von oberflächenständigen Molekülen auf den malignen Einzelzellen unterstreicht.

Seitens tumorassozierter Hitzeschockproteine wurde das Molekül Hsp60 als oberflächenständiges Molekül auf Mundhöhlenkarzinomen beschrieben und mit einer Immunerkennung durch  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in Verbindung gebracht (Anupama et al., 1999).

In einer Vorarbeit von Kaur et al. (1998) wurde die Detektion des Hitzeschockproteins Hsp70 auf Kopf-Hals-Tumoren diskutiert, wobei sich die Kopf-Hals-Tumorentitäten nicht wesentlich in ihren Häufigkeiten Hsp70-positiver Analysen unterschieden. In diesem Falle wurde eine Analysenmethode gewählt, welche die Vitalität immunzytometrisch über den Ausschluss des Nachweises des kernständigen Proliferating Cell Nuclear Antigens (PCNA) führte. Somit wurden in erster Linie proliferierende Zellen in den Zellzyklus-Abschnitten der G1- und der S-Phase ausgeschlossen, in denen die PCNA-Expression erhöht ist, während Membranläsionen der disaggregierten Zellen, die nicht zu einer Bindung des Antikörpers gegen PCNA führten, unter Umständen kaum zwischen zytosolisch vorliegendem und oberflächenständigem Hsp70 unterscheiden ließen.

### 1.3.6 Makropathologische Einteilung der Tumore

Während die Durchflusszytometrie als Routinemethode für Knochenmarks- und Blutzellanalysen in der Hämatologie verbreitet ist (Rothe und Schmitz, 1996; Campana und Behm; 2000), handelte es sich bei der Immunphänotypisierung von vitalen Einzelzellen aus soliden malignen und nicht-malignen Gewebebiopsien um ein neu zu etablierendes Anwendungsgebiet für die Immunphänotypisierung.

Im Gegensatz zur Analyse von Zelllinien wurden zusätzliche diagnostisch-pathologische, mikroskopische und makroskopische Eigenschaften der einzelnen untersuchten Tumorbiopsien berücksichtigt.

Üblich ist in der Pathologie eine histologische Begutachtung eines soliden Tumors (Böcker et al., 2001). Diese beschreibt anhand von Gewebeschnitten den zellulären Aufbau des Tumors und seine Ausbreitung in tiefere Gewebeschichten und Nachbarorgane (Eder und Gedigk, 1990; Stevens und Lowe, 1997; Böcker et al., 2001). Klinische Relevanz besitzt vor allem die TNM-Klassifikation der UICC (Wittekind und Wagner, 1997), die neben dem Tumorstadium den Lymphknotenbefall und das Vorliegen von Fernmetastasen anführt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde den makropathologischen Eigenschaften des vorliegenden Gewebes Rechnung getragen (Thomas, 2002). Ein wichtiges Augenmerk lag auf der Konsistenz des Tumorgewebes (Eder und Gedigk, 1990), die die „Härte“ des vorliegenden Gewebes umschrieb.

Die Konsistenz des epithelialen Tumors (Karzinoms) hängt ab vom Verhältnis des Tumorparenchyms und des tumorassoziierten Bindegewebes (Tab.4): Karzinome mit einem überwiegenden Anteil an Tumorparenchym weisen eine weiche Konsistenz auf und werden als medullär bezeichnet. Einfache Karzinome zeigen mikroskopisch ein ausgeglichenes Verhältnis von Tumorparenchym und Stroma und makroskopisch eine mittelfeste Konsistenz. Liegt der Stromaanteil deutlich höher als das Tumorparenchym, so liegt ein szirrhöses Karzinom vor mit einer schnittfesten Konsistenz (Hildebrandt, 1998).

| <i>Karzinomart</i> | <i>Volumenverhältnis von<br/>Tumorparenchym und<br/>Bindegewebe</i> | <i>Konsistenz</i> |
|--------------------|---|-------------------|
| medullär           | mehr als 50% Tumorparenchym   | weich             |
| einfach            | etwa 50%  | mittelfest        |
| szirrhös           | über 50% Bindegewebe  | fest              |

Tab.4: *Makroskopische Definition von Karzinomarten nach Tumorparenchym, Bindegewebe und Konsistenz (nach Hildebrandt, 1998).*

### 1.3.7 Akute myeloische Leukämie

#### 1.3.7.1 Definition der akuten myeloischen Leukämie

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine maligne Erkrankung von frühen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (Lübbert et al., 2002).

Der Anteil dieser als Blasten bezeichneten Zellen ist im Vergleich zu gesundem Knochenmark deutlich erhöht. Zugleich unterbleibt deren Differenzierung zu funktionstüchtigen Monozyten und Granulozyten. Seltener sind die Thrombopoese und die Erythropoese betroffen (Harrison, 1999; Büchner, 1997).

Eine akute myeloische Leukämie stellt sich klinisch entweder als Neudiagnose ohne Vorerkrankung dar, man spricht von der *de novo*-AML, oder sie entwickelt sich auf dem Boden vorbestehender Reifungsstörungen im Knochenmark, die als myelodysplastische Syndrome (MDS) zusammengefasst werden. Das MDS kann über eine Reifungsstörung der Thrombopoese, Granulopoese, Monopoese und/oder Erythropoese unter bislang ungeklärten Umständen zu einer *sekundären* akuten myeloischen Leukämie führen (Harrison, 1999; Büchner et al., 1999b).

#### 1.3.7.2 Einteilung der akuten myeloischen Leukämie nach WHO

Von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde eine Neuklassifikation der akuten myeloischen Leukämie vorgenommen (Tab.5).

Sie stellt die myeloischen Leukämien mit wiederkehrenden genetischen Anomalien denjenigen myeloischen Leukämien mit einer Dysplasie mehrerer Zellreihen oder unklarer betroffener Zellreihe den therapiebedingten, myeloischen Leukämien und myelodysplastischen Syndromen und den anders nicht charakterisierten Leukämien gegenüber. Nach den Vorgaben der Weltgesundheitsbehörde WHO wurde bei mehr als 20% Blasten eine akute myeloische Leukämie definiert (Harris et al., 1999).

Diese Einordnung berücksichtigt die klinische und therapeutische Relevanz der leukämie-assoziierten Translokationen. Die Vorgabe der WHO stellt die akuten myeloischen Leukämien mit definierten karyotypischen oder anamnestischen Merkmalen fest, die für die Abschätzung einer Prognose Bedeutung erlangt haben.

In der Routinediagnostik der akuten myeloischen Leukämie hat die Morphologie neben der Immunphänotypisierung und der Untersuchung des Karyotyps ihren festen Stellenwert (Büchner, 1997), da sie eine Selektion von Leukämien mit prognostisch distinkten Merkmalen gemäß der WHO-Klassifikation ermöglichen.

---

### **WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie**

---

*AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Abnormalitäten*

- mit t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO)
- mit inv(16)(p13;q22) oder t(16;6)(p13;q22), (CBFb(MYH11))
- akute Promyelozytenleukämie: mit t(15;17)(q22;q12)
- (Mutationen an PML/RAR $\alpha$  und Varianten)
- mit 11q23 (MLL) Abnormalitäten

*AML mit Dysplasie mehrerer Zellreihen (multilineär)*

- mit MDS-Vorphase
- ohne MDS-Vorphase

*AML und myelodysplastisches Syndrom, therapiebedingt*

- nach alkylierenden Substanzen
- nach Topoisomerase-Inhibitoren

*AML ohne weitere Kategorie*

- mit minimaler Ausreifung
- ohne Ausreifung
- akute myelomonoytäre Leukämie
- akute monoblastische und monozytäre Leukämie
- akute Erythroleukämie
- akute Basophilienleukämie
- akute Panmyelosis mit Myelofibrose
- myeloisches Sarkom

*Akute Leukämie unklarer Zellreihe*

---

Tab. 5: Klassifizierung der akuten myeloischen Leukämie nach Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation (Harris et al., 1999)

#### 1.3.7.3 Häufigkeit der AML

Akute myeloische Leukämien (AML) machen zirka 70% der akuten Leukämien im Erwachsenenalter aus (Büchner, 1997; 1999).

Die Inzidenz der akuten myeloischen Leukämie beträgt 3-4 Neuerkrankungen jährlich pro 100.000 Einwohner. AML-Erkrankungen können in jedem Alter auftreten, der Altersmedian liegt bei 61 Jahren. Jenseits des siebzigsten Lebensjahres steigt die Inzidenz auf 15 bis 20 Fälle an. (Büchner, 1999b; Lübbert, 2002)

#### 1.3.7.4 Ätiologie

Der genaue Mechanismus der Entwicklung einer AML ist bislang unbekannt. Als toxikologische Risikofaktoren werden die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und alkylierenden Substanzen angesehen. Ebenso wie bei soliden Tumoren wird auch bei der Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie ein mehrstufiger Prozess mit genetischen Veränderungen vermutet (Lin und Tohal, 1999).

Smith et al. (1998) beobachteten in ihrer Studie an chinesischen Arbeitern, die beruflich Benzol ausgesetzt waren, vermehrte chromosomale Translokationen und Aneusomien der Chromosomen 8 und 21 in den zirkulierenden Lymphozyten phänotypisch Gesunder. In einem Falle konnte die Translokation t(8;21) und das zugehörige Fusionstranskript AML1-MTG8 detektiert werden. Diese Aberration wird auf Leukämiezellen der akuten myeloischen Leukämie mit Differenzierung (AML M2, siehe unten) in Verbindung gebracht. Jenes Ergebnis legt nahe, dass mutagene Agenzien wie Benzol an einer Induktion einer akuten myeloischen Leukämie mitbeteiligt sein können, indem sie über eine fortgesetzte Exposition genetische Schäden akkumulieren lassen, zu denen auch solche zählen, die typischerweise bei Leukämien auftreten. Eine familiäre Prädisposition ist bislang nicht bewiesen. Patienten mit Down-Syndrom haben ein 20-fach höheres Risiko als Menschen mit unauffälligem Chromosomensatz (Harrison, 1999).

Das myelodysplastische Syndrom (MDS) stellt in zweifacher Hinsicht einen Risikofaktor für eine akute myeloische Leukämie dar: Einerseits über die ohnehin gestörte Ausreifung der Zellen im Knochenmark, andererseits deswegen, weil je nach Schweregrad und Gehalt an unreifen Blasten mit einer antineoplastischen Chemotherapie begonnen wird. Letztere birgt ihrerseits über den Einsatz mutagener und karzinogener Einzelsubstanzen ein Risiko für die Ausbildung einer akuten myeloischen Leukämie (Büchner, 1997).

### 1.3.7.5 Zytologische Definition der AML

Die französisch-amerikanisch-britische Arbeitsgruppe (FAB) definierte eine akute Leukämie ab einem Anteil von 30% Blasten im Knochenmark. (Bennett et al., 1976 ; 1985a; 1991). Bei Gesunden beträgt der Anteil von Blasten höchstens 5%.

Die akute myeloische Leukämie wird nach ihrem lichtmikroskopischen Erscheinungsbild von der FAB-Gruppe in acht Hauptgruppen (AML MO - AML M7) unterschieden (Tab.6), die sich von den Zwischenstufen der normalen Myelopoiese, Monopoiese, Megakaryopoiese und Erythropoiese ableiten (Bennett et al. 1976, 1985, 1991).

Neben der Morphologie der Zellen lassen zytochemische Färbungen eine Unterscheidung hämatopoetischer Zellen in der lichtmikroskopischen Unterscheidung zu: Die Zugehörigkeit derblastären Leukämiezellen zur myeloischen Reihe kann zytochemisch über den Nachweis der Myelo-Peroxidase (MPO) in den Granula der Myeloblasten und Promyelozyten und deren Anfärbung mit Sudanschwarz belegt werden.

Für Blasten monozytärer Differenzierung (AML M4, AML M5) kommt der zytochemische Nachweis der monozytären unspezifischen Esterase zum Einsatz, die das Substrat  $\alpha$ -Naphthylazetat zu spalten vermag. Die Blasten der Erythroleukämie (AML M6) lassen sich zytochemisch weder mit Hilfe von  $\alpha$ -Naphthylacetatesterase noch mittels eines Substrats für die Myelo-Peroxidase anfärben. In einigen Fällen gelingt eine Anfärbung des Zytoplasmas der erythropoetischen Blasten mit Periodsäure-Schiff-

Reagenz. Für die Megakaryoblasten der AML M7 unterbleibt ein positives Resultat sowohl für den Nachweis der monozytenspezifischen Esterase als auch für die myeloische Peroxidase (Büchner et al., 1999; Beutel und Ganser, 2000).

| Bezeichnung nach FAB | Klinische Bezeichnung                                     | Zytologische Kriterien  | Zytochemie  |
|----------------------|---|---|---|
| AML M1               | Akute Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung                | Blasten mit wenigen Granula im Zytoplasma   | Peroxidase-positiv  |
| AML M2               | Akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung                 | Auer-Stäbchen, feinste Granula auf 20-50% der Blasten, Monozyten weniger als 20%  | Peroxidase-positiv  |
| AML M3               | Akute Promyeloblastenleukämie                             | Blasten mehrheitlich Promyelozyten mit ausgeprägter Granularität und Auer-Stäbchen  | Peroxidase-positiv  |
| AML M4               | Akute Myelomonoytäre Leukämie                             | 30 bis 80% der Blasten sind Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten, Monozyten zu mehr als 20% der Zellen                                      | Peroxidase- und Esterase-positiv  |
| AML M4eo             | Akute Myelomonoytäre Leukämie mit atypischen Eosinophilen | wie AML M4, zusätzlich bis zu 5% eosinophile, unreife Vorstufen mit atypischen groben tief basophilen Granula neben normalen eosinophilen Granula | Peroxidase- und Esterase-positiv  |
| AML M5               | Akute Monozytenleukämie                                   | monozytäre Zellen >80% aller nicht-erythropoetischen Zellen, Granulozyten <20%  | Esterase-positiv  |
| AML M5a              | Akute unreifzellige Monozytenleukämie                     | >80% der monozytären Zellen sind Blasten, vereinzelt Auerstäbchen   | Esterase-positiv  |
| AML M5b              | Akute reifzellige Monozytenleukämie                       | Monoblasten reifen über Promonozyten bis hin zu reifen Monozyten, weniger als 80% der Monozyten sind Blasten                                      | Esterase-positiv  |
| AML M6               | Akute Erythroleukämie                                     | >50% der Markblasten (und mehr) gehören zur Erythropoese, Anteil der Myeloblasten: > 30%  | Erythropoese: PAS-positiv   |
| AML M7               | Akute Megakaryoblastenleukämie                            | > 30% Megakaryoblasten, Blasten mit ausgeprägter Anisozytose, Faservermehrung im Knochenmark  | Elektronenmikroskopischer Nachweis der Plättchenperoxidase sowie Glykoprotein |

|        |   |  |                    |
|--------|---|--|--------------------|
|        |   |  | IIb/IIIa           |
| AML M0 | AML mit minimaler Markerdifferenzierung | undifferenzierte Blasten ohne Granula, nur <i>zytogenetisch oder immunphänotypisch</i> von der AML M1 und ALL zu unterscheiden | Peroxidase-negativ |

Tab.6: Einteilung akuter myeloischer Leukämien durch die Französisch-amerikanisch-britische Arbeitsgruppe (FAB) anhand mikroskopisch-morphologischer Kriterien der Hämatopoese und mit zytochemischem Nachweis der myeloiden Peroxidase und der monozytären Esterase (nach Bennett et al., 1976; 1985; 1991; Büchner, 1997).

Für die Diagnose dieser Form der AML und die akute minimal differenzierte myeloische Leukämie (AML M0) kommt die immunologische Charakterisierung mittels spezifischen monoklonalen Antikörpern für myeloide Antigene in Betracht, wobei zugleich lymphozytäre Antigene ausgeschlossen werden (Campana und Behm, 2000).

#### 1.3.7.6 Häufigkeit der Subtypen der akuten myeloischen Leukämie

Die von der FAB-Arbeitsgruppe unterschiedenen Subtypen treten klinisch mit unterschiedlicher Frequenz auf. Am häufigsten werden die Myeloblastenleukämien AML M1 (26%), AML M2 (34%) und die Myelomonzytäre Leukämie AML M4 (22%) diagnostiziert. (Tab.7):

| AML Subtyp<br>nach FAB | Häufigkeit<br>[%] |
|------------------------|-------------------|
| AML M1                 | 26%               |
| AML M2                 | 34%               |
| AML M3                 | 6%                |
| AML M4                 | 22%               |
| AML M5                 | 8%                |
| AML M6                 | 2%                |
| AML M7                 | 2%                |

Tab.7: Häufigkeit der nach FAB unterschiedenen Subtypen der akuten myeloischen Leukämie (nach Heyll et al., 1999)

Die Promyelozytenleukämie AML M3 macht etwa 6% der akuten myeloischen Leukämien aus. Der Anteil der Monozytenleukämien (AML M5) beträgt etwa 10% (Heyll et al., 1999).

Erythroleukämien (AML M6), akute minimal differenzierte myeloische (AML M0) und Megakaryoblastenleukämien (AML M7) gehören mit jeweils 2% und weniger zu den seltenen Formen (Senn et al., 1998).

### 1.3.7.7 Molekulare Marker der akuten myeloischen Leukämie

Die akute myeloische Leukämie zählt zu den wenigen malignen Erkrankungen, bei denen neben ihrer immunologischen Charakterisierung auch zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen charakteristische genetische Anomalien identifizierten.

Ein klonaler Charakter bei menschlichen Leukämien, d.h. deren Abstammung von *einer* mutierten Zelle, wurde erstmals an der chronischen myeloischen Leukämie (CML) gezeigt, bei der die charakteristische Mutation des Philadelphia-Chromosoms auf sämtlichen Leukämiezellen nachgewiesen werden konnte (Nowell, 1960). Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) gelang ein Beleg der Klonalität anhand der Expression des uniformen Isoenzyms der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PD): Bei Frauen, die heterozygot waren für dieses X-chromosomal vererbte Gen, zeigte sich im Falle einer akuten Leukämie eine Genexpression, die entweder limitiert war auf die Granulozyten oder auf Granulozyten und Erythrozyten. Dies entsprach einer leukämischen Transformation von myeloiden Vorläuferzellen auf reiferem oder unreiferem Niveau (Fialkow et al., 1987).

Weitere Veränderungen auf chromosomaler und genetischer Ebene wurden charakterisiert, von denen einige mit distinkten Subtypen der akuten myeloischen Leukämie assoziiert sind.

#### 1.3.7.7.1 t(15;17)

Bei der akuten Promyelozytenleukämie (FAB: AML M3) handelt es sich um einen distinkten Subtyp der akuten myeloischen Leukämie. Durch die Translokation t(15;17) werden zwei Gene rupturiert, nämlich auf dem langen Abschnitt von Chromosom 15 das Gen des Putative Transcription Factors (PML) und des Retinoidsäure-Rezeptor  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) auf Chromosom 17 (de The et al., 1990; Kakizuta et al. 1991). Die entstandenen chimären Gene können beide transkriptionell aktiv sein, wobei PML-RAR $\alpha$  auf Chromosom 15 abgelesen wird und Messenger-RNA von PML-RAR $\alpha$  bei allen Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie nachgewiesen werden konnten (Borrow et al., 1992). Fusionstranskripte von RAR $\alpha$ -PML, gebildet auf Chromosom 17, wurden nur bei zirka 70% der Patienten gesehen (Grignardi et al., 1993).

Klinisch zeichnet die akute Promyelozytenleukämie das Risiko von Koagulopathien aus, da in den Vesikeln der leukämischen Promyelozyten aberrant hohe Mengen an Gerinnungsfaktoren gebildet werden (Büchner et al., 1999).

#### 1.3.7.7.2 t(8;21)

Zu den häufigsten chromosomalen Aberrationen zählt die Translokation t(8;21). Sie kommt hauptsächlich bei AML M2 (nach FAB) vor. Die Translokation betrifft die Gene AML1 auf Chromosom 21 und MTG2 (ETO) auf Chromosom 8. Das entstandene Fusionsgen AML1-ETO wurde bei 20% der adulten akuten Myeloblastenleukämien mit

Ausreifung (AML M2) und 40% der im Kindesalter auftretenden AML M2 nachgewiesen (Erickson et al. 1992).

Akute Leukämien mit dem Fusionsgen AML1-ETO zeigen eine vergleichsweise gute Ansprechbarkeit auf die Chemotherapie mit einer hohen Remissionsrate und einem hohen Anteil an Patienten, die rezidivfrei bleiben (Grimwade et al., 1998), dennoch bleibt auch bei dieser Leukämieform das Risiko für ein Rezidiv insbesondere in den ersten beiden Jahren erhöht (Liu Yin, 1999).

#### 1.3.7.7.3 inv(16)

Die akute myelomonozytäre Leukämie mit einer abnorm hohen Anzahl Eosinophiler (AML M4eo) kann assoziiert sein mit einer Inversion auf Chromosom 16 (inv(16)) (Le Beau et al., 1983). Sowohl inv(16) als auch die Transition t(16;16) unterbrechen das Gen für den Cor binding Faktor beta (CBF $\beta$ ) auf 16q22 und auf Chromosom 16q13 das Gen Myosin smooth muscle haevy chain (MYH11). Die Mutation führt zum Fusionsgen CBF $\beta$ -MYH11 (Liu et al., 1993). Inv(16) beziehungsweise CBF $\beta$ -MYH11 charakterisiert klinisch einen Subtyp der AML mit ebenfalls überdurchschnittlich hohen Remissionsraten und symptomfreiem Überleben (Grimwade et al., 1998) und betrifft zirka 5% der AML M4eo (Senn et al., 1998).

#### 1.3.7.8 Klinischer Stellenwert der wiederkehrenden genetischen Anomalien

Trotz ihrer teilweise geringen Häufigkeit besitzen die oben beschriebenen genetischen Anomalien klinische Relevanz, weil ihre Präsenz, die über RT-PCR gezeigt werden kann (Borrow et al., 1992), das Verbleiben von Leukämiezellen im Knochenmark im Sinne eines Minimal residual disease (MRD) anzeigt (Muto et al., 1996), welches ein Risiko für ein AML-Rezidiv darstellt (Liu Yin, 1999; Campana und Pui, 1995).

Andererseits ermöglicht die Beurteilung der genetischen Schädigung der leukämischen Blasten eine Korrelation mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung (Slovac et al., 2000; Grimwade et al., 2001; Schoch und Haferlach, 2002).

Die zytogenetischen und molekularbiologischen Merkmale lassen die akuten myeloischen Leukämien in drei Gruppen unterscheiden mit günstiger, intermediärer und ungünstiger Prognose (Tab. 8) (Harris et al., 1999).

Akute myeloische Leukämien mit dem Fusionstranskript AML1/ETO, auch bezeichnet als PML/RAR $\alpha$ , d.h. der Translokation t(15;17)(q22;q11-12) (Tallman et al., 1997; Lo Coco et al., 1998; Sanz et al., 1999), oder mit dem Nachweis des Gentranskripts von CBF- $\beta$ /MYH11, die der Inversion an Chromosom 16 (inv16) oder t(16;16)(p13;q22) entspricht, weisen eine günstigere Prognose auf als andere Leukämieformen. Eine günstige prognostische Aussicht weisen auch Leukämien auf, welche die Translokation t(8;21) tragen, die morphologisch häufig mit der akuten Myeloblastenleukämie mit Ausreifung (AML M2) assoziiert ist.

| Prognostische Einleitung nach zytogenetischen Merkmalen |                    |                                     |
|---|--------------------|-------------------------------------|
| <i>günstig</i>  | <i>intermediär</i> | <i>ungünstig</i>                    |
| t(15;17)  | normaler Karyotyp  | mehr als drei komplexe Aberrationen |
| t(8;21)   | +8                 | del(5q)                             |
| inv/t(16)   | +11                | -5, -7                              |
|   | 12p abn            | inv/t(3)                            |
|   |                    | del/t(11q23)                        |

Tab.8: Prognostisch relevante karyogenetische Merkmale der AML (*t*: Translokation, *inv*: Inversion, +: Duplikation, -: Deletion) und deren Einteilung in eine günstige, intermediäre und ungünstige Prognose (nach Harris et al., 1999; Willmann, 2000, Grimwade et al., 1998)

In die prognostisch intermediäre Gruppe der AML gehen Duplikationen der Chromosomen 8 oder 11 ein, ferner Anomalien auf dem kurzen Abschnitt von Chromosom 12, oder Leukämien mit zytogenetisch unauffälligem Karyotyp.

Die Genrearrangements von MLL an 11q23 hingegen deuten auf eine ungünstigere Prognose für die Merkmalsträger (Dastague et al., 1995; Mrózek et al., 1997; Grimwalde et al., 1998). Für den Verlauf der Erkrankung ungünstig werden komplexe genetische Aberrationen angesehen, sowie Verluste der Chromosomen 5 oder 7, Deletionen des Chromosomenabschnitts 5q, Inversionen oder Transitionen an Chromosom 3 oder Mutationen des Chromosomenabschnitts 11q23 (Grimwade et al., 1998; Harris et al., 1999; Willmann, 2000; Slovac et al., 2000). Im Gegensatz zu den in der Hämatologie eingesetzten diagnostischen Methoden der mikroskopisch-morphologischen Analyse und der Immunphänotypisierung kommt der Untersuchung des Karyotyps und seiner leukämie-assoziierten Aberrationen eine zusätzliche tragende Rolle in der Prognostik zu.

Wissenschaftliche Arbeiten, die weitere Eigenschaften charakterisieren, die mit der akuten myeloischen Leukämie assoziiert sein können, orientieren sich aus diesem Grunde an den beschriebenen karyotypischen Merkmalen, sofern eine Abklärung der prognostischen Relevanz eines leukämieassoziierten Markers vorgenommen werden soll.

### 1.3.7.9 Immunzytochemische Marker der akuten myeloischen Leukämie

Die immunologische Klassifikation der Leukämien spiegelt die Entwicklung auf dem Gebiet der monoklonalen Antikörper wider. Mehrere hundert monoklonale Antikörper können herangezogen werden, um Leukozyten zu charakterisieren und deren Expressionsprofil als "Cluster of differentiation" (CD) einzuteilen (Kishimoto 1992). Das "International Workshop on Leucocyte Differentiation Antigens" klassifizierte 166 derartige Antigene bis zum Jahr 2001.

Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und weitere hämatopoetische Zellen konnten auf diese Weise anhand ihres Antigenspektrums beschrieben werden. Die

---

immunphänotypische Untersuchung von Knochenmark vermag Leukämiezellen anhand ihrer Antigenexpression einer Differenzierungsstufe und somit einer „Lineage-Zugehörigkeit“ zuzuordnen.

In Zweifelsfällen der morphologischen Untersuchung besitzt die Immunphänotypisierung eine wichtige differential-diagnostische Funktion (Campana und Behm, 2000; Thalhammer-Scherrer et al., 2002).

Die im Zytosol lokalisierte Myeloperoxidase (MPO) wird bei Granulozyten und deren Vorläufern der myeloischen Reihe exprimiert und Differenzierung in die immunzytometrische Diagnostik der akuten myeloischen Leukämien miteinbezogen.

Monozytär differenzierte Zellen exprimieren weiterhin u.a. den LPS-Rezeptor gp55 (CD14), so dass dieser Marker auch für akute myeloische Leukämien der Subtypen AML M4 und AML M5 in Frage kommt.

Akute myeloische Leukämien, die sich von erythroiden Vorstufen ableiten (AML M6), kommen selten vor. Ihr erythroider Phänotyp lässt sich über den Transferrin-Rezeptor (CD71) und Glycophorin A (GPA) charakterisieren. Diese Marker exprimieren Vorläuferzellen der roten Reihe in späten Stadien. Für die ebenfalls vorhandenen Leukämiezellen mit myeloischer Differenzierung kommen die myeloischen Marker CD13, CD33 und die Myeloperoxidase in Betracht (Campana und Behm, 2000).

Leukämiezellen der akuten megakaryoblastischen Leukämie (AML M7) tragen häufig die Immunmarker Integrin  $\alpha$ II $\beta$  (GPIIb, CD41a) und Integrin  $\beta$ III (GPIIIa, CD61) neben dem myeloischen Antigen CD33. Die anderen myeloischen Antigene CD13, CD34, CD36, CD45 und HLA-DR indes treten weniger häufig auf (Bennett et al., 1985b)

Die Diagnose der akuten myeloischen Leukämie mit minimaler Differenzierung (AML M0) wird gestellt, wenn ein oder mehrere myeloische Antigene, etwa CD13, CD15, CD33, CDw65, CD117 oder die Myeloperoxidase nachgewiesen werden können (Campana und Behm; 2000). Gleichzeitig fehlen bei der AML M0 die für andere Leukämieformen typische Marker. Nicht detektiert werden können demnach das für T-Zell-Lineage typische Antigen CD3, gleichfalls das auf B-Zell-Percursoren deutende Antigen CD79a und megakaryozytäre Antigene CD41 (Bennett et al., 1985a).

Die immunphänotypische Untersuchung der akuten myeloischen Leukämie stützt sich auf den Nachweis myeloischer, monozytärer oder - je nach Differenzierungsgrad - Immunmarker aus beiden Gruppen. Die Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse zur Häufigkeit hämatopoetischer Vorläuferantigene (CD34, HLA DR), myeloider (CD33, CD13, MPO, CDw65, CD117), monozytoider (CD14, CD15), thrombozytoider (CD36) und erythroider Antigene (GPA) von Campana und Behm (2000) bei der Immunphänotypisierung von Blasten akuter myeloischer Leukämie.

Leukämiezellen aller myelozytärer und monozytärer Subtypen (AML M0 bis M5) können die myeloiden Marker CD13, CD33, CDw65 sowie die stammzellassoziierten Marker CD34, CD117 und MPO exprimieren (Bene et al.; 1995, Rothe und Schmitz, 1996; Knapp et al., 1994; Buccheri et al., 1992; Bennett et al., 1976; 1985a), wenngleich ihre Verteilung und Häufigkeit klinisch erheblich schwanken kann (Terstappen et al., 1992).

Die Europäische Gruppe zur immunologischen Charakterisierung der Leukämien (EGIL) definierte die akute myeloische Leukämie immunzytometrisch durch die Expression von mindestens zwei der Marker Myeloperoxidase, CD13, CD33, CDw65, CD117. Nach den Kriterien der Europäischen Gruppe zur immunologischen Charakterisierung von Leukämien (EGIL) gilt ein Marker als positiv, wenn er auf 20% oder mehr der malignen Zellen vorgefunden wird (Bene et al., 1995).

Man charakterisiert akute myeloische Leukämie über die Expression von myeloischen Markern, deren Frequenz gegenüber gesundem Knochenmark deutlich erhöht ist, namentlich CD33 und CD13.

| Immunmarker | AML Subtyp nach FAB |           |           |           |           |           |           |           |
|-------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|             | AML<br>M0           | AML<br>M1 | AML<br>M2 | AML<br>M3 | AML<br>M4 | AML<br>M5 | AML<br>M6 | AML<br>M7 |
| CD34        | 75                  | 75        | 75        | <10       | 75        | <10       | 30        | 30        |
| CD117       | 75                  | 75        | 75        | 30        | 75        | 30        | 30        | 30        |
| HLA DR      | 75                  | 75        | >80       | <10       | >80       | >80       | 75        | 30        |
| MPO         | >80                 | >80       | >80       | >80       | >80       | >80       | >80       | 0         |
| CD13        | 75                  | 75        | >80       | >80       | 75        | 75        | 75        | 30        |
| CD33        | 75                  | 75        | >80       | >80       | >80       | >80       | 75        | 75        |
| CD15        | 30                  | 75        | 75        | 75        | 75        | 75        | 30        | 30        |
| CDw65       | 30                  | 75        | 75        | 75        | >80       | >80       | 75        | <10       |
| CD14        | 0                   | 0         | 0         | 0         | 75        | 75        | 0         | 0         |
| GPA         | 0                   | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | >80       | <10       |
| CD36        | 0                   | 0         | 0         | 0         | 30        | 75        | 75        | 75        |

Tab.9: Prozentuale Häufigkeit von Immunmarkern bei akuten myeloischen Leukämien, gegliedert nach den FAB-Kriterien der Blastenmorphologie (Campana und Behm, 2000)

Eine weitere Möglichkeit der immunzytometrischen Leukämiediagnostik besteht im Nachweis einer aberranten Koexpression von myeloischen oder anderen hämatopoetischen Markern, beispielsweise des hämatopoetischen Markers gp105 (CD34) und des Lipopolysaccharidrezeptors CD14 als Marker für eine monozytoiden Differenzierung, worin sich leukämische Myeloblasten von gesunden Vorläufern unterscheiden können (Campana und Behm, 2000; Bene, 1995; Bennett, 1985a).

Hinzu kommt der Nachweis des Oberflächenantigens HLA-DR, dessen Expression neben myeloiden Vorläuferzellen auch Monozyten sowie B- und T-Lymphozyten betreffen kann. Mit Ausnahme der akuten Promyelozytenleukämie (AML M3) und der akuten Megakaryoblastenleukämie (AML M7) besitzt das Antigen HLA DR eine Prävalenz von zirka 75% bei den akuten myeloiden Leukämien (Campana und Behm, 2000).

Mit Hilfe von geeigneten multiparametrischen durchflusszytometrischen Analysen gelingt es auf diesem Wege, leukämische Blasen anhand ihrer Markerexpression mit einer Sensitivität von 1: 10<sup>4</sup> zu identifizieren (Campana und Pui, 1995).

## 1.4 Untersuchung des Vorkommens von Hsp70 auf humanen Tumoren

Es galt, eine Analysenmethode für Tumorbiopsien zu entwickeln, die speziell auf der Zelloberfläche exprimierte Antigene erfasst, um die tumorbiologische, pathologische und klinische Relevanz einer Hsp70-Expression an der Zelloberfläche maligner Zellen untersuchen zu können.

Eine möglicherweise vorhandene Expression von Hsp70 an der Zelloberfläche sollte quantifiziert und hinsichtlich der Zellart näher charakterisiert werden.

Ferner war die statistische Signifikanz der Merkmalsexpression verschiedener Tumor- und Normalgewebe zu ermitteln. Falls möglich, sollten klinisch relevante Vergleiche zwischen Tumoren angestellt werden.

### 1.4.1 Mögliche analytische Verfahren

Um die Bindung eines spezifischen, monoklonalen Antikörpers an ein charakterisiertes Antigen zu erfassen, stehen mehrere Untersuchungsmethoden zur Verfügung, deren Prinzip eine Markierung des Antikörpers mit einem Farbstoff, einem radioaktiven Isotop, einem Enzym ist, das mit Hilfe eines Substrats einen Farbstoff bildet. Die Farbintensität beziehungsweise ihre erzeugte Strahlung korreliert jeweils mit dem Umfang der erfolgten Antigen-Antikörper-Bindung und wird quantitativ erfasst.

Für quantitative Bestimmung von löslichen Bestandteilen, etwa Hormone im Blutserum, steht der Radioimmunoassay (RIA) zur Verfügung. Eine Antigenquantifizierung an Gewebeschnitten erfolgt über die Immunhistochemie. Sie lässt Aussagen zu über die Verteilung eines Antigens im Gewebeverband von Zellen und beschreibt auf diese Weise den Aufbau des untersuchten Gewebes.

Die Präsenz von Hsp70 auf der Zelloberfläche der humanen kultivierten Zelllinien wurde von Frau Prof. Multhoff elektronenmikroskopisch, immunhistochemisch mit „Erythrorosetting“ (Multhoff et al., 1999), durch selektive Biotinylierung der Zelloberfläche und durchflusszytometrisch mit Hilfe Hsp70-spezifischer Antikörper nachgewiesen (Multhoff et al., 1997a).

Die Immunhistochemie vermag aufgrund der begrenzten mikroskopischen Auflösung zwar Zuordnungen zur Lokalisation eines immunphänotypisch erfassten Antigens leisten. Wenn es jedoch darum geht, ein Antigen ausschließlich auf der Zelloberfläche zu detektieren, das auch im Zytosol nachweisbar ist, erscheint die Immunhistochemie als zu wenig sensitiv.

Um eine Antigenverteilung bei Zellorganellen innerhalb einer Zelle zu beschreiben, kommt eine elektronenmikroskopische Untersuchung, etwa mit Hilfe Goldmarkierter Antikörper in Frage, die jedoch experimentell umfangreich ist und für eine Reihenuntersuchung zu aufwendig ist.

#### 1.4.1.1 Messprinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erfasst, quantifiziert oder sortiert mit Hilfe computergestützter Technologie Einzelzellen oder zelluläre Bestandteile nach ihren Streulichteigenschaften und nach ihrer Fluoreszenzemission, sofern eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörpern vorgenommen worden ist (Loken et al., 2000).

Die Zellgröße korreliert mit dem Parameter Vorwärtsstreulicht, das Seitwärtsstreulicht gibt die Granularität der Zelloberfläche bzw. des Zellbestandteils wieder (Carter und Ormerod, 2000).

Die Immunfluoreszenz wendet Farbstoffe an, die durch Laserlicht angeregt werden und aus dem aktivierte Zustand unter Energieabgabe in Form von Fluoreszenz in einer anderen Wellenlänge zurückkehren. Das Durchflusszytometer registriert diese Fluoreszenzsignale mit Hilfe optischer Filter simultan.

Nach exakt durchgeführter rechnerischer Kompensation einer möglichen Überlagerung der Fluoreszenzemissionen parallel vorliegender Farbstoffe kann deren Intensität bei *einer* bestimmten Wellenlänge bestimmt werden. Diese ist proportional zur Häufigkeit des Antigens auf einer Zelle, das immunfluoreszent markiert wurde.

Die Messung mehrerer tausend Zellen soll repräsentative Aussagen zur Verteilung und Häufigkeit des Antigens ermöglichen, das mit einem fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörper quantifiziert wurde.

#### 1.4.1.2 Pathologische Anwendungen der Durchflusszytometrie

Der Hauptaspekt der durchflusszytometrischen Untersuchung von soliden Tumorproben in der Pathologie liegt in der Bestimmung der Ploidität der Tumorzellen (Watson et al., 1987; Ormerod et al., 1995) und des quantitativen zellulären Anteils in der S-Phase des Zellzyklus.

Vorteilhaft an der DNA-Durchflusszytometrie ist ihre Anwendbarkeit an Zellen, die präpariert wurden aus in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten (Yamazoe et al., 1994). Um die DNA mit Bromdesoxyuridin (BrDU) oder anderen DNA-bindenden Farbstoffen anfärben zu können, wird die Zellmembran permeabilisiert (Ormerod, 2000).

Neben dem DNA-Gehalt können zytosolisch lokalisierte Antigene erfasst werden, wie Zytokeratin als Marker für epitheliale Zellen (Yamazaki, 1993) oder Vimentin für Bindegewebe (Corver et al., 2000).

#### 1.4.1.3 Voraussetzungen für die Durchflusszytometrie an Gewebeproben

Die Durchflusszytometrie erfordert in jedem Falle Suspensionen von Einzelzellen, Chromosomen oder Zellbestandteilen (Böcker et al., 2001).

Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen an peripherem Blut oder Knochenmark kann die Voraussetzung einer Suspension von Einzelzellen erbracht werden. Um gezielt Leukozyten untersuchen zu können, bietet sich die Lyse von Erythrozyten mit Hilfe geeigneter Pufferlösungen an. Gilt es, neben Erythrozyten auch Granulozyten abzutrennen, so werden diese in der Dichtegradientenzentrifugation von den mononukleären Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark abgetrennt.

Aus Geweben müssen Einzelzellen erst durch enzymatische oder physikalische Methoden herausgelöst werden, um sie in einer Zellsuspension durchflusszytometrisch untersuchen zu können (Carter und Ormerod, 2000).

Um proteolytische Abbauvorgänge so gering wie möglich zu halten, kann im Rahmen dieser Untersuchung ein nicht-enzymatisches Verfahren der Gewebedisaggregation zum Einsatz, das hinsichtlich seiner Einwirkung auf das Gewebe und die Gewebearten zu validieren war.

#### 1.4.1.4 Erfordernisse an die immunphänotypische Bestimmung von Hsp70 als Oberflächenmarker

Bei der Evaluation der Expression von Hsp70 auf der Oberfläche von Leukämiezellen bot sich die kombinierte Analyse mit leukämie-assoziierten Oberflächenantigenen an.

Für die Analyse von Einzelzellen aus Primärtumorbiopsien oder nichtmalignen Gewebebiopsien musste ein immunphänotypisches Verfahren gewählt werden, das die Zuordnung einer möglichen Antigenexpression zur Zelloberfläche ermöglichte. Dieses Vorhaben wurde durch die Verwendung des Vitalitätsfarbstoffs Propidiumiodid umgesetzt. Es wurde davon ausgegangen, dass seine Bindung an die DNA des Zellkerns nur im Falle rupturer Zellen möglich war. Es leitete sich ab, dass im Falle von nicht durch Propidiumiodid angefärbten Zellen eine intakte Zellmembran vorlag, die für die Identifikation von Oberflächenantigenen relevant war.

Tumorzelllinien aus der Zellkultur stellten sich durchflusszytometrisch weitgehend homogen in ihren Streulichteigenschaften dar, ihre Vitalität konnte als quantitativ beschrieben werden (Multhoff et al., 1995a, Ormerod et al., 2000, Farkas et al., 2003). Anders bei den Gewebebiopsien: Sowohl die Scattereigenschaften als auch die Vitalität waren für die Einzelzellen aus den Gewebebiopsien zu ermitteln.

| <i>Vorkommen von Zellen im Primärmaterial</i> | <i>Immunphänotypische Charakterisierung</i>               |
|---|---|
| Erythrozyten,                                 | fehlende MHC-Klasse-I-Expression                          |
| Thrombozyten                                  |   |
| epitheliale Zellen                            | MHC-Klasse-I  |
| Bindegewebe                                   | MHC-Klasse I, AS02  |
| Leukozyten                                    | MHC-Klasse I, CD45  |
| maligne Zellen                                | MHC-Klasse I,<br>oberflächenständiges<br><i>Hsp70 (?)</i> |

Tab.10: In der Einzelzellsuspension aus Gewebebiopsien vorkommende Zellarten und deren Identifikation anhand von möglichen Oberflächenantigenen.

Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung der Fraktion vitaler Einzelzellen aus den soliden Gewebebiopsien musste weiter differenziert werden zwischen kernlosen Erythrozyten und Thrombozyten, sowie zwischen epithelialen, fibrotischen und leukozytären Zellen.

Wie in Tab.10 angegeben, ließen sich Thrombozyten und Erythrozyten als mögliche Bestandteile in der Fraktion vitaler Zellen anhand ihrer fehlenden MHC-Klasse-I-Expression klassifizieren.

Als MHC-Klasse-I-Moleküle tragende vitale Zellen wurden die weiteren Zellarten charakterisiert. Eine positive Markierung von fibrotischen Zellen wurde mit dem bindegewebespezifischen Antikörper AS02 durchgeführt. Vitale leukozytäre Zellen wurden über das Oberflächenantigen CD45 positiv selektiert.

Für die zu identifizierenden malignen Zellen wurde der Nachweis der MHC-Klasse I-Expression vorausgesetzt, wobei andere Zellarten wie die tumorinfiltrierenden CD45-tragenden Leukozyten und AS02-tragende Zellen des Bindegewebes durchflusszytometrisch in Mehrfachfärbungen zu analysieren waren, um eine auftretende Hsp70-Detektion zuordnen zu können.

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Pathologische Daten der untersuchten Tumorbiopsien

### 2.1.1 Biopsien kolorektaler Karzinome und kolorektaler Normalmucosa

#### 2.1.1.1 Stichprobenumfang bei kolorektalen Karzinomen und Normalgeweben

Insgesamt 159 kolorektale Tumorbiopsien von präoperativ unbehandelten Patienten wurden im Zeitraum von August 1999 bis Oktober 2001 untersucht. Aus dem Institut für Pathologie des Klinikums der Universität Regensburg stammten 74 Biopsien, aus der Frankenwaldklinik Kronach 82, aus dem Carl von Hess-Krankenhaus in Hammelburg 2 und aus dem Anatomisch-pathologischen Institut Prof. Röcklein / Dr. Zimmermann in Regensburg eine kolorektale Tumorbiopsie.

Makroskopisch unauffällige Normalmucosa stand als Negativkontrolle in 65 Fällen von den selben Patienten zur Verfügung.

Das durchschnittliche Alter der 159 Tumorpatienten (55 weibliche, 104 männliche) betrug 63,1 Jahre (28 bis 87 Jahre), der Altersmedian lag bei 64 Jahren.

#### 2.1.1.2 Tumorlokalisierung der untersuchten kolorektalen Karzinome

| <i>Lokalisation des Tumors</i> | <i>Anzahl<br/>analysierter<br/>Tumorproben</i> | <i>prozentualer<br/>Anteil</i> |
|--------------------------------|--|--------------------------------|
| Zökum                          | 8  | 5%                             |
| Colon ascendens                | 8  | 5%                             |
| rechte Flexur                  | 4  | 3%                             |
| Colon transversum              | 10   | 6%                             |
| linke Flexur                   | 1  | 1%                             |
| Colon descendens               | 6  | 4%                             |
| Colon sigmoideum               | 28   | 18%                            |
| Colon (ohne nähere Angabe)     | 9  | 6%                             |
| Rektum                         | 85   | 53%                            |

Tab.11: Lokalisation und Häufigkeit untersuchter kolorektaler Tumorbiopsien

Die 159 kolorektalen Tumorbiopsien waren wie folgt verteilt (Tab.11): 74 Karzinome mit Lokalisation im Kolon und 85 Tumorbiopsien aus dem Bereich des Rektums. Innerhalb der Kolonkarzinome wurde folgende Verteilung erfasst: acht Zökumkarzinome, acht Colon ascendens-Karzinome und vier Tumorbiopsien aus dem Bereich der rechten Flexur.

10 Karzinome wurden entnommen aus dem Colon transversum, eine Biopsie aus der linken Kolonflexur, sechs Colon descendens-Karzinome, 28 Karzinome mit Lokalisation im Colon sigmoideum und neun Kolonkarzinobiopsien ohne weitere Angabe zur Lokalisation. An Rektumkarzinomen standen 85 Tumorbiopsien zur Verfügung, die Entität stellte 53% der analysierten Tumore.

### **2.1.2 Biopsien hepatischer Metastasen**

Im Zeitraum von Dezember 1999 bis August 2001 wurden 22 Resektate von operablen, hepatischen Metastasen analysiert, die Patienten mit kolorektalen Karzinomen als Grunderkrankung entnommen wurden.

Es handelte sich um acht weibliche und 14 männliche Patienten. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 58 Jahre.

### **2.1.3 Magenkarzinome**

Im Zeitraum von November 1999 bis September 2001 konnten 24 Magenkarzinobiopsien unbehandelter Patienten nach Gastrektomie und Befundung durch den Pathologen durchflusszytometrisch untersucht werden. Die Biopsien stammten aus dem Institut für Pathologie des Klinikums der Universität Regensburg (n=8), der Frankenwaldklinik Kronach (n=5), dem Anatomisch-pathologischen Institut Prof. Röcklein u. Dr. Zimmermann Regensburg (n=11).

Die Magenkarzinopatienten waren im Durchschnitt 65,7 Jahre alt (34 bis 78 Jahre) bei einer Verteilung von 10 männlichen (42%) Patienten und 14 weiblichen Patientinnen (58%).

Punktate maligner Ergüsse von Magenkarzinopatienten wurden zur Hsp70-Analyse von den niedergelassenen Onkologen Dr. Martina Stauch aus Kronach (n=3) und Dr. Robert Dengler aus Regensburg (n=1) zur Verfügung gestellt.

### **2.1.4 Nichtkleinzellige bronchiale Tumorbiopsien**

Im Zeitraum von Mai 2000 bis November 2001 wurden insgesamt 88 bronchiale Tumorbiopsien untersucht. Die 74 Patienten (18 weiblich, 56 männlich) mit der Diagnose NSCLC waren im Durchschnitt 64 Jahre alt (37-80 Jahre, Median: 65 Jahre). 34 Tumorbiopsien davon stammten aus der Lungenklinik Hemer (Ärztlicher Leiter Dr. Thomas Freitag), 39 Resektate aus dem Anatomisch-pathologischen Institut Prof. Dr. Röcklein und Dr. Zimmermann in Regensburg, eine Tumorbiopsie wurde im Uniklinikum Regensburg reseziert.

74 nichtkleinzellige Tumorbiopsien wurden unbehandelten Patienten entnommen.

Die nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome wurden histopathologisch als 22 Adenokarzinome klassifiziert, vier weitere als bronchiolo-alveolare Karzinome, 34 Plattenepithelkarzinome, ein adenosquamöses Karzinom sowie zwei großzellige Bronchialkarzinome. Bei elf Biopsien wurde keine weitere diagnostische Spezifizierung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms mitgeteilt.

### **2.1.5 Kopf-Hals-Tumore und Normalgewebebiopsien**

Im Zeitraum von Mai 2000 bis Oktober 2001 wurden insgesamt 44 Kopf-Hals-Tumorbiopsien und sechs Lymphknotenmetastasen von Kopf-Hals-Tumoren durchflusszytometrisch untersucht. Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität Regensburg (Prof. Dr. Strutz) stammten 33 Primärtumorbiopsien und fünf Lymphknotenresekte, aus dem Krankenhaus Fulda zehn Biopsien von Primärtumoren und eine Lymphknotenmetastase. Eine Larynxkarzinobiopsie wurde aus der Lungenklinik in Hemer (Westfalen) zur Verfügung gestellt.

Ärztliche Kooperationspartner im Rahmen der Kopf-Hals-Tumor-Analyse waren der damalige Oberarzt PD Dr. O. Arndt, jetzt Chefarzt der HNO-Abteilung des Krankenhauses Weimar, und Frau PD Dr. Bockmöhler in Fulda.

Bei den 44 untersuchten Kopf-Hals-Tumorbiopsien handelte es sich um neun Mundhöhlenkarzinome, 18 Oropharynxkarzinome, 6 Hypopharynxkarzinome, elf Larynxkarzinome. Hinzu kamen sechs Lymphknotenmetastasen von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren.

Unter den 23 makroskopisch unauffälligen Normalschleimhautbiopsien befanden sich acht Exemplare, bei denen zugleich der Hsp70-Status des Tumors ermittelt wurde, und sieben weitere Probeexzisionen, die von Patienten ohne maligne Erkrankung entnommen wurden.

Bei Kopf-Hals-Tumorbiopsien wurde von einer makroskopischen Beurteilung der Konsistenz abgesehen, da Proben im Durchmesser von 3mm und darunter nicht eindeutig beurteilt werden konnten.

### **2.1.6 Tumorbiopsien für die Evaluation der Disaggregation**

Für die Analyse zur Optimierung der Parameter der manuellen Disaggregation wurden zehn konsekutiv eingesandte Tumorbiopsien herangezogen. Es handelte sich um vier Bronchialtumorbiopsien, drei kolorektale Tumorbiopsien, zwei Magenkarzinobiopsien und eine Mammakarzinobiopsie.

## 2.2 Klinische Vorgaben der akuten myeloischen Leukämie (AML)

### 2.2.1 Vergleichsgruppe nicht-leukämischen Knochenmarks

Als nicht-maligne Vergleichsgruppe konnte Knochenmark von gesunden Spendern (n=2) und Knochenmarksaspirate von AML-Patienten in kompletter Remission (n=9), d.h. mit normal ausreifender Hämatopoese, untersucht werden.

In beiden Fällen lag der klinisch vorgegebene, lichtmikroskopisch determinierte Anteil von Blasten definitionsgemäß unter 5%.

### 2.2.2 Patienten mit *de novo* akuter myeloischer Leukämie

Insgesamt wurden 80 konsekutive Knochenmarksaspirate oder periphere Blutproben von Patienten untersucht, bei denen eine *de novo* akute myeloische Leukämie diagnostiziert und zum Zeitpunkt der Knochenmarkspunktion noch keine Chemotherapie verabreicht wurde.

Bei den an einer *de novo* AML Erkrankten handelte es sich um 44 männliche und 36 weibliche AML-Patienten. Das Durchschnittsalter betrug 55 Jahre, der Median lag bei 60,5 Jahren (19 - 80 Jahre).

Nach ihren morphologischen Charakteristika wurden 17 (21%) akute myeloische Leukämien ohne Differenzierung (AML M1) beschrieben. Die Patienten (10 männlich, 7 weiblich) mit AML M1 waren im Durchschnitt 59,4 Jahre alt (Altersmedian 67 J., 25-77 Jahre). Morphologisch als akute myeloische Leukämie mit Differenzierung (FAB: AML M2) wurden 19 Knochenmarksbiopsien (24%) ausgewiesen. Das durchschnittliche Alter der neunzehn Patienten (7 männlich, 12 weiblich) war 61,4 Jahre (35-80 Jahre, Median: 66 Jahre).

Eine akute Promyelozytenleukämie (AML M3) wurde in sechs Fällen (8%) gesehen. Diese Patienten (4 männlich, 2 weiblich) waren im Mittel 35,6 Jahre alt (Altersmedian: 24 Jahre, 19-65 Jahre).

Bei 22 Patienten (28%, 11 männliche, 11 weibliche Patienten) wurde eine akute Myelomonocytenleukämie (AML M4) ermittelt. Als Durchschnittsalter wurde 50,2 Jahre (Median: 55 Jahre, 20-74 Jahre) errechnet.

Eine akute Monoblasten- bzw. Monozytenleukämie (AML M5) konnte bei 10 Patienten (12,5%, 8 männliche, 10 weibliche Patienten) untersucht werden. Für diese Patienten betrug das Durchschnittsalter 57,1 Jahre (Median 58 J., 19-78 Jahre).

Die akute Erythroleukämie AML M6 konnte an einem 76-jährigen, männlichen Patienten untersucht werden.

Nicht auf mikroskopisch-morphologischem Wege, sondern mit Hilfe der Immunzytochemie und der Immunphänotypisierung wurde bei zwei Knochenmarks-Aspiraten die Diagnose AML M0 gestellt. Die beiden männlichen Patienten waren 62 und 67 Jahre alt.

Drei Knochenmarksaspirate von AML-Patienten wurden ohne Klassifizierung nach FAB-MIC immunphänotypisch untersucht und als "unklassifizierte" Leukämien (AML

Mx) dargestellt. Die Patienten waren durchschnittlich 55 Jahre alt (19 - 80 Jahre, Median: 60,5 Jahre).

### **2.2.3 Patienten mit sekundärer akuter myeloischer Leukämie**

Fünfzehn Knochenmarksaspirate von Patienten mit einer sekundären akuten myeloischen Leukämie konnten im Zeitraum von Januar 2000 bis April 2001 untersucht werden. Morphologisch wurden sie nach den FAB-MIC-Kriterien eingeordnet: AML M1 (n=1), AML M2 (n=6), AML M4/M4eo (n=2), AML M5 (n=2), AML M6 (n=1) und unklassifizierte sekundäre akute myeloische Leukämie (n=3).

Die zehn männlichen und fünf weiblichen Patienten waren zwischen 38 und 79 Jahre alt, das Durchschnittsalter lag bei 65,9 Jahren (Altersmedian: 70,5 Jahre).

### **2.2.4 Patienten mit rezidivierter akuter myeloischer Leukämie**

In zehn Fällen stand Untersuchungsmaterial eines Rezidivs einer akuten myeloischen Leukämie zur Verfügung. Morphologisch wurden die wieder auftretenden leukämischen Blasten als akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung (AML M0) charakterisiert (n=2), als akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung (AML M2, n=3), in zwei weiteren Fällen als akute Promyelozytenleukämie (AML M3). Bei drei Knochenmarksproben waren karyotypische Merkmale evaluierbar, nicht jedoch die betreffenden mikroskopisch-morphologischen Befunde. Infolgedessen wurden letztere Leukämien als morphologisch unklassifiziert (Mx) dargestellt.

Bei den zehn Patienten handelte es sich um vier Männer und sechs Frauen im Alter von 20 bis 78 Jahren und einem Durchschnittsalter von 49 Jahren (Altersmedian: 56,0 Jahre).

### **2.2.5 Knochenmarksaspirate von Patienten mit einer AML in Persistenz**

In drei Fällen lag eine akute myeloische Leukämie in Persistenz vor. Diese betraf zwei männliche Patienten und eine weibliche Patientin im Alter von 39 bis 70 Jahren. Ihr Durchschnittsalter betrug 54,3 Jahre (Median: 54 Jahre). Morphologisch wurden diese Leukämien als akute Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung, mit Ausreifung und als akute Promyelozytenleukämie (AML M3) diagnostiziert.

## 2.2.6 Zytogenetische Merkmale der akuten myeloischen Leukämie

### 2.2.6.1 de novo AML

Bei den achtzig durchflusszytometrisch untersuchten *de novo* akuten myeloischen Leukämien waren zwölf Fälle (15%) mit einer prognostisch günstigen Zytogenetik assoziiert, 51 (64%) mit einer intermediären und 17 (21%) mit einer ungünstigen Zytogenetik (Tab.12). Die Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie, ihre mikroskopisch-morphologische Einteilung und die Altersstruktur der AML-Patienten zeigt untenstehende Tabelle:

| <b><i>De novo</i> akute myeloische Leukämie</b> |                                  | <i>Alter der Erkrankten</i>                       | <i>Prognostische Abschätzung nach zytogenetischer Einordnung</i> |                    |                  |
|---|----------------------------------|---|--|--------------------|------------------|
| <i>Einordnung nach FAB-MIC</i>                  | <i>Anzahl untersuchter Fälle</i> | <i>Durchschnittsalter (Altersbereich; Median)</i> | <i>günstig</i>   | <i>intermediär</i> | <i>ungünstig</i> |
| M1  | 17                               | 59,5 (25-77; 67,0)                                | 0  | 14                 | 3                |
| M2  | 19                               | 61,4 (35-80; 66,0)                                | 1  | 15                 | 3                |
| M3  | 6                                | 35,6 (19-65; 24,0)                                | 5  | 0                  | 1                |
| M4, M4eo  | 22                               | 57,1 (20-74; 55,0)                                | 6  | 14                 | 2                |
| M5  | 10                               | 57,1 (19-78; 58,0)                                | 0  | 4                  | 6                |
| M6  | 1                                | 76  | 0  | 1                  | 0                |
| M0  | 2                                | 64,5 (62-67; 64,5)                                | 0  | 1                  | 1                |
| unklassifiziert                                 | 3                                | 60 (50-70; 60)                                    | 0  | 2                  | 1                |
| <b>gesamt</b>                                   | <b>80</b>                        | <b>55,0 (19-80; 60,5)</b>                         | <b>12 (15%)</b>  | <b>51 (64%)</b>    | <b>17 (21%)</b>  |

Tab.12: *Klinisch-diagnostische Daten zur de novo akuten myeloischen Leukämie mit Angabe der mikroskopisch-morphologischen Subgruppe nach FAB-MIC, der Altersstruktur der Patienten und der prognostischen Einteilung nach dem zytogenetischen Profil der zugrunde liegenden de novo AML.*

### 2.2.6.2 Sekundäre akute myeloische Leukämien

Knochenmarksaspirate beziehungsweise periphere Blutproben konnten durchflusszytometrisch von fünfzehn Patienten untersucht werden, bei denen die Diagnose der sekundären akuten myeloischen Leukämie gestellt wurde (Tab.13). Die zytogenetische Analyse ergab, dass keine der sekundären akuten myeloischen Leukämien prognostisch günstige karyotypische Merkmale aufwies. Neun der fünfzehn sekundären Leukämien wurden als prognostisch intermediär eingeteilt und sechs als prognostisch ungünstig.

| <b>Sekundäre akute myeloische Leukämie</b> |                                  | <i>Alter der Erkrankten</i>                       | <i>Prognostische Abschätzung nach zytogenetischer Einordnung</i> |                    |                  |
|--|----------------------------------|---|--|--------------------|------------------|
| <i>Klassifizierung nach FAB-MIC</i>        | <i>Anzahl untersuchter Fälle</i> | <i>Durchschnittsalter (Altersbereich; Median)</i> | <i>günstig</i>   | <i>intermediär</i> | <i>ungünstig</i> |
| M1   | 1                                | 73  | 0  | 1                  | 0                |
| M2   | 6                                | 65,8 (58-75; 66,0)                                | 0  | 3                  | 3                |
| M4, M4eo                                   | 2                                | 72,5 (70-75)                                      | 0  | 1                  | 1                |
| M5   | 2                                | 58,5 (38-79)                                      | 0  | 1                  | 1                |
| M6   | 1                                | 73  | 0  | 0                  | 1                |
| unklassifiziert                            | 3                                | 64,3 (56-72; 65,0)                                | 0  | 3                  | 0                |
| <b>gesamt</b>                              | <b>15</b>                        | <b>65,9 (38-79; 65,9)</b>                         | <b>0 (0%)</b>  | <b>9 (60%)</b>     | <b>6 (40%)</b>   |

Tab.13: Sekundäre akute myeloische Leukämien: FAB-Klassifikation, Anzahl untersuchter Knochenmarksaspirate, Altersstruktur und geschätzte Prognose nach dem zytogenetischen Profil.

#### 2.2.6.3 Rezidivierte akute myeloische Leukämie

Bei den zehn rezidivierten akuten myeloischen Leukämien handelte es sich um zwei prognostisch günstige Leukämieerkrankungen, um fünf prognostisch intermediäre und drei prognostisch ungünstige Fälle (Tab.14).

| <b>Rezidivierte akute myeloische Leukämie</b> |                                  | <i>Alter der Erkrankten</i>                       | <i>Prognostische Abschätzung nach zytogenetischer Einordnung</i> |                    |                  |
|---|----------------------------------|---|--|--------------------|------------------|
| <i>Klassifizierung nach FAB-MIC</i>           | <i>Anzahl untersuchter Fälle</i> | <i>Durchschnittsalter (Altersbereich; Median)</i> | <i>günstig</i>   | <i>intermediär</i> | <i>ungünstig</i> |
| M0  | 2                                | 26,0 (21-31; 26,0)                                | 0  | 2                  | 0                |
| M2  | 3                                | 69,0 (60-78; 69,0)                                | 0  | 2                  | 1                |
| M3  | 2                                | 41,0 (20-61; 41,0)                                | 2  | 0                  | 0                |
| unklassifiziert                               | 3                                | 56,6 (39-75; 56,0)                                | 0  | 1                  | 2                |
| <b>gesamt</b>                                 | <b>10</b>                        | <b>65,9 (38-79; 65,9)</b>                         | <b>2 (20%)</b>   | <b>5 (50%)</b>     | <b>3 (30%)</b>   |

Tab.14: Rezidivierte akute myeloische Leukämie: Angaben zur mikroskopischen Diagnostik, Fallzahl, Altersverteilung und karyogenetisch-prognostische Einteilung.

#### 2.2.6.4 Persistente akute myeloische Leukämie

Die drei persistenten akuten myeloischen Leukämien wiesen in einem Falle ein karyotypisch günstiges Profil auf und bei zwei Erkrankungen ein prognostisch intermediäres (Tab.15).

| <b>Persistierende akute myeloische Leukämie</b> |                                  | <i>Alter der Erkrankten</i>                       | <i>Prognostische Abschätzung nach zytogenetischer Einordnung</i> |                    |                  |
|---|----------------------------------|---|--|--------------------|------------------|
| <i>Klassifizierung nach FAB-MIC</i>             | <i>Anzahl untersuchter Fälle</i> | <i>Durchschnittsalter (Altersbereich; Median)</i> | <i>günstig</i>   | <i>intermediär</i> | <i>ungünstig</i> |
| <b>M1, M2, M3 (je 1)</b>                        | <b>3</b>                         | <b>54,3 (39-70, 54,0)</b>                         | <b>1</b>   | <b>2</b>           | <b>0</b>         |

Tab.15: Akute myeloische Leukämie in Persistenz: Lichtmikroskopische Diagnostik nach FAB, Altersstruktur der Patienten und karyogenetisch erhobenes prognostisches Profil.

## 2.3 Einzelzellpräparation

### 2.3.1 Knochenmarksaspirate und periphere Blutproben

#### 2.3.1.1 Isolation der mononukleären Zellen

Die leukämischen Knochenmarksaspirate und peripheren Blutproben wurden zunächst einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen, um Erythrozyten und Thrombozyten zu entfernen und mononukleäre Zellen anzureichern.

Die Pipettier- und Verdünnungsschritte wurden bei Raumtemperatur in einer sterilen Werkbank (Laminar Air Flow, Cleanair, Marseilles, Frankreich) durchgeführt.

Zunächst wurde das Aspirat in Aliquots zu 5,0 ml in einem Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) mit Nährmedium RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Grossbritanien) auf 45,0 ml verdünnt und in einem zweiten Zentrifugenröhrchen über 5,0 ml Lymphozyten-Separationsmedium (PAA Laboratories, Linz, Österreich) geschichtet. Bei 2000 U/min und 20°C wurde 15 Minuten zentrifugiert (Heraeus Megafuge 3.0R, Heraeus/Kendro Langenselbold, Deutschland). Die an der Interphase angereicherten mononukleären Zellen wurden mit einer Pipette (Steripette, Costar / Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande) vorsichtig aufgesogen und in ein Falcon-Röhrchen überführt.

Um Reste des Separationsmediums zu entfernen, wurden die isolierten Zellen zweimal mit RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Grossbritanien) gewaschen und abzentrifugiert (1500 U/min, 4°C, 5 min).

Für die Mituntersuchung von Granulozyten aus normalen Knochenmarksaspiraten wurde anstelle der Dichtegradientenzentrifugation eine Lyse der Erythrozyten mit Lysepuffer (BD FACS Lysing Solution®, Becton-Dickinson, Heidelberg) und zwei Waschschritten mit RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Großbritannien) durchgeführt.

#### 2.3.1.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Lichtmikroskopisch (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) erfolgte die Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität in der Zählkammer nach Neubauer (Roth, Marienfeld, Deutschland).

Mit Hilfe von Trypanblau (Gibco BRL Paisley, Grossbritanien), gelöst zu 0,4% in PBS (Gibco BRL, Paisley, Großbritannien), konnten letale Zellen angefärbt und von den vitalen Zellen unterschieden werden.

### 2.3.1.3 Übernacht-Recovery

Um den Einfluß von Stressreaktion aufgrund der Separation auf die später durchgeführte Immunphänotypisierung gering zu halten, wurden die aus dem Aspirat erhaltenen mononukleären Zellen in Nährmedium für Zellkulturen suspendiert und über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% H<sub>2</sub>O im Brutschrank kultiviert (Heraeus/Kendro, Langenselbold, Deutschland). Für die Kurzzeitkultur wurden bis zu 5\*10<sup>6</sup> Zellen in 5-10 ml Nährmedium in Zellkulturflaschen (T25 Cell Culture Flask, Costar Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande) eingebracht.

Im Gegensatz zum Nährmedium für Tumore (Tab.16) fehlte die Beimengung von Amphotericin B. Penicillin-/Streptomycin-Lösung wurde lediglich 1%ig zugesetzt.

### 2.3.1.4 Einfrieren von kultivierten mononukleären Zellen aus Knochenmarksaspiraten

Zum Zwecke der Nachuntersuchung wurden Leukämiezellen aus der Zellkultur eingefroren.

Die Leukämiezellen wurden abzentrifugiert (1500 U/min, 4°C, 5 min), mit PBS (Gibco, Paisley, Grossbritanien) gewaschen, mit einer maximalen Zelldichte von 5\*10<sup>6</sup> Zellen pro 0,9 Milliliter auf Eiswasser in FCS (Gibco, Paisley, Grossbritanien) suspendiert, wobei Kryoröhrchen (Roth, Marienfeld, Deutschland) verwendet wurden. Das gleiche Volumen an Dimethylsulfoxid wurde als eisgekühlte Lösung zugetropft und durch einmaliges Aufziehen der Mischung vermischt. Anschließend wurden die auf Eis lagernden Kryoröhrchen bei -80°C tiefgefroren (Roth, Marienfeld, Deutschland).

## 2.3.2 Analyse solider Gewebebiopsien

### 2.3.2.1 Makroskopische Konsistenzbestimmung solider Gewebebiopsien

Um die Tumorbiopsien makroskopisch zu charakterisieren, wurde die Konsistenz herangezogen. Die Einteilung beruht zum einen auf dem histologisch ermittelten Verhältnis zwischen Tumorphänotyp und tumorassoziiertem Bindegewebe (Stroma), zum anderen auf der makroskopisch feststellbaren Konsistenz des Gewebes, die mit dem bindegewebigen Anteil korreliert (Eder und Gedingk, 1990).

Die Tumore wurden in drei Gruppen unterschieden: medulläre Karzinome mit weicher Konsistenz, einfache Karzinome mit mittlerer Konsistenz und szirrhöse mit schnittfester Konsistenz.

### 2.3.2.2 Gewebedisaggregation

Die Biopsien wurden nach pathologischer Begutachtung oder aus den OP-Bereichen freigegeben und abgeholt, gekühlt bei 4°C gelagert und sobald als möglich untersucht. Alle weiteren Arbeitsschritte an der Biopsie fanden bei Lagerung auf Eiswasser (0 - 4°C) in einer sterilen Werkbank (Cleanair, Marseilles, Frankreich) mit sterilen Einmal-Instrumenten statt.

| <b>Zusammensetzung des Tumornährmediums</b> |                     |                                |
|---|---------------------|--------------------------------|
| <i>Bestandteil</i>                          | <i>Volumen [ml]</i> | <i>Hersteller</i>              |
| RPMI 1640                                   | 500,0               |                                |
| Natriumpyruvat (10 mmol/l)                  | 5,0                 |                                |
| L-Glutamin (200 mmol/l)                     | 5,0                 | Gibco, Paisley, Grossbritanien |
| Penicillin, Streptomycin                    | 10,0                |                                |
| fötales Kälberserum (FCS)                   | 50,0                |                                |
| Amphotericin B (100 I.E.)                   | 0,5                 |                                |

Tab.16: Bestandteile des Tumornährmediums für Einzelzellen aus soliden Tumoren und nicht-malignen Gewebebiopsien.

Aus den soliden Gewebebiopsien wurden durch mechanische, nicht-enzymatische Disaggregation Einzelzellen isoliert, indem das Gewebestück in einer Petrischale (Tissue Culture Dish®, Falcon, Franklin Lakes, USA) mit einem Skalpell (Nr.22, Feather Safety Razor Co., Köln, Deutschland) eine Minute lang zerhackt wurde. Anschließend wurde es mit 10 ml eisgekühltem Tumornährmedium überschichtet (Tab.16).

Die Zellsuspension wurde durch Aufziehen einer 10ml-Steripette (Costar®, Corning / Schiphol-Rijk, Niederlande) aufgenommen und über ein 70µm-Zellsieb (Cellstrainer® von Becton Dickinson, Heidelberg) gegeben. Gewebestücke wurden durch den Filter abgetrennt und das Filtrat mit einem 50ml-Zentrifugenröhrlchen aus Polypropylen (Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) aufgefangen.

### 2.3.2.3 Vitalitätsbestimmung

Der verfügbare Anteil an vitalen Zellen im Filtrat wurde lichtmikroskopisch (Axiolab, Zeiss, Jena, Deutschland) mit Hilfe des Farbstoffs Trypanblau bestimmt, wie im Abschnitt der Zellzählung von Leukämien beschrieben.

Vitale Zellen blieben ungefärbt, Zellen mit zerstörter Membran nahmen den Farbstoff auf.

Mit der Neubauer-Zählkammer (Roth, Marienfeld, Deutschland) wurde die Gesamtzellzahl bestimmt, die aus vitalen epithelialen Zellen, Tumorzellen und Leukozyten bestand. Die Erythrozyten wurden aufgrund ihrer Morphologie charakterisiert und bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl berücksichtigt, bei der Vitalität hingegen nicht.

Aus den Gewebebiopsien präparierte Einzelzellen wurden mit einer Zellzahl von bis zu  $2,0 \cdot 10^6$  Zellen in 10 ml Tumormedium in T25-Zellkulturflaschen (Costar, Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande) bei  $37^\circ\text{C}$ , 95%  $\text{H}_2\text{O}$  und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank kultiviert (Teco 20, Selutec, Mössingen-Öschingen, Deutschland).

Ob ein Wachstum der inkubierten Zellen an der Kollagenbeschichtung der Kulturflasche eingesetzt hat, wurde im Abstand von zwei Tagen lichtmikroskopisch überprüft (Axiovert, Zeiss, Jena, Deutschland).

## 2.4 Durchflusszytometrie

### 2.4.1 Technische Voraussetzungen für die Durchflusszytometrie

Als Durchflusszytometer stand das FACScan<sup>®</sup> von Becton-Dickinson (Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung. Es enthielt einen Argon-Laser mit einer Fluoreszenzemission bei  $\lambda = 488$  nm, der neben der Messung der Streulichteigenschaften hinsichtlich Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) eine simultane Aufzeichnung von drei Fluoreszenzen ermöglichte. Es wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) verwendet (Tab.17).

Ab Dezember 2000 wurde das von der Multimmune GmbH beschaffte Durchflusszytometer FACScalibur<sup>®</sup> (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet, das neben seiner Argon-Laserlichtquelle zusätzlich mit einem Heliumlaser ausgestattet war, der mit seiner Fluoreszenzemission bei  $\lambda = 635$  nm eine zusätzliche Fluoreszenzmessung gestattete. In diesem Falle konnten der Messreihe direktkonjugierte Antikörper hinzugefügt werden, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) konjugiert waren.

| <b>Fluorophore und deren Detektion in der durchflusszytometrischen Analyse</b> |                         |                                      |                                |                              |
|--|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <i>Detektierte Fluoreszenz</i>   | <i>Laserlichtquelle</i> | <i>Fluoreszenzfarbstoff</i>          | <i>Absorptionsmaximum (nm)</i> | <i>Emissionsmaximum (nm)</i> |
| FL.1   | Argon                   | Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)     | 495                            | 520                          |
| Fl. 2  | Argon                   | Phycoerythrin (PE)                   | 564, 495                       | 576                          |
| Fl. 3  | Argon                   | Peridinin-Chlorophyllprotein (PerCP) | 490                            | 677                          |
| Fl. 3  | Argon                   | Propidiumiodid (PI)                  | 495, 342                       | 639                          |
| Fl. 4  | Helium                  | Allophycocyanin (APC)                | 650                            | 755                          |

Tab.17: Durchflusszytometrisch verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit Angaben der Laserlichtquelle und der Wellenlängen mit maximaler Absorption und Fluoreszenzemission.

## 2.4.2 Antikörperspektrum

### 2.4.2.1 Leukämische und nicht-leukämische Knochenmarksaspirate und periphere Blutproben

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden jeweils 200.000 Zellen für einen Ansatz aus dem Isolat in FACS®-Röhrchen (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) vorgelegt. Überschüssiges Kulturmedium wurde nach Zentrifugation bei 1500 U/min, 5 min, 4°C (Heraeus Megafuge 3.0 R, Heraeus / Kendro, Langenselbold, Deutschland) abgesaugt. Das Zellpellet wurde resuspendiert und mit den unten beschriebenen Antikörpern inkubiert (Tab.18).

Für die Untersuchungen zur Hsp70-Expression auf leukämischen Blasten und nicht-malignen mononukleären Zellen wurden FITC- und PerCP-konjugierte Antikörper zur Identifikation myeloider Antigene verwendet.

Die monoklonalen unkonjuguierten Antikörper W6/32 gegen MHC-Klasse I- und cmHsp70.1, spezifisch für Hsp70- Moleküle, wurden indirekt durchflusszytometrisch erfasst über einen PE-markierten, für Maus-Immunglobulin IgG der Maus spezifischen Sekundärantikörper (DAKO, St. Louis, USA).

Die 30-minütige Inkubation mit den unkonjuguierten Primärantikörpern und den direktmarkierten Antikörpern wurde auf Eis lagernd durchgeführt.

| Immunphänotypisierung von mononukleären Zellen |                         |                   |              |                            |                   |
|--|-------------------------|-------------------|--------------|----------------------------|-------------------|
| Ansatz Nr.                                     | identifiziertes Antigen | Antikörper (Klon) | Volumen [µl] | Hersteller                 | Farbstoffkonjugat |
| 1  | Isotyp                  | IgG1              | 3 µl         | Immunotech                 | unkonjugiert      |
| 2  | MHC-Klasse I            | W6/32             | 40 µl        | eigene Hybridom-überstände | unkonjugiert      |
| 3  | Hsp70                   | cmHsp70.1         | 10 µl        |                            | unkonjugiert      |
| 4  | Isotyp                  | IgG1              | 3 µl         | Becton-Dickinson           | FITC              |
| 5  | CD45                    | 2D1               | 3 µl         | Becton-Dickinson           | FITC              |
| 6  | CD13                    | L138              | 5 µl         | Becton-Dickinson           | FITC              |
| 7  | Isotyp                  | IgG1              | 5 µl         | Becton-Dickinson           | PerCP             |
| 8  | CD45                    | 2D1               | 3 µl         | Becton-Dickinson           | PerCP             |

Tab.18: Zur Immunphänotypisierung von mononukleären Zellen verwendete unkonjugierte und direktkonjugierte Antikörper mit Bezeichnung von Klon und Hersteller unter Angabe der zugesetzten Volumina.

Anschließend wurde in jedes FACS®-Röhrchen mit 1000µl eisgekühltem FACS-Medium (Tab.19) pipettiert, die Zellen abzentrifugiert (1500 U/min, 5 min, 4°C), das Medium verworfen und die Zellen resuspendiert. Die Ansätze Nr.4 bis 8 (Tabelle oben) wurden mit 400µl Medium für die durchflusszytometrische Analyse versetzt und bis zur FACS-Analyse auf Eis gelagert.

| <b>Medium für die durchflusszytometrische Analyse</b> |                     |                                |
|---|---------------------|--------------------------------|
| <i>Bestandteil</i>                                    | <i>Volumen [ml]</i> | <i>Hersteller</i>              |
| PBS   | 500,0               | Gibco, Paisley, Grossbritanien |
| fötale Kälberserum (FCS)                              | 50,0                |                                |

Tab.19: Zusammensetzung des Mediums, mit dem die antikörpermarkierten Zellen zwischen den Inkubationsschritten gewaschen wurden.

In einem zweiten Inkubationsschritt wurden die mit unkonjugierten Primärantikörper inkubierten Zellen mit Phycoerythrin(PE)-markiertem Sekundärantikörper (anti-Maus-Immunglobulin der Ziege, Dako, St. Louis, USA) versetzt (Tab.20). Der Sekundärantikörper wurde in einer 1:50-Verdünnung mit PBS (Gibco, Paisley, Grossbritanien) verwendet.

| <b>Sekundärinkubation bei unkonjugierten Antikörpern</b> |                                 |                     |                                |                      |
|--|---------------------------------|---------------------|--------------------------------|----------------------|
| <i>Ansatz Nr.</i>  | <i>Sekundär-<br/>antikörper</i> | <i>Volumen [µl]</i> | <i>Farbstoff-<br/>konjugat</i> | <i>Hersteller</i>    |
| 1  |                                 | 50µl*               | PE                             |                      |
| 2  | Anti-Maus-IgG                   | 50µl*               | PE                             | Dako, St. Louis, USA |
| 3  |                                 | 50µl*               | PE                             |                      |

Tab.20: Sekundäre Inkubation mit PE-markiertem anti-Maus-IgG- Antikörper. Dieser wurde aus der von Dako bezogenen Stammlösung 1:50 in PBS verdünnt, wovon 50 µl pipettiert wurden (\*).

Es folgte eine zweite Inkubationsperiode von 30 min, wobei die Zellen auf Eis gelagert wurden. Anschließend setzte man mit einem Waschschritt mit 1000 µl 10%iger FCS-Lösung in PBS fort und zentrifugierte bei 1500 U/min, 4°C, 5 min. Nach Verwerfen des Waschmediums wurden die Ansatzröhren 1 und 2 mit 400µl FCS-Lösung (10% in PBS) versetzt und auf Eis abgelegt.

Um eine Zuordnung einer potentiellen Hsp70-Expression vornehmen zu können, wurden in einem dritten Inkubationsschritt (Tab.21) die mit Hsp70-Antikörper einschließlich PE-markiertem Sekundärantikörper mit Antikörpern gegen CD33 und HLA DR inkubiert (30 Minuten auf Eis).

| <b>Tertiärinkubation bei unkonjugierten Antikörpern</b> |                                    |                                       |                     |                   |                                |
|---|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------|
| <i>Ansatz Nr.</i>                                       | <i>identifiziertes<br/>Antigen</i> | <i>Tertiäranti-<br/>körper (Klon)</i> | <i>Volumen [µl]</i> | <i>Hersteller</i> | <i>Farbstoff-<br/>konjugat</i> |
| 3   | CD33                               | P67.6                                 | 10 µl               | Becton-Dickinson  | FITC                           |
|   | HLA DR                             | L243                                  | 10µl                | Becton-Dickinson  | PerCP                          |

Tab.21: Dritte Antikörperinkubation mit monoklonalen Antikörpern gegen CD33 und HLA DR.

Nach dem dritten Waschschritt mit 1000µl 10%iger FCS-Lösung in PBS, Zentrifugation, Abnehmen des überstehenden Mediums und Resuspendieren des Zellpellets wurde das Ansatzröhren mit 400µl FCS-Lösung versetzt und unmittelbar folgend die durchflusszytometrische Analyse der markierten Zellen begonnen.

Bei Arbeiten am FACScalibur® konnten zusätzlich APC-konjugierte Antikörper zum Einsatz kommen. In diesem Falle wurden die Reihe der Isotyp-Antikörper um IgG1 APC (Caltag, Hamburg) in der Konzentration von 1µl pro 100.000 Zellen ergänzt. Bei

der Immunphänotypisierung mit cmHsp70.1 wurde bei der Tertiärinkubation zusätzlich mit CD45 APC (Caltag, Hamburg) inkubiert.

Im Rahmen der Demonstrationsanalyse wurden in Kombination mit CD45 APC zusätzlich Mehrfachfärbungen mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen die myeloiden Antigene CD13 (5 $\mu$ l pro 100.000 Zellen, Klon L138, Becton-Dickinson) und CD117 (10 $\mu$ l pro 100.000 Zellen, Klon 104D2, Becton Dickinson) angefertigt. Im Falle der Immunphänotypisierung von CD14 über den FITC-konjugierten Antikörper (10 $\mu$ l pro 100.000 Zellen, Klon MFP9, Becton Dickinson) wurde der Isotyp IgG2b bereitgehalten (5 $\mu$ l pro 100.000 Zellen, Kodierung MG2b01, Caltag, Hamburg).

#### 2.4.2.2 Antikörperspektrum für solide Tumore und nicht-maligne Vergleichsgewebe

Die durchflusszytometrische Untersuchung von Einzelzellen aus Gewebebiopsien beinhaltete den Hsp70-spezifischen monoklonalen Antikörper cmHsp70.1, den Antikörper W6/32 zur Determination von MHC-Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche sowie einen darauf abgestimmten unkonjugierten Isotypkontrollantikörper (Klon 679.1Mc7, Immunotec, Beckman-Coulter, Fullerton, USA).

| <b>Primärinkubation mit unkonjugierten Antikörpern</b> |                                |                          |                                    |                            |                          |
|--|--------------------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <i>Ansatz Nr.</i>                                      | <i>identifiziertes Antigen</i> | <i>Antikörper (Klon)</i> | <i>Volumen [<math>\mu</math>l]</i> | <i>Hersteller</i>          | <i>Farbstoffkonjugat</i> |
| 1  | Isotyp                         | IgG1                     | 3 $\mu$ l                          | Immunotech                 | unkonjugiert             |
| 2  | MHC-Klasse I                   | W6/32                    | 40 $\mu$ l                         | eigene Hybridom-überstände | unkonjugiert             |
| 3  | Hsp70                          | cmHsp70.1                | 10 $\mu$ l                         |                            | unkonjugiert             |
| 4  | Isotyp                         | IgG1                     | 3 $\mu$ l                          | Becton-Dickinson           | FITC                     |
| 5  | CD45                           | 2D1                      | 3 $\mu$ l                          | Becton-Dickinson           | FITC                     |
| 6  | AS02                           | L138                     | 3 $\mu$ l                          | Dianova                    | FITC                     |
| 7  | Isotyp                         | IgG1                     | 1 $\mu$ l                          | Caltag                     | APC                      |
| 8  | CD45                           | HI30                     | 1 $\mu$ l                          | Caltag                     | APC                      |

Tab.22: Primärer Inkubationsschritt mit den eingesetzten Antikörpern für die Immunphänotypisierung von Einzelzellen aus Gewebebiopsien. Die Ansätze 7 und 8 waren ausschließlich einer Messung mit dem FACScalibur® vorbehalten. Die FACS-Analyse beschränkte sich bei dem andernfalls verwendeten FACScan® auf die Ansätze 1-6.

Zusätzlich wurden der bindegewebespezifische Antikörper AS02 (Dianova, Hamburg, Deutschland) und der CD45-spezifische Antikörper 2D1 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) eingesetzt, beide in FITC-Konjugation, zusammen mit dem entsprechenden FITC-markierten Isotyp-Antikörper IgG1-FITC (Klon X40, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

Durchflusszytometrische Analysen an dem Gerät FACScan® bestanden aus den oben genannten Antikörpern. Für durchflusszytometrische Analysen mit dem FACScalibur®

kamen die Ansätze 7 und 8 hinzu, die dank des zweiten Lasers eine zusätzliche Erfassung von Allophycocyanin (APC)-markierten Antikörpern ermöglichten.

Die Primärantikörper wurden in den angegebenen Volumina den präparierten Zellen zugefügt, die in Polystyrolrörchen (FACS-Röhrchen, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) vorgelegt waren (Tab.15). Die Ansätze wurden 30 min auf Eis stehengelassen. Die mit Antikörper inkubierten Zellen wurden jeweils mit 1000 µl 10%iger FCS-Lösung überschichtet und überschüssiger Primärantikörper abzentrifugiert (1500 U/min, 4°C, 5 min, Heraeus Megafuge 3.0R, Heraeus / Kendro, Langenselbold, Deutschland). Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe vorsichtig abgesaugt, bis das Zellpellet in zirka 50µl Lösung vorlag. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert.

Die Ansätze mit unkonjugierten Primärantikörpern wurden mit FITC- oder PE-konjugiertem sekundären Antikörper versetzt und 30 min auf Eis inkubiert (Tab.22).

| <b>Sekundärinkubation bei unkonjugierten Antikörpern</b> |                                 |                     |                                |                      |
|--|---------------------------------|---------------------|--------------------------------|----------------------|
| <i>Ansatz Nr.</i>  | <i>Sekundär-<br/>antikörper</i> | <i>Volumen [µl]</i> | <i>Farbstoff-<br/>konjugat</i> | <i>Hersteller</i>    |
| 1  |                                 | 50µl*               | FITC                           |                      |
| 2  | Anti-Maus-IgG                   | 50µl*               | oder                           | Dako, St. Louis, USA |
| 3  |                                 | 50µl*               | PE                             |                      |

Tab.22: Sekundärer Inkubationsschritt für Zellen aus soliden Gewebebiopsien, die unmarkierte Primärantikörper trugen. (\*: verwendet wurden 50µl der Verdünnung der Stocklösung im Verhältnis 1:50 in PBS).

Bei Verwendung eines mit FITC direktkonjugierten Antikörpers C92F3B1 (Aliquot: 10µl) als Alternative zum unkonjugierten Primärantikörper wurde als Positivkontrolle der ebenfalls FITC-direktkonjugierte Antikörper (Klon W6/32, Dianova, Hamburg) eingesetzt.

Die Zellpellets in den Ansatzrörchen mit direktmarkierten Antikörpern wurden nach Absaugen der FCS-Lösung ebenfalls resuspendiert, mit 400 µl 10%iger FCS-Lösung in PBS versetzt und bis zum Beginn der durchflusszytometrischen Analyse auf Eis gelagert.

Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte ein zweiter Waschschritt mit 1000µl 10%iger FCS-Lösung, eine Zentrifugation (Bedingungen wie oben) und ein Abnehmen des Überstandes.

Für Messungen am FACScan wurden die resuspendierten Zellen mit 400µl 10%iger FCS-Lösung versetzt und bis zur Analyse auf Eis gelagert.

Bei Immunphänotypisierungen mit dem FACScalibur schloß sich für den mit anti-Hsp70-Primärantikörper inkubierten Ansatz (Nr.3) ein dritter Inkubationsschritt an, der den CD45-spezifischen Antikörper HI30 miteinschloß (Tab.23).

| <b>Tertiärinkubation bei unkonjugierten Antikörpern</b> |                                |                                 |                     |                   |                           |
|---|--------------------------------|---------------------------------|---------------------|-------------------|---------------------------|
| <i>Ansatz Nr.</i>                                       | <i>identifiziertes Antigen</i> | <i>Tertiärantikörper (Klon)</i> | <i>Volumen [µl]</i> | <i>Hersteller</i> | <i>Farbstoff-konjugat</i> |
| 3   | CD45                           | HI30                            | 10 µl               | Caltag            | APC                       |

Tab.23: Inkubationsschritt mit Ansatz Nr.3 für die Gegenfärbung von CD45, gemessen als APC-Konjugat.

Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis, Überschichten mit FCS-Lösung, Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes, Resuspension und Auffüllen mit 400µl FCS-Lösung konnte mit der durchflusszytometrischen Analyse begonnen werden.

Die isolierten viablen Zellen wurden durchflusszytometrisch mit dem Farbstoff Propidiumiodid 4 µl Propidiumiodidlösung mit einer Konzentration von 10µg/ml (Propidiumiodid bezogen von Calbiochem, La Jolla, USA) kenntlich gemacht, das man unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung des Ansatzes hinzupipettiert hatte.

#### 2.4.3 Immunphänotypisierung von Knochenmarksaspiraten und peripheren Blutproben

##### 2.4.3.1 Anpassung der probenindividuelle Geräteeinstellungen

Die Parameter der eingesetzten Durchflusszytometer FACScan® und FACScalibur® mussten individuell auf die in der analysierten Probe enthaltenen Zellen angepasst werden.

Im verwendeten Programm CellQuest®, Version 3.3, (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurde dieser Arbeitsgang in dem Modus „Setup“ durchgeführt, der die durchflusszytometrische Analyse anzeigte, jedoch nicht speicherte, wobei Einstellungen an den Fluoreszenzdetektoren vorgenommen werden konnten (Tab.24).

| <b>Menüpunkte zur Adjustierung des Zytometers</b> |
|---|
| Detectors/Amps                                    |
| Threshold   |
| Compensation                                      |
| Instrument Settings                               |

Tab.24: Einstellungen des Zytometers

Das Durchflusszytometer bot mehrere Parameter zur individuellen Einstellung: die Empfindlichkeiten und Verstärkerspannungen der Streulicht- und Fluoreszenzdetektoren (Detectors/Amps), den unteren Schwellenwert (Threshold), die Kompensation der Interferenz der Fluoreszenzen (Compensation) sowie das Aufrufen abgespeicherter Messeinstellungen über den Menüpunkt „Instrument Settings“.

Die Streulichteigenschaften wurden in linearem Modus aufgezeichnet. Um die Trennschärfe zu erhöhen, wurden die detektierten Fluoreszenzen logarithmisch registriert und dargestellt.

#### 2.4.3.1.1 Scattereigenschaften

Zunächst wurden die Einstellungen von Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) so gewählt, dass alle enthaltenen, unterschiedlich großen und unterschiedlich granulären Zellpopulationen in einer Dotblotdarstellung (FSC-SSC-Dotblot) sichtbar waren. Auf diese Weise wurden bei nicht-malignen Aspiraten die Populationen von Lymphozyten und Monozyten identifiziert sowie deren beider Vorläuferzellen, die in sehr geringem Umfang innerhalb der beiden genannten Populationen enthalten waren.

Debris wurde aufgrund seiner geringen Vorwärtslichtstreuung (FSC) und seiner relativ hohen Seitwärtslichtstreuung (SSC) von intakten Zellen unterschieden.

Bei akut-leukämischen Aspiraten befanden sich die malignen Blasten zu deutlich erhöhten Anteilen innerhalb der Population der mononukleären Zellen. In beiden Fällen wurden für die Immunphänotypisierung die mononukleären Zellen eingegrenzt.

#### 2.4.3.1.2 Justieren der Fluoreszenzkäneale

Um die Fluoreszenzintensität quantifizieren zu können, wurde ein Bezugssystem gewählt aus einer Negativkontrolle, die die Fluoreszenzintensität bei unspezifischer Bindung des (nicht-spezifischen) Isotyp-Antikörpers an die Zellen wiedergab, und der Fluoreszenzintensität bei Immunphänotypisierung eines Antigens als Positivkontrolle, das mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den Zellen exprimiert wurde. Für mononukleäre Zellen wurde als Positivkontrolle die MHC-Klasse I-Expression und das Leukocyte common Antigen (LCA, CD45) verwendet.

Die sogenannte „Messmaske“ enthielt neben dem obligatorischen Dotblot von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht die Histogramme der eingesetzten Fluoreszenzen sowie Dotblots aller Fluoreszenzkombinationen.

Eine eindimensionale Darstellung der registrierten Fluoreszenzsignale der Zellen erfolgte in Histogrammen mit einer logarithmischen Auftragung der Fluoreszenzintensität pro Einzelzelle auf der Ordinate und der Häufigkeit der registrierten Zellen mit entsprechender Fluoreszenzintensität auf der Abszisse.

Zirka 10.000 Zellen des Ansatzes eines Isotypantikörpers oder einer Positivkontrolle wurden in den Dotblot- und Histogrammblot-Darstellungen der angewählten Messübersicht überprüft.

Die Empfindlichkeit des Detektors wurde manuell anhand seiner Verstärkerspannung so eingestellt, dass sich die registrierten Fluoreszenzsignale der Zellpopulationen im linken Abschnitt des Histogrammbots wiederfanden, so dass die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten der ausgewählten Zellen vollständig erkennbar war.

| <b>Justierung der Fluoreszenzkanäle für die Durchflusszytometrie von mononukleären Zellen (MNC)</b> |            |                         |                   |
|---|------------|-------------------------|-------------------|
| Durchflusszytometrische Funktion  | Ansatz Nr. | identifiziertes Antigen | Farbstoffkonjugat |
| Negativkontrolle Fl.1   | 4          | Isotyp                  | FITC              |
| Negativkontrolle Fl.2   | 1          | Isotyp                  | PE                |
| Negativkontrolle Fl.3   | 7          | Isotyp                  | PerCP             |
| Positivkontrolle Fl.1   | 5          | CD45                    | FITC              |
| Positivkontrolle Fl.2   | 2          | MHC-Klasse I            | PE                |
| Positivkontrolle Fl.3   | 8          | CD45                    | PerCP             |

Tab.25: Einstellung der Fluoreszenzdetektion bei der Analyse mononukleärer Zellen (MNC) anhand von Negativkontrollen und Positivkontrollen für jede eingesetzte Fluoreszenz, die einzeln nacheinander überprüft wurden.

Anhand der zweidimensionalen Darstellung von zwei Fluoreszenzkanälen in einem Dotplot wurden die Einstellungen der betreffenden Fluoreszenz einreguliert, so dass die im FSC-SSC-Dotplot eingegrenzte Zellpopulation im linken unteren, doppelnegativen Quadranten zu liegen kam. Dieser definierte negative Zellen für die gerade untersuchte Fluoreszenz und eine weitere Fluoreszenz.

Analog wurde mit den Negativkontrollen (Tab.25) für die weiteren Fluoreszenzkanäle verfahren, die für jede der beteiligten Fluoreszenzen ein möglichst gut übereinstimmendes Dotplotbild mit ausschließlicher Besetzung der zweifach negativen Quadranten ergeben mussten.

Die Ansätze, welche die Positivkontrollen (Tab.19) für die verwendeten Fluoreszenzen enthielten, wurden herangezogen, um die Verstärkerspannung des Photomultiplers so einzustellen, dass die Fluoreszenzsignale der Positivkontrollen (MHC Klasse I, CD45) im dafür vorgesehenen rechten Abschnitt des Histogramms abgebildet wurden.

Die Positivkontrollen für die Fluoreszenz der Laserfarbstoffe FITC, PE und PerCP wurden weiterhin dazu verwandt, das Überlagern verschiedener Fluoreszenzen rechnerisch auszugleichen. Die Lage der für eine Fluoreszenz positiv markierten Zellen wurde im Dotplot gegen die benachbarten Fluoreszenzkanäle überprüft und anhand des Parameters „Compensation“ derart eingestellt, dass die betreffende einfach positiv gefärbte Zellpopulation ausschließlich in den vorgesehenen einfach positiven Quadranten des jeweiligen Dotblots präsentiert wurde, ohne in einen benachbarten Fluoreszenzkanal einzustrahlen.

Nach probenindividueller Justierung der Detektoren wurden die Parameter als Einstellung für die vorliegende Patientenprobe gespeichert und für die durchflusszytometrische Messung verwendet.

#### 2.4.3.2 Aufzeichnung der durchflusszytometrischen Messung

Mit Hilfe der für die Analyse erforderlichen Geräteeinstellungen wurden nacheinander die Negativkontrollen, die aus drei FACS-Röhrchen zusammengefügt waren, die Positivkontrollen MHC Klasse I und CD45 sowie als Mehrfachfärbung die Hsp70-, CD33/CD13- und HLA DR-Immunphänotypisierung durchflusszytometrisch analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse ermöglichte unter gegebenen Bedingungen die simultane Aufzeichnung von Vorwärts- und Seitwärtsstreuulicht und der Fluoreszenzintensitäten, die die Detektion von FITC-konjugierten Antigenen der Zelloberfläche auf Fl.1, PE-konjugierten Antigenen auf Fl.2 und PerCP-konjugierten Antigenen auf Fl.3 erzeugten.

| <b>Aufzeichnung der Immunphänotypisierung von mononukleären Zellen</b> |                   |                       |                             |
|--|-------------------|-----------------------|-----------------------------|
| <i>Reihenfolge</i>   | <i>Ansatz Nr.</i> | <i>Antigen</i>        | <i>Fluoreszenzfarbstoff</i> |
| 1.   | 1, 4, 7           | Isotyp                | FITC, PE, PerCP             |
| 2.   | 2                 | MHC-Klasse I          | PE                          |
| 3.   | 8                 | CD45                  | PerCP                       |
|  |                   | Hsp70                 | PE                          |
| 4.   | 4                 | CD33 / CD13<br>HLA DR | FITC<br>PerCP               |
| 5.   | 5                 | CD45                  | FITC<br>PI                  |

Tab.26: Immunphänotypisierung von mononukleären Zellen mit einer Kombination aus Isotyp-Kontrollantikörpern (Negativkontrollen), Positivkontrollen (MHC Klasse I, CD45) und Hsp70-Detektion. Sporadisch erfolgte bei CD45-FITC die Überprüfung der Vitalität mit 4 µl Propidiumiodid (PI, gemessen auf FL.3), das unmittelbar vor der FACS-Analyse hinzupipettiert wurde.

Jeweils 50.000 Zellen, d.h. durchflusszytometrische Ereignisse aus den Ansätzen wurden abgespeichert (Tab.26).

Zur Überprüfung der Vitalität der vorliegenden mononukleären Zellen wurde neben der unmittelbar vor der Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern lichtmikroskopischen Analyse mit Trypanblau sporadisch bei der Durchflusszytometrie Propidiumiodid (PI) eingesetzt und kombiniert mit dem Antigen CD45 (FITC) auf dem Fluoreszenzkanal Fl.3 miterfasst.

#### 2.4.3.3 Auswertung der Immunphänotypisierung

Im Rahmen der Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte zunächst die Eingrenzung von mononukleären Zellen im FSC-SSC-Dotblot. Diese Zellen erhielten von der Software Cellquest® die Bezeichnung „R1“, was sich von der „Region“ im genannten Dotblot ableitete.

Das Markerprofil wurde anhand der Fluoreszenzintensitäten in einzelnen Histogrammen ausgewertet. In das Histogramm der jeweiligen Isotypen wurde jenseits der Verteilung der Fluoreszenz des Isotyps ein Marker (in den Histogrammen als M1 bezeichnet) eingebracht, um Zellen zu kennzeichnen, deren Fluoreszenzintensität stärker ausgeprägt war als die des Isotyps und welche somit als positiv bezeichnet werden konnte.

Der Marker wurde auf die Histogramme der anderen abgespeicherten Analysen desselben Fluoreszenzkanals übertragen, was über die zugehörige Statistik den Anteil der positiv gefärbten Zellen ermittelte.

Um die Verteilung einer detektierten Hsp70-Expression zu betrachten, wurden Dotblots der Mehrfachfärbungen CD33/Hsp70, Hsp70/CD13, Hsp70/HLA DR aufgerufen.

Als Negativkontrolle wurden die jeweiligen Dotblots der Isotypen der gleichen Fluoreszenz zugrundegerichtet.

Als Messwerte wurden die prozentualen Anteile positiver Zellen übernommen, die aus den Histogrammen und Dotblot-Darstellungen abgeleitet wurden.

Die in der vorliegenden Arbeit als Abbildungen gezeigten repräsentativen Auswertungen wurden aus den gespeicherten Messfiles nachträglich angefertigt, so dass sich geringfügige Unterschiede in der einzelnen Markerexpression im Vergleich mit den Listen zur quantitativen Auswertung Immunphänotypisierung ergeben können. Das qualitative Resultat wurde nicht beeinflusst.

### 2.4.4 Immunphänotypisierung von Einzelzellen aus soliden Gewebebiopsien

#### 2.4.4.1 Anpassung der Geräteeinstellungen

Auch bei der Immunphänotypisierung von Einzelzellen aus soliden Gewebebiopsien wurden die Einstellungen individuell an die vorliegende Probe angepasst, die im Setup-Modus des FACS®-Gerätes überprüft und korrigiert wurden.

##### 2.4.4.1.1 Scattereigenschaften

Die Empfindlichkeiten des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsscatters (SSC) wurden so gewählt, dass alle durchflusszytometrisch erkennbaren Populationen abgebildet werden konnten. Weitere Aussagen zur Zellart wurden aus den Scattereigenschaften der untersuchten Zellen nicht gezogen.

#### 2.4.4.1.2 Vitalität

Die Vitalität wurde bei Einzelzellsuspensionen aus soliden Gewebebiopsien mit Propidiumiodid (PI) ermittelt. Um die vitalen Zellen ermitteln zu können, wurden der Ansatz Nr.1 mit dem indirekt FITC-markierten Isotyp-Antikörper in der Dotblotdarstellung der Propidiumiodid-Fluoreszenz (PI, Fl.3) und des Vorwärtsstreuulichts (FSC) wurden vitale Zellen charakterisiert. Zusätzlich wurden PI-negativer Zellschrott und Erythrozyten anhand ihres geringeren Vorwärtsstreuulichts ausgegrenzt.

Für die weitere durchflusszytometrische Analyse wurden die detektierten vitalen Zellpopulationen als Regionen (R1, R2, R3) im PI-FSC-Dotplot eingegrenzt und separat analysiert.

#### 2.4.4.1.3 Justierung der Fluoreszenzdetektoren

Die Einstellung der Fluoreszenzdetektoren wurde auf die ausgewählte Population vitaler Zellen bezogen.

Analog der Justierung bei der Analyse von mononukleären Zellen wurde auch bei Einzelzellen aus Gewebebiopsien nacheinander die Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektoren anhand von einzeln fluoreszenzmarkierten Isotyp-Antikörpern und den zugehörigen einfach markierten Positivkontrollen (Tab.27) angepasst.

Die Wechselwirkung der Fluoreszenz, die von Propidiumiodid ausging, wurde bei den Messeinstellungen berücksichtigt, indem im Anschluss an die Einstellungen der Fluoreszenz Fl.1 Propidiumiodid zur FITC-markierten Isotypkontrolle pipettiert und im Setup-Modus gemessen wurde.

Für durchflusszytometrische Analysen mit dem Durchflusszytometer FACScan<sup>®</sup>, für die ausschließlich ein Argon-Laser verfügbar war, beschränkte sich die Einstellung auf die Fluoreszenzkanäle Fl.1 und Fl.3 mit den Ansätzen 1-5.

Bei Mehrfachfärbungen, bei denen Allophycocyanin (APC) als Farbstoff miteingesetzt wurde, kam die Einstellung der Empfindlichkeit des Fluoreszenzkanals Fl.4 hinzu, die über die Ansätze 7 und 8 bewerkstelligt wurde.

| <b>Überprüfung der Fluoreszenzdetektion für die Analyse von Einzelzellen aus Gewebebiopsien</b> |            |                          |                    |
|---|------------|--------------------------|--------------------|
| Durchflusszytometrische Funktion  | Ansatz Nr. | identifizier-tes Antigen | Farbstoff-konjugat |
| Negativkontrolle Fl.1   | 1          | Isotyp                   | FITC (indirekt)    |
| Negativkontrolle Fl.1   | 4          | Isotyp                   | FITC (direkt)      |
| Negativkontrolle Fl.4   | 7          | Isotyp                   | APC (*)            |
| Positivkontrolle Fl.1   | 2          | MHC-Klasse I             | FITC (indirekt)    |
| Positivkontrolle Fl.1   | 5          | CD45                     | FITC (direkt)      |
| Positivkontrolle Fl.4   | 8          | CD45                     | APC (*)            |
| Positivkontrolle Fl.3   | 4          | Isotyp                   | FITC + PI          |

Tab.27: Überprüfung der Verstärkerspannungen an den Fluoreszenzdetektoren Fl.1, Fl.3 und Fl.4 (\*: Fl.4 nur bei Einsatz des Durchflusszytometers FACScalibur) mit sukzessive analysierten Negativ- und Positivkontrollen für jede Fluoreszenz.

Eine mögliche Überlagerung von Fluoreszenzen wurde im Setup-Modus in Dot-Blots, in denen alle Varianten der eingesetzten Fluoreszenzen abgebildet waren, detektiert und mit Hilfe geeigneter Quadranten abgeglichen. Falls erforderlich, wurde mit Hilfe der jeweiligen Positivkontrolle die rechnerische Kompensation eines Einstrahlens in einen benachbarten Fluoreszenzkanal vorgenommen.

Der Fluoreszenzkanal F1.2 wurde wegen der von Propidiumiodid ausgehenden, breiten Fluoreszenzemission auf F1.3 nicht belegt und seine Verstärkerspannung gegenüber den beiden anderen Kanälen reduziert.

Die justierten Parameter der Streulicht- und Fluoreszenzdetektoren wurden abgespeichert, nachdem sie auf die Emissionen der vorliegenden Probe eingestellt worden waren.

#### 2.4.4.2 Aufzeichnung der durchflusszytometrischen Analyse

Die Einstellungen der Parameter wurden für die Aufzeichnung aufgerufen. Im Programm-Modus „Aquisition“ wurden jeweils 100.000 Zellen aus jedem Einzelansatz aufgenommen. Die Isotypen IgG1 FITC in indirekter Markierung (Ansatz Nr.1) und IgG1 APC (Ansatz Nr. 7) wurden als eine Negativkontrolle vermessen und abgespeichert (Tab.28).

| <b>Aufzeichnung der Immunphänotypisierung von vitalen Einzelzellen aus Gewebebiopsien</b> |                   |                |                             |                          |
|---|-------------------|----------------|-----------------------------|--------------------------|
| <i>Reihenfolge</i>  | <i>Ansatz Nr.</i> | <i>Antigen</i> | <i>Fluoreszenzfarbstoff</i> | <i>Viabilitätsmarker</i> |
| 1.  | 1, 7              | Isotyp         | FITC (ind.), APC (*)        | PI                       |
| 2.  | 2                 | MHC-Klasse I   | FITC (ind.), APC (*)        | PI                       |
| 3.  | 3                 | Hsp70<br>CD45  | FITC (ind.),<br>APC (*)     | PI                       |
| 4.  | 4                 | IgG1           | FITC                        | PI                       |
| 5.  | 5                 | CD45           | FITC                        | PI                       |
| 6.  | 6                 | ASO2           | FITC                        | PI                       |
| 7   | 8                 | CD45           | APC (*)                     | PI                       |

Tab.28: Aufzeichnung der durchflusszytometrischen Analyse von Einzelzellen aus Gewebebiopsien. Bei Arbeiten mit der zweiten Laserlichtquelle (Fluoreszenzemission bei 635nm) wurde Allophycocyanin (APC) eingesetzt, um CD45 in Mehrfachfärbung mit der Hsp70-Immunphänotypisierung anzuwenden zu kombinieren(\*). Propidiumiodid(PI) wurde unmittelbar vor Messung hinzupippettiert.

#### 2.4.4.3 Auswertung der Analysen von Einzelzellen aus den Gewebebiopsien

##### 2.4.4.3.1 Eingrenzung der Vitalzellfraktion

Den Ausgangspunkt für die Auswertung der immunphänotypisch erhobenen Daten der Einzelzellen aus Gewebebiopsien bildete der Dotplot mit der Darstellung des Vorwärtsstreuolichts (FSC) und der Fluoreszenzintensität von Propidiumiodid (PI).

Eine quantitative Aussage zur Vitalität ergab sich aus dem Anteil PI-negativer eingegrenzter Zellen des oben genannten Diagramms.

Lagen mehrere vitale Zellpopulationen vor, die sich in ihrem Vorwärtsstreu Licht unterschieden, so wurden diese Populationen separat voneinander quantifiziert.

#### 2.4.4.3.2 Ermittlung des Anteils durchflusszytometrisch positiver Zellen

Der prozentuale Anteil positiver Zellen wurde in Histogrammen quantifiziert, indem im Histogramm des Isotyps eine Markierung (Marker, im Diagramm als M1 bezeichnet) eingebracht wurde, die alle Ereignisse markierte und quantifizierte, die in ihrer Fluoreszenz diejenige der mit Isotyp-Antikörper markierten Zellen überstiegen. Ein Anteil von zirka 1,00% positiv gewerteter Zellen war bei dem Isotyp zulässig.

Zur Quantifizierung der weiteren Histogramme der Immunphänotypisierung wurde der Marker in die Histogramme übertragen.

Weiterhin wurde der durchschnittliche Fluoreszenzwert (Mean) aus der Histogramm-Statistik registriert.

Bei Doppelfärbung wurde in der Dotblotdarstellung der kombinierten Isotypkontrollen die Quadrantsetzung auf die Dotblots der getesteten Immunfluoreszenz-Darstellungen übertragen.

Die prozentuale Verteilung in den als positiv beziehungsweise negativ definierten Quadranten wurde in der zweidimensionalen Darstellung ermittelt.

#### 2.4.4.3.3 Qualitative Beurteilung der immunphänotypischen Resultate

Allgemeine Zielsetzung war der qualitative Nachweis einer Hsp70-Expression auf den Einzelzellen.

In den Histogrammen der Hsp70-Expression die durchflusszytometrische Analysen war ein Schwellenwert von 5,00% der eingegrenzten Zellen erforderlich, um zu einem „Hsp70-positiven“ Resultat zu führen.

Zusätzlich war in der durchflusszytometrischen Auswertung Bedingung, dass sich das Fluoreszenzprofil der Hsp70-Färbung von dem des Isotyps deutlich unterschied.

In den Dotplot-Analysen wurde ein mögliches positives Resultat der Histogramme weiter untersucht und eine Mehrfachfärbung gegen das Leukozytenantigen CD45 analysiert.

#### 2.4.4.3.4 Quantitative Beurteilung der immunphänotypischen Resultate

Quantitativ ausgewertet wurde der prozentuale Anteil der Zellen, auf welchen durchflusszytometrisch für die immunphänotypisch untersuchten Merkmale positiv waren, welcher aus der Markersetzung vom Isotyp-Kontrollantikörper hervorging.

Hierfür wurden die Histogramme der immunphänotypischen Analysen zugrundegelegt.

In den Fällen der Mehrfachfärbung der Dotblots wurde zusätzlich die Verteilung der Merkmalsexpression quantitativ beschrieben.

Für die als Dotblots und Histogramme gezeigten durchflusszytometrischen Analysen wurde aus denselben Messaufzeichnungen erneut eine Auswertung durchgeführt, wodurch es zu geringfügigen Abweichungen von den gelisteten Messwerten kommen konnte. Die qualitative Wertung der durchflusszytometrischen Analyse blieb davon unbeeinflusst.

## **2.5 Statistische Untersuchungen**

Die statistischen Berechnungen wurden im Tabellenkalkulationsprogramm Excel aus der Softwarekombination Office 2000 durchgeführt. Für die inferenzstatistischen Analysen wurde auf das Add-in Modul „Analyse it“ zurückgegriffen, das die unten beschriebenen Untersuchungen ermöglichte (Download von <http://www.analyse-it.com> vom 20.08.2002).

### **2.5.1 Vergleiche zwischen klinisch distinkten Subtypen**

Eine Gegenüberstellung der quantitativen Merkmalsexpression innerhalb einer Tumorentität wurden als parameterfreie Daten behandelt und mit der Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis auf ihre statistische Signifikanz untersucht (Conover, 1980).

Als Konfidenzintervall wurde 95% vorgegeben. Unter 5% wurde eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p) als statistisch signifikant (\*) gewertet (Clauß et al., 1995).

### **2.5.2 Gruppenvergleiche zwischen Tumorbiopsien und nicht-malignen Kontrollgeweben**

Die statistische Signifikanz durchflusszytometrisch ermittelter Merkmale von Tumorbiopsien und nicht-malignen Vergleichsbiopsien unterschiedlicher Patienten wurde anhand der nichtparametrischen Daten mit dem u-Test nach Mann und Whitney errechnet (Conover, 1980).

### **2.5.3 Individualvergleiche zwischen Tumorbiopsie und normalem Gewebe**

Der Wilcoxon-Test wurde verwendet, um die Merkmalsexpression der abhängigen Stichproben von Tumorbiopsien und zugehörigem Normalgewebe derselben Patienten zu untersuchen (Conover, 1980; Siegel und Castellan, 1980)

#### **2.5.4 Relative Häufigkeiten Hsp70-positiver Aspirate und Biopsien**

Die relative Häufigkeit der Hsp70-positiver Immunphänotypisierungen bei den verschiedenen Subtypen einer Tumorentität wurde mit dem Chi-quadrat-Mehrfeldertest untersucht (Conover, 1980).

#### **2.5.5 Berechnungen zur Validität der Hsp70-Bestimmung**

Gemäß üblicher medizinisch-statistischer Vorgaben (Krämer et al., 1998) wurden aus den quantitativen Resultaten der Hsp70-Expression Eckdaten zur diagnostischen Validität der durchflusszytometrischen Bestimmung errechnet.

Sämtliche qualitativen Betrachtungen gründen auf einer Festlegung von 5,00% als Schwellenwert einer als Hsp70-positiv gewerteten quantitativen Hsp70-Expression.

Die Sensitivität ergab sich aus dem Anteil der Hsp70-positiv gewerteten Tumorbiopsien an der Gesamtzahl der untersuchten Tumorbiopsien einer Entität.

Die Spezifität konnte aus den Analysen von Normalgeweben bestimmt werden. Sie errechnete sich aus dem Anteil der Hsp70-negativ gewerteten Normal-Biopsien an der Gesamtzahl der verglichenen Normalgewebe.

Der positive prädiktive Wert umschrieb den Anteil der Hsp70-positiv befundenen Tumorbiopsie an der Gesamtzahl der Hsp70-positiv bewerteten Tumor- und Normalgewebe.

Der negative prädiktive Wert erfasste den Anteil der Hsp70-negativen Normalgewebe an der Gesamtheit der Hsp70-negativen Tumor- und Normalgewebe.

### **3 Ergebnisse und Diskussion**



### 3.1 Basisexperimente zur manuellen Disaggregation von soliden Gewebebiopsien

Für die klinische und pathologische Diagnostik maligner Tumore ist die TNM-Klassifikation üblich (Wittekind und Wagner, 1997; Wittekind et al., 2002).

Daneben existiert eine Tumorbeschreibung nach dem Gehalt von tumorassoziiertem Bindegewebe (Hildebrandt, 1998; Böcker et al., 2001): Bei den medullären Karzinomen überwiegt das Tumorparenchym. Bei einfachen Karzinomen liegt ein ausgewogenes Verhältnis von Tumorparenchym und Bindegewebe, während bindegewebige Anteile bei den szirrhösen Karzinomen dominieren (Eder und Gedigk, 1990).

Die makroskopischen Eigenschaften eines Gewebes rücken dann in den Mittelpunkt, wenn aus den Geweben Zellen vital präpariert werden sollen. Bei der Beschreibung des nicht-enzymatischen Verfahrens waren makropathologische Gewebeeigenschaften einzubeziehen und in ihrer Bedeutung für die weitere Analyse zu prüfen.

Makroskopisch korreliert der Gehalt an Bindegewebe, der histologisch diagnostiziert werden kann, mit der feststellbaren Härte der Biopsie: Medulläre Karzinome besitzen weiche Konsistenz, einfache Karzinome haben eine mittelharte Konsistenz und szirrhöse Karzinome zeigen harte, schnittfeste Konsistenz (Hildebrandt, 1998).

Im Rahmen der vorliegende Arbeit wurde zunächst untersucht, welche Bedeutung die makroskopische Konsistenz der Tumore für die Präparation von Einzelzellen aus Gewebebiopsien besitzt.

Zu diesem Zweck wurde die manuelle Disaggregation an zehn konsekutiv eingetroffenen Tumorbiopsien analysiert. Es handelte sich um vier Bronchialkarzinome, drei kolorektale Karzinome, zwei Magen- und ein Mammakarzinom.

Zugrundegelegt wurden eine einminütige und eine zweiminütige manuelle Disaggregation mit dem Skalpell. Im Anschluss wurde lichtmikroskopisch die Gesamtzellzahl bestimmt, sowie durchflusszytometrisch die Fraktion propidiumiodid-negativer Zellen, die für eine immunphänotypische Analyse in Frage kommt.

### 3.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchung der Zellsuspension

Nach erfolgter manueller Disaggregation und Abtrennung von größeren Gewebestücken über das Zellsieb wurde lichtmikroskopisch geprüft, inwieweit vitale Zellen aus der Gewebeprobe isoliert werden konnten.

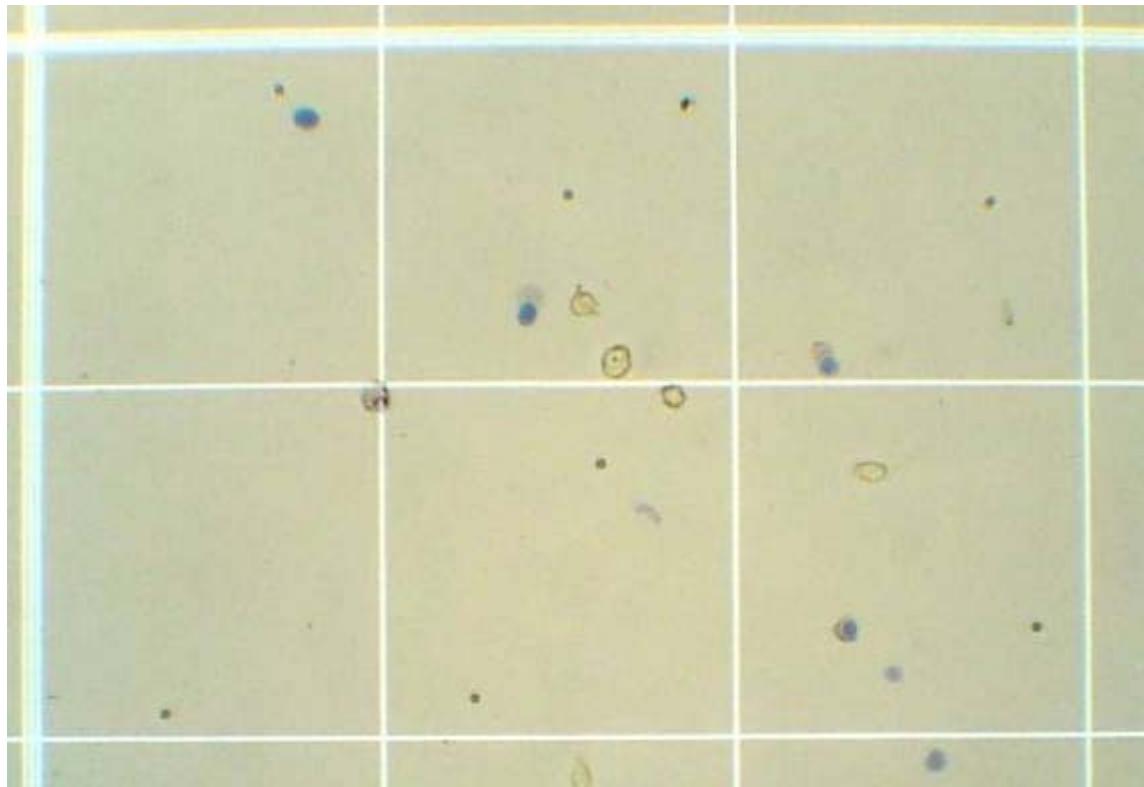


Abb.2: Lichtmikroskopische Analyse von Einzelzellen aus einer soliden Gewebebiopsie. Mit Trypanblau wurden letale Zellen blau angefärbt. Vitale Zellen imponieren als gelbliche Zellen mit großem Durchmesser neben dunkel erscheinenden Erythrozyten mit kleinem Durchmesser (Vergrößerung: 200-fach, Neubauer-Zählkammer).

Wie Abb.2 zeigt, konnten neben blau angefärbten letalen Zellen auch vitale, ungefärbte und gelblich erscheinende Zellen aus dem Gewebe freigesetzt werden. Wichtig in diesem Zusammenhang war das Vorliegen *einzelner* vitaler Zellen, während Zellverbände oder Gewebefragmente fehlten. Die vitalen Einzelzellen waren von mitenthaltenen Erythrozyten anhand ihres deutlich größeren Zelldurchmessers zu unterscheiden.

### 3.1.2 Optimierung der manuellen Disaggregation

Es wurde untersucht, welche Auswirkung eine unterschiedlich lange Einwirkung auf die Gewebebiopsie von einer beziehungsweise zwei Minuten mit dem Skalpell zu einer Veränderung der zellulären Ausbeuten führt.

#### 3.1.2.1 Gesamtzellzahl

Nach dem Abtrennen von Gewebebruchstücken über das Zellsieb ergaben sich mikroskopisch folgende Gesamtzellzahlen in der Zellsuspension (Tab.29):

| Manuelle Disaggregation<br>solider Tumorbiopsien | Gesamtzellzahl<br>[pro<br>ml] | Prozentuale<br>Veränderung |
|--|-------------------------------|----------------------------|
| Präparat Nr.                                     | 1 min                         | 2 min                      |
| PT#01 (BC)                                       | 3050000                       | 2370000                    |
| PT#02 (CRC)                                      | 1275000                       | 1560000                    |
| PT#03 (CRC)                                      | 260000                        | 335000                     |
| PT#04 (BC)                                       | 1250000                       | 420000                     |
| PT#05 (BC)                                       | 2580000                       | 835000                     |
| PT#06 (CRC)                                      | 240000                        | 100000                     |
| PT#07 (GC)                                       | 225000                        | 445000                     |
| PT#08 (MC)                                       | 955000                        | 970000                     |
| PT#09 (BC)                                       | 1690000                       | 1240000                    |
| PT#10 (GC)                                       | 230000                        | 610000                     |
| Signifikanz                                      | p = 0,3750 (n.s.)             |                            |

Tab.29: Lichtmikroskopische Bestimmung der Gesamzellzahlen nach ein- und zweiminütiger manueller Disaggregation aus zehn konsekutiv eingesandten Primärtumorbiopsien (PT) der Entitäten Bronchialkarzinom (BC), kolorektales Karzinom (CRC), Magen-(GC) und Mammakarzinom (MC).

Es zeigte sich in fünf von zehn untersuchten Fällen mikroskopisch eine Abnahme der Vitalität, wenn die manuelle Disaggregation statt einer zwei Minuten lang einwirkte, während bei fünf weiteren die Gesamtzellzahl zunahm, so dass bezüglich der Gesamtzellzahl keine einheitliche Tendenz abgeleitet werden konnte.

Neben der Dauer der Einwirkung der Disaggregation sind weitere Gesichtspunkte zu berücksichtigen, vor allem die makroskopischen Eigenschaften der untersuchten Gewebe.

### 3.1.2.2 Bestimmung der Vitalität

Wichtig für die immunphänotypische Analyse war der Anteil vitaler Zellen: Die Intaktheit der Zellmembran wurde lichtmikroskopisch überprüft über den Ausschluss von Trypanblau-positiven, letalen Zellen sowie durchflusszytometrisch als propidiumiodidnegative Population.

| <b>Manuelle Disaggregation<br/>solider Tumorbiopsien</b> | <b>Makroskopische<br/>Tumorkonsistenz</b> | <b>Viabilität [%]<br/>(mikroskopisch)</b> |       | <b>Viabilität [%]<br/>(durchflus-<br/>zytometrisch)</b> |       |
|--|---|---|-------|---|-------|
| Präparat Nr. (Tumorentität)                              |   | 1 min                                     | 2 min | 1 min   | 2 min |
| PT#01 (BC)   | medullär                                  | 70,2                                      | 27,0  | 0,29  | 0,05  |
| PT#02 (CRC)  | medullär                                  | 47,1                                      | 26,0  | 7,06  | 4,66  |
| PT#03 (CRC)  | medullär                                  | 67,3                                      | 4,5   | 5,86  | 1,29  |
| PT#04 (BC)   | einfach                                   | 6,8                                       | 4,8   | 2,99  | 1,67  |
| PT#05 (BC)   | einfach                                   | 21,3                                      | 8,4   | 8,47  | 2,89  |
| PT#06 (CRC)  | einfach                                   | 25,0                                      | 20,0  | 7,85  | 8,03  |
| PT#07 (GC)   | szirrhös                                  | 60,0                                      | 15,7  | 3,05  | 1,44  |
| PT#08 (MC)   | szirrhös                                  | 8,4                                       | 3,6   | 2,5   | 1,65  |
| PT#09 (BC)   | szirrhös                                  | 4,7                                       | 3,2   | 1,22  | 0,97  |
| PT#10 (GC)   | szirrhös                                  | 6,5                                       | 3,3   | 6,58  | 1,98  |
| Signifikanz  |   | $p = 0,0020 (*)$                          |       | $p = 0,0039 (*)$  |       |

Tab.30: Lichtmikroskopische und durchflusszytometrische Bestimmung der Vitalität aus zehn konsekutiv analysierten Tumorbiopsien.

Nach der einminütigen Disaggregation wurden lichtmikroskopisch als Maximum 70,2% vitale Zellen gezählt, das Minimum betrug 4,7%. Nach zwei Minuten Disaggregation konnten aus dem Gewebe 27,0% als Maximum und 3,2% als Minimum an vitalen Zellen identifiziert werden (Tab.30). In beiden Fällen wiesen die Resultate starke individuelle Streuungen auf. Weitere äußere Faktoren wie beispielsweise die Transportdauer zwischen Resektion und experimenteller Analyse mögen als möglicherweise ursächlich für die unterschiedlich vorgefundene Vitalität angeführt werden.

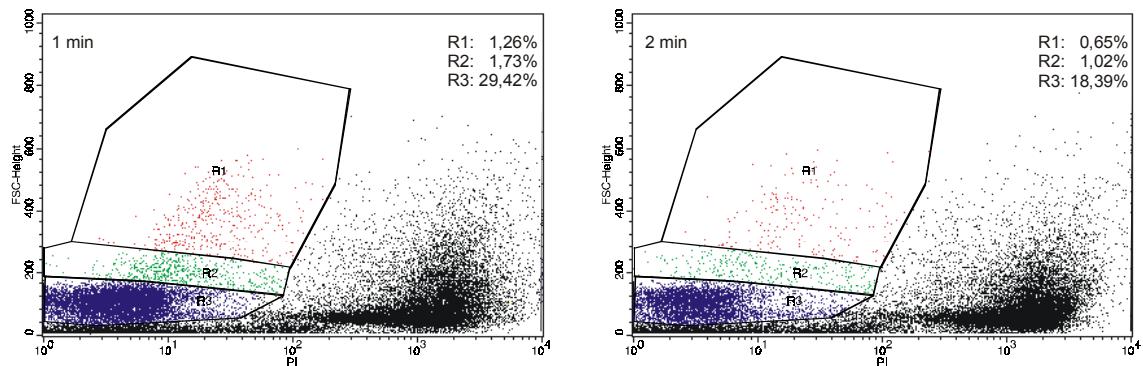
Einheitlich verhielten sich die lichtmikroskopisch bestimmten Vitalitätszahlen von jeder der zehn analysierten Tumorbiopsien insofern, als nach zwei Minuten ein Reduktion der vitalen Zellfraktion zu beobachten war.

### 3.1.3 Durchflusszytometrische Analyse der Vitalität

Quantitativ vermindert stellten sich die parallel erhobenen durchflusszytometrisch bestimmten Resultate der vitalen Zellen dar: Bei der kurz einwirkenden einminütigen Disaggregation wurde eine Vitalität zwischen 0,29% und 8,47% gemessen. Nach zweiminütiger Disaggregation wurden Vitalitätszahlen zwischen 0,05% und 8,03% registriert.

Mit Ausnahme einer Tumorbiospie wurde auch bei der durchflusszytometrischen Analyse eine Abnahme bei der länger einwirkenden zweiminütigen Disaggregation registriert.

Eine exemplarische Darstellung ist in Abb.3 gegeben, bei welcher für die durchflusszytometrisch bestimmte Vitalität die Summe aus den PI-negativen Zellen der Regionen R1 und R2 herangezogen worden ist. Nach einminütiger Disaggregation waren 2,99% PI-negative Zellen einzugrenzen, nach zweiminütiger Disaggregation nur 1,67%.



*Abb.3: Durchflusszytometrische Analyse der propidiumiodidnegativen Populationen R1, R2, R3 in der Vorwärtsscatter(FSC)-Propidiumiodid(PI)-Seitwärtsscatter-Darstellung mit Angabe der prozentualen Anteile der eingeschlossenen registrierten Ereignisse(PT#04).*

Das quantitative Ausmaß bei durchflusszytometrischer Analyse fiel deutlich reduziert aus im Vergleich zur zuvor ausgeführten lichtmikroskopischen Zählung.

Es war davon auszugehen, dass zelluläre Abbaumechanismen wie die Apoptose, oder proteolytische Abbauvorgänge trotz Zugabe von fetalem Kälberserum (FSC) und zusätzlichen Waschschriften nicht vollständig inhibiert werden konnten, was zu einer Verringerung der vitalen Population geführt hatte.

Überprüfte man das experimentelle Vorgehen der ein- und zweiminütigen Disaggregation statistisch, so ließen sich mit  $p=0,0002(*)$  bei mikroskopischer Prüfung und  $p=0,0039(*)$  bei durchflusszytometrischer Analyse jeweils signifikant höhere, also günstigere Vitalitätszahlen erzielen.

Aus den geschilderten Vorversuchen ergaben sich für die manuelle einminütige Disaggregation insgesamt günstigere Resultate, weshalb einer möglichst kurz einwirkenden Gewebedisaggregation der Vorzug zu geben war.

## 3.2 Kolorektales Karzinom

### 3.2.1 Makropathologische Untersuchung der Gewebebiopsien

Bei 110 der insgesamt 159 Tumorbiopsien konnte eine Einteilung der Gewebekonsistenz des Tumors vorgenommen werden.

70 Tumorbiopsien wurden als medulläre Karzinome charakterisiert, 33 als einfache Karzinome und 7 Karzinome wurden als szirrhös beschrieben (Tab.31):

| <i>Makroskopisch determinierte<br/>Tumorkonsistenz</i> | <i>Anzahl<br/>analysierter<br/>Tumorproben</i> | <i>prozentualer<br/>Anteil</i> |
|--|--|--------------------------------|
| medullär   | 70   | 64%                            |
| einfach  | 33   | 30%                            |
| szirrhös   | 7  | 6%                             |

Tab.31: Makropathologisch bestimmte Gewebekonsistenz von 110 kolorektalen Tumorbiopsien

Anhand dieser Tumore wurde der Einfluss der Konsistenz auf die durchflusszytometrische Analyse untersucht.

Für die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächen sowie die Ermittlung der oberflächenspezifischen Hsp70-Expression der Tumorentität der kolorektalen Karzinome wurden den Biopsien mit definierter makroskopischer Konsistenz diejenigen mit Mischformen oder nicht exakt definierbarer Konsistenz hinzugefügt.

### 3.2.2 Multiparametrische Analyse von vitalen Einzelzellen aus kolorektalen Biopsien

Für die Immunphänotypisierung vitaler Einzelzellen aus Tumoren erwies sich als bedeutsam, tumorinfiltrierende Leukozyten über ihr Oberflächenantigen CD45 zu identifizieren, um ein auf Tumorzellen vermutetes Antigen, das über einen spezifischen Antikörper detektiert werden sollte, letztgenannter Zellart zuordnen zu können.

Aus theoretischen Erwägungen kamen vor allem leukozytäre oberflächenständige IgG-Rezeptoren wie CD16, CD32, CD64 als mögliche unspezifische Bindungsstellen für die hier analytisch eingesetzten Immunglobuline in Betracht.

Die Parameter Propidiumiodid-Negativität und quantitative MHC-Klasse I Expression schufen die Voraussetzungen für die immunphänotypische Charakterisierung der Plasmamembranexpression von Hsp70 auf vitalen Einzelzellen aus soliden Tumorbiopsien.

In Mehrfachfärbungen wurde versucht, die potenzielle Merkmalsexpression von Hsp70 auf der Zelloberfläche derjenigen von CD45 gegenüberzustellen, um eine Trennung der Leukozyten von anderen Zellen aus der Tumorbiopsie sicherzustellen.

### 3.2.2.1 Durchflusszytometrische Analyse einer Normalschleimhautbiopsie



*Abb.4: Gewebebiopsien: Tumorresektat CX#155(links), Normalschleimhaut des Dickdarms (N)CX#155 (rechts).*

Bei dem linken Resektat (CX#155) handelte es sich um das zirka 1 cm lange Gewebestück des im Colon sigmoideum lokalisierten Karzinoms (Abb.4). Makropathologisch wurde der Tumor wegen seiner weichen Konsistenz als medullär eingestuft. Als nicht-maligne Vergleichsprobe mituntersucht wurde Normalmucosa desselben Patienten (N)CX#155. Die kolorektale Normalschleimhaut imponierte durch ihre regelmäßig glatte und glänzende Oberfläche. An der Rückseite der Biopsie war das hellere Gewebe der Serosa sichtbar. Die durchflusszytometrische Analyse beschränkte sich bei dem Normalgewebe auf die Mucosa.

### 3.2.2.1.1 Quantifizierung vitaler Zellen

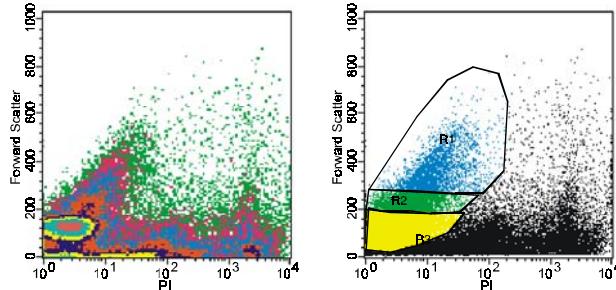


Abb.5: Bestimmung von drei viablen Zellpopulationen (R1, R2, R3) aus der Zellsuspension der Normalgewebebiopsie anhand der Vorwärtsscattereigenschaften (FSC) und der Propidiumiodid-Färbung.

Anhand des Densityblots von Vorwärtsscatter (FSC-Height) und der Intensität der Propidiumiodid-Färbung (PI) wurden im PI-negativen Bereich drei viable Zellpopulationen identifiziert (Abb.5). Die Population mit den kleinsten FSC-Werten, bezeichnet als Population R3, enthielt 53,21% der insgesamt registrierten Zellen. Die in Region R2 zusammengefassten Zellen machten einen Anteil von 5,34% aus. Die Region R1 beinhaltete 3,25% der Zellen.

### 3.2.2.1.2 Immunphänotypisierung der vitalen Populationen

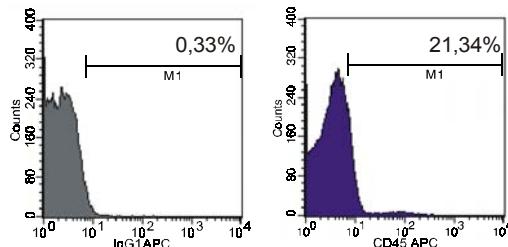


Abb.6: Quantifizierung CD45-positiver Zellen der Region R3 ausgehend von zugehörigen Isotyp.

Die Auswertung der Histogramme ermittelte 21,34% CD45 APC-positive Zellen, denen der zugehörige Isotyp mit 0,33% vorgegeben war (Abb.6).

Die weitere Immunphänotypisierung wurde mit FITC-direktkonjugierten Antikörpern durchgeführt:

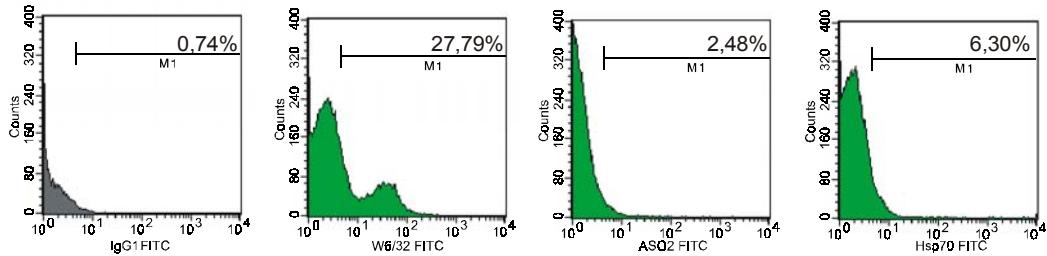


Abb.7: Quantifizierung der Antikörperbindung von W6/32 (Mitte) und cmHsp70.1(rechts) sowie ASO2 an die Zellen der Region R3 ausgehend vom Isotyp-Kontrollantikörper (links).

27,79% der Zellen in der Population R3 erwiesen sich als MHC-Klasse-I-positiv (Abb.7). Bei einem Isotyp von 0,74% wurden 2,48% ASO2-positive Zellen ermittelt. Die oberflächliche Hsp70-Expression betraf 6,30% der Zellen in R3. Der grenzwertige Hsp70-Befund wurde in der Mehrfachfärbung mit CD45 näher untersucht.

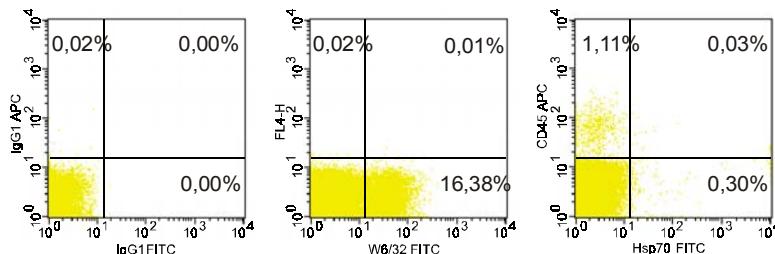


Abb.8: Mehrfachfärbung der Oberflächenantigene CD45 und Hsp70 auf den Zellen der Region R3 in den Dotblots (rechte Spalte) neben zugehörigen Isotyp-Färbungen (linke Spalte) und der MHC-Klasse-I-Identifikation über W6/32(Mitte).

Aus den gezeigten Dotblots ging ein mit 16,38% qualitativ positiver Nachweis MHC-Klasse-I-positiver Zellen hervor (Abb.8). Zugleich wurden 1,11% CD45-positive Zellen identifiziert. Beide Resultate lagen unterhalb derjenigen der Histogramm-Auswertung derselben Messungen. CD45- und Hsp70-doppelpositive Zellen waren zu lediglich 0,03% vorhanden. Bedeutsam war, dass 0,30% einfache Hsp70-positive Zellen ermittelt werden konnten.

Aufgrund der Scattercharakteristik der Population R3 und wegen ihrer niedrigen MHC-Klasse-I-Expression war zu vermuten, dass Erythrozyten einen Großteil der in R3 charakterisierten Zellen ausmachten.

Das schwach-positive Resultat der Hsp70-Detektion konnte auch durch eine unspezifische Bindung an Zelldebris hervorgerufen werden. Gegen quantitativ intakte Zellmembranen sprach auch die geringe Detektion von MHC-Klasse-I-Molekülen.

Wegen der fehlenden quantitativen Detektion von MHC-Klasse-I-Molekülen und wegen des quantitativ negativen Dotblots durfte die Immunphänotypisierung bezüglich der Hsp70-Expression nicht als positiv bezeichnet werden.

Die immunphänotypische Bestimmung der Zellpopulation R2 zeigte einen leukozytären Anteil von 3,95% als CD45-positive Zellen (Abb.9):

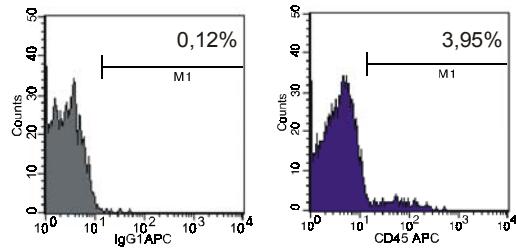


Abb.9: Quantifizierung CD45-positiver Zellen der Region R2 ausgehend von zugehörigen Isotyp.

Die weitere durchflusszytometrische Analyse führte zu 35,18% MHC-Klasse-I-positiven Zellen für die Population R2 (Abb.10). Zwar ergab sich ein gegenüber der MHC-Expression der Zellen in R3 ein leicht erhöhter Wert, dennoch konnte das Resultat nicht als quantitative Expression bezeichnet werden.

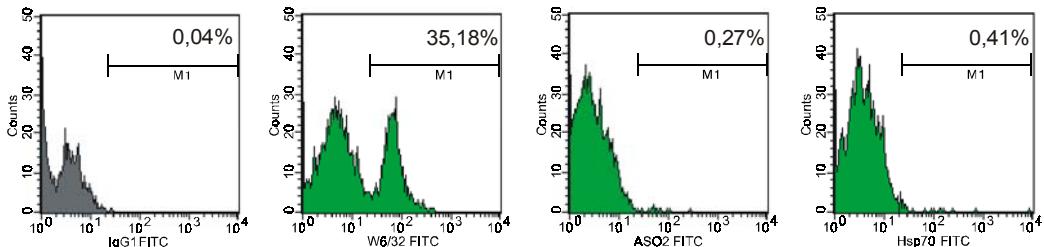


Abb.10: Quantifizierung der Antikörperbindung von W6/32 (Mitte), AS02 und cmHsp70.1(rechts) an die Zellen der Region R2 ausgehend vom Isotyp-Kontrollantikörper.

Die immunphänotypische Bestimmung von AS02 und Hsp70 verlief mit 0,27% und 0,41% in beiden Fällen negativ:

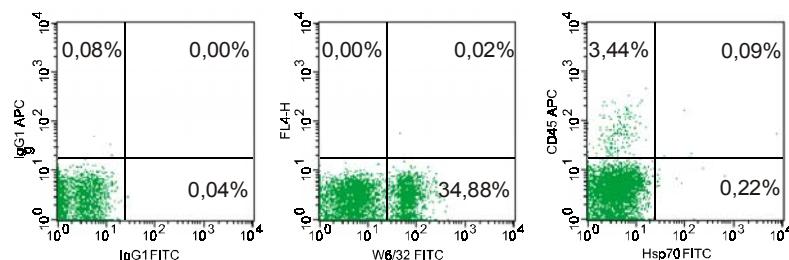


Abb.11: Mehrfachfärbung der Oberflächenantigene CD45 und Hsp70 auf den Zellen der Region R2. in den Dotblots (rechte Spalte) neben zugehörigen Isotyp-Färbungen (linke Spalte) und der MHC-Klasse-I-Identifikation über W6/32(Mitte).

Zu quantitativ vergleichbaren Resultaten kam auch die quantitative Auswertung der Dotblots mit 34,88% MHC-Klasse-I-positiven Zellen und 3,44% CD45-positiven Zellen (Abb.11). Die Hsp70-Erfassung verlief mit 0,09% CD45- und Hsp70-doppelpositiven und 0,22% einfach Hsp70-positiven registrierten Zellen negativ.

Sowohl die Histogramm- als auch die Dotplot-Analyse führte zu einem Hsp70-negativen Resultat für die Zellen der Population R2.

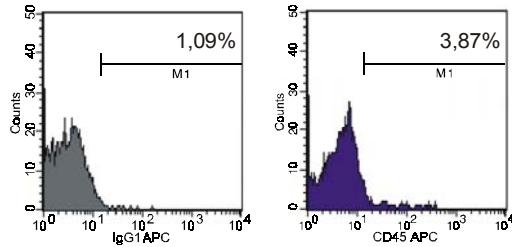


Abb.12: Bestimmung des Anteils CD45-positiver Zellen in der FACS-Population R1.

Als dritte Zellpopulation wurde die Region R1 immunphänotypisiert. Die Analyse CD45-positiver Zellen ergab einen leukozytären Anteil von 3,87% (Abb.12).

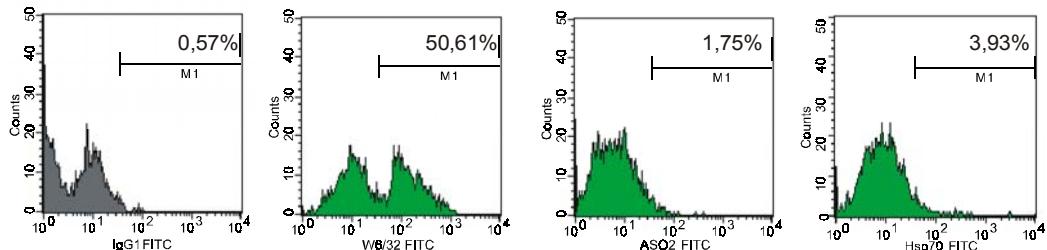


Abb.13: Immunphänotypische Quantifizierung der MHC-Klasse-I-, AS02- und Hsp70-Expression der Population R1.

In der weiteren Analyse konnten 50,61% MHC-Klasse-I-positive Zellen ermittelt werden. Die durchflusszytometrische Identifikation von Bindegewebe führte zu einem niedrigen Resultat von 1,75% AS02-positiven Zellen (Abb.13).

Mit 3,93% gleichfalls niedrig ausgeprägt war die Immunphänotypisierung von oberflächenständigem Hsp70. Eine Beteiligung CD45-positiver Zellen wurde in der Mehrfachfärbung untersucht:

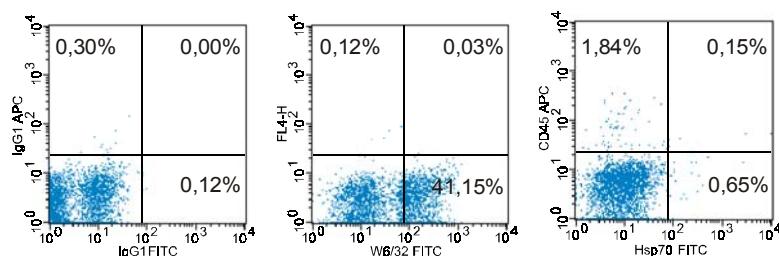


Abb.14: Mehrfarbfärbung der Oberflächenantigene CD45 und Hsp70 auf den Zellen der Region R1. in den Dotblots (rechte Spalte) neben zugehörigen Isotyp-Färbungen (linker Spalte) und der MHC-Klasse-I-Identifikation über W6/32(Mitte).

Darin konnte die MHC-Klasse-I-positive Population mit einem gemessenen Anteil von 41,15% gut dargestellt werden (Abb.14). Zugleich bestätigte sich der geringe leukozytäre

Anteil mit 1,84%. Nur zu 0,15% trugen diese als doppelpositive Zellen zu einem Hsp70-Resultat bei.

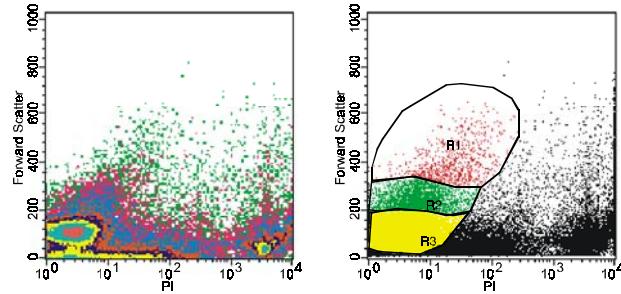
Der Anteil von 0,65% Hsp70-positiven Zellen unterschritt den Schwellenwert von 5,00%, der einen positiven Nachweis von Hsp70 als Oberflächenmarker determinieren würde, ebenso wie dies das Resultat der Auswertung im Histogramm-Modus tat.

Mit einer durchflusszytometrischen Detektion von Hsp70 deutlich unterhalb von 5,00% ließ sich das Normalgewebe (N)CR#155 als „Hsp70-negativ“ klassifizieren.

### 3.2.2.2 Durchflusszytometrische Analyse der Tumorbiopsie

#### 3.2.2.2.1 Determination viabler Zellpopulationen

Auf analoge Weise wurde auch die Tumorbiopsie CR#155 untersucht. In der Vitalitätsanalyse wurden bei den Einzelzellen aus dem Tumor drei Populationen definiert (Abb.15).

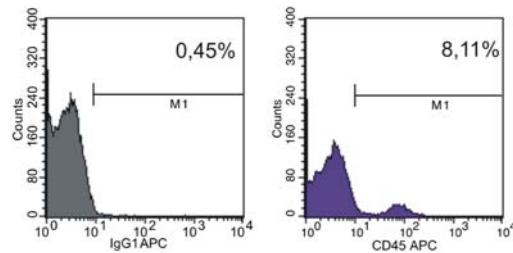


*Abb.15: Bestimmung von drei vitalen Zellpopulationen (R1, R2, R3) der Einzelzellsuspension aus der Tumorbiopsie CR#155.*

Diese machten mit der Region R3 57,97%, mit den Zellen der Region R2 3,20% und mit der Region R1 0,95% der aufgezeichneten Zellen aus.

#### 3.2.2.2.2 Immunphänotypisierung der vitalen Zellpopulationen

Zunächst wurde eine Überprüfung auf Leukozyten vorgenommen. CD45-positive Zellen waren zu 8,11% in der Population R3 vertreten (Abb.16).



*Abb.16: Bestimmung von CD45-positiven Zellen in der Region R3.*

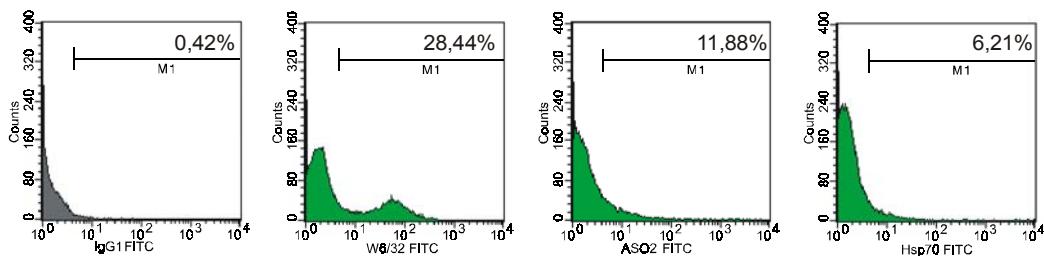


Abb.17: Quantifizierung der MHC-Klasse-I-Expression sowie des Anteils AS02-bzw. Hsp70-positiver Zellen der Region R3 ausgehend vom Isotyp.

Als MHC-Klasse-I-positiv konnten 28,44% der Zellen ermittelt werden. Ebenfalls mit FITC-direktkonjugierten Antikörpern wurden 11,88% AS02-positive Zellen und 6,21% Hsp70-positive Zellen vorgefunden (Abb.17).

Sowohl die AS02-Expression als auch das mit 6,21% schwach positive Hsp70-Resultat wurden in Gegenfärbung mit anti-CD45 überprüft (Abb.18).

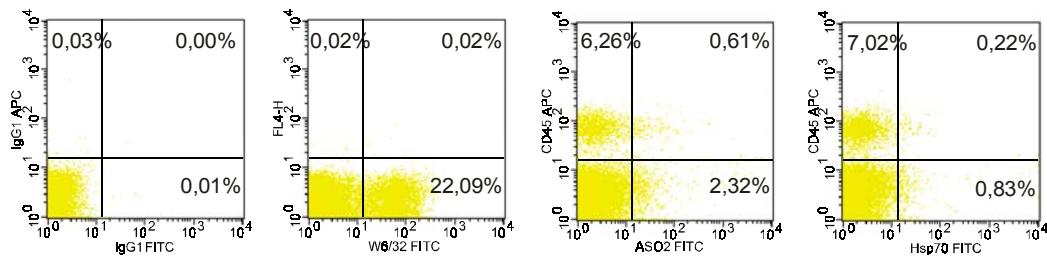


Abb.18: Mehrfachfärbung der Oberflächenantigene CD45 und Hsp70 auf den Zellen der Region R3 der malignen Gewebebiopsie ausgehend von der Isotyp-Färbungen (linke Spalte) und der MHC-Klasse-I-Identifikation über W6/32(Mitte).

Es zeigte sich ein mit 7,02% beziehungsweise 6,26% leicht verminderter Anteil CD45-positiver Zellen. Die CD45-positiven Zellen waren in geringem Umfang, das heißt zu 0,61%, am AS02-positiven Resultat und zu 0,22% am Hsp70-Resultat beteiligt. Als einfach AS02-positive Zellen wurden 2,32% errechnet und 0,83% Hsp70-positive Zellen.

Das geschilderte grenzwertig positive Resultat des Histogramms wurde durch die Dotplot-Auswertung relativiert.

Es kam hinzu, dass die als Positivkontrolle erforderliche, möglichst quantitative Detektion von MHC-Klasse-I-Oberflächenmolekülen mit lediglich 22,09% nicht vorhanden war. Erythrozyten mögen auch in diesem Fall die in R3 dominierende Zellart gewesen sein.

Aus diesem Grund sind die Zellen aus der Population R3 für eine Beschreibung von Oberflächenantigenen wenig geeignet.

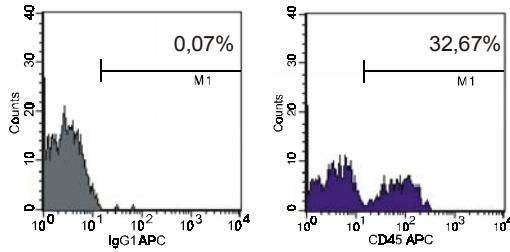


Abb.19: Quantitative Bestimmung der CD45-positiven Zellen aus der Region R2 der Zellsuspension aus der Tumorbiose.

Die durchflusszytometrische Analyse der Population R2 ergab einen Anteil von 32,67% CD45-positiven Zellen (Abb.19).

Die weitere Immunphänotypisierung zeigte 67,27% MHC-Klasse-I-positive Zellen und 9,09% AS02-positive Zellen. Der letztgenannte Anteil bindegewebiger Zellen fiel für ein medulläres Karzinom erwartungsgemäß aus, indem Tumorphänotypen gegenüber tumorassoziiertem Bindegewebe dominierte.

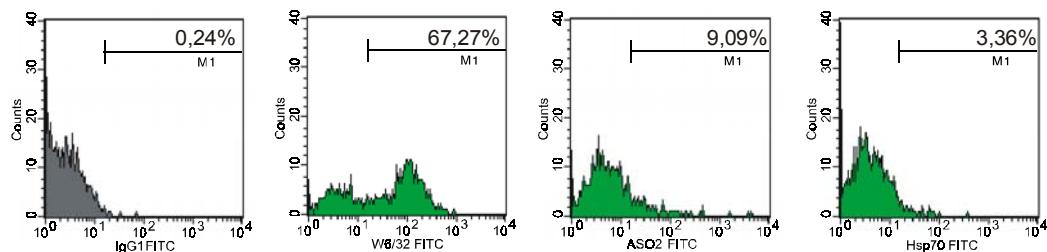


Abb.20: Immunphänotypische Bestimmung der Bindung von W6/32-FITC, AS02-FITC und cmHsp70.1-FITC neben CD45 an die Zellen der Population R2 aus der Tumorbiose.

Die quantitative Auswertung der Hsp70-Analyse ermittelte 3,36% Hsp70-positive Zellen (Abb.20).

Das unterhalb des Schwellenwerts gelegene, qualitativ negative Resultat wurde ebenfalls in Dotblots weiter untersucht (Abb.21).

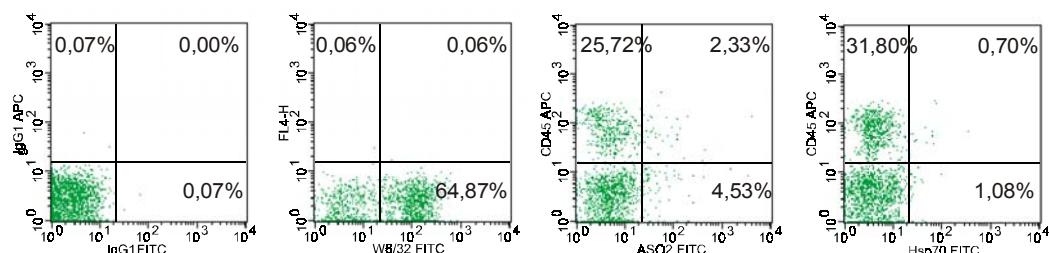
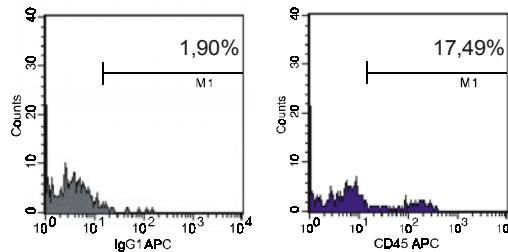


Abb.21: Mehrfachfärbung der Oberflächenantigene CD45 und Hsp70 (Dotplot rechts) auf den Zellen der Region R2 der malignen Gewebebiopsie mit der Isotyp-Färbung (linke Spalte) und der MHC-Klasse-I-Identifikation über W6/32(Mitte).

Diese ermöglichen eine Auf trennung in CD45-positive und CD45-negative Zellen. Es wurde eine Bindung des Antikörpers AS02 an 2,33% CD45-positive Zellen beobachtet, denen 4,53% einfach AS02-positive Zellen gegenüberstanden.

Seitens der Hsp70-Analyse ergab die Dotblot-Quantifizierung eine Mitbeteiligung von CD45-positiven Zellen am Resultat von 0,70% doppelpositiven Zellen gegenüber 1,08% einfach Hsp70-positiven Zellen.

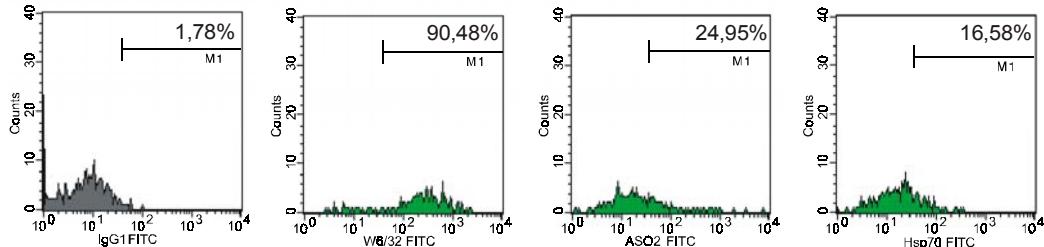
Nur minimal trugen CD45-positive Zellen zum Resultat bei Hsp70 bei. Sowohl im Histogramm als auch im Dotblot unterschritt die Detektion von Hsp70 die 5,00% deutlich. Die mehrheitlich aus Leukozyten bestehende Population R2 konnte anhand der geschilderten Immunphänotypisierung als „Hsp70-negativ“ klassifiziert werden.



*Abb.22: Quantitative Bestimmung des leukozytären Anteils als CD45-positive Fraktion der Zellen aus R1 der Tumorzellsuspension.*

Mit lediglich 17,49% CD45-positiven Zellen war der leukozytäre Anteil in der Population R1 gegenüber der zuletzt genannten Population R2 reduziert (Abb.22).

Die weitere immunphänotypische Auswertung bestätigte die MHC-Klasse-I-Expression bei 90,48% der Zellen (Abb.23).



*Abb.23: Quantitative Bestimmung der Oberflächenmarker MHC-Klasse-I, AS02 und Hsp70 in der Zellpopulation R1 ausgehend vom Bindungsverhalten des Isotyps.*

Zwar entsprach die vorgefundene AS02-Expression mit 24,95% den theoretischen Erwartungen an ein medulläres Karzinom mit einem Fibrosegrad von weniger als 50%, verglichen mit anderen kolorektalen Karzinomen lag die detektierte Menge an Bindegewebe-Zellen überdurchschnittlich hoch. Dies gilt auch für den direkten Vergleich mit der nicht-malignen Biopsie (Region R1: 1,75% AS02-positiv) derselben Patientin.

Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Populationen wiesen die Region R1 16,58% Hsp70-positive Einzelzellen auf. Auch für diese Population wurde die Mehrfachfärbung ausgewertet (Abb.24).

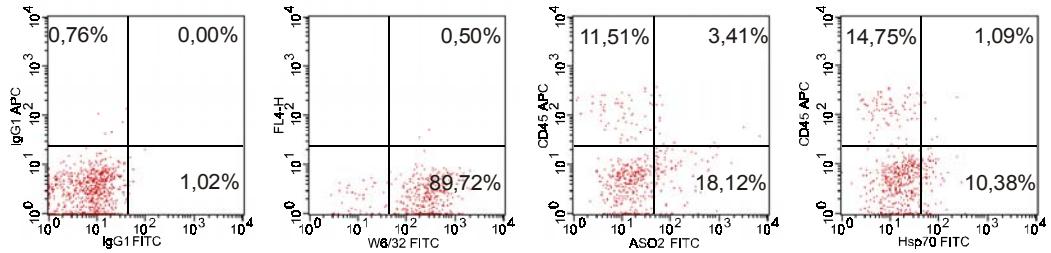


Abb. 24: Mehrfachfärbung der Oberflächenantigene CD45 und Hsp70 auf den Zellen der Region R1 der malignen Gewebebiopsie mit der Isotyp-Färbungen (linke Spalte) und der MHC-Klasse-I-Identifikation über W6/32(Mitte).

Der mit 89,72% hohe Anteil MHC-Klasse-I-positiver Zellen konnte auch bei der Auswertung der Dotblots bestätigt werden. In der Gegenfärbung mit AS02 zeigten sich die AS02-positiven Zellen (18,12%) separat von den CD45-positiven Leukozyten (11,51%). Ein Einstrahlen beider Zellarten in den doppelpositiven Bereich (3,41%) konnte nicht vollständig vermieden werden.

Auch in der Gegenfärbung mit cmHsp70.1 gelang eine eindeutige Auftrennung von CD45-positiven Leukozyten mit einem Anteil von 14,75%, die zwar zu 1,09% in den doppelpositiven Bereich drifteten, jedoch deutlich zu unterscheiden waren von CD45-negativen Zellen. Diese Population war zu 10,38% Hsp70-positiv.

Aufgrund der übereinstimmenden Befundslage von Histogramm und Dotplot konnte ermittelt werden, dass die Population R1 Hsp70-positive Zellen enthielt. Die Tumorbiopsie unterschied sich hiermit von der auf gleiche Weise analysierten normalen Mucosa der Patientin und wurde als „Hsp70-positiv“ eingestuft.

### 3.2.3 Quantitative Untersuchungen zum Einfluss der makroskopischen Konsistenz kolorektaler Karzinome auf die Immunphänotypisierung

#### 3.2.3.1 Vitalität

Durch kurzeinwirkende einminütige manuelle Disaggregation wurde der Gewebeverband der kolorektalen Tumore zerstört und neben Zelltrümmern vitale Einzelzellen präpariert:

Der höchste Anteil an vitalen Zellen konnte aus medullären Karzinobiopsien mit weicher Konsistenz isoliert werden und betrug 4,97%. Aus einfachen Karzinomen wurden im Mittel 3,79% vitale Zellen isoliert. Anders verhielt es sich bei den szirrhösen Karzinomen mit ihrer schnittfesten Konsistenz. Diese Karzinomart kam bei dem kolorektalen Karzinom mit 7 Exemplaren vergleichsweise selten vor.

Dort war es nur möglich, im Mittel 0,51% vitale Zellen für die durchflusszytometrische Untersuchung zu gewinnen. Der Unterschied zwischen den Vitalzellanteilen der Karzinomarten ist statistisch signifikant ( $p=0,0001^*$ )(Tab.32).

| Karzinomart | Viabilität                     | Stat. Signifikanz |
|-------------|--------------------------------|-------------------|
| medullär    | 4,97%<br>(0,19-19,6%; s=4,35)  | $p=0,0001^*$      |
| einfach     | 3,79%<br>(0,08-31,27%; s=5,57) |                   |
| szirrhös    | 0,51%<br>(0,21-1,06%; s=0,29)  |                   |

Tab. 32: Anteil viabler Einzelzellen aus kolorektalen Tumorbiopsien nach manueller Disaggregation in Abhängigkeit von der Konsistenz des vorliegenden Gewebes. Zugrundegelegt wurde der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil der propidiumiodid-negativen Population. Im Mittel wurden aus medullären Karzinomen 4,97% vitale Zellen präpariert, aus einfachen 3,79% und aus szirrhösen 0,51%. Der Unterschied zwischen den Vitalzellanteilen verschiedener Gewebekonsistenzen ist statistische signifikant ( $p=0,0001^*$ ). Ebenso statistisch signifikant waren die konsistenzbedingten Vitalitätsunterschiede zwischen medullären und einfachen ( $p=0,0277^*$ ), zwischen medullären und szirrhösen ( $p=0,0002^*$ ) sowie zwischen einfachen und szirrhösen Karzinomen ( $p=0,0028^*$ ).

Die in der Tabelle aufgeführten Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte geben ausgeprägte individuelle Streuungen der Vitalität der Einzelzellen aus Tumorbiopsien wieder. Die nicht-enzymatische Disaggregation des Zellverbands führte zu einem hohen Anteil an Zelltrümmern und letalen Zellen, die anhand ihrer Granularität und des hohen Seitwärtsstreuulichts sowie durch PI-Positivität immunzytometrisch von vitalen Zellen unterschieden werden mussten.

Trotz der individuellen Heterogenität kolorektaler Tumore und der großen Standardabweichungen schien die manuelle Disaggregation je nach Konsistenz der kolorektalen Tumorbiopsie zu unterschiedlich hohen Ausbeuten vitaler Zellen zu führen: Aus medullären Karzinomen wurden signifikant mehr vitale Zellen ( $p=0,027^*$ ) als aus einfachen sowie aus szirrhösen ( $p=0,0002^*$ ) verfügbar gemacht.

Insofern eignete sich die manuelle Disaggregation bevorzugt für medulläre und einfache kolorektale Karzinome. Bei selten vorgefundenen szirrhösen kolorektalen Karzinomen war

mit einem signifikant reduzierten Vitalzellanteil ( $p=0,0028^*$ ) zu rechnen, aber eine durchflusszytometrische Untersuchung dennoch möglich.

Bei den malignen Tumoren wurden nekrotische Gewebeabschnitte beschrieben (Thomas, 1998). Diese bereits vor der manuellen Disaggregation letalen Zellen konnten den verfügbaren Anteil an vitalen Zellen reduzieren. Die vorhandenen letalen Zellen wurden immunphänotypisch ausgeschlossen, indem sich die durchflusszytometrische Analyse ausschließlich auf vitale, propidiumiodidnegative Zellen beschränkte.

Es bestand ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Konsistenz und der Ausbeute an vitalen Zellen, die immunphänotypisch charakterisiert werden können. Es musste eingeschränkt werden, dass bezüglich des Parameters Vitalität ausgeprägte individuelle Unterschiede bei den kolorektalen Karzinomen gesehen wurden, die zu entsprechend hohen Standardabweichungen führten.

Dennoch ermöglichte die kurzeinwirkende manuelle Disaggregation mit Skalpell und Zellsieb die Präparation vitaler Einzelzellen aus kolorektalen Tumorbiopsien jeder der beschriebenen Konsistenzen.

### 3.2.3.2 Expression von MHC-Klasse I auf vitalen Einzelzellen kolorektaler Tumore

Unter anderem als Positivkontrolle für die angedachte Hsp70-Immunphänotypisierung wurde die Detektion von MHC-Klasse I-Molekülen auf vitalen Einzelzellen aus Tumorbiopsien verwandt. Nach der makroskopisch bestimmten Tumorkonsistenz fanden sich folgende Resultate: Bei medullären Karzinomen betrug der Anteil MHC-Klasse I-positiver Zellen im Durchschnitt 79,70%, bei einfachen 75,57% und bei szirrhösen 50,59% (Tab.33). Die Karzinomarten verhielten sich im Hinblick auf ihre MHC-Klasse I-Expression nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,08$ ).

| <i>Karzinomart</i> | <i>MHC Klasse I</i>              | <i>stat. Signifikanz</i> |
|--------------------|----------------------------------|--------------------------|
| medullär           | 79,70%<br>(2,45-99,49%; s=25,56) | $p=0,08$ (n.s.)          |
| einfach            | 75,57%<br>(4,42-99,82%; s=25,33) |                          |
| szirrhös           | 50,59%<br>(1,99-99,17; s=34,09)  |                          |

Tab.33: Durchflusszytometrische Bestimmung der MHC-Klasse I-Expression auf vitalen Einzelzellen aus kolorektalen Tumorbiopsien. Aufgetragen sind die Mittelwerte für MHC-Klasse I-positive Zellen, gegliedert nach der Konsistenz des Tumors. Die Unterschiede der MHC-Klasse I Expression zwischen Konsistenzarten waren nicht signifikant ( $p=0,08$ ).

Für das Antigen MHC-Klasse I waren innerhalb der Gruppen individuelle Schwankungen in der Merkmalsausprägung anzutreffen. Dennoch konnten die Oberflächenmoleküle mit Hilfe des gewählten Verfahrens auf vitalen Einzelzellen aller untersuchten Karzinomarten wiedergefunden werden.

Der Anteil MHC-positiver Zellen fiel bei szirrhösen Karzinomen geringer aus als bei den beiden anderen Tumorarten. Als mögliche Ursache mag die ehedem verringerte Vitalität in Frage kommen, zumal nicht ausgeschlossen werden kann, dass nicht nur durch sie, sondern

auch durch eine gleichfalls stattfindende Adsorption von Primär- oder Sekundärantikörper an letale Zellen die Sensitivität der Detektion von Antigenen auf vitalen Einzelzellen verringert wurde. Ein derartiger Effekt schien bei szirrhösen Tumoren am deutlichsten ausgeprägt.

### 3.2.3.3 Immunzytometrische Erfassung bindegewebiger Zellen

Über den murinen monoklonalen Antikörper AS02 Dianova steht ein diagnostisches Tool zur Verfügung, mit dem sich Fibroblasten (Bindegewebezellen) mit hoher Spezifität identifizieren lassen. Die genaue Bindungsstelle ist bislang unbekannt, seine durchflusszytometrische Verwendbarkeit indes erprobt (Saalbach et al., 1997).

Es galt zu untersuchen, ob bei kolorektalen Karzinomen ein Zusammenhang zwischen makroskopisch definierter Tumorkonsistenz und immunzytometrisch quantifiziertem Gehalt an AS02-positiven Fibroblasten besteht. Für die immunphänotypische Charakterisierung wurde der Absolutwert positiv gefärbter Zellen zugrundegelegt. Einen Schwellenwert für die AS02-Expression einer einzelnen Konsistenzart zu suchen, war nicht praktikabel, da von ausgeprägten inter- und individuellen Diversität auszugehen war und die Präsenz des Markers AS02 *a priori* nicht vorausgesetzt werden konnte.

| Karzinomart | AS02-Expression                  | stat.<br>Signifikanz |
|-------------|----------------------------------|----------------------|
| medullär    | 13,92%<br>(0,08-75,23%; s=17,52) | p=0,023*             |
| einfach     | 14,88%<br>(0,51-62,48%; s=14,10) |                      |
| szirrhös    | 42,88%<br>(31,85-62,92; s=14,20) |                      |

Tab.34: Immunphänotypische Bestimmung des Bindegewebeanteils innerhalb vitaler Einzelzellen aus kolorektalen Tumoren. Der Anteil AS02-positiver Zellen betrug aus medullären Karzinomen durchschnittlich 13,92%, aus einfachen 14,88% und aus szirrhösen Karzinomen durchschnittlich 42,88% (p=0,023 n.s.). Zur Signifikanz der AS02-Expression einzelner Karzinomarten: medullär vs. einfach: 0,2355 n.s., einfach vs. szirrhös: 0,0168\*, medullär vs. szirrhös: 0,0323\*.

Die Immunphänotypisierung kolorektaler Tumorbiopsien ergab für den Fibroblastenmarker AS02 ein distinktes Expressionsmuster bei makroskopisch unterschiedlichen Gewebetypen (p=0,0323\*). Der Gehalt an AS02-positiven Zellen war mit durchschnittlich 13,92% AS02-positiver vitaler Zellen aus medullären und durchschnittlich 14,88% AS02-positiven Zellen aus einfachen Karzinomen gering ausgeprägt (Tab.34), jedoch statistisch nicht signifikant (p=0,2355).

Der Anteil AS02-positiver vitaler Zellen aus szirrhösen Karzinomen unterschied sich mit 42,88% statistisch signifikant von einfachen (p=0,0168\*) und medullären Karzinomen (p=0,0228\*).

Bei den untersuchten kolorektalen Karzinobiopsien korrelierte die makropathologische Karzinomart nicht nur mit der Ausbeute an vitalen Zellen insgesamt, innerhalb der vitalen Zellen konnte auch eine distinkte oberflächliche Expression der Bindungsstelle für AS02 in Abhängigkeit von der makroskopischen Konsistenz gesehen werden. Insofern korreliert der Bindegewebegehalt, der makroskopisch die Konsistenz der Biopsie vorgibt, mit dem Anteil AS02-positiver vitaler Zellen aus Tumorbiopsien.

### 3.2.3.4 Quantifikation von tumorinfiltrierenden Leukozyten

Über das Oberflächenantigen CD45 (Leucocyte common antigen, LCA) wurden der Gehalt an Leukozyten quantifiziert. Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten sind bedeutsam im Rahmen einer peritumoralen Infiltration - und damit die Basis jeglicher immuntherapeutischer Ansätze gegen Tumore.

Andererseits stellen Leukozyten nicht-adhärente Zellen dar, die im Gegensatz zu Tumorzellen nicht aus einem Gewebeverband herausgelöst werden müssen, sondern unmittelbar in die Einzelzellsuspension übergehen können und durchflusszytometrisch in der Fraktion vitaler Zellen miterfasst werden.

| Karzinomart | CD45-FITC                        | stat. Signifikanz |
|-------------|----------------------------------|-------------------|
| medullär    | 19,70%<br>(0,82-68,41; s=16,89)  | p=0,4168 (n.s.)   |
| einfach     | 28,55%<br>(1,01-88,72%; s=22,02) |                   |
| szirrhös    | 20,81%<br>(5,14-36,48%; s=15,67) |                   |

Tab.35: Immunphänotypische Quantifizierung von Leukozyten, angegeben der durchschnittliche Anteil CD45-positiver vitaler Zellen, zusätzlich Minima, Maxima, Standardabweichungen einzelner kolorektaler Tumorbiopsien. Die Leukozytenmenge ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Konsistenzarten ( $p=0,4168$ , Kruskal-Wallis)

Leukozyten, die sich über das Oberflächenantigen CD45 quantifizieren ließen, waren bei medullären kolorektalen Karzinomen zu durchschnittlich 19,70 % anzutreffen (Tab.35). Tumore mit einfacher Konsistenz enthielten mit durchschnittlich 28,55% den höchsten leukozytären Anteil an vitalen Zellen. Einzelzellsuspensionen aus szirrhösen kolorektalen Karzinomen wiesen im Mittel 20,81% Leukozyten auf. Die CD45-Expression unterschied sich innerhalb der Konsistenzgruppen nicht signifikant ( $p=0,4168$ ).

Bei den kolorektalen Tumorbiopsien wurde ein Streubereich von 0,82% bis 88,72% an CD45-positiven Zellen beobachtet. Dies deutete auf eine ausgeprägte individuelle Heterogenität in der Detektion des Merkmals CD45 und damit auf eine heterogene Fraktion der tumorinfiltrierenden Leukozyten.

Obwohl das quantitative Ausmaß der Infiltration eines Tumors durch natürliche Killerzellen geringer ausgeprägt gefunden wurde als von T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen (Tang et al., 1992). Untersuchungen von Coca et al. (1997), Ishigami et al. (2000) und Villegas et al. (2002) belegten die tumorbiologische Relevanz der NK-Zellen im Hinblick auf eine signifikant günstigere Prognose. In den zitierten Arbeiten kamen immunhistochemische Verfahren zur Anwendung. Lynch et al. (1999) führten die günstigere Prognose HNPCC-assozierter kolorektaler Karzinome zumindest teilweise auf die verstärkte leukozytäre Infiltration zurück. Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) bilden die Basis für zelluläre immunologische Therapieansätze (Viale et al., 1990; Melioli et al., 1996).

Aus methodologischen und rationellen Gründen wird für die Fragestellung der Quantifizierung von NK-Zellen innerhalb der tumorinfiltrierenden Leukozyten die immunhistochemische Analyse von Gewebeschnitten empfohlen (Böcker, 2001).

### 3.2.3.5 Immunzytometrische quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von Hsp70 auf Einzelzellen kolorektaler Tumore

Ein positiver Nachweis von Hsp70 auf der Oberfläche von vitalen Einzelzellen konnte für Tumorbiopsien jeder Karzinomart geführt werden. Hinsichtlich des Anteils positiver Zellen unterscheiden sich die Karzinomarten nicht signifikant voneinander ( $p=0,7513$ , Tab.36).

| Karzinomart | Hsp70                            | stat.<br>Signifikanz |
|-------------|----------------------------------|----------------------|
| medullär    | 10,84%<br>(0,00-72,38%; s=17,19) |                      |
| einfach     | 7,20%<br>(0,00-19,30; s=5,93)    | $p=0,7513$ (n.s.)    |
| szirrhös    | 9,71%<br>(0,82-23,33; s=7,87)    |                      |

Tab.36: Durchschnittlicher Anteil vitaler Zellen mit membranärer Hsp70-Expression auf Einzelzellen aus kolorektalen Tumorbiopsien, tabellarisch dargestellt Minima, Maxima und Standardabweichungen. Die graduellen Unterschiede der Hsp70-Expression zwischen den Karzinomarten blieben statistisch nicht signifikant ( $p=0,7513$ ).

Aus Einzelzellsuspensionen medullärer Karzinome wurden mit durchschnittlich 10,84% Hsp70-positiven Zellen und 9,71% bei kolorektalen Tumoren mit szirrhöser Konsistenz geringfügig mehr Hsp70-positive Zellen detektiert als aus einfachen mit einem mittleren Anteil von 7,20% (Tab.20). Für jede Tumorkategorie wurden erheblich Streubereiche der oberflächenständigen Hsp70-Expression beobachtet, die sich bei medullären Karzinomen von 0,00% bis 72,38% erstreckte, bei einfachen zwischen 0,00-19,30% und bei szirrhösen von 0,82-23,33% Hsp70-positiven vitalen Einzelzellen.

Die Expression von Hsp70 auf der Oberfläche vitaler Einzelzellen aus malignen kolorektalen Tumoren war nicht an die Konsistenz gebunden, sondern konnte in Einzelfällen, die jeder der Karzinomarten angehörten, zu einem positiven Nachweis führen.

### 3.2.4 Immunzytometrischer Vergleich von kolorektaler Normalschleimhaut und Tumor

Bei 65 der 159 kolorektalen Tumorbiopsien stand zugehörige normale Mucosa zur Verfügung. Die parallel durchgeführte durchflusszytometrische Untersuchung lieferte folgendes Ergebnis (Tab.37):

| Immunzytometrischer Parameter | Gewebeart                         |                                  | Statistische Signifikanz |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
|                               | Normalschleimhaut                 | Tumor                            |                          |
| Vitalität                     | 3,79%<br>(0,05-38,23%; s=5,30)    | 4,78%<br>(0,19-16,19%; s=4,19)   | p=0,0070*                |
| MHC K lasse I                 | 66,48%<br>(1,29-100,00%; s=29,64) | 78,07%<br>(1,99-99,41%; s=25,34) | p=0,0011*                |
| ASO2-Expression               | 11,01%<br>(0,00-97,21%; s=17,66)  | 11,90%<br>(0,26-62,48%; s=14,71) | p=0,4328<br>(n.s.)       |
| Leukozyten (CD 45)            | 14,14%<br>(0,00-52,17%; s=12,34)  | 23,73%<br>(1,17-88,72%; s=19,29) | p=0,0248*                |
| Hsp70-Expression              | 2,28%<br>(0,00-8,42%; s=1,74)     | 6,94%<br>(0,00-65,57%; s=9,85)   | p<0,0001*                |

Tab.37: Übersicht der quantitativen Resultate der durchflusszytometrischen Analyse kolorektaler Darmschleimhaut und kolorektaler Karzinome. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte der quantitativen immunzytometrischen Auswertungen, die Minima und Maxima der Messwertebereiche, sowie die Standardabweichungen (s).

#### 3.2.4.1 Vitalität

Aus kolorektaler Normalschleimhaut wurden durch manuelle Disaggregation im Mittel 3,79% vitale, PI-negative Zellen detektiert. Das Minimum betrug 0,05%, die maximale Ausbeute lag bei 38,23%. Aus malignen Biopsien waren durchschnittlich 4,78% vitale Zellen isoliert worden, minimal 0,19%, maximal 16,19%. Die nicht-enzymatische, manuell-destructive Methode zur Einzelzellisolierung, die zwangsläufig auch zu Debris und zu propidiumiodid-positiven Zellen mit zerstörter Zellmembran führte, schränkte den verfügbaren Anteil an vitalen Zellen ein.

Weitere äußere Faktoren wie unvermeidbare unterschiedliche Zeitspannen zwischen Resektion und durchflusszytometrischer Untersuchung kamen hier in Betracht. Es musste auch von individuellen Unterschieden bei kolorektalen Tumoren ausgegangen werden, die makroskopische, pathologische und durchflusszytometrische Parameter betreffen konnten. Aus den Standardabweichungen, die bei der Vitalität der kolorektalen Normalschleimhaut s=5,30 und bei kolorektalen Tumoren s=4,19 betragen, ließ sich eine ausgeprägte individuelle Variabilität beider Gewebearten ableiten.

Im direkten Vergleich zeigte sich eine signifikant höher ausgeprägte Vitalität der malignen Biopsien als bei zugehörigen nicht-malignen Geweben (p=0,0070\*).

Ein Verlust der intakten Zell-Zell-Adhäsion bei malignen Zellen beschrieben wurde über abnormale Adhäsionsmoleküle, z.B. der Integrine (Suzuki et al., 1993; Nigam et al., 1993; Thomas und Speight, 2002). Dieser Verlust kann zugleich mit einer verminderten Zell-

Zellkohärenz einhergehen. Der durchflusszytometrische Befund der erhöhten Anteile vitaler Zellen aus malignen Gewebebiopsien korreliert mit diesen molekularpathologischen Untersuchungen.

### 3.2.4.2 MHC Klasse I -Expression

Die Immunphänotypisierung vitaler Zellen ergab durchschnittlich 66,48% MHC-Klasse-I-positive Zellen aus nicht-maligner Dickdarmschleimhaut gegenüber 78,07% MHC-Klasse I-positiven Zellen. Bei dem Normalgewebe wurden Werte zwischen 1,29-100% gemessen, bei vitalen Zellen aus Tumorbiopsien zwischen 1,99 und 99,41% (Tab.37).

An den Standardabweichungen von  $s=29,64$  bei Normalgewebe und  $s=25,34$  bei Tumoren zeigten sich individuelle Unterschiede innerhalb der Biopsien gleicher Dignität. Aus der inferenzstatistischen Untersuchung konnte errechnet werden, dass auf vitalen Einzelzellen aus Tumoren signifikant mehr MHC-Klasse I-positive Zellen quantifiziert werden konnten als aus zugehöriger normaler intestinaler Schleimhaut ( $p=0,0011$ ).

Das Resultat mag zurückzuführen sein auf den größeren Anteil an vitalen Zellen aus malignen Biopsien. Obwohl die Inkubation der Zellen mit einem Überschuß an Antikörpern durchgeführt wurde, konnten Primär- (W6/32) und Sekundärantikörper (FITC-anti-Maus-IgG) unspezifisch an propidiumiodid-positive Zellen oder Zellfragmente adsorbiert werden und folglich nicht mehr für vitale Zellen zur Verfügung stehen.

Zwar wurden tumorassoziierte Veränderungen von MHC-Klasse-I-Molekülen auf humanen Tumorzellen beschrieben (Pantel et al., 1991; Feenstra et al., 1999; Ritz et al., 2001). Aus den hier dargestellten Resultaten konnte keine Tendenz über eine tumorassoziierte Deregelation von MHC-Klasse I-Molekülen ersehen werden.

### 3.2.4.3 AS02-Expression

Bindegewebige Zellen wurden immunzytometrisch über den monoklonalen Antikörper AS02 quantifiziert (Tab.37). Bei vitalen Einzelzellen aus intestinaler Mucosa wurden durchschnittlich 11,01% AS02-positive Zellen detektiert. Innerhalb des Messwertebereichs betrug das Minimum 0,00 % und das Maximum 97,21%. Bei der Immunphänotypisierung von kolorektalen Tumoren ergab sich ein vergleichbarer Mittelwert von 11,90% und ein Messwertebereich von 0,26% bis 62,48%. Bezuglich der Quantifizierung von bindegewebigen Zellen aus kolorektaler Normalschleimhaut und kolorektalen Tumoren wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt ( $p=0,4328$ ). Wie aus den Standardabweichungen von  $s=18,17$  bei Normalmucosa und  $14,71$  bei Karzinomen abgelesen werden konnte, wies auch das immunphänotypisch charakterisierte Merkmal der AS02-Expression große individuelle Variabilität auf.

### 3.2.4.4 Immunphänotypische Quantifizierung der Lymphozyten

Die immunphänotypische Quantifizierung von Leukozyten über ihr Oberflächenantigen CD45 führte zu durchschnittlich 14,14% CD45-positiven vitalen Zellen aus kolorektaler Normalmucosa und 23,73% CD45-positiven Zellen aus malignen Biopsien (Tab.37). Der

Messwertebereich erstreckte sich bei Normalschleimhaut von 0,00% bis 52,17% ( $s=12,34$ ) und bei Karzinomen von 0,82 bis 88,72% ( $s=19,29$ ). Eine individuelle Heterogenität äußerte sich in den beschriebenen betragsmäßig großen Standardabweichungen. Es zeigte sich für die Isolation und Charakterisierung von epithelialen Einzelzellen sowohl bei Normalgewebe als auch bei malignen Tumoren, dass nicht adhärente Leukozyten in die Fraktion der präparierten Einzelzellen übergingen.

Von einer negativen Selektion von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten wurde abgesehen, da bei der Durchführung, beispielsweise über Antikörper gegen CD45 tragende Beads, die über magnetische Säulen geführt und abgetrennt werden könnten, mit einer zusätzlichen drastischen Einbusse der Vitalität ausgegangen werden musste, wie sie bereits eingangs geschildert bei einer zweiminütigen Disaggregation auftritt.

Maligne Biopsien unterschieden sich von nicht-malignen kolorektalen Biopsien durch einen signifikant höheren quantitativen Umfang der durchflusszytometrisch determinierten Leukozyten ( $p=0,0248^*$ ).

### 3.2.4.5 Oberflächenexpression von Hsp70

Auf vitalen Einzelzellen wurde eine Expression des Hitzeschockproteins Hsp70 in indirekter Markierung mit dem Hsp70-spezifischen Antikörper cmHsp70.1 und einem FITC-Farbstoff-markierten Anti-Maus-Immunglobulin detektiert (Tab.37). Aus den 65 gepaarten Proben ergab sich eine durchschnittliche Expression von Hsp70 auf der Oberfläche von 2,28% auf Normalschleimhaut und 6,94% auf Einzelzellen aus korrespondierenden Tumorzellen. Bei Einzelzellen aus nicht-maligner Dickdarmschleimhaut wurden Werte zwischen 0,00 und 8,42% gemessen ( $s=1,74$ ) und bei Tumoren zwischen 0,00 und 65,57% ( $s=9,85$ ). Während für die Oberflächenexpression der Normalschleimhaut eine relativ geringe Streuung der Messwerte gesehen wurde, ergab die parallele Untersuchung der kolorektalen Tumoren signifikant höhere Werte für die Hsp70-positiven vitalen Einzelzellen ( $p<0,0001^*$ ).

Der Vergleich der Hsp70-Expression auf malignen Einzelzellen bestätigte die früheren Ergebnisse zur Hsp70-Expression auf der Zelloberfläche von humanen kolorektalen Tumorzelllinien (Multhoff et al., 1995b; 1997b; Botzler et al., 1998a; 1998b).

Für vitale Einzelzellen aus den nicht-malignen Mucosa-Biopsien wurden nach dem vorliegenden Auswertungsmodus Hsp70-positive Zellen in sehr geringem Umfang detektiert, Dies war auf den Histogramm-Verlauf und die vorgenommene Setzung des Markers zurückzuführen.

Die quantitative Auswertung der Immunphänotypisierung von Oberflächenantigenen auf vitalen Einzelzellen anhand von Histogrammen ergab sowohl bei Normalgewebe als auch bei Tumoren keine absoluten Nullwerte, sondern eine geringe Zahl von positiv determinierten Zellen.

Dies möchte zum einen auf die Einsetzung des Markers (siehe Analyse-Beispiele) zurückzuführen sein, die eine unspezifische Bindung des als Negativkontrolle zugrundegelegten Isotypantikörpers minimieren soll, diese jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausschließen konnte. Aus diesem Grunde wurden zusätzliche durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt, die in Mehrfachfärbungen das Bindungsverhalten des Hsp70-spezifischen Antikörpers cmHsp70.1 auch gegenüber CD45-positiven Leukozyten analysierten. Als problematisch bei der Untersuchung von malignen Tumoren erwies sich

nicht nur die vorgefundene individuelle Diversität, sondern auch eine individuelle Heterogenität innerhalb *eines* Tumors, welche unter anderem von Baisse et al. (2001) anhand genetischer Marker diskutiert wurde.

Für den quantitativen Vergleich der immunphänotypischen Bestimmung der oberflächenständigen Expression von Hsp70 bei den kolorektalen Karzinomen und den normalen Mucosabiopsien anhand der Histogramme konnte dennoch gefolgert werden, dass die Einzelzellen aus malignen kolorektalen Tumoren signifikant erhöhte Anteile an Hsp70-positiven Zellen enthielten als Zellen aus der normalen kolorektalen Mucosa desselben Patienten.

### 3.2.5 Qualitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse von Hsp70

#### 3.2.5.1 Gegenüberstellung von Tumor- und Normalgeweben

Bei den etablierten Tumormarkern des kolorektalen Karzinoms werden quantitative Grenzen zugrundegelegt:

Das karzinoembryonale Antigen (CEA), das die höchste Sensitivität unter kolorektalen Tumoren besitzt, gilt mit einem Serumspiegel von mehr als 15 bis 20 mg/ml als pathologisch. CEA kann auch im Gesunden mit 3-5 ng/ml angetroffen werden (Lamerz et al., 2001). Das als Zweitmarker von kolorektalen Karzinomen eingesetzte CA19-9 gilt oberhalb von 40 U/ml als pathologisch (Lamerz et al., 2001). Im Hinblick auf die pathologisch-klinische Relevanz der Expression von Hsp70 erschien nicht nur das individuell vorgefundene quantitative Resultat der durchflusszytometrischen Analyse der Hsp70-Expression wichtig, sondern es sollte auch ein Schwellenwert ermittelt werden, der eine qualitative Bewertung ermöglichte.

Für die qualitative Auswertung war es wichtig, eine hohe Tumorspezifität des Testsystems zu erreichen, um eine möglicherweise pathologische, tumorassoziierte Hsp70-Expression von Messwerten nicht-pathologischer Biopsien abgrenzen zu können: Auf Einzelzellen aus Tumoren wurden bis zu 65,57% Hsp70-positive Zellen registriert. Die Resultate der durchflusszytometrischen Analysen der 69 kolorektalen Normalgewebe derselben Patienten zeigten eine Streuung der Messwerte zwischen 0,00% und 8,42% Hsp70-positiven Zellen.

| Durchflusszytometrisches Resultat | Normalgewebe- biopsien | Tumorgewebe- biopsien |
|-----------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Hsp70-Expression < 5,00%          | 66                     | 86                    |
| Hsp70-Expression > 5,00%          | 3                      | 73                    |
| insgesamt untersucht:             | 69                     | 159                   |

Tab.38: Qualitative Resultate der durchflusszytometrische Analyse der Hsp70-Expression auf vitalen Einzelzellen aus kolorektalen Tumoren und normaler Dickdarmschleimhaut bei einem Schwellenwert von 5,00%..

Legte man statt dessen einen Schwellenwert von 5,00% für ein quantitatives Resultat zugrunde, so stellte sich Hsp70-Resultat von 66 der untersuchten 69 Normalgewebebiopsien unterhalb von 5,00% als qualitativ negativ dar (Tab.38). Für die qualitative Auswertung kam dies einer Spezifität von 96% gleich.

Eine 100%ige Tumorspezifität konnte bislang noch von keinem Testsystem für einen Tumormarker erzielt werden (Lamerz et al., 2001a; Harrison, 1999).

### 3.2.5.2 Validität der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenexpression von Hsp70

Ausgehend von einer Spezifität von 96% und einem Schwellenwert von 5,00% wurde bei den kolorektalen Tumoren, deren Normalgewebe mituntersucht werden konnte, bei 73 der 159 Tumoren eine Hsp70-Expression auf mehr als 5,00% der Zellen detektiert. Dies entspricht einer Rate an Hsp70-positiven Tumoren, d.h. einer Sensitivität von 46% für das kolorektale Karzinom (Tab.39).

Die ermittelte Sensitivität von 46% für die Detektion der Hsp70-Expression lag somit im Größenbereich der Tumormarker CEA mit 40-70% (Lamerz et al., 2001a; Duffy, 2001) und von CA19-9 mit 20-60% (Lamerz et al., 2001a).

| <i>Validität der Analysenmethode</i> |     |
|--------------------------------------|-----|
| Spezifität                           | 96% |
| Sensitivität                         | 46% |
| negativer Vorhersagewert             | 43% |
| positiver Vorhersagewert             | 96% |

Tab.39: Kenngrößen zur Validität der durchflusszytometrischen Erfassung der Oberflächenexpression von Hsp70 auf kolorektalen Normalschleimhäuten und Karzinomen bei einem Schwellenwert von 5,00%.

Anhand der qualitativen Auswertung der durchflusszytometrischen Messresultate ergab sich ein negativer Vorhersagewert von 43% und ein positiver Vorhersagewert von 96% für das beschriebene Testsystem.

### 3.2.5.3 Lokalisation der Hsp70-positiven kolorektalen Tumore

Innerhalb des Kolorektums treten Karzinome zu zirka zwei Dritteln in Rektum und Colon sigmoideum auf. Das restliche Drittel bilden Tumore proximaler Colonabschnitte (Lagiader, 1998).

Entsprechend stellten sich die Häufigkeiten der durchflusszytometrisch untersuchten Tumorbiopsien dar. 74 (46,2%) Karzinome wurden der Entität Kolonkarzinom und 86 (53,8%) Biopsien dem Rektumkarzinom zugeordnet (Tab.40).

Das Hitzeschockprotein Hsp70 konnte durchflusszytometrisch auf der Oberfläche vitaler Einzelzellen aus kolorektalen Tumorbiopsien aller Lokalisationen festgestellt werden.

Bei der Gesamtzahl der Kolonkarzinome zeigte sich eine geringfügig höhere Sensitivität von 49% gegenüber 44% bei der Tumorentität Rektumkarzinom. Der Gesamtanteil Hsp70-positiver kolorektaler Karzinome betrug 46% (73 von 159).

Weitere statistische Untersuchungen zur unterschiedlichen Häufigkeit Hsp70-positiver Tumore innerhalb der Kolon- und Rektum-Karzinome kamen zu nicht signifikanten Ergebnissen:

Weder unterschieden sich Kolon- (49% Hsp70-positiv) und Rektumkarzinome (44% Hsp70-positiv) bei kategorialer Bewertung ( $p=0,6265$ , nicht signifikant), noch bei der metrischen verteilungsfreien Überprüfung der Einzelmesswerte innerhalb der Entitäten Kolon- und Rektumkarzinom mit Hilfe des u-Tests nach Man und Whitney ( $p=0,4372$ , n.s.) in ihrer Signifikanz.

| <b>Lokalisation</b>                   | <b>Anzahl Hsp70-positiver Tumore</b> |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Zökum                                 | 3 / 8 (38%)                          |
| C. ascendens                          | 4 / 8 (50%)                          |
| rechte Flexur                         | 4 / 4 (100%)                         |
| C. transversum                        | 6 / 10 (60%)                         |
| C. descendens                         | 3 / 6 (50%)                          |
| C. sigmoideum                         | 12 / 28 (43%)                        |
| Kolon (o. nähere Angabe)              | 4 / 10 (40%)                         |
| <b>Kolonkarzinome (gesamt)</b>        | <b>36 / 74 (49%)</b>                 |
| <b>Rektumkarzinome (gesamt)</b>       | <b>37 / 85 (44%)</b>                 |
| <b>Kolorektale Karzinome (gesamt)</b> | <b>73 / 159 (46%)</b>                |

Tab.40:Lokalisation der untersuchten kolorektalen Karzinome und Frequenz Hsp70-positiver FACS-Resultate.

Zum gleichen qualitativen inferenzstatistischen Ergebnis führte eine Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis ( $p=0,5770$ , nicht signifikant), die Hsp70-Befunde der Zökum-, Kolon- und Colon sigmoideum jeweils einzeln neben den durchflusszytometrischen Resultaten der Rektumkarzinome verglich.

Die erhobenen Daten ließen den Schluß zu, dass aus der Lokalisation des Primärtumors kein Zusammenhang mit der detektierten Membranären Expression von Hsp70 abgeleitet werden konnte. Indes wurden aus malignen kolorektalen Gewebebiopsien unabhängig von ihrer Lokalisation Einzelzellen präpariert, bei denen durchflusszytometrisch eine Expression auf der Zelloberfläche von mehr als 5,00% der vitalen Zellen nachgewiesen.

Das Expressionsmuster von Hsp70 auf malignen Tumorzellen unterschied sich statistisch signifikant von demjenigen der Zellen aus makroskopisch unauffälliger normaler Dickdarmschleimhaut.

Dies eröffnet weitere wissenschaftliche Untersuchungen zu den molekularen und mechanistischen Ursachen der Oberflächenexpression von Hsp70.

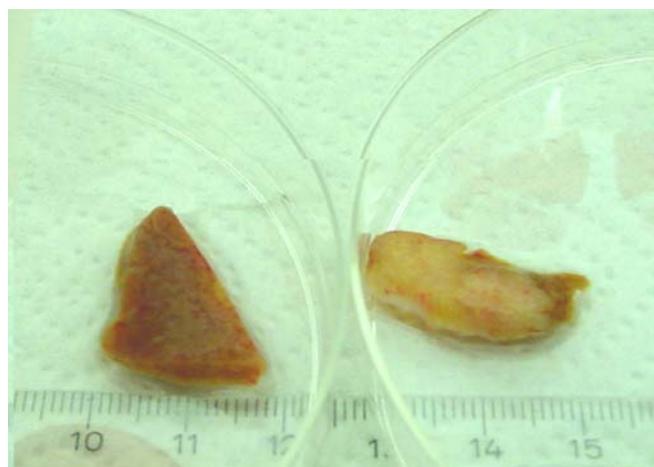
### 3.3 Hepatische Metastasen kolorektaler Karzinome

#### 3.3.1 Makropathologische Bestimmung der Konsistenz der Metastasen

Vor der manuellen Disaggregation der Gewebebiopsie wurde die Konsistenz des Gewebes bestimmt und die graduelle Ausprägung analog den soliden Primärtumorbiospien beschrieben.

Bei 18 von 22 Resektaten war eine Einordnung der Konsistenz möglich. Innerhalb der achtzehn resezierten Metastasen wurde in 12 Fällen (67%) eine szirrhöse Konsistenz, in sechs Fällen (33%) eine einfache Konsistenz gesehen.

In keinem der zur FACS-Untersuchung eingegangenen Biopsien wurde eine medulläre Konsistenz beobachtet.



*Abb.48: Darstellung einer nicht-malignen, makroskopisch unauffälligen Leberbiopsie (links), daneben ein Gewebestück der resezierten Metastase(LM#22).*

Gegenüber der links gezeigten Biopsie von Lebernormalgewebe stellt das rechts gezeigte Gewebestück ein Resekat einer Lebermetastase dar (LM#22). Makroskopisch wurde das Gewebe als szirrhös eingestuft (Abb.48).

Die immunphänotypische Untersuchung des Lebernormalgewebes war nicht praktikabel, da ausschließlich propidiumiodid-positive Zellen detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Es blieb offen, ob normales Lebergewebe einer derartigen Untersuchung zugänglich ist.

### 3.3.2 Exemplarische durchflusszytometrische Analyse

#### 3.3.2.1 Eingrenzen vitaler Populationen der Metastasen-Biopsie

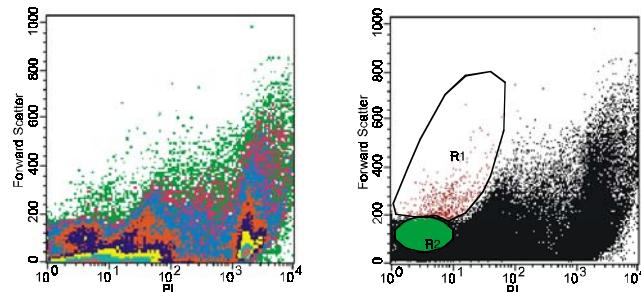


Abb.25: Eingrenzen propidiumiodid-negativer Zellen aus Density- und Dotplot der Parameter Vorwärtsscatter und PI-Intensität der Einzelzellen aus der Lebermetastasen-Biopsie, bezeichnet als Populationen R1 und R2.

Der Densityplot der Parameter Vorwärtsscatter (FSC) und der Intensität der registrierten Fluoreszenz von Propidiumiodid zeigte einen Großteil an propidiumiodid-positiven, letalen Zellen im rechten und mittleren Bereich des Diagramms sowie Zelldebris, deren geringe Zellgröße zu einem geringen Vorwärtsscatter (FSC) führte und deren Fluoreszenzintensität von Propidiumiodid (PI) sich über den gesamten Messbereich erstreckte (Abb.25).

Gut abgrenzbar war eine Population von propidiumiodid-negativen Zellen, die als Region R2 bezeichnet wurde. Der Bereich größerer Zellen, charakterisiert durch höhere FSC-Werte bei gleichfalls negativer PI-Fluoreszenz, wurde als Region R1 abgezirkelt. Die viable Population R1 umfasste lediglich 0,54%, der Anteil von R2 betrug 9,74%.

Die makroskopisch vorgegebene szirrhöse Konsistenz führte nach manueller Disaggregation zu der gering ausgeprägten Vitalität der Zellpopulation in Region R1.

#### 3.3.2.2 Immunphänotypisierung vitaler Zellpopulationen

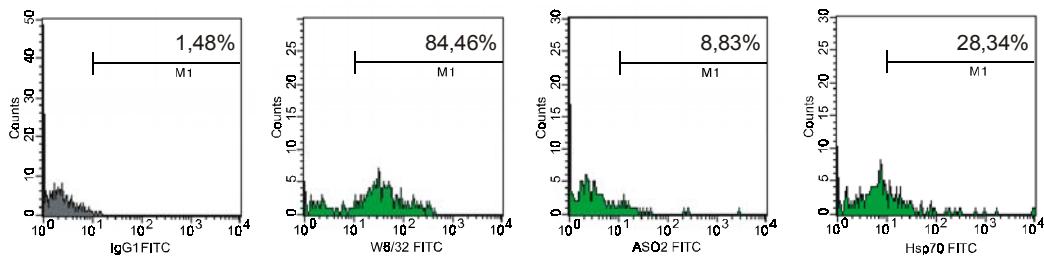


Abb.26: Quantitative Auswertungen der Histogramme der Immunphänotypisierung von Isotyp, MHC-Klasse I mit dem Antikörper W6/32, ferner ASO2 zur Bestimmung von Bindegewebe und cmHsp70.1 zur Detektion von Hsp70 an der Zelloberfläche von Zellen der Region R1.

Die vitale Zellpopulation R1 wies 84,46% MHC-Klasse I-positive Zellen aus, daneben 8,83% ASO2-positive fibrotische Zellen. 28,34% wiesen eine oberflächenständige Hsp70-Expression auf (Abb.26). Die Isotypkontrolle für die eingesetzten FITC-direktkonjugierten Antikörper erfasste 1,48% der Zellen.

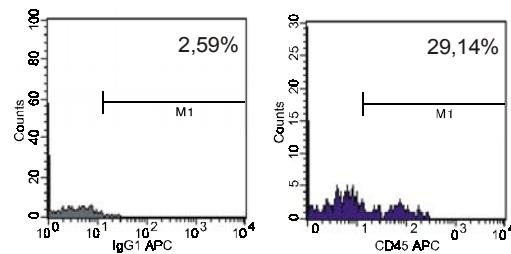


Abb.27: Immunphänotypische Erfassung der leukozytären Fraktion als CD45-positive Zellen der Region R1 ausgehend vom Isotyp .

Über das Antigen CD45 wurden die Leukozyten mit Hilfe APC-direktkonjugierter Antikörper quantifiziert (Abb.27), wobei 29,14% der Zellen in der Population R1 CD45-positiv waren, wenn ein positives Resultat des Isotyp-Antikörpers von 2,59% zugrundegelegt wurde.

Mit 4,44% CD45-positiven Zellen bei einem Resultat von 0,42% der Zellen bei dem zugehörigen Isotyp waren die Leukozyten in der Population R2 deutlich weniger präsent (Abb.28).

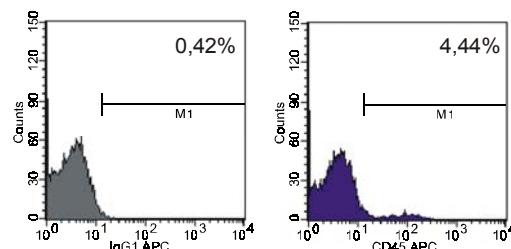


Abb.28: Quantifizierung der CD45-positiven Zellen aus der Region R2 der Zellsuspension, die aus der Lebermetastase präpariert werden konnte.

In gleichfalls vermindertem quantitativen Umfang war die Expression der Antigene MHC Klasse I mit 23,08%, AS02 mit 2,31% und Hsp70 mit 12,65% messbar, deren Isotyp-Antikörper ein positives Resultat von 0,03% der Zellen erlangte (Abb.29).

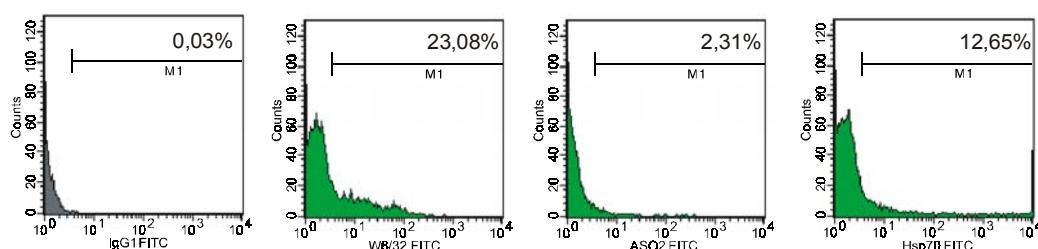


Abb.29: Immunphänotypisierung der Zellen der Region R2 hinsichtlich der Oberflächenmarker MHC Klasse I über W6/32, bindegewebiger Zellen über AS02 sowie Hsp70 über den Antikörper cmHsp70.1.

Wegen der Streulichteigenschaften der Zellen in der Population R2 und wegen der geringen MHC-Klasse-I-Expression der Zellen musste von einer stark mit Erythrozyten angereicherten Zellpopulation ausgegangen werden, in der zusätzlich 4,44% der Zellen als Leukozyten identifiziert wurden. Eine Mehrfachfärbung von Hsp70 und CD45 APC lag nicht vor, so dass für die Auswertung lediglich die Quantifizierung der Histogramme herangezogen wurde.

Das immunphänotypische Resultat von 12,65% Hsp70-positiven Zellen sollte nicht malignen Zellen zugeschrieben werden, zumal die Voraussetzung des Nachweises der MHC-Klasse-I-Expression mit lediglich 23,08% nicht quantitativ war.

Für eine Beschreibung von Tumorzellen rückte die Population R1 in den Vordergrund, die mit 84,46% annähernd quantitativ MHC-Klasse I-positiv war. Eine mögliche Adsorption an PI-positive Zellen mochte dazu beigetragen haben, dass die Detektion von 100% MHC-Klasse-I-positiven Zellen nicht erreicht werden konnte.

Die Immunphänotypisierung wies 29,14% CD45-positive Zellen als Leukozyten aus, die aufgrund ihrer fehlenden Integration in einen Gewebezellellverband möglicherweise bevorzugt in die Fraktion der vitalen Zellen übergingen. Fibrotische Zellen waren mit 8,83% für ein szirrhöses Karzinom seltener als theoretisch erwartet anzutreffen. Unter Umständen führte die manuelle Disaggregation bei den Lebermetastasen verstärkt zur Zerstörung bindegewebiger Zellen und zu einer verringerten Nachweisrate in der Fraktion der vitalen Zellen.

Neben Leukozyten und Stromazellen waren immunzytometrisch 28,34% der vitalen Einzelzellen als Hsp70-positiv identifizierbar.

Jene Zellen ließen sich möglicherweise mit der metastasierten Tumorerkrankung in Verbindung bringen. Aufgrund der länger zurückliegenden Resektion des Primärtumors konnte in dem individuell geschilderten Fall keine Aussage zu einer etwaigen Expression von Hsp70 bei dem Primärtumor gemacht werden.

Der Einzelwert von 28,34% Hsp70-positiven Zellen erschien verglichen mit der Hsp70-Expression auf kolorektalen Primärtumoren erhöht.

Aufgrund der geringen Fallzahl von zweiundzwanzig hepatischen Metastasen sowie des Mangels an direkten Vergleichen zwischen kolorektalem Primärtumor und hepatischen Filiae konnten zur Hsp70-Expression auf Primärtumoren und operablen Lebermetastasen bislang keine ausreichenden Informationen zum gemeinsamen Hsp70-Status ermittelt werden.

### 3.3.3 Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Resultate

| Parameter:   | Konsistenz der Lebermetastasen           |  | Signifikanz    |
|--------------|--|--|----------------|
|              | einfache Karzinome                       | szirrhöse Karzinome                      |                |
| Viabilität   | <b>5,04%</b><br>(0,40-17,02%; s=5,55)    | <b>1,50%</b><br>(0,05-6,26%; s=1,71)     | p=0,1246, n.s. |
| MHC Klasse I | <b>88,04%</b><br>(68,14-98,26%; s=12,37) | <b>70,68%</b><br>(39,93-95,30%; s=20,25) | p=0,0818, n.s. |
| AS02         | <b>17,94%</b><br>(4,52-48,18%; s=16,20)  | <b>19,66%</b><br>(0,22-71,17%; s=21,77)  | p=1,0000, n.s. |
| CD45         | <b>62,91%</b><br>(4,50-99,12%; s=31,83)  | <b>32,31%</b><br>(3,09-77,21%; s=26,44)  | p=0,2222, n.s. |
| Hsp70        | <b>11,27%</b><br>(0,13-25,38%; s= 10,53) | <b>16,33%</b><br>(0,40-53,25%; s=18,7)   | p=0,6820, n.s. |

Tab. 41: Quantitative Resultate der Analysen von resektablen Lebermetastasen (n=18)

#### 3.3.3.1 Vitalität

Für die Durchflusszytometrie von entscheidender Bedeutung war der Anteil vitaler Zellen der Suspension von Einzelzellen, die durch manuelle Disaggregation aus der Gewebebiopsie isoliert wurden. Bei den 22 Metastasen umfasste die Vitalität durchschnittlich 2,41% (s=3,55), wobei Werte zwischen 0,05% und 17,02 gemessen wurden.

Legte man die Gewebekonsistenz zugrunde, so wurde folgendes Ergebnis innerhalb der Konsistenzarten ermittelt: Aus Lebermetastasen mit einfacher Konsistenz wurden durchschnittlich 5,04% vitale Zellen isoliert. Bei szirrhösen Metastasen betrug der Anteil vitaler Einzelzellen 1,51% (Tab.41).

Wie für andere solide Tumore, beispielsweise primäre kolorektale Karzinome beschrieben, korrelierte ein erhöhter Fibrosegrad, makroskopisch fassbar als szirrhöse Konsistenz des Gewebes, mit einer geringeren Ausbeute an vitalen Zellen (p=0,1246 n.s.), die durch manuelle Disaggregation isoliert und nachfolgend durchflusszytometrisch immunphänotypisiert werden konnten.

Bei der Vitalität wurden individuelle Unterschiede beobachtet, die zu entsprechenden Standardabweichungen führten. Man kann vermuten, dass neben der Gewebekonsistenz weitere Faktoren die Vitalität beeinflussen können, zum Beispiel die Handhabung der Gewebebiopsie nach Entnahme, die Temperatur der Zwischenlagerung oder die Transportdauer aus dem OP-Saal über die Pathologie in das Forschungslabor.

Dank der Sensitivität der durchflusszytometrischen Analyse konnte durch Registrieren entsprechend hoher Eventzahlen vitale FACS-Populationen ausfindig gemacht werden, die Aussagen über den Immunphänotyp zuließen.

### 3.3.3.2 MHC Klasse I - Expression

Die Expression der MHC-Klasse I-Moleküle auf vitalen Einzelzellen wurde auch in der FACS-Analyse von Lebermetastasen erfasst und als Referenz für einen Oberflächenmarker herangezogen.

Die immunphänotypische Analyse ergab bei den insgesamt 22 Biopsien eine durchschnittliche Expression von MHC-Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche von 73,86% der vitalen Einzelzellen (31,99-98,26%; s=22,87) (Tab.41).

Stellt man die Gewebebiopsien mit mittelfester Konsistenz den szirrhösen gegenüber, so wies die erste Gruppe eine positives FACS-Resultat von durchschnittlich 88,04% (s=12,37) auf, die zweite Gruppe hingegen 70,68% (s=20,25).

Eine kompetitive Bindung von Primär- und Sekundärantikörper an letale Zellen, die bei szirrhösen Biopsien häufiger vertreten waren, kann als Erklärung für diese Beobachtung herangezogen werden, gleichwohl die Zellsuspension mit beiden Testantikörpern im Überschuß inkubiert wurde.

Es wurde eine MHC-Klasse I Expression ermittelt, die im Mittel mehr als 70% der vitalen Einzelzellen umfasste. Durchflusszytometrisch kommt dem Nachweis der MHC-Klasse I-Expression eine Bedeutung zu sowohl als Positivkontrolle für die indirekte immunzytometrische Messmethode und die Auswertung ihrer Fluoreszenz-Intensitäten, als auch für die Intaktheit der Oberflächenstruktur der aus dem Gewebe präparierten Einzelzellen.

Nachdem die Bedingungen für eine intakte Oberflächenstruktur der FACS-Population der vitalen Einzelzellen anhand ihrer Negativität für Propidiumiodid und den Nachweis einer breite Expression von MHC-Klasse I-Molekülen an ihrer Oberfläche erfüllt wurden, konnten mit Hilfe der durchflusszytometrische Analyse weitere Marker auf der Oberfläche vitaler Einzelzellen charakterisiert werden.

Da jede Tumorbiopsie einmal durchflusszytometrisch vermessen wurde, kann über eine veränderte quantitative Expression im Sinne einer für Malignome postulierten MHC-Klasse-I-Downregulation (Pantel et al., 1991; Feenstra et al., 1999; Ritz et al., 2001) keine Aussage getroffen werden.

Dies wäre allenfalls für die FACS-Analyse im direkten Vergleiche von Primärtumor und Metastase ein und desselben Patienten möglich.

### 3.3.3.3 Expression des Bindegewebemarkers AS02

Durchflusszytometrisch wurde der Anteil bindegewebiger Zellen auch bei den Biopsien der hepatischen Metastasen über den monoklonalen Antikörper AS02 quantifiziert (Tab.41).

Die FACS-Analyse ergab im Mittel 19,12% AS02-positive Zellen innerhalb der Fraktion vitaler Einzelzellen aus operablen Lebermetastasen (0,22-71,17%; s=20,21).

Bei Metastasen mit einfacher Konsistenz lag der durchschnittliche Anteil AS02-positiver Zellen bei 17,94% (s=16,20), aus szirrhösen Biopsien bei 19,67% (s=21,77).

Die makroskopisch festgestellte Gewebekonsistenz korrelierte mit dem immunphänotypisch ermittelten Gehalt an AS02-positiven Zellen, die Unterschiede innerhalb beider Konsistenzarten waren jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=1,0000$ ).

Die großen Standardabweichungen deuten eine Streuung des Markers AS02 bei beiden Konsistenzarten an. Analog der Analyse an soliden Tumoren mussten wir davon ausgehen, dass tumorassoziiertes Bindegewebe in der FACS-Analyse nicht quantitativ AS02-positiv reagierte, sondern von einer interindividuellen Tumorheterogenität mitbetroffen sein könnte.

### 3.3.3.4 Leukozytäre Infiltration

Über den Oberflächenmarker CD45 wurde der Anteil an tumorinfiltrierenden Leukozyten bestimmt (Tab.41).

Im Durchschnitt wurden bei den Einzelzellsuspensionen aus Leberfiliae 44,08% der vitalen Einzelzellen als CD45-positiv ermittelt (3,09-99,12; s=32,28).

Bei Biopsien mit einfacher Konsistenz betrug der leukozytäre Anteil im Mittel 62,91% (s=31,83) und bei szirrhösen Lebermetastasen lediglich 32,31% (s=26,44).

Die Unterschiede zwischen den nach ihrer makroskopischen Konsistenz eingeordneten Gruppen waren mit  $p=0,2222$  nicht signifikant. Es zeigte sich auch bei dem FACS-analytisch ermittelten Parameter CD45 eine individuelle Heterogenität innerhalb der untersuchten Metastasen.

Während die hohe Frequenz von Leukozyten bei Leberfiliae mit einfacher Konsistenz eine Immuntherapie aus theoretischen Gründen begünstigt, scheint die beobachtete Reduktion der Leukozyten der szirrhösen, hoch fibrotischen Metastasen für einen verminderten immunogenen tumoralen Reiz zu sprechen. Andererseits könnten wir es auch mit verschiedenen Stadien der Tumorprogredienz zu tun haben: Während bei Metastasen mit makroskopisch fassbarer einfacher Konsistenz eine massive leukozytäre Infiltration Zeichen einer Bekämpfung des Tumors auf immunologischer Ebene war, könnte die tumorale Fibrosierung der szirrhösen Metastasen Zeichen einer nur mehr verminderten Ansprechbarkeit des Tumors sein, was sich zugleich in einer reduzierten immunzytometrisch gemessenen leukozytären Infiltration äußerte.

Nicht nur bei den primären Tumoren, sondern auch bei den Metastasen zeigte sich eine Heterogenität der malignen Biopsien mit individuellen Unterschieden in der Vitalität, der MHC-Klasse I-Expression, der Quantifizierung fibrotischer Anteile über den Marker AS02, die leukozytäre Infiltration.

### 3.3.3.5 Expression von Hsp70

Nachdem gezeigt wurde, dass aus Biopsien von Lebermetastasen vitale Einzelzellen präpariert werden konnten, deren intakte Zelloberfläche immunphänotypisch weiter untersucht wurde, um MHC-Klasse I-Moleküle, Bindegewebe und Leukozyten zu quantifizieren, waren die Voraussetzungen gegeben, um auf die Expression von Hsp70 auf der Zelloberfläche einzugehen.

Ausgehend von ihrer makroskopischen Konsistenz wurde bei den Biopsien einfacher Metastasen ein durchschnittlicher Gehalt von 11,27% (0,13-25,38%; s=10,53) und bei szirrhösen Karzinomen von 16,33% (s=18,73) an Hsp70-positiven Zellen ermittelt (Tab.41).

Obwohl die Standardabweichungen große individuelle Schwankungsbreiten wiedergaben, ließen die Durchschnittswerte eine nicht signifikante, tendenziell höhere Expression von Hsp70 auf Einzelzellen aus szirrhösen Metastasen erkennen ( $p=0,6820$ ).

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Induktion von Hsp70 auf der Tumorzelloberfläche und der Fibrosierung im Sinne einer sich aufbauenden Tumorresistenz.

### 3.3.4 Häufigkeit der Merkmalsexpression von Hsp70 bei resektablen Lebermetastasen

| Gewebekonsistenz der Lebermetastasen | Anzahl Hsp70-positiver Biopsien / gesamt untersucht (%) |
|--------------------------------------|---|
| einfach                              | 3/6 (50%)   |
| szirrhös                             | 6/12 (50%)  |
| k.A.                                 | 3/4 (75%)   |
| insgesamt                            | 12/22 (55%)   |

Tab.42: Oberflächenexpression von Hsp70 auf Tumorzellen aus Lebermetastasen. Als positiv wurde ein FACS-Resultat auf mehr 5% der vitalen Einzelzellen zugrundegelegt. (k.A. = Keine Angabe zur Konsistenz möglich).

Legte man einen Schwellenwert von 5% zugrunde, so ergab die durchflusszytometrische Analyse der Leberfiliae nach kolorektalen Karzinomen in zwölf von 22 Fällen. Dies entspricht einer Sensitivität von 54% (Tab.42).

Leider stand kein gesundes Lebergewebe zur Verfügung, um die Tumorspezifität der Oberflächenexpression von Hsp70 in diesem Falle zu evaluieren.

### 3.3.5 Potenzielle klinische Bedeutung

Gleichwohl die jeweiligen Fallzahlen der untersuchten primären kolorektalen Tumore und Leberfiliae unterschiedlich waren, zeigte sich eine Zunahme von Hsp70-positiver

---

Exemplare bei den hepatischen Metastasen mit 54% im Vergleich zum Anteil 46% der primären kolorektalen Tumore.

Man könnte vermuten, dass ähnlich der prognostischen Einteilung der Akuten myeloischen Leukämie und dem gehäuften Auftreten Hsp70-positiver Fälle bei AML mit ungünstiger Prognose (Gehrman et al., 2003) auch bei der Tumorentität der kolorektalen Karzinome Hsp70 eher mit dem Auftreten von Metastasen korreliert.

Andererseits bietet sich mit einer vorhandenen Expression von Hsp70 auf der Oberfläche der Tumorzellen die Möglichkeit der Immuntherapie mit autologen, Hsp70-Fragment stimulierten NK-Zellen, auch und gerade für metastasierte kolorektale Tumorerkrankungen.

Bei der Ermittlung der Hsp70-Expression wurden zwei Probleme deutlich:

Die untersuchte Fallzahl repräsentierte ausschließlich operable Metastasen. Dies gilt für diffus hepatisch metastasierte Karzinome nicht, die als inoperabel eingestuft werden.

Tumorpatienten mit resektable Lebermetastasen repräsentieren demnach eine Teilgruppe, die eine günstigere Prognose im Vergleich zu inoperabel metastasierten kolorektalen Karzinomen besitzen. Bei inoperablen Lebermetastasen konnte aus naheliegenden Gründen keine Hsp70-Expression ermittelt werden.

Darüber hinaus werden bei CRC-Patienten selten synchron Primärtumor und hepatische Metastase(n) reseziert. Gewöhnlich liegen zwischen der Resektion des kolorektalen Primärtumors und dem messbaren Auftreten von hepatischen Metastasen Monaten oder Jahre, so dass innerhalb des für diese Untersuchung zugrundegelegten Zeitraums lediglich bei zwei Patienten die durchflusszytometrische Analyse des primären kolorektalen Tumors *und* der resezierten Metastase möglich war mit jeweils Hsp70-negativem durchflusszytometrischen Resultat. Die Fragestellung nach der membranären Expression von Hsp70 bei Primärtumor und Metastasen konnte anhand des zur Verfügung stehenden Probenmaterials noch nicht abschließend bewertet werden. Zusätzliche klinische und durchflusszytometrische Analyse sind hierfür erforderlich.

## 3.4 Magenkarzinom

### 3.4.1 Makroskopische Beurteilung der Gewebekonsistenz der Tumorbiopsien

Gemäß makropathologischer Definition handelte es sich bei den untersuchten Biopsien um acht medulläre Karzinome (33%) mit weicher Konsistenz, um sechs einfache Karzinome (25%) mit mittelfester Konsistenz und sechs szirrhöse Karzinome (25%) mit szirrhöser Konsistenz. In vier Fällen (17%) war eine eindeutige Zuordnung nicht möglich (Tab.43).

| Konsistenz | Anzahl untersuchter<br>Tumorbiopsien | prozentualer<br>Anteil |
|------------|--------------------------------------|------------------------|
| medullär   | 8                                    | 33%                    |
| einfach    | 6                                    | 25%                    |
| szirrhös   | 6                                    | 25%                    |
| k.A.       | 4                                    | 17%                    |

Tab.43: Makroskopisch beurteilte Konsistenz und Anzahl der untersuchten Magenkarzinobiopsien und prozentuale Häufigkeit der vorgefundenen Konsistenz (k.A.: keine Angaben).

Die manuelle Gewebedisaggregation von Magenkarzinomen stellte besondere Anforderungen an die Einzelzellpräparation, da bei operativer Resektion im Gesunden und pathologisch befundeter diffuser Infiltration der Tumor freigelegt und Gewebeabschnitte normaler Magenmucosa abgetrennt werden mussten.

### 3.4.2 Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse einer Magenkarzinombiopsie

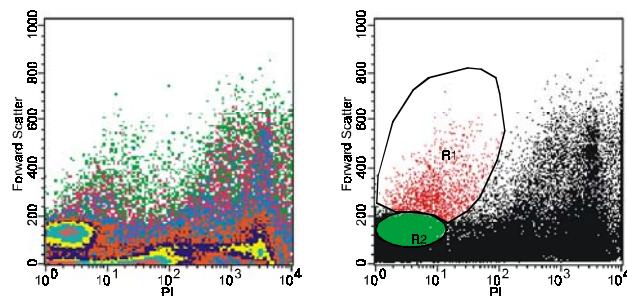


*Abb.31: Makropathologische Darstellung der Magenkarzinombiopsie GX#23: Karzinom, erkennbar an fibrotischen Aufhellungen, einwachsend in normale Magenmucosa.*

Bei der Magentumorbiospie GX#23 handelte es sich um ein Gewebestück in Größe von zirka 3 auf 4 cm, wobei der Tumor bzw. sein zur Verfügung gestelltes Teilstück von Magenschleimhaut umgeben ist und durch die Aufhellungen imponiert, die fibrotische, möglicherweise auch nekrotische Areale des Tumors anzeigen (Abb.31). Bezüglich der Konsistenz handelte es sich um ein einfaches Karzinom.

#### 3.4.2.1 Detektion vitaler Zellpopulationen

Der Densityplot der Parameter Vorwärtsscatter (Forwardscatter) und Intensität der Propidiumiodidfluoreszenz (PI) machte die viablen Zellen als propidiumiodid-negative Populationen sichtbar:



*Abb.32 FSC/PI-Densityplot zur Ermittlung der propidiumiodid-negativen Zellpopulationen (R1, R2) der Einzelzelluspension aus der Metastase.*

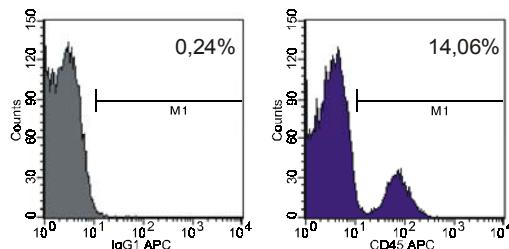
In der Dotplot-Darstellung derselben durchflusszytometrischen Parameter wurden zwei propidiumiodidnegative Populationen (R1, R2) eingegrenzt (Abb.32).

Die Region R1 umfasste 1,51% aller registrierten Ereignisse, die Region R2 1,36%. Die beiden Zellpopulationen unterschieden sich voneinander in ihren Vorwärtsscattereigenschaften, d.h. in ihrer Zellgröße. In beiden Fällen entsprach die für die Propidiumiodidfärbung detektierte Fluoreszenz derjenigen einer propidiumiodid-freien Zellsuspension, wie sie bei dem Justieren des Messgeräts individuell überprüft wurde. Von vitalen Zellen mit intakter, also für Propidiumiodid undurchlässiger Zellmembran konnte bei den Zellpopulationen R1 und R2 ausgegangen werden.

### 3.4.2.2 Immunphänotypisierung vitaler Zellpopulationen

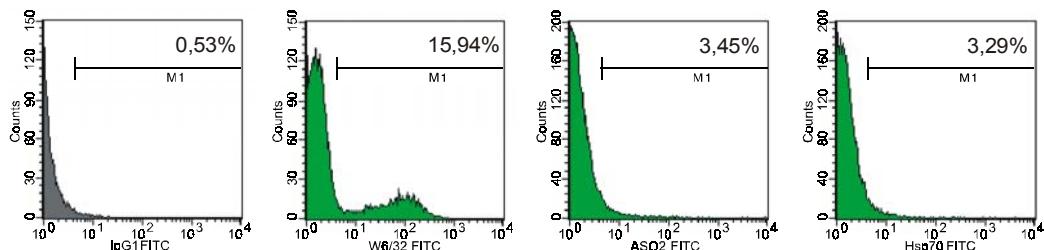
Die Präsenz der Oberflächenantigene MHC-Klasse I, CD45 und AS02 wurde bei den selektierten vitalen Zellpopulationen gegen die entsprechenden Isotypkontrollantikörper bestimmt. Die quantitative Auswertung erfolgte anhand der Histogramme.

Die Immunphänotypisierung der Zellpopulation R2 ergab folgendes Resultat:



*Abb.33 Immunzytometrische Bestimmung von CD45-positiven Ereignissen der Population R2 ausgehend vom Isotyp als Negativkontrolle.*

Über oberflächenständiges CD45 wurden Leukozyten zu 14,06% innerhalb der Population R2 charakterisiert (Abb.33).



*Abb.34: Ausgehend vom Isotyp die weitere immunphänotypische Bestimmung der MHC-Klasse I-, AS02- und Hsp70-positiven Zellen der Population R1.*

Eine MHC-Klasse-I-Expression wurde auf lediglich 15,94% der Zellen gesehen, das Antigen AS02 auf 3,45% und Hsp70 auf 3,29% der Zellen (Abb.34).

Zur näheren Untersuchung wurde die Mehrfachfärbung der Zellen in der Region R2 ausgewertet (Abb.35):

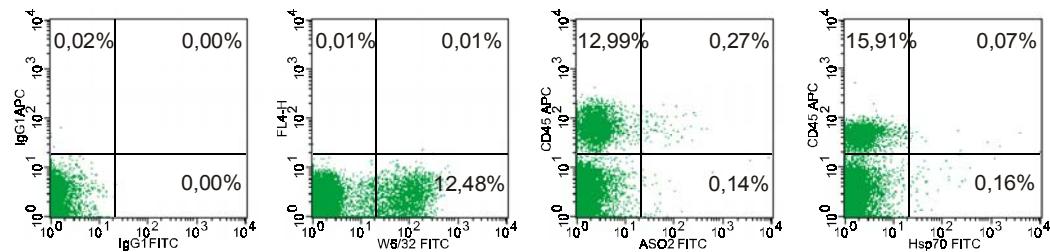


Abb.35: Mehrfachfärbung von CD45/AS02 und CD45/Hsp70 auf Zellen der Population R2, ausgehend von den Isotypen (links) und der W6/32-Färbung als einfach-positiver Kontrolle.

Bei der quantitativen Auswertung der Zellen aus der Region R2 anhand der Isotyp-Färbung wurden 0,02% IgG1 APC-positive Zellen detektiert, jedoch jeweils keine IgG1 FITC- und IgG1 FITC-IgG1 APC-positiven Zellen.

MHC-Klasse I-Moleküle waren bei 12,48% der Zellen nachweisbar. Ein einfach- bzw. ein doppelpositives Resultat wurde bei jeweils 0,01% der Zellen aus der Population R2 beobachtet. Das quantitative Resultat korrelierte mit der Histogramm-Auswertung (15,94%).

Die im Dotplot (Abb.34) über das Antigen CD45 quantifizierten Leukozyten entsprachen mit 12,99% bzw. 15,91% in ihrer Größenordnung der Auswertung des Histogramms (14,06%). Bei 0,27% der Zellen trat ein doppelpositives Resultat des Markers AS02 auch bei CD45-positiven Zellen auf, während 0,14% als einfach AS02-positiv identifiziert wurden.

Die Identifikation von Hsp70 umfasste auch Leukozyten zu 0,07%, während 0,16% der Zellen CD45-negativ und zugleich Hsp70-positiv waren. Die Mehrfachfärbung der Zellpopulation R2 bestätigte im vorliegenden Fall, dass eine Kreuzreaktion des Antikörpers gegen CD45 und cmHsp70.1 praktisch auszuschließen war.

Der niedrige Anteil MHC-Klasse-I-positiver Zellen, die Scattercharakteristik und die fehlende Anfärbbarkeit durch Propidiumiodid legten nahe, dass die Population der Region R2 neben einer geringen Menge an Leukozyten hauptsächlich Erythrozyten beinhaltete.

Für die vitale Zellpopulation der Region R1 wurde folgende Antigenexpression detektiert:

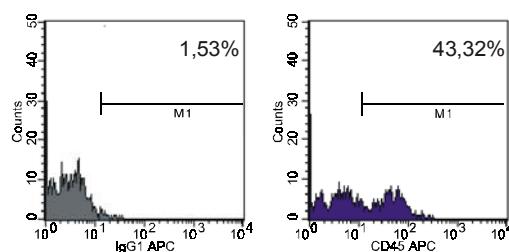


Abb.36: Quantifizierung CD45-positiver Zellen der Population R1

Auf dem Fluorensenzkanal FL.4 wurden die Expression des Antigens CD45 quantifiziert, wobei auf 43,32% ein positives Resultat zu verzeichnen war (Abb.36).

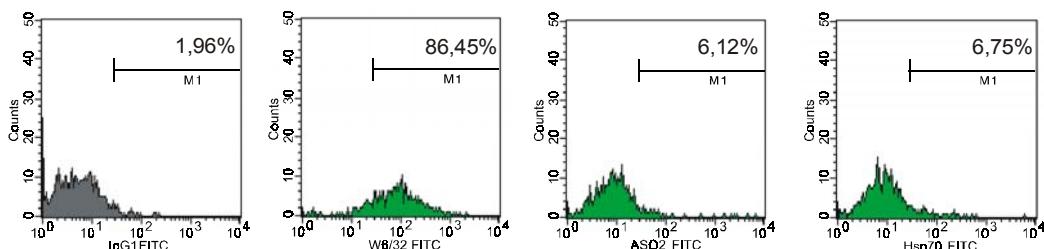


Abb.37: Histogramm-Auswertung: ausgehend vom Bindungsverhalten des Isotyps IgG1 wurden W6/32, ASO2 und der Hsp70-spezifische Antikörper cmHsp70.1, jeweils als FITC-direktkonjugierte Antikörper, auf den Zellen der Population R1 quantifiziert.

Die MHC-Klasse I-Expression war auf 86,45% der Zellen nachweisbar, das bindegewebetypische Antigen ASO2 auf 6,12% und das Hitzeschockprotein Hsp70 wurde auf 6,75% der Zellen detektiert (Abb.37). Der zu dieser mit FITC-direktkonjugierten Antikörpern durchgeführten Färbung gehörige Isotyp lieferte ein positives Resultat auf 1,96% der Zellen.

Obwohl makroskopisch als einfaches Karzinom charakterisiert, fiel der detektierte Anteil bindegewebiger ASO2-positiver Zellen vergleichsweise niedrig aus. Dies warf die Frage auf, inwiefern Magenkarzinome ASO2-positives Bindegewebe zeigen und welche Korrelationen zur makroskopisch klassifizierten Tumorkonsistenz bestehen.

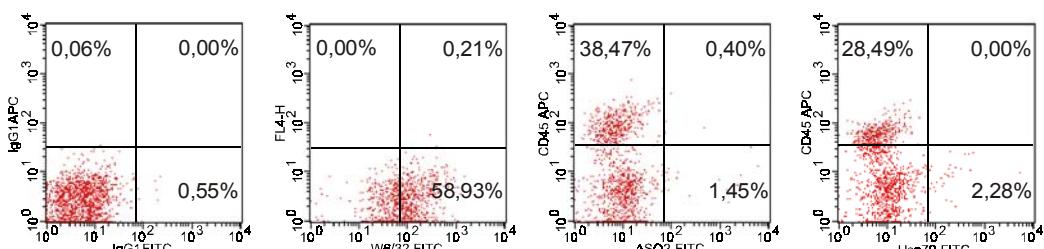


Abb.38: Mehrfachfärbung von CD45/ASO2 und CD45/Hsp70 auf Zellen der Population R1, quantifiziert nach den Isotypen und der W6/32-Färbung.

Neben der quantitativen Analyse von Hsp70 als möglichem Oberflächenantigen auf den vitalen Einzelzellen aus Magenkarzinobiopsien wurde untersucht, inwiefern Leukozyten zu einem positiven FACS-Resultat bei den interessierenden Antigenen ASO2 und Hsp70 führen können.

Die Dotblots ergaben für die Doppelfärbung von CD45 und ASO2 der Zellen in Region R1 38,47% einfach positive Leukozyten, 0,40% doppel-positive Leukozyten und 1,45% einfach ASO2-positive Zellen (Abb.38).

Für die Gegenfärbung mit CD45 APC ergaben sich 28,49% CD45-einfach-positive Zellen und 2,28% CD45-negative, Hsp70-positive Zellen, während eine Überschneidung beider Antigene CD45 und Hsp70 ausblieb (0,00%).

Zugrundegelegt war zum einen die Positivkontrolle der MHC-Klasse I-Expression, die zu einem einfach-positiven Resultat bei 58,93% der Zellen führte. Ein positives Resultat

in dem doppelpositiven Bereich wurde bei 0,21% der Zellen der Region R1 registriert. Die Emission von Fluoreszenz der mit Isotyp-Antikörpern IgG1 FITC und IgG1 APC markierten Zellen aus der Einzelzellsuspension bildete die Basis für die geschilderte Quantifizierung. Diese führte zu 0,06% IgG1 APC-positiven Zellen, 0,55% IgG1 FITC-positiven Zellen und zu keinem doppelpositiven Ereignis (0,00%).

Sowohl die Identifikation von CD45 als auch Hsp70 führte im Vergleich zur oben geschilderten Histogramm-Auswertung derselben Diagramme zu mässig geringeren Wiederfindungsraten.

Indes bedeutsam erschien, dass bei Leukozyten lediglich 0,40% bei der Mehrfachfärbung mit AS02 FITC beziehungsweise 0,00% der Zellen bei der Mehrfachfärbung mit Hsp70 FITC zu einem doppelpositiven Ergebnis mit CD45-positiven Zellen geführt haben.

Das Ausmaß einer unspezifischen Bindung der FITC-direktkonjugierten Antikörper AS02 und cmHsp70.1 ließ sich als sehr gering umschreiben.

In der Doppelfärbung waren bindegewebige Zellen zu 1,45% AS02-positiv detektierbar und weitere vitale, nicht leukozytäre Zellen aus der Tumorzellsuspension als Hsp70-positiv zu 2,28%. Gleichwohl das letztgenannte Resultat quantitativ geringer ausgeprägt ist als bei der vorweg geschilderten Auswertung der Histogramme, konnte eine unspezifische Kreuzreaktion mit CD45-positiven Leukozyten praktisch ausgeschlossen werden und das qualitativ positive Resultat in der Histogrammauswertung sowohl für die Detektion von bindegewebigen Zellen über AS02 als auch für die Identifikation von oberflächenständigem Hitzeschockprotein Hsp70 bestätigt werden.

Für eine durchflusszytometrische Identifikation der epithelialen Tumorzellen war aufgrund obiger Befunde die Zellpopulation R1 heranzuziehen, in welcher neben tumorinfiltrierenden CD45-positiven Leukozyten, AS02-positiven bindegewebigen Zellen auch vitale Zellen mit einer Expression von Hsp70 auf ihrer Zelloberfläche nachweisbar waren.

Aufgrund der qualitativen immunphänotypischen Korrelation konnte für einen weitergehenden Vergleich sowohl die Auswertung der Dotblots als auch der HistogrammbLOTS verwendet werden.

Wegen der Praktikabilität wurden für die weitergehende Darstellung die Resultate der Histogramme der betreffenden vitalen Zellpopulationen herangezogen und verglichen.

Bei einem Schwellenwert von 5,00% Hsp70-positiven Zellen in der Histogramm-Auswertung ließ sich jenes Magenkarzinom mit 6,75% Hsp70-positiven Zellen in der Zellpopulation R1 als „Hsp70-positiv“ eingestufen.

### 3.4.3 Quantitative Vergleiche der Immunphänotypisierung

#### 3.4.3.1 Vitalität

Der Anteil vitaler Zellen, die durch manuelle Disaggregation aus soliden Magentumoriopsien freigesetzt werden konnten und als propidiumiodidnegative Fraktion durchflusszytometrisch erfasst wurde, betrug im Durchschnitt aller untersuchten Magenkarzinome 4,92% (0,39 bis 15,78%,  $s=4,52\%$ ).

Wie in unten stehender Abbildung gezeigt, beträgt der Anteil vitaler Zellen bei medullären Tumorbiopsien knapp sechs Prozent (5,98%,  $s=3,66$ ), bei einfachen Karzinomen im Mittel 2,37% ( $s=0,73$ ) und bei szirrhösen Karzinomen 1,93% ( $s=1,03$ ) vitale Zellen (Abb.39).

Der für die Tumorkonsistenz ermittelte Unterschied bezüglich der Vitalität war signifikant ( $p=0,0147$ ): Die manuelle Disaggregation führte bei medullären Magenkarzinomen zu mehr vitalen Einzelzellen als bei einfachen ( $p= 0,0200$ ) und szirrhösen ( $p= 0,0127$ ). Der Unterschied im Anteil vitaler Zellen einfacher und szirrhöser Karzinome war vorhanden, jedoch nicht statistisch signifikant ( $p= 0,4848$ ).

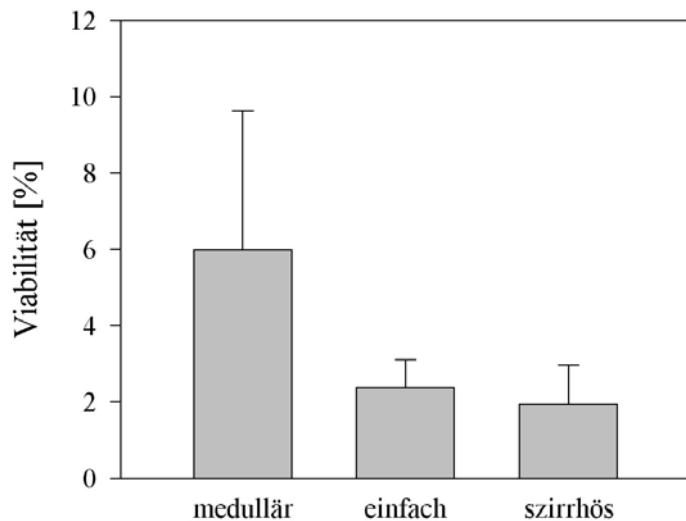


Abb.39: Anteil vitaler Zellen aus Magenkarzinobiopsien nach Konsistenz des Karzinoms, durchflusszytometrisch bestimmt als Fraktion propidiumiodid-negativer Zellen: Durchschnittlicher Anteil vitaler Zellen aus medullären Magenkarzinomen 5,98% (0,44-11,87%;  $s=3,66$ ), aus Magenkarzinomen mit einfacher Konsistenz 2,73% (1,17-3,14%;  $s=0,73$ ) und aus szirrhösen Magenkarzinomen 1,93% (0,39-2,93%;  $s=1,03$ ). Die Vitalitätsunterschiede zwischen den Karzinomarten waren mit  $p= 0,0147$  (\*) statistisch signifikant. Für die Subgruppen errechnete sich: medullär vs. einfach:  $p=0,02$ (\*), medullär vs. szirrhös:  $p=0,0127$ (\*), einfach vs. szirrhös:  $p=0,4848$  (n.s.).

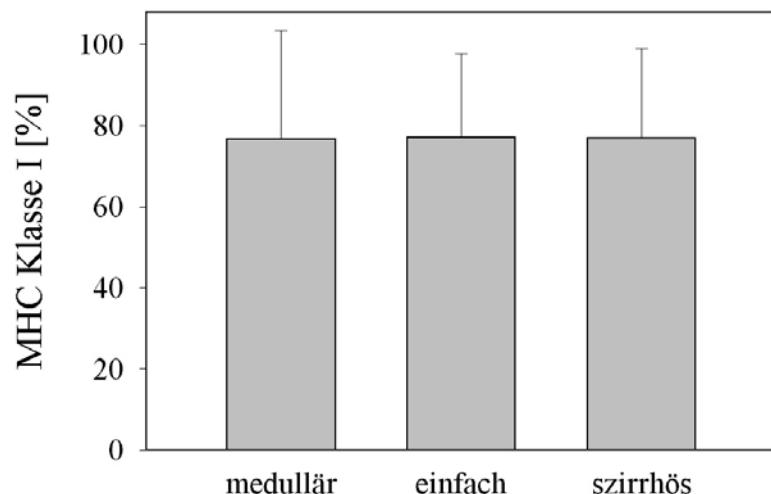
Mit zunehmender makroskopischer Härte des Gewebes sank die Ausbeute an vitalen Einzelzellen ab. Nicht unerwähnt bleiben konnte, dass auch innerhalb der verschiedenen

Tumorkonsistenzen die untersuchten Magenkarzinome eine ausgeprägte Heterogenität aufwiesen, die sich in den hohen Standardabweichungen niederschlugen.

Es zeigte sich, dass auch bei hohem Fibrosegrad einfacher und szirrhöser Magenkarzinome durch manuelle Disaggregation vitale Zellen isoliert werden konnten.

### 3.4.3.2 MHC-Klasse I-Expression

Durchflusszytometrisch wurde wie bei anderen Tumorarten der Anteil MHC Klasse I-positiver Zellen ermittelt. In allen untersuchten Fällen waren humane MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche nachweisbar. Bei medullären Karzinomen ergaben durchschnittlich 76,72% der vitalen Zellen ein positives immunzytometrisches Resultat für die MHC Klasse I Expression, bei Magenkarzinomen mit einfacher Konsistenz 77,08% und bei szirrhösen Magenkarzinomen 76,95% der vitalen Zellen (Abb.40). Zwischen den Konsistenzarten waren keine signifikanten Unterschiede fassbar ( $p=0,9245$ ).



*Abb. 40: MHC Klasse I-Expression auf vitalen Einzelzellen aus Magentumorbiopsien. Durchschnittlich betrug der Anteil MHC Klasse I-positiver vitaler Einzelzellen aus medullären Magenkarzinomen 76,72% (32,06-99,09%;  $s=26,64$ ), aus Magenkarzinomen mit einfacher Konsistenz 77,08% (43,94-97,33%;  $s=20,64$ ), aus szirrhösen Magenkarzinome 76,95% (33,65-100,00%;  $s=22,10$ ). Die Karzinomarten unterschieden sich nicht signifikant in ihrer MHC-Klasse I Expression ( $p=0,9245$ ).*

Trotz verminderter Gehalt an vitalen Einzelzellen unterschieden sich einfache und szirrhöse Magenkarzinome in den Mittelwerten ihrer MHC-Klasse-I-Expression nicht signifikant von medullären Karzinomen. Somit war der Nachweis von MHC auf der Oberfläche vitaler Einzelzellen aus Magenkarzinobiopsien nicht an die Konsistenz gebunden, sondern in allen Konsistenzgruppen ähnlich ausgeprägt und fungierte neben der Negativität für Propidiumiodid als zweites wichtiges Kriterium für die Vitalität und intakte Oberflächenstruktur der aus dem Magenkarzinom isolierten Zellen.

Die Adsorption von Erst- oder Sekundärantikörper an letale Zellen oder Zellfragmente, die in allen Fällen mit vorlagen, ging einher mit einer verminderten Verfügbarkeit des Antikörpers W6/32 für vitale Zellen. Sie reduzierte den theoretisch erwarteten Wert von annähernd 100% auf die tatsächlich vorgefundenen von etwa 80%.

Eine bei Tumoren diskutierte Down-Regulation von MHC-Molekülen (Pantel et al., 1991) konnte nicht weiterverfolgt werden, da von jeder Tumorgewebeprobe nur eine einzelne Analyse angefertigt wurde. Eine Analyse zur MHC-Expression von gesunder Magenmucosa desselben Patienten, die diesbezüglich quantitative Vergleiche zugelassen hätte, stand leider nicht zur Verfügung.

### 3.4.3.3 AS02-Expression

In die durchflusszytometrische Analyse der Magenkarzinome wurde der für humane Fibroblasten spezifische Antikörper AS02 miteinbezogen, um Stromazellen innerhalb der Fraktion der präparierten vitalen Einzelzellen immunphänotypisch zu quantifizieren.

Das arithmetische Mittel der AS02-positiven Zellen aus Magenkarzinobiopsien betrug 8,63% ( $s=11,92$ ). Bei medullären Karzinomen betrug die Expression von AS02 1,89% ( $s=1,62$ ), bei einfachen 9,98% ( $s=10,34$ ), bei szirrhösen 18,05% ( $s=16,29$ ) (Abb.41). Nach inferenzstatistischer Analyse war die Expression von AS02 mit  $p=0,028(*)$  signifikant unterschiedlich.

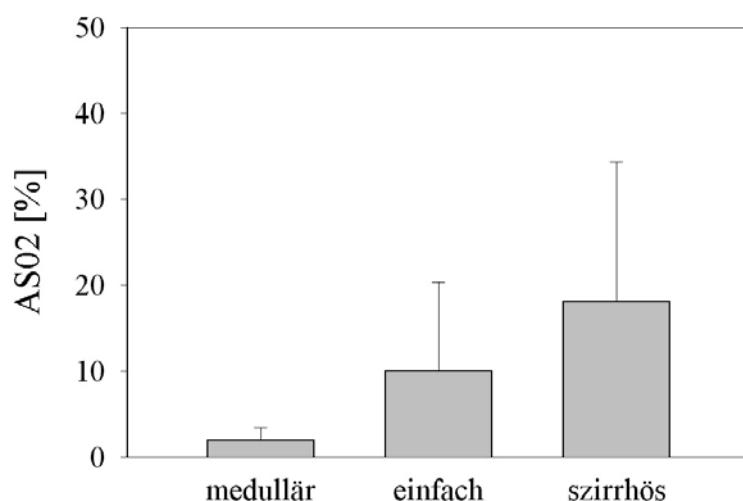


Abb.41: Bindegewebegehalt vitaler Einzelzellen aus Magenkarzinobiopsien. Mit zunehmender Härte des Gewebes stieg der Anteil AS02-positiver Zellen: medulläre Biopsien mit 1,89% der vitalen Einzelzellen positiv für AS02(0,28-4,55%;  $s=1,62$ ), bei einfachen Magenkarzinomen 9,98% (2,57-30,32%;  $s=10,34$ ) und bei szirrhösen 18,05% (0,34-44,54%;  $s=16,29$ ). Die AS02-Expression war bei unterschiedlichen Fibrosegraden signifikant ( $p=0,028*$ ), Subgruppen: medullär vs. einfach:  $p=0,451(*)$ , medullär vs. szirrhös:  $p=0,0186$  (n.s.), einfach vs. szirrhös:  $p=0,6905$  (n.s.).

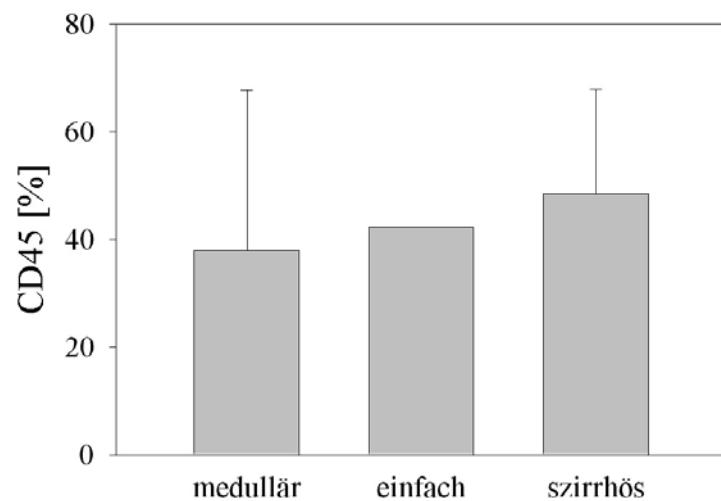
Innerhalb der Entität der Magenkarzinome zeigte sich eine ausgeprägte Heterogenität in der Merkmalsexpression von AS02-positiven Zellen. Der Bereich gemessener Werte erstreckte sich bei szirrhösen Biopsien zwischen 0,34% und 44,54%, bei einfachen Karzinomen zwischen 2,57 und 30,32% und bei als medullär eingestuften Karzinomen zwischen 0,28% und 44,54%. Zugleich konnte nicht davon ausgegangen werden, dass das Oberflächenantigen auf Zellen aus Bindegewebe, das durch AS02 erkannt wurde, auf allen Stromazellen nachweisbar wären.

Dennoch zeigten die Resultate der FACS-Analysen in der Tendenz, dass die Detektion von AS02 mit der makroskopischen Konsistenz korrelierte und zu signifikant unterschiedlichen Resultaten führte ( $p=0,028$ ).

Zusammenfassend konnte für die Magenkarzinobiopsien festgestellt werden, dass der durchflusszytometrisch ermittelte Antigenstatus des Fibroblastenmarkers AS02 neben dem Vitalzellanteil mit dem makroskopisch determinierten Fibrosegrad des Karzinoms korrelierte.

#### 3.4.3.4 Immunphänotypische Quantifikation der leukozytären Infiltration

In allen untersuchten Magenkarzinomen fanden sich auch in der durchflusszytometrischen Analyse CD45-positive Zellen, durchschnittlich 37,84% der vitalen Zellen (Abb.42).



*Abb.42: Anteil von Leukozyten (CD45-positiv) innerhalb der Fraktion vitaler Zellen.: medulläre Magenkarzinome: 37,93% CD45-positive Zellen (6,95-92,50%;  $s=37,93$ ), einfache Konsistenz 42,34% (eine Magenkarzinobiopsie), szirrhöse Magenkarzinobiopsien 48,38% (33,19-75,86%;  $s=19,46$ ) mit Leukozyten auf. Die konsistenzbedingten Unterschiede waren nicht signifikant ( $p=0,71$ ).*

Legt man die makroskopische Tumorkonsistenz zugrunde, so wurde folgendes Expressionsmuster ermittelt: Innerhalb der Fraktion vitaler Einzelzellen waren in

medullären Magenkarzinobiopsien im Durchschnitt 37,93% CD45-positiv ( $s=29,82$ ): Szirrhöse Magenkarzinome enthielten 48,38% Leukozyten ( $s=19,47$ ). Bei lediglich einem mit anti-CD45-Antikörper untersuchten Exemplar eines einfachen Magenkarzinoms wurde ein Gehalt an Leukozyten von 42,34% gemessen, eine Standardabweichung konnte aus diesem Grunde nicht errechnet werden. Für die Messungen zur Expression von CD45 an Magenkarzinomen wurden die Immunphänotypisierung mit APC-konjugierten Antikörpern herangezogen, die bei einem direkten quantitativen Vergleich der CD45-Expression bei anderen Tumorentitäten berücksichtigt werden müsste.

Zwischen der immunphänotypisch charakterisierten leukozytären Infiltration und der Konsistenz des Magenkarzinoms wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt ( $p=0,7073$ ). Die vermerkten Standardabweichungen lassen auch bei diesem durchflusszytometrischen Parameter individuelle Schwankungen der Merkmalsexpression erkennen, die auf eine individuelle Heterogenität der Magenkarzinome deuteten.

Mit zunehmendem bindegewebigen Anteil des Gewebes konnte eine leicht ausgeprägte Zunahme des Anteil an Leukozyten beobachtet werden. Leukozyten sind als nicht-adhärerente Zellen bei der Präparation der Einzelzellen gegenüber den Tumor- und Bindegewebezellen der Gewebebiopsie insofern prädisponiert, als sie nicht erst durch die Disaggregation freigesetzt werden, sondern unmittelbar in die Fraktion der vitalen Einzelzellen überzugehen vermögen.

Die oben beschriebene verminderte Vitalität einfacher und szirrhöser Tumorbiopsien führte also nicht nur zu einer verminderten messbaren Vitalität, sondern schien zusätzlich das Übertreten von nicht adhärenten Leukozyten in die vermessene Population zu begünstigen.

Die Zusammensetzung der Leukozytenpopulation wurde im Rahmen dieser Untersuchung nicht weiter untersucht, da die Zielsetzung war, Tumorzellen zu charakterisieren. Um Kreuzreaktionen von Leukozyten auszuschließen, wurden Mehrfachfärbungen durchgeführt, die eine Zuordnung von Leukozyten und einer möglichen Hsp70-Expression innerhalb der vitalen Zellen zuließen.

### 3.4.3.5 Hsp70-Expression auf vitalen Einzelzellen

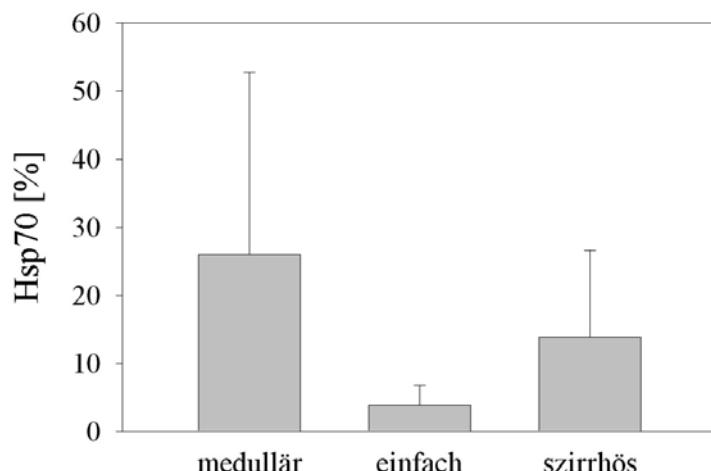


Abb.43: Expression von Hsp70 auf vitalen Einzelzellen aus Magenkarzinobiopsien, aufgegliedert nach ihrer makroskopischen Konsistenz. Medulläre gastrische Adenokarzinome mit durchschnittlich 25,98% der vitalen Zellen positiv für Hsp70 an ihrer Zelloberfläche (0,66-81,86%;  $s=26,72$ ), aus Magenkarzinobiopsien mit einfacher Konsistenz 3,83% (1,04-9,91%;  $s=2,99$ ) und aus szirrhösen Magenkarzinomen im Durchschnitt 13,83% (1,81-33,51%;  $s=12,75$ ), Unterschiede in der Hsp70-Expression einzelner Gruppen waren statistisch nicht signifikant ( $p=0,2657$ ).

Bei den 24 analysierten Magentumorbiopsien zeigte sich ein heterogenes Expressionsmuster von Hsp70 (Abb.43). Während bei medullären Karzinomen der Anteil Hsp70-positiver Zellen 25,98 % betrug, wurden bei den sechs Magenkarzinomen mit einfacher Konsistenz lediglich der 3,99% der Zellen mit positivem Hsp70-Resultat beobachtet. Sechs weitere Magenkarzinome mit szirrhöser Gewebekonsistenz wiesen eine durchschnittliche Hsp70-Expression von 13,83 % ( $s=12,75$ ) auf.

Die FACS-Ergebnisse zeigen zum einen eine individuelle Schwankung der Hsp70-Expression, deren Minimum 0,66% und deren Maximum 81,66% betrug. Die Expression von Hsp70 scheint auf Magenkarzinomen mit medullärer und szirrhöser Konsistenz gehäuft aufzutreten, während die makroskopisch determinierte mittelfeste (einfache) Tumorkonsistenz mit einer verminderten Hsp70-Expression einherzugehen schien.

Es wurde beobachtet, dass *einfache* Magenkarzinome ein vermindertes Ergebnis der quantitativen Hsp70-Ausprägung besaßen, wenngleich der Unterschied der Merkmalsexpression nicht signifikant war ( $p=0,2657$ ). Weitere pathologische, histologische und klinische Merkmale sind hier mit einzubeziehen, um zu versuchen, einen Zusammenhang zu der gering ausgeprägten Hsp70-Detektion der Subgruppe der Magenkarzinome mit einfacher Konsistenz herzustellen.

Aus Vorexperimenten an den Hsp70-positiven Zelllinien CX+ und CX- konnten Kreuzreaktionen des Hsp70-Antikörpers cmHsp70.1 und des anti-Fibroblasten-Antikörpers AS02 ausgeschlossen werden (eigene nicht publizierte Daten).

Doppelfärbungen von Hsp70 gegen CD45 wurden in 12 der 24 Magenkarzinobiopsien durchgeführt. Sie bestätigten eine Hsp70-Expression auf CD45-negativen Zellen, die aus dem Tumorgewebe präpariert wurden.

In den Fällen indirekter Konjugation des Hsp70-Antikörpers wurde vereinzelt ein Hsp70- und CD45-doppelpositives Ergebnis angetroffen, die bei der Verwendung von direktmarkiertem anti-Hsp70-Antikörper fehlte. Inhomogenitäten der Chargen der verwendeten, im eigenen Labor aus Hybridomüberständen gewonnenen Hsp70-Antikörper sind hier zu diskutieren. Vermutlich spielt eine Bindung über den Fc-Teil unspezifisch an humane Fc-Rezeptoren von Leukozyten eine Rolle, da dieses Phänomen bei direktkonjugiertem anti-Hsp70-Antikörper cmHsp70.1-FITC nicht beobachtet wurde.

Leider konnten keine nicht-malignen Magenmucosa-Biopsien untersucht werden, so dass Fragen zur Spezifität der durchflusszytometrisch detektierten, membranären Expression von Hsp70 als Tumormarker offen bleiben.

#### 3.4.3.6 Qualitative Wertung der oberflächenständigen Expression von Hsp70

Legte man einen Schwellenwert von 5,00% der vitalen Zellen mit durchflusszytometrisch detekter membranständiger Hsp70-Expression für eine qualitative immunphänotypische Aussage zugrunde, so konnte Hsp70 auf der Oberfläche vitaler Einzelzellen aus Magenkarzinobiopsien jeder der drei Konsistenzgruppen detektiert werden (Tab.44).

| Karzinom-art | Hsp70-positive Tumore | Anzahl der Analysen | Sensitivität |
|--------------|-----------------------|---------------------|--------------|
| medullär     | 6                     | 8                   | 75%          |
| einfach      | 1                     | 6                   | 17%          |
| szirrhös     | 4                     | 6                   | 67%          |
| k.A.         | 0                     | 4                   | 0%           |
| insgesamt    | 11                    | 24                  | 46%          |

Tab.44: Qualitative Resultate der Immunphänotypisierung von Magenkarzinomen in Abhängigkeit von ihrer Konsistenz und Angabe der ermittelten Sensitivität (k.A.= Konsistenz nicht klassifiziert)

Medulläre und szirrhöse Karzinome wiesen mit sechs von acht und vier von sechs Tumorbiopsien einen höheren Anteil Hsp70-positiver Tumore auf als einfache

---

Karzinome mit 1 von 6 Hsp70-positiv, 17%. Dies ergab eine Sensitivität von 75% für medulläre und 67% für szirrhöse Magenkarzinome.

Für die Biopsien einfacher Karzinome ergab sich eine Sensitivität von 17%. Fügte man vier nach ihrer Konsistenz nicht näher bestimmte Magenkarzinome hinzu, so zeigten elf der 24 Magentumorbiopsien ein qualitativ positives durchflusszytometrisches Resultat.

Dies entsprach einer Sensitivität von 46% für die immunphänotypische Analyse von Hsp70 an der Oberfläche von Magenkarzinome.

Hinsichtlich der quantitativen Hsp70-Expression unterschieden sich Hsp70-positive Tumore mit einer Hsp70-Expression auf mehr als 5,00% der Zellen von den Hsp70-negativen Tumorproben signifikant ( $p < 0.0001$ ).

Diese Berechnung stützte die Hypothese, dass ein Cut-off bei 5,00% des quantitativen Hsp70-Resultats zugleich qualitativ zwei Gruppen von Magenkarzinomen definierte mit distinkter oberflächenständiger Hsp70-Expression.

### **3.4.4 Potenzielle klinische Relevanz des Hsp70-Befunds**

Aufgrund der errechneten Signifikanz konnte davon ausgegangen werden, dass sowohl Messmethode als auch Auswertungskriterien distinkte Resultate ergeben sollten, deren pathologisch-diagnostische und deren klinische-prognostische Bedeutung in Folgearbeiten weiter geprüft werden kann.

Die immunphänotypisch erhobenen Daten zur Hsp70-Expression auf Tumorzellen aus Magenkarzinomen sollten der Option für eine Immuntherapie mit *ex vivo* (Multhoff et al., 2001) oder *in vivo* mit Hsp70-Peptid stimulierten NK-Zellen (Moser et al., 2002) bei der Diagnose *Magenkarzinom* den Weg ebnen.

## 3.5 Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome

### 3.5.1 Makropathologische Einstufung der bronchialen Tumorbiopsien

In der Diagnostik bronchialer Tumore kam der histologisch-pathologischen Unterscheidung und der resultierenden Einstufung wichtige Bedeutung zu, jedoch fiel auch makroskopisch eine Heterogenität der Biopsien auf. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwiefern die Konsistenz der Gewebeprobe Einfluss nimmt auf die Präparation vitaler Einzelzellen aus den Biopsien, auf deren Immunphänotypisierung sowie schließlich auf den Anteil und die Verteilung Hsp70-tragender Zellen aus der Tumorbiopsie.

Gemäß der üblichen Einteilung von Karzinomen nach ihrem Bindegewebegehalt und ihrer makroskopischen Beschaffenheit (Eder und Gedigk, 1990) wurden die vorgelegten unbehandelten bronchialen Tumorbiopsien vor der Disaggregation beurteilt:

Bei den 74 nichtkleinzelligen Bronchialtumoren wurden 31 Biopsien (48%) aufgrund ihrer weichen Konsistenz als medullär, 24 Karzinome (38%) mit mittelfester Konsistenz als einfache Karzinome und neun Exemplare (14%) mit ausgeprägt schnittfester Konsistenz als szirrhöse Karzinome eingestuft. Bei zehn Tumorbiopsien konnte die Konsistenz dieser Präparate nicht eindeutig zugeordnet werden.

Nachfolgend werden drei Analysen vorgestellt mit jeweils einem medullären, einem einfachen und einem szirrhösen Karzinom.



*Abb.44: Makropathologische Darstellung des medullären Karzinoms LX#81.*

Bei der Bronchialtumorbiopsie LX#81 handelte es sich um ein medulläres Karzinom mit makroskopisch weicher Konsistenz (Abb.44). An den Randbereichen des Biopsiestücks erscheint residuales Lungenparenchym, in welches der Tumor infiltrierte. Zur durchfluszytometrischen Analyse wurde tumorales Gewebe aus dem abgebildeten mittleren Gewebebereich entnommen.



*Abb.45: Bronchialtumorbiopsie (LX#66), nach ihrer makroskopischen Konsistenz als einfaches Karzinom bestimmt.*

Bei der vorliegenden bronchialen Tumorbiopsie (LX#66) zeigten sich zwei Gewebestücke, bei denen sich der Tumor durch seine helle Farbe von dem am Rand in Resten vorhandenen normalen rötlichen Lungenparenchym unterschied (Abb.45). Beim Anschneiden der Gewebeprobe wurde eine Konsistenz festgestellt, die angesiedelt war zwischen der weichen Konsistenz medullärer und der schnittfesten, harten Konsistenz szirrhöser Karzinome. Die Biopsie wurde als einfaches Karzinom eingestuft.



*Abb.46: Makropathologische Darstellung der szirrhösen Tumorbiopsie LX#80: Der Tumor imponiert als heller, fibrotischer Gewebeabschnitt.*

Makroskopisch stellte die Tumorbiopsie LX#80 um ein zirka 2,0 auf 3,5 cm großes Gewebestück dar. Am linken Randbereich war ein Stück der Pleura viszeralis mitreseziert worden, was auf eine Lokalisation des Tumors im Randbereich der Lunge schließen ließ (Abb.46). Reste von hellrötlichem Lungenparenchym sind im rechten Bereich zu erkennen. Zentral dominiert das helle, fibrotische Areal des Tumors. Bei der manuellen Disaggregation ergab sich eine schnittfeste bis harte Konsistenz, die das Karzinom als szirrhös einstufen ließ.

### 3.5.2 Durchflusszytometrische Analysen der Tumorbiopsien

#### 3.5.2.1 Bestimmung der Vitalität

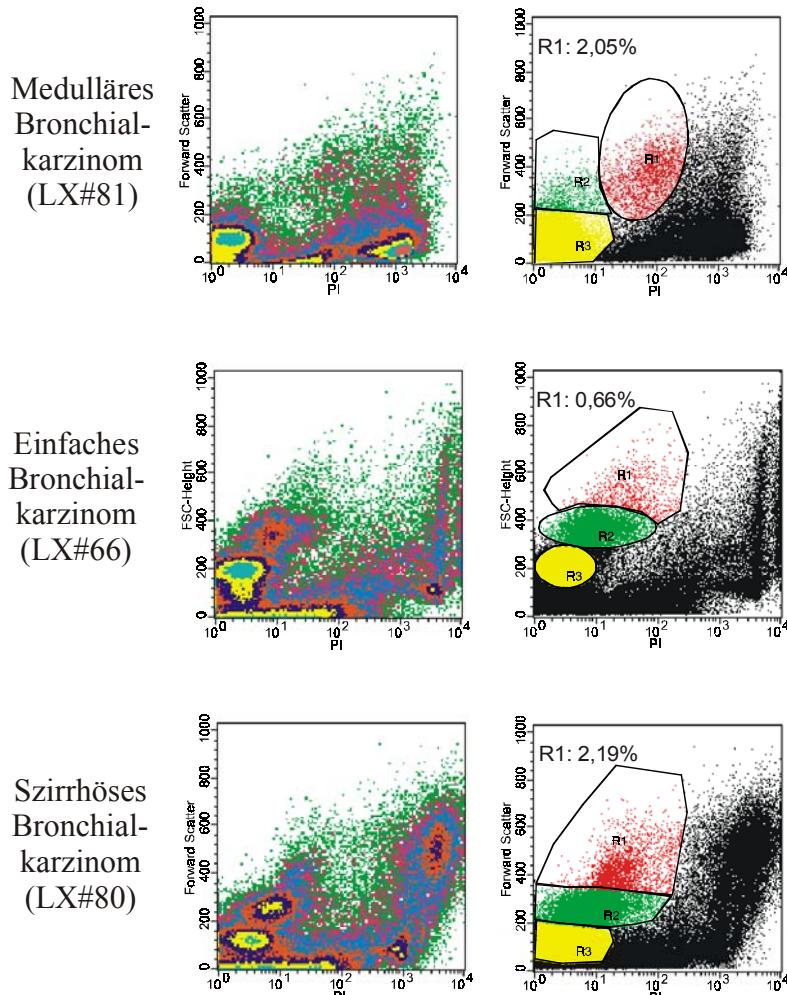


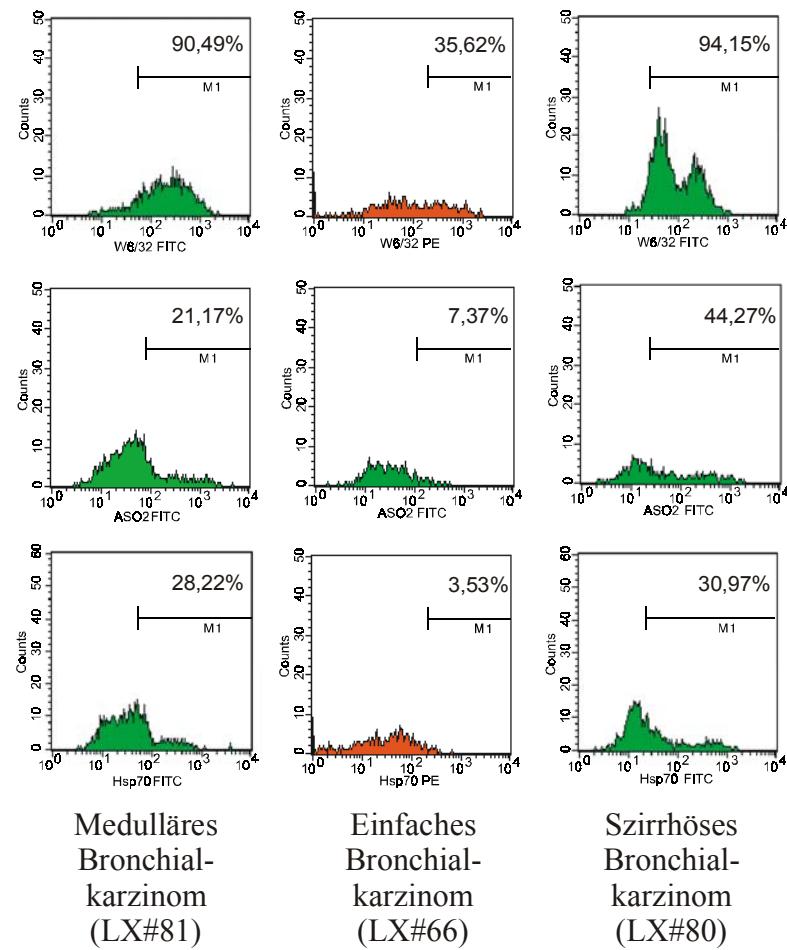
Abb. 47: Quantifizierung der vitalen, propidiumiodidnegativen Populationen, die für die Identifikation von Tumorzellen maßgeblich waren, unterschieden nach der makropathologischen Konsistenz der Biopsien.

Aus dem medullären Karzinom (LX#81) konnten als vitale Zellpopulation (R1) 2,05% der aufgezeichneten Ereignisse eingegrenzt werden (Abb.47). In Analogie zu den Untersuchungen an kolorektalen Karzinomen wurde diese Population als maßgebliche Population für die Immunphänotypisierung von malignen Zellen eingestuft, während bei den als R2 und R3 bezeichneten Populationen überwiegend von Leukozyten beziehungsweise von Erythrozyten auszugehen war.

Mit lediglich 0,66% vitalen Einzelzellen wies die Vitalzellpopulation R1, welche aus dem einfachen Bronchialkarzinom LX# 66 stammte, eine gering ausgeprägte Vitalität auf, welche unterhalb der vitalen Einzelzellen aus dem szirrhösen Karzinom LX#81 mit 2,19% lag (Abb.). Ursächlich hierfür könnte die stark ausgeprägte Population (R2) sein,

die im Vergleich zur Population R1 zahlenmäßig dominierte. Man könnte spekulieren, dass innerhalb der propidiumiodidnegativen Zellen die Verteilung zugunsten der Leukozyten und Erythrozyten in den Populationen R2 und R3 hin verschoben war. Zugleich sollte in den letztgenannten Populationen von einer verminderten Präsenz von malignen Zellen auszugehen sein (vollständige Analysen im Anhang).

### 3.5.2.2 Vergleich der Immunphänotypisierung der vitalen Zellpopulationen



*Abb.48: Histogramm-Auswertungen der durchflusszytometrischen Analyse von drei Bronchialkarzinomen, makropathologisch unterschieden nach ihrer Konsistenz.*

Die immunphänotypische Bestimmung ergab eine Detektion von MHC-Klasse-I-Molekülen auf 90,49% der vitalen Einzelzellen aus dem medullären Karzinom sowie 94,15% aus dem szirrhösen Karzinom (Abb.48). Das einfache Bronchialkarzinom bildete hier mit 35,62% MHC-Klasse-I-positiven Zellen eine Ausnahme. Auch für den Parameter MHC-Klasse-I-Expression mag die verhältnismäßig geringe Anzahl der vitalen Zellen der Teilpopulation maßgeblich gewesen sein. Dennoch konnte die MHC-Klasse-I-Expression als –qualitative- Positivkontrolle in den drei Fällen herangezogen

werden. Bei dem Vergleich der Expression des Bindegewebsmarkers AS02 konnte eine Expression bei dem szirrhösen Karzinom mit 44,27% beobachtet werden, welche stärker ausgeprägt war als bei dem medullären Karzinom mit 21,17%. Mit 7,37% positiven Zellen ergab die durchflusszytometrische Detektion von fibrotischen Zellen eine geringe Expression von AS02.

Man könnte spekulieren, dass das quantitativ vergleichsweise geringe Resultat der AS02-Expression des einfachen Bronchialkarzinoms möglicherweise in einem Zusammenhang mit der gleichfalls gering ausgeprägten Viabilität stand. Als weitere endogene Ursachen könnten intratumorale Nekrosen diskutiert werden, als exogene eine möglicherweise verlängerte Dauer zwischen operativer Resektion und durchflusszytometrischer Analyse.

In den Histogrammen ergab sich für die Expression von membranständigem Hsp70 eine Resultat von 28,22% bei dem medullären und 30,97% Hsp70-positiven Zellen bei dem szirrhösen Karzinom. Das einfache Bronchialkarzinom zählte im Histogramm lediglich 3,53% Hsp70-positive Ereignisse.

Die Expression von AS02 und Hsp70 wurde in der Mehrfachfärbung der Detektion von CD45 gegenübergestellt (Abb.49):

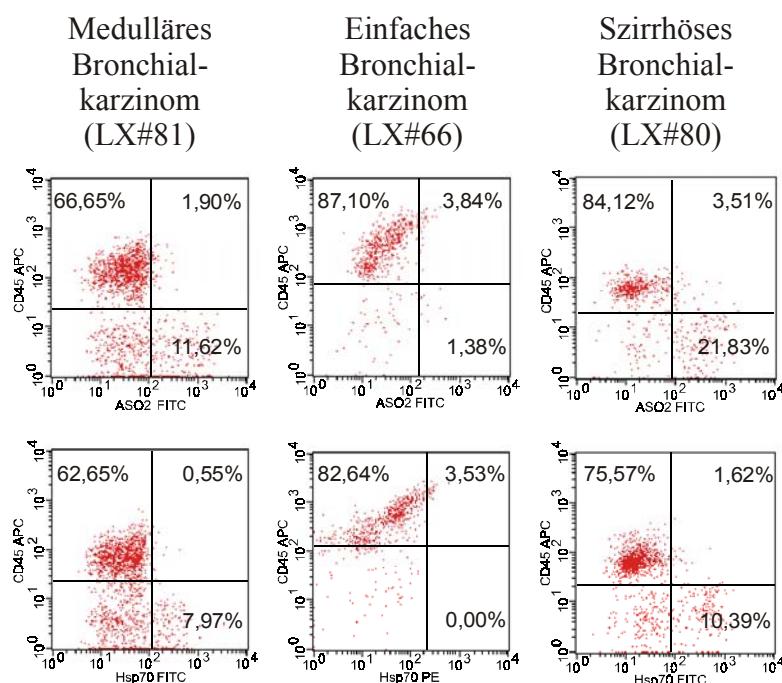


Abb.49: Mehrfachfärbung der vitalen Einzel aus den makropathologisch unterschiedenen Bronchialtumoren. obere Reihe : AS02/CD45, untere Reihe Hsp70/CD45.

Die Leukozyten zeigten sich in den Dotplot-Darstellung als CD45-positive Population, die von den anderen Zellen jeweils gut abgrenzbar erschien. Im Dotplot bestätigte sich die unterschiedlich starke Frequenz von AS02-positiven Zellen, die bei dem medullären Karzinom 11,62% betraf und bei dem szirrhösen Karzinom mit 21,83% fast das Doppelte.



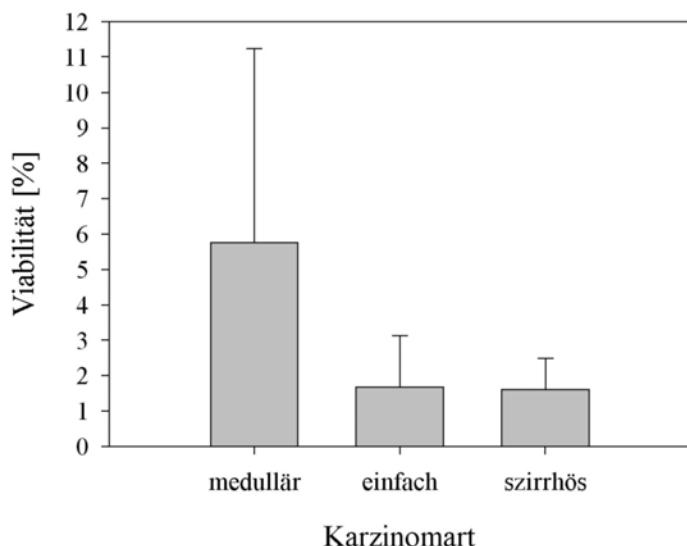
### 3.5.3 Quantitative Analyse der Resultate nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome

#### 3.5.3.1 Viabilität

Der Anteil an vitalen Einzelzellen wurde durchflusszytometrisch mit der Propidiumiodidfärbung bestimmt.

Im Hinblick auf die makroskopische Konsistenz der bronchialen Tumore fanden sich folgende Unterschiede (Abb.50):

Bei medullären bronchialen Tumoren betrug der Anteil an vitalen Zellen durchschnittlich 5,76% (0,03-23,91;  $s=5,48$ ), bei einfachen Karzinomen 1,67% (0,12-6,40;  $s=1,46$ ) und bei szirrhösen Biopsien 1,60% (0,40-2,90;  $s=0,89$ ).



*Abb.50: Vergleich der Viabilität der Einzelzellen aus nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, durchflusszytometrisch ermittelt mit Propidiumiodid (PI): Aus medullären bronchialen Karzinomen wurden durchschnittlich 5,76% (0,03-23,91;  $s=5,48$ ), aus einfachen Karzinomen 1,67% (0,12-6,40;  $s=1,46$ ) und aus szirrhösen Karzinomen 1,60% (0,40-2,90;  $S=0,89$ ) vitale Zellen isoliert und durchflusszytometrisch analysiert ( $p=0,0004(*)$ ). Weitere Untersuchungen: Viabilität medullär vs. einfach:  $p=0,0002 (*)$ ; medullär vs. szirrhös:  $p=0,0115(*)$ ; einfach vs. szirrhös:  $p=0,8398$  (n.s.).*

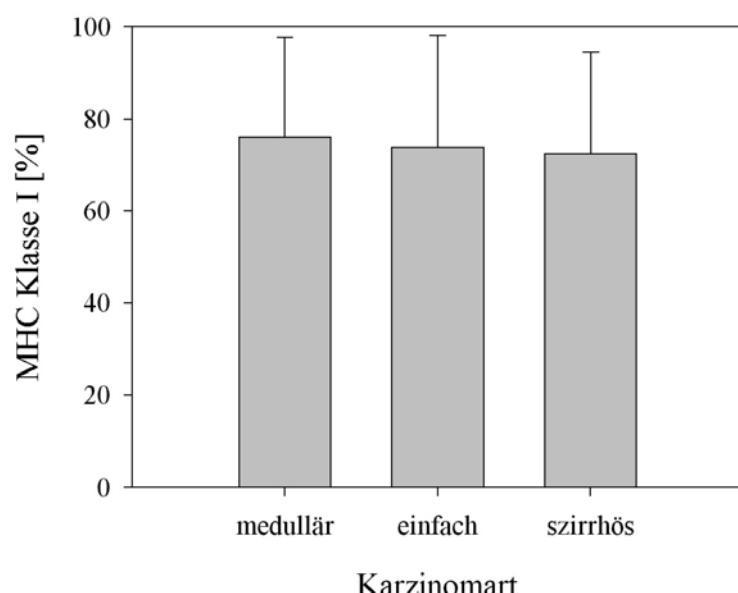
Aus szirrhösen und einfachen Karzinomen mit ihren vergleichsweise hohen Bindegewebeanteilen konnten signifikant weniger vitale Zellen extrahiert werden als aus medullären Bronchialtumorbiopsien, wie die inferenzstatistische Untersuchung ergab ( $p=0,0004$ ). Letztgenannte Karzinomart unterschied sich in ihrer Viabilität signifikant von derjenigen der beiden anderen ( $p=0,0002$  vs. einfach und  $p=0,0115$  vs. szirrhös). Dies galt nicht für einfache und szirrhöse Karzinome ( $p=0,8398$ ).

Tumorassoziiertes Bindegewebe schien bei dem Bronchialkarzinom sensibel gegenüber der manuellen Gewebedisaggregation zu sein, was sich besonders bei einfachen und

szirrhösen Karzinomen in einem geringeren viablen Anteil bemerkbar machte. Aus medullären Lungenkarzinomen konnte ein signifikant höherer Anteil viabler Zellen isoliert werden, während sich einfache und medulläre Karzinome nicht signifikant in ihren Ausbeuten an vitalen Zellen unterschieden.

### 3.5.3.2 MHC-Klasse I-Expression

Die quantitative Expression von MHC Klasse I - Molekülen wurde immunphänotypisch mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 quantifiziert. Sie wurde neben der Propidiumiodid-Färbung als weiteres Kriterium für eine intakte Zellmembran der Einzelzellen herangezogen.



*Abb.51: Immunphänotypisierung der MHC-Klasse I – Expression Anteil MHC Klasse I positiver vitaler Einzelzellen in Abhängigkeit von der Konsistenz des bronchialen Karzinoms: bei medullären Tumoren durchschnittlich 76,01% (24,34-99,84%; s= 21,61), einfache Karzinome 73,77%(21,39-99,10%;s=24,41) und szirrhöse Karzinome 72,37%(21,81-97,91%; s=22,05). Die Unterschiede in der MHC-Klasse I –Expression zwischen den Karzinomarten waren nicht signifikant ( $p=0,8339$ ).*

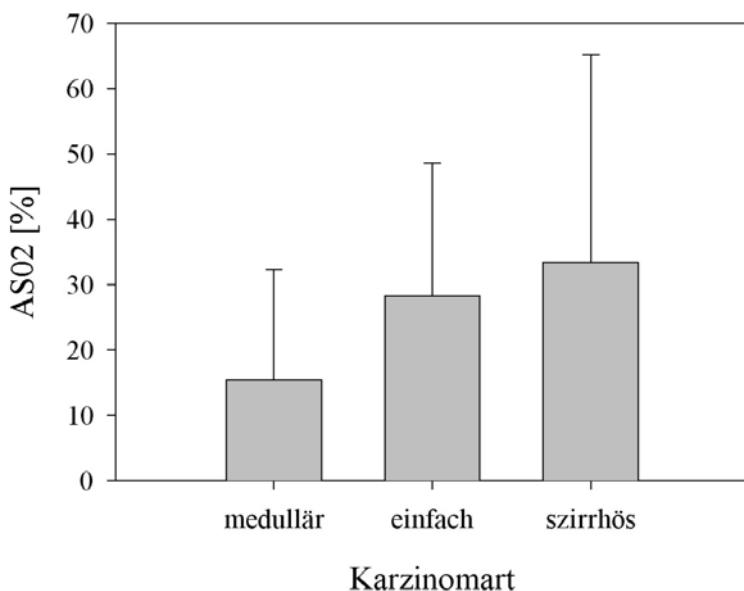
Eine MHC-Klasse I - Expression konnte auf vitalen Einzelzellen aller Tumorarten nachgewiesen werden. Im Mittel betrug der Anteil MHC-positiver Zellen bei medullären Karzinomen 76,01% (24,34-99,84%; s=21,61), bei einfachen Karzinomen 73,77% (21,39-99,10%; s=24,41) und bei szirrhösen Karzinomen 72,37% (21,81-97,91; s=22,1) (Abb.51). Die inferenzstatistische Untersuchung ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der MHC-Klasse I Expression verschiedener Karzinomarten. ( $p=0,8339$ ). Medulläre, einfache und szirrhöse Karzinome verhielten sich bezüglich ihrer MHC-Klasse I-Moleküle weitgehend einheitlich.

Eine gleichfalls vorhandene Bindung des Primärantikörpers W6/32 an MHC-Moleküle letaler Zellen, die in der Überzahl vorgelegen haben (siehe oben), sowie die indirekte

durchflusszytometrische Analyse mochten dazu beigetragen haben, dass eine theoretisch erwartete 100%ige Detektion von MHC-Klasse I nicht eingetroffen war. Eine tumorimmunologisch relevante Downregulation von MHC-Klasse I-Molekülen (Pantel et al., 1991; Ritz et al., 2001) konnte indes aus der Einzelmessung pro Tumorbiopsie nicht abgelesen werden.

Es lag der immunphänotypischen Quantifizierung von MHC-Klasse I eine heterogene Zellpopulation zugrunde, die nicht ausschließlich aus Tumorzellen, sondern auch aus Bindegewebezellen und Leukozyten bestand, die ihrerseits zu dem vorliegenden MHC-Resultat beitrugen. Gleichwohl wies die erfasste MHC-Expression auf vitalen Einzelzellen eine ausgeprägte interindividuelle Heterogenität auf, wie aus den betragsmäßig großen Standardabweichungen abgelesen werden konnte.

### 3.5.3.3 Immunphänotypisierung des Bindegewebsmarkers AS02



*Abb.52: FACS-Analyse mit durchschnittlichem Anteil AS02-positiver Zellen aus bronchialen Tumoren, gegliedert nach der Karzinomart (Konsistenz): im Mittel 15,98% AS02-positive Zellen aus medullären Karzinomen (0,34-69,63%; s=16,94), bei einfachen Karzinomen 28,29% (5,86-70,94%; s=20,30), bei szirrhösen Karzinomen 33,42% (1,33-87,13%; s=31,72%). Konsistenzbedingte Unterschiede in der AS02-Expression waren mit p=0,0458(\*) statistisch signifikant.(medullär vs. einfach: p=0,0146(\*); medullär vs. szirrhös: 0,1768 (\*); einfach vs. szirrhös: 0,9833).*

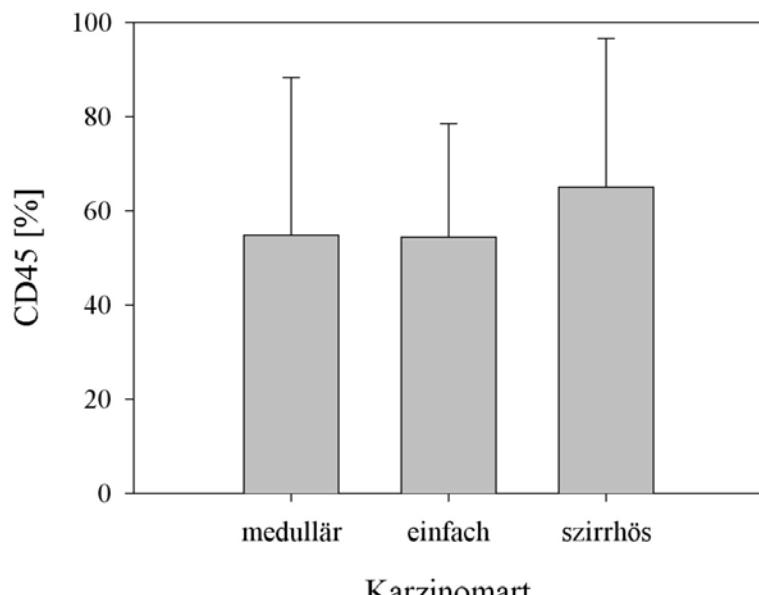
Die durchflusszytometrische Analyse sollte untersuchen, ob AS02 als Marker für tumorassoziiertes Stroma bei bronchialen Tumoren in Frage kommt und ob der Gehalt an AS02-positiven vitalen Einzelzellen aus bronchialen Tumorbiopsien mit der Konsistenz des Karzinomes korreliert.

Bei medullären bronchialen Karzinomen betrug der durchschnittliche Anteil an vitalen Zellen, bei denen der bindegewebespezifische Antikörper AS02 eine Bindung an die

Zelloberfläche und damit den tumorassoziierten bindegewebigen Anteil zeigte (Abb. 52), bei medullären Karzinomen 15,98 % (0,34-69,63%; s=16,90), bei einfachen Karzinomen 28,3% (5,86-70,94; s=20,30) und bei szirrhösen Karzinomen 33,42% (1,33-87,13; s=31,72). Medulläre Karzinome wiesen signifikant weniger AS02-positive Zellen auf als einfache Karzinome ( $p=0,0146$ ), wohingegen der Unterschied zwischen medullären und szirrhösen Karzinomen ( $p=0,1786$ ) und zwischen einfachen und szirrhösen Karzinomen nicht statistisch signifikant ausgeprägt war ( $p=0,9833$ ). Die hohen Standardabweichungen deuteten auf interindividuelle Schwankungen in der Merkmalsexpression von AS02 hin, die sich insbesondere bei einfachen und szirrhösen bronchialen Karzinomen bemerkbar machten.

### 3.5.3.4 Quantifikation der Leukozytenfraktion

In der Zellpopulation der vitalen Einzelzellen aus bronchialen Tumorbiopsien wurden Leukozyten über ihren Oberflächenmarker CD45 immunphänotypisch charakterisiert. (Abb.53):



*Abb.53: Quantifizierung des leukozytären Anteils aus nichtkleinzelligen Bronchialtumorbiopsien. Medulläre Karzinome enthielten in der Vitalzellfraktion durchschnittlich 54,71% CD45-positive Zellen (0,72-99,07%; s=33,39), einfache Karzinome 54,29% (15,18-87,90; s= 24,12) und szirrhöse Karzinome 64,97% (20,71-92,39, s=31,59). Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ( $p=0,6947$ ).*

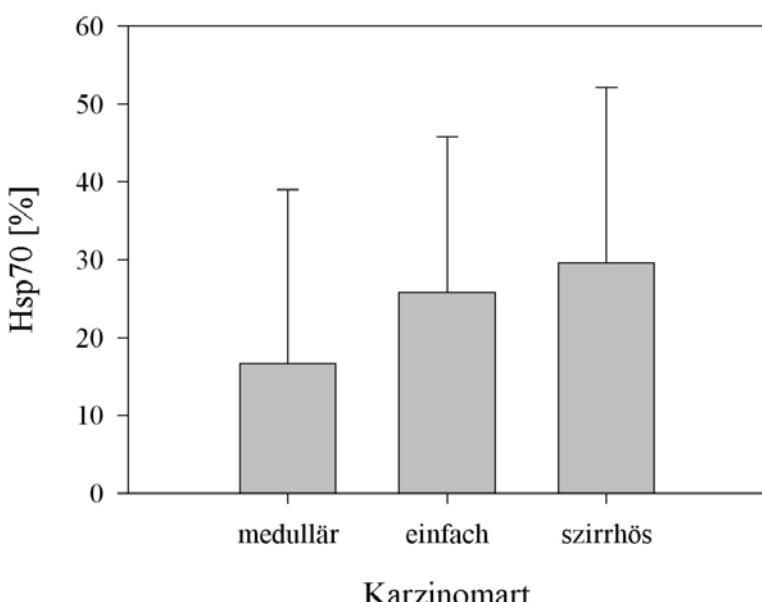
Nach der makroskopischen Einteilung gegliedert fanden sich folgende Werte zur Expression von CD45 auf vitalen Einzelzellen aus bronchialen Tumoren: medulläre Karzinome zeigten zu 54,72% (0,72-99,07%; s=33,99), einfache Karzinome zu 54,29% (15,18-87,90%, s=24,12), szirrhöse Karzinome im Mittel zu 64,97% (20,71-92,39%; s=31,60) CD45-positive Zellen (Abb.53). Es ergab sich mit  $p=0,6947$  keine signifikante

Unterschiedlichkeit bei den festgestellten Anteilen CD45-positiver Zellen bei den untersuchten Karzinomkonsistenzen bronchialer Karzinome.

Tumorinfiltrierende Leukozyten werden bei der manuellen Disaggregation zusammen mit malignen Zellen und weiteren Zelltypen isoliert, beispielsweise Erythrozyten und tumorassoziierte Bindegewebezellen. Da Leukozyten nicht als adhärente Zellen eines Gewebes vorliegen, sondern frei migrieren können und -wie beobachtet- bevorzugt in die Vitalzellfraktion übergehen können, gilt ihnen besondere Berücksichtigung in der vitalen Zellpopulation. In Doppelfärbung von CD45 und Hsp70 wurde im folgenden geprüft, ob Leukozyten die Immunphänotypisierung von Tumorzellen beeinflussen.

### 3.5.3.5 Hsp70-Expression vitaler Einzelzellen nichtkleinzelliger bronchialer Tumore

Die Expression von Hsp70 auf der Oberfläche von vitalen Einzelzellen wurde immunphänotypisch mit dem Hsp70-spezifischen murinen Antikörper Klon cmHsp70.1 bestimmt. In Abhängigkeit von der Karzinomart wurden aus medullären Karzinomen im Durchschnitt 16,73% (0,12-98,18; s=22,21) Hsp70-positive vitale Einzelzellen registriert, aus einfachen Karzinomen 25,75% (0,18-71,71; s=20,10) und aus szirrhösen Karzinomen 29,54% (0,74-65,84; s=22,59) (Abb.54). Die Unterschiede zwischen den Karzinomarten erwiesen sich als statistisch nicht signifikant ( $p=0,065$ ).



*Abb.54: Immunphänotypisch ermittelte Oberflächenexpression von Hsp70-positiven Zellen aus bronchialen Tumorbiopsien in Abhängigkeit von der Konsistenz: im Mittel 16,73% bei medullären Karzinomen (0,12-98,18%; s=22,21), aus einfachen Karzinomen 25,75% (0,18-71,71%; s=20,10) und aus szirrhösen Karzinomen 29,54% (0,74-65,84; s=22,59). Die Hsp70-Expression unterschiedlicher Konsistenzarten war mit  $p=0,065$  nicht signifikant.*

### 3.5.3.6 Qualitative Auswertung der Messresultate zur Hsp70-Expression nichtkleinzelliger Bronchialtumore nach makroskopischer Tumorkonsistenz

Legt man einen Schwellenwert von 5,00% positiven Zellen zugrunde, so wurden 20 von 31 medullären Karzinomen als Hsp70-positiv beurteilt, was einer Sensitivität von 65% entspricht (Tab.45). Zwanzig von 24 Karzinomen mit einfacher Konsistenz wiesen eine Hsp70-Expression auf mehr als 5,00% der vitalen Zellen auf. Dies entspricht einer Sensitivität von 83% für nichtkleinzellige Bronchialkarzinome mit einfacher Konsistenz. Sieben von neun nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen mit szirrhöser Konsistenz wiesen eine Hsp70-Expression auf mehr als 5,00% ihrer vitalen Zellen auf, was eine Sensitivität von 78% für szirrhöse nichtkleinzellige Bronchialkarzinome bedeutete.

| <i>Karzinomart nichtkleinzelliger Bronchialtumore</i> | <i>Hsp70-positiv</i> | <i>insgesamt untersucht</i> | <i>Sensitivität</i> | <i>Signifikanz</i> |
|---|----------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------|
| medullär  | 20                   | 31                          | 65%                 | p=0,2461           |
| einfach   | 20                   | 24                          | 83%                 | (n.s.)             |
| szirrhös  | 7                    | 9                           | 78%                 |                    |

Tab.45: *Hsp70-Expression nach makroskopisch determinierter Tumorkonsistenz mit Angabe der Signifikanz. Die relativen Häufigkeiten waren statistisch nicht signifikant (p=0,2461).*

Hsp70-positive Biopsien wurden bei allen Konsistenzarten beobachtet. Die relativen Häufigkeiten unterschiedlicher Konsistenzarten waren statistisch nicht signifikant ( $p=0,2461$ ).

### 3.5.3.7 Quantitative Ausprägung der Hsp70-Expression histologisch unterschiedener nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome

Berücksichtigt man die Histologie des vorliegenden nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms, so ergab sich bei den Plattenepithelkarzinomen ein durchschnittlicher Anteil von 26,10% Hsp70-positiven Zellen, bei Adenokarzinomen im Mittel 19,40%, bei den bronchiolo-alveolären Karzinomen 28,71% (Tab.46):

| <i>Histologie nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome</i> | <i>Fallzahl</i> | <i>detektierte Hsp70-Expression [%]</i> | <i>Signifikanz</i> |
|---|-----------------|---|--------------------|
| Plattenepithelkarzinom                                  | 34              | 26,10%<br>(0,38-98,18; s=23,89)         | p=0,2080<br>(n.s.) |
| Adenokarzinom   | 22              | 19,40%<br>(0,12-62,50; s=20,94)         |                    |
| Bronchiolo-alveoläres Karzinom                          | 4               | 28,71%<br>(15,03-46,80; s=11,48)        |                    |
| Adenosquamöses Karzinom                                 | 1               | 54,62%                                  |                    |
| Grosszelliges Karzinom                                  | 2               | 7,36%<br>(0,22-14,50; s=7,14)           |                    |

Tab.46: Durchschnittliche Hsp70-Expression nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome nach vorgegebener Histologie unter Angabe der Probenanzahl und deren membranärer Hsp70-Expression mit arithmetischem Mittelwert, Messwertebereich, Standardabweichung (s) sowie der errechneten statistischen Signifikanz.

Ein Exemplar eines adenosquamösen Karzinoms wies eine Hsp70-Expression auf 54,62% der Zellen auf, bei zwei histologisch als grosszelligen Karzinomen diagnostizierten Fällen betrug der durchschnittliche Anteil Hsp70-positiver Zellen 7,36%. Die histologischen Subtypen nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Hsp70-Expression ( $p=0,2080$ ).

Zur Gesamtdarstellung hinzuzufügen sind elf weitere histologisch nicht spezifizierte Biopsien. Ihre Hsp70-Expression betrug im Mittel 21,57% (0,18-60,62; s=18,72).

### 3.5.3.8 Qualitative Bewertung der Hsp70-Expression auf nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen unterschieden nach ihrer Histologie

| Histologie nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome | Hsp70-positiv | insgesamt untersucht | Sensitivität |
|--|---------------|----------------------|--------------|
| Plattenepithelkarzinom                           | 29            | 34                   | 85%          |
| Adenokarzinom                                    | 14            | 22                   | 64%          |
| Bronchiolo-alveoläres Karzinom                   | 4             | 4                    | 100%         |
| Großzelliges Karzinom                            | 1             | 2                    | 50%          |
| Adenosquamöses Karzinom                          | 1             | 1                    | 100%         |
| histologisch nicht spezifiziert                  | 7             | 11                   | 64%          |
| NSCLC unbehandelt (insgesamt)                    | 56            | 74                   | 76%          |

Tab.47: Immunphänotypische Bestimmung der membranären Hsp70-Expression nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome, unterschieden nach ihrer Histopathologie. Häufigkeitsunterschiede zwischen histopathologisch definierten Tumoren waren mit  $p=0,2008$  statistisch nicht signifikant.

Legt man als Schwellenwert eine membranäre Expression von mindestens 5% der vitalen Einzelzellen zugrunde, so zeigten bronchiolo-alveoläre und großzellige Bronchialtumore die höchste Sensitivität (100%), gefolgt von Plattenepithelkarzinomen mit 85%. Für Adenokarzinome ergab sich eine Sensitivität von 64% (Tab.47).

Fasste man Adenokarzinome und bronchiolo-alveoläre Karzinome zusammen, so ergab sich mit einem Anteil von 18 von 26 Hsp70-positiven Biopsien eine Sensitivität von 69%.

Mit einer Sensitivität von 64% gelangte auch die durchflusszytometrische Analyse derjenigen Gruppe von Tumorbiopsien, deren Histologie nicht belegt worden war, zu einem vergleichbaren Resultat.

Insgesamt ergaben sich aus 56 Hsp70-positiven durchflusszytometrischen Analysen von insgesamt 74 getesteten nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen eine Sensitivität von 76%.

### **3.5.4 Potenzielle klinischen Relevanz der durchflusszytometrischen Resultate zur Hsp70-Expression**

Die Erfassung klinisch relevanter Tumormarker greift auf Untersuchungen des Serums zurück. Um die Expression einer tumorassoziierten Struktur in oder auf bronchialen Tumorzellen zu analysieren, wurden überwiegend immunhistochemische oder immunfluoreszierende Methoden angewendet (Bunn et al., 2001; Han et al., 2002).

Zwar wurden durchflusszytometrisch bronchiale Tumorzelllinien (Bishop et al., 2002) und tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) untersucht (Viale et al., 1990), doch gab es über durchflusszytometrische immunphänotypische Analysen von Oberflächenantigenen auf vitalen Zellen aus Bronchialkarzinomen keine Publikationen.

Die geschilderte Untersuchung unterschied sich von früheren immunhistochemischen Arbeiten, bei denen eine Induktion von Hitzeschockprotein Hsp70 in malignen bronchialen Zellen beobachtet wurde (Malusecka et al., 2001; Michils et al., 2001), darin, dass hier mit durchflusszytometrischen Mitteln versucht wurde, das Hitzeschockprotein 70 kDa (Hsp70) spezifisch auf der Zelloberfläche von Einzelzellen aus Gewebebiopsien zu detektieren. Bisherige Anwendungen der Durchflusszytometrie beschränkten sich auf die Analysen der DNA, die eine Lyse der Zellmembran beinhaltet und anschließend nicht mehr zwischen Oberflächen- und zytosolischer Lokalisation differenzieren kann (Ormerod, 2000b).

Für das klinisch relevante, mit dem NSCLC assoziierte Zytokeratinfragment Zyfra 21-1 (Karnak et al., 2001) und die Neuronenspezifischen Enolase (NSE), die als Tumormarker für SCLC klinische Bedeutung hat (Lamy et al., 2000), erscheinen immuntherapeutische Ansätze unmöglich, solange die besprochenen Antigene in der Tumorzelle im Zytosol lokalisiert sind. Anderen beschriebenen Oberflächenmarkern, etwa dem Adhäsionsmolekül NCAM (CD56) fehlt die Tumorspezifität (Lamerz et al., 2000).

Für die Erfassung von Hsp70 waren die Voraussetzungen, nämlich propidiumiodidnegative, vitale Einzelzellen, immunphänotypisch bestätigte MHC-Klasse I-Expression, zu erbringen. Hinzu kam der immunphänotypische Ausschluss von Leukozyten.

Die gewählte durchflusszytometrische Analysenmethode gestattete eine selektive Untersuchung von Antigenen auf der Zelloberfläche vitaler Einzelzellen, die aus bronchialen Tumorbiopsien isoliert wurden.

Da Resultate von nicht-malignen Bronchialgeweben nicht zur Verfügung standen, konnte keine Aussage über die Spezifität der analytischen Methode sowie der detektierten Oberflächenexpression des Hitzeschockproteins Hsp70 gemacht werden.

Die Konsistenzarten zeigten keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,065$ ) bei den Absolutwerten Hsp70-positiver vitalen Einzelzellen. Hsp70-positive Zellen konnten auf

---

jeder der nach ihrer Konsistenz spezifizierten Karzinome detektiert werden. Sie lagen mit durchschnittlich 29% bei szirrhösen Karzinomen am höchsten, bei den einfachen bei 26% und bei den medullären durchschnittlich 17% der vitalen Einzelzellen aus der Tumorbiopsie.

Rechnete man die Hsp70-Expression als „positiv“, wenn die Immunphänotypisierung einer Tumorbiopsie ein positives Resultat auf mindestens 5,00% der Zellen aufwies, so ergaben sich Sensitivitäten von 65% für medulläre, 83% für einfache und 78% für szirrhöse Tumorbiopsien. Die Häufigkeit Hsp70-positiver nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome war zwischen den Konsistenzarten nicht statistisch signifikant unterschiedlich ( $p=0,2461$ ).

Gleichermaßen galt für den quantitativen Vergleich der Hsp70-Expression, wenn die histologische Typisierung nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome ( $p=0,2080$ ) berücksichtigt wurde. Für die untersuchten Plattenepithelkarzinome errechnete sich eine Sensitivität von 85%, für Adenokarzinome 64%, für bronchiolo-alveoläre Karzinome 100%. Hinzu kamen großzellige Karzinome (50%) und ein Hsp70-positives adenosquamöses Karzinom.

Zusammen mit elf weiteren, histologisch nicht spezifizierten Biopsien ergab sich mit 56 testpositiven von 74 untersuchten Tumorbiopsien eine Sensitivität von 76% für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) und seine tumorassoziierte Oberflächenexpression von Hsp70. Positive durchflusszytometrische Resultate wurden auf allen Karzinomarten gesehen, unabhängig von ihrer histologischen Einteilung.

Die klinische Relevanz der erhobenen Resultate gilt den resektablen nichtkleinzelligen Bronchialtumoren, die sowohl unbehandelt als auch vorbehandelt Tumorzellen mit membranärer Hsp70-Expression enthielten, wobei die Sensitivität bei unbehandelten Tumoren 76% und bei vorbehandelten 78% betragen hat.

Aufgrund der stark unterschiedlichen Stichprobenumfänge und der fehlenden Angabe der Stadien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms erscheint die Bearbeitung weiterer Fragestellungen verfrüht. Durchaus bedeutsam blieb, dass auch maligne Zellen dieser Tumorentität in drei von drei untersuchten Gewebeproben mehr als 5,00% Hsp70-positive Zellen in der Fraktion vitaler Einzelzellen enthielten.

Die atypische Lokalisation von Hitzeschockprotein Hsp70 auf der Zelloberfläche, die von Multhoff et al. (1995) erstmals beschrieben wurde, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Setzt man eine membranäre Expression von Hsp70 voraus, die bei normalen Zellen nicht vorkommt, zugleich jedoch bei maligne entarteten angetroffen werden kann, so würden die dargestellten durchflusszytometrischen Befunde den Weg für eine Hsp70-basierte antitumorale Therapie ebnen.

In Frage kommt auch eine passive Immuntherapie ähnlich der Anwendung von Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen den oberflächenständigen humanen epidermalen Wachstumsfaktor EGFR-II (Her-2/neu), der auch bei dem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom überexprimiert gefunden wurde (Han et al., 2001).

In Zulassungsstudien geprüft wird derzeit mit Cetuximab ein monoklonaler Antikörper, dessen Paratop sich gegen den oberflächenständigen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) richtet, der bei NSCLC dysreguliert vorgefunden wurde (Brabender et al., 2001; Sridhar et al., 2003).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der gezielten Stimulation immunkompetenter Effektorzellen, beispielsweise T-Lymphozyten, Monozyten oder NK-Zellen. Dieser von Multhoff et al. (2001) gewählte Ansatz unterscheidet sich von früheren immuntherapeutischen Studien zur immunologischen Therapie des Bronchialkarzinom dadurch, dass nicht lediglich tumorinfiltrierende Leukozyten isoliert und reappliziert wurden (Schiltz et al., 1997), oder durch eine mit Interleukin-2 (IL-2) hervorgerufene Steigerung der Zytotoxizität von LAK und NK-Zellen, wobei keine spezifische tumorale Zielstruktur angegeben werden konnte (Kimura et al., 1995; Melioli et al., 1996).

Im Gegensatz zu früheren zellulären Therapien gegen das Bronchialkarzinom handelt es sich bei Hsp70 um eine exakt definierte Zielstruktur auf der Zelloberfläche maligner Zellen.

Um den *in vitro* funktionierenden Mechanismus der Tumorzelllyse, ausgelöst durch Hsp70-stimulierte natürliche Killerzellen (Multhoff et al., 2001) im Hinblick auf die optimale therapeutische Wirkung *in vivo* übertragen zu können, ist eine weitere Hürde überwunden, nämlich der Nachweis der membranären Expression des Proteins auf nichtkleinzelligen und kleinzelligen Bronchialtumoren.

Mit Blick auf die diagnostische Pathologie werden medizinische Forschungsprojekte abklären, ob ein Zusammenhang zwischen dem detektierten membranären Hsp70-Befund und dem Tumorstadium nach UICC (Wittekind und Wagner, 1997; Wittekind et al., 2002) besteht.

Weitere Zielsetzungen sind die Optimierung der Stimulation der NK-Zell-Antwort hinsichtlich Proliferation und Steigerung der Zytotoxizität sowie klinische Fragen der applizierten Dosis von Hsp70-Peptid-stimulierten NK-Zellen.

## 3.6 Kopf-Hals-Tumoren und nasopharyngeale Normalschleimhaut

### 3.6.1 Analyse von nicht-malignen Schleimhautbiopsien

#### 3.6.1.1 Repräsentative durchflusszytometrische Analyse vitaler Einzelzellen aus nasopharyngealer Normalschleimhaut

Für die exemplarische Darstellung einer Analyse einer Normalschleimhaut aus dem HNO-Trakt wurde die Biopsie ON#6 verwendet, bei der es sich um eine nicht-maligne Nasenmuschel handelte.

##### 3.6.1.1.1 Determination der vitalen Zellpopulation

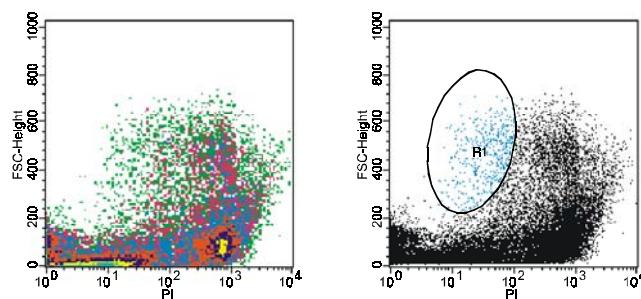


Abb.55: Eingrenzen der propidiumiodid-negativen Zellen in Density- und Dotblot-Darstellungen des Vorwärtsscatter und der Fluoreszenzintensität PI.

Der Densityplot des Vorwärtsscatters (FSC-Height) und der Propidiumiodidintensität zeigte eine verglichen mit tumoralen Biopsien deutlich verminderte Menge an Zellen in den propidiumiodid-negativen Bereichen (Abb.55). Zum einen war von einer normalen stark ausgeprägten Kohäsion der Zellen der Mund-Rachenschleimhaut auszugehen, welche die Präparation vitaler Einzelzellen erschwerte.

Schließlich fiel auch auf, dass an derjenigen Stelle im FSC-PI-Dotplot, bei welcher bei Tumorbiopsien mit Leukozyten zu rechnen war, kaum Zellen vorhanden waren. Die tumorassoziierte leukozytäre Infiltration fehlte bei den Normalschleimhautbiopsien.

Die eingegrenzten vitalen Zellen machten einen Anteil von 1,57% der insgesamt registrierten Ereignisse aus.

### 3.6.1.1.2 Immunphänotypische Charakterisierung der vitalen Zellpopulation

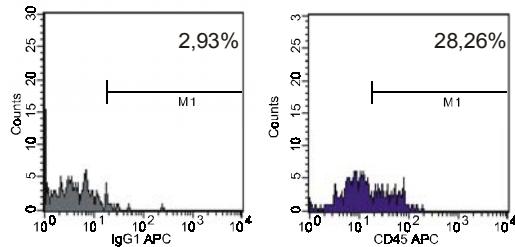


Abb.56: Quantifizierung CD45-positiver Zellen in der vitalen Population der Einzelzellen aus der Normalmucosa.

Die Analyse von CD45 APC-konjugierten Antikörpern zeigte 28,26% CD45-positive Zellen (Abb.56). Es konnte gefolgert werden, dass auch bei den Normalgewebebiopsien Leukozyten in den Einzelzellsuspensionen enthalten waren. Eine Mehrfachfärbung sollte klären, inwieweit diese zu einem positiven Resultat der Hsp70-Expression beitragen können.

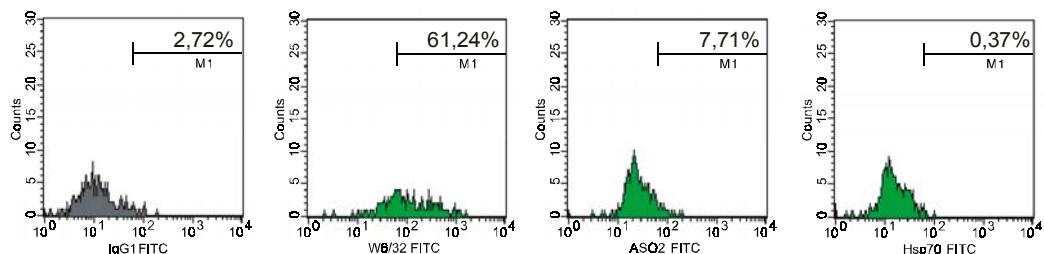


Abb.57: Histogramm-Auswertungen der Immunphänotypisierung der Einzelzellen aus der HNO-Normalmucosa.

Die Immunphänotypisierung der propidiumiodid-negativen Population ergab 61,24% MHC-Klasse-I-positive Zellen (Abb.57). Bindegewebige Zellen waren als ASO2-positive Zellen zu 7,71% anzutreffen, während einem Isotyp-Resultat von 2,72% lediglich 0,37% Hsp70-positive Zellen zugeordnet werden konnten.

Als Positivkontrolle für die Mehrfachfärbung konnte die Detektion von 39,89% MHC-Klasse I-positiven Zellen fungieren (Abb.58).

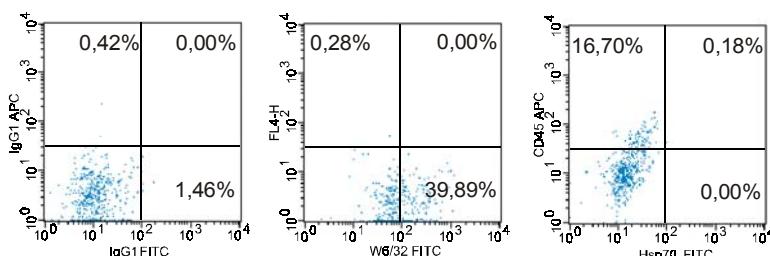


Abb.58: Mehrfachfärbung vitaler Zellpopulation aus dem HNO-Normalgewebe mit Isotyp, MHC-Quantifizierung als Positivkontrolle und Gegenüberstellung CD45 und Hsp70.

In der Mehrfachfärbung (Abb.58) wurden 16,70% der Zellen als CD45-positiv identifiziert. Die simultane durchflusszytometrische Erfassung von CD45 und Hsp70 führte zu 0,18% doppelpositiven Ereignissen, während keine (0,00%) einfach Hsp70-positiven Zellen detektiert werden konnten. Die Basis für jene Auswertung bildete der Isotyp mit 1,46% einfach FITC-positiven vitalen Einzelzellen und 0,00% doppelpositiven Ereignissen.

Die Mehrfachfärbung schloss auch bei der Analyse der Einzelzellen aus Normalschleimhautbiopsien ein theoretisch mögliches Binden des Hsp70-spezifischen Antikörpers cmHsp70.1 an die Leukozyten, beispielweise an ihre Fc-Rezeptoren CD16, CD32, CD64 (Roitt et al., 1995) aus.

Die durchflusszytometrische Analyse dieser vorliegenden Normalschleimhautbiopsie ergab, dass sowohl quantitativ im Histogrammblot als auch qualitativ im Dotplot eine Hsp70-Expression auf den vitalen Einzelzellen nicht nachweisbar war.

### 3.6.1.2 Quantitative Auswertung der Untersuchungen an makroskopisch unauffälliger Mundschleimhaut

#### 3.6.1.2.1 Viabilität

In dreiundzwanzig Fällen konnte pharyngeale, makroskopisch unauffällige Schleimhaut untersucht werden. Bei sieben Präparaten handelte es sich um Schleimhautbiopsien aus der Nasenmuschel. 16 Schleimhautbiopsien stammten von Tumorpatienten aus der Umgebung eines Kopf-Hals-Tumors.

Augenscheinlicher Unterschied etwa im Vergleich zu Dickdarmtumorbiopsien war die geringe Größe der für die FACS-Untersuchung verfügbaren Gewebebiopsien. Sie betrug bisweilen 3\*3\*6mm und machte eine manuelle Disaggregation schwieriger als bei großen Biopsien. Auf die makroskopische Beschreibung der Tumorkonsistenz musste deswegen verzichtet werden.

Durch Anfärbung letaler Zellen mit Propidiumiodid verblieb ein durchschnittlicher Anteil vitaler Zellen von 3,12% ( $s=10,33$ ), deren Immunphänotypisierung im folgenden dargestellt ist (Tab.48).

Die aus Kopf-Hals-Normalschleimhaut-Biopsien nach manueller Disaggregation erzielte durchschnittliche Viabilität war mit derjenigen von Biopsien anderer Gewebe vergleichbar. Wie aus der betragsmäßig großen Standardabweichung abzulesen war, musste man von ausgeprägten interindividuellen Schwankungen ausgehen.

| Durchflusszytometrischer Parameter | Immunphänotypische Resultate der Normalschleimhautbiopsien (N=22) |
|------------------------------------|---|
| <b>Viabilität [%]</b>              | <b>3,12</b><br>(0,08-50,34; s=10,33)                              |
| <b>MHC Klasse I [%]</b>            | <b>62,87</b><br>(2,42-97,13; s=27,86)                             |
| <b>AS02 [%]</b>                    | <b>9,81</b><br>(0,00-38,68; s=11,51)                              |
| <b>CD45 [%]</b>                    | <b>24,26</b><br>(0,00-66,02; s=19,66)                             |
| <b>Hsp70 [%]</b>                   | <b>17,50</b><br>(0,00-72,11; s=22,71)                             |

Tab.48: Quantitative Resultate der Immunphänotypisierung von Normalschleimhautbiopsien aus dem Kopf-Hals-Bereich (N=22) unter Angabe des Messwertebereichs, der Standardabweichung (s) und des Mittelwertes.

Als mögliche Ursache für eine gering vorgefundene Viabilität könnte die makroskopisch festgestellte deutlich ausgeprägte Kohärenz der Schleimhautbiopsie angeführt werden, in der sich die Kopf-Hals-Normalschleimhautbiopsien von den nicht-malignen gastrointestinalen oder malignen Biopsien auch makroskopisch unterschieden. In der Folge führte eine manuelle Disaggregation zu dem erwähnten Resultat der verminderten Viabilität.

### 3.6.1.2.2 Immunphänotypisierung von MHC-Klasse-I, CD45 und AS02

Im Rahmen der Immunphänotypisierung der vitalen Einzelzellen, die aus makroskopisch normalen Schleimhautbiopsien präpariert werden konnten, wurde die MHC-Klasse I-Expression bestimmt, ferner bindegewebige Zellen über den monoklonalen Antikörper AS02 und Leukozyten mit Hilfe des Pan-Leukozytenmarkers CD45.

Eine Expression von Hsp70 auf der Zelloberfläche wurde mit dem Hsp70-spezifischen Antikörper cmHsp70.1 in indirekter Färbung mit FITC-gelabeltem Anti-Ig-Maus-Immunglobulin untersucht, in einigen Fällen stand FITC-direktkonjugierter C92F3F1 zur Verfügung.

Der durchflusszytometrisch fassbare Anteil von MHC-Klasse-I-Molekülen betrug 62,87% (Tab.48). Im Vergleich mit der Immunphänotypisierung von anderen Gewebearten erscheint dieser Wert vermindert. In Fällen mit niedriger MHC-Klasse-I-Expression könnte eine mögliche Ursache in der ebenfalls gering vorgefundenen Viabilität liegen, indem eine Adsorption von Primär- und Sekundärantikörper an die

letalnen Zellen oder Zellfragmente trotz Überschuss der Antikörper während ihrer Inkubation nicht vollständig kompensiert worden sein könnte.

Die Immunphänotypisierung des Bindegewebemarkers AS02 ergab ein positives Resultat auf durchschnittlich 9,81% der vitalen Einzelzellen (Tab.48). Das FACS-Ergebnis spiegelte möglicherweise den histologischen Aufbau der Mundschleimhaut wider, in dem epitheliale Zellen und Zellen der Mund-, Kiefer- und pharyngealen Muskulatur gegenüber bindegewebigen Schichten dominieren (Geneser, 1990). Angemerkt sei, dass der im Test verwendete Antikörper AS02 an humanem gastrointestинаlern Bindegewebe etabliert ist, und bisher keine Daten veröffentlicht wurden, welche die Dichte des von AS02 erkannten Antigens in der Schleimhaut des Mund- und Rachentraktes beschrieben haben.

Leukozyten ließen sich über ihr Oberflächenantigen CD45 in durchschnittlich 24,26% der vitalen Einzelzellen aus makroskopisch unauffälliger Schleimhautbiopsien detektieren (Tab.48). Letztgenanntes Ergebnis belegte auch bei der durchflusszytometrischen Analyse dieser Gewebeart die Wichtigkeit der zusätzlich durchgeführten Mehrfachfärbung von Hsp70 gegen CD45, um das Risiko einer leukozytären Kreuzreaktion im Falle nicht-konjugierter Primärantikörper zu minimieren.

### 3.6.1.2.3 Hsp70-Expression auf der Oberfläche vitaler Einzelzellen

Die durchflusszytometrische Untersuchung vitaler Einzelzellen, die aus makroskopisch unauffälliger, normaler Schleimhaut von Probanden beziehungsweise Tumorpatienten isoliert wurden, ergab ein positives Resultat von durchschnittlich 17,50% ( $s=22,71$ ). Die Einzelmesswerte bewegten sich in einem Bereich von 0,00% bis 72,11% und wiesen auf eine ausgeprägte individuelle Variabilität hin (Tab.48).

Zugleich lag das quantitative Resultat der Immunphänotypisierung mit durchschnittlich 17,50% Hsp70-positiven Zellen für ein nicht-malignes Gewebe vergleichsweise hoch (Tab.48).

Nach den Vorgaben zur quantitativen Auswertung wurde ein Schwellenwert von 5,00% Hsp70-positiven Zellen herangezogen. Hieraus ergaben sich elf Hsp70-negative immunphänotypische Resultate (50%) und elf Hsp70-positive Analysen (50%) von Normalschleimhautbiopsien aus dem Nasen-Mund-Rachenraum.

Fünf der fünfzehn Normalschleimhautbiopsien (33%) von Kopf-Hals-Tumorpatienten wiesen ein Hsp70-positives Resultat auf. Die restlichen sechs Hsp70-positiven Biopsien stammten von Patienten nach operativen Eingriffen ohne eine diagnostizierte Tumorerkrankung.

| Durchflusszytometrischer Parameter | HNO-Normalschleimhautbiopsien             |  |                    |
|------------------------------------|---|--|--------------------|
|                                    | Hsp70<5,00% (n=11)                        | Hsp70>5,00% (n=11)                       | Signifikanz        |
| <b>Viabilität [%]</b>              | <b>0,84</b><br>(0,08-2,94;<br>s=0,79)     | <b>5,40</b><br>(16,12-59,05;<br>s=19,31) | p=0,5190<br>(n.s.) |
| <b>MHC Klasse I [%]</b>            | <b>56,35</b><br>(10,88-93,75;<br>s=27,05) | <b>68,20</b><br>(0,08-97,13;<br>s=14,23) | p=0,3312<br>(n.s.) |
| <b>AS02 [%]</b>                    | <b>7,16</b><br>(0,00-26,41;<br>s=8,77)    | <b>12,13</b><br>(0,12-38,68;<br>s=13,02) | p=0,4634<br>(n.s.) |
| <b>CD45 [%]</b>                    | <b>24,71</b><br>(0,00-56,08;<br>s=20,46)  | <b>23,81</b><br>(1,88-66,02;<br>s=18,80) | p=1,0000<br>(n.s.) |
| <b>Hsp70 [%]</b>                   | <b>2,13</b><br>(0,00-4,94;<br>s=1,67)     | <b>32,88</b><br>(5,13-72,11;<br>s=23,58) | p<0,0001 (*)       |

Tab.49: Vergleich der quantitativen immunphänotypischen Resultate von Kopf-Hals-Normalschleimhautbiopsien.

Vergleicht man die parallel erhobenen durchflusszytometrischen Daten der Analyse der 22 Normalschleimhautbiopsien (Tab.49), so zeigten sich neben der Detektion von Hsp70 zugleich auch erhöhte Werte der durchschnittlich determinierten Viabilität (5,40% gegenüber 0,84%), der MHC-Klasse-I-Expression (68,20% gegenüber 56,35%) und der AS02-Detektion (12,13% gegenüber 7,16%). Die im Mittel detektierte leukozytäre Infiltration blieb mit 23,18% gegenüber 23,81% annähernd unverändert. Wie der Tabelle oben entnommen werden kann, waren die quantitativen Unterschiede der Messwerte beider Gruppen nicht signifikant.

Statistisch signifikant unterschiedlich verhielten sich lediglich die Hsp70-Werte beider Gruppen von Normalgeweben, zu deren Differenzierung der Schwellenwert von 5,00% zugrundegelegt war.

Dieses Resultat warf mehrere Fragen auf: Wie valide ist das durchflusszytometrische Analysensystem für die Untersuchung von Einzelzellen aus Kopf-Hals-Schleimhautbiopsien und wie müssen die Voraussetzungen des experimentellen Settings sowie des Read-outs präzisiert werden? Handelte es sich bei den als Normalgeweben eingestuften Biopsien tatsächlich um reizlose, nicht entzündete, nicht infizierte, nicht toxisch vorgeschädigte und nicht maligne entartete Zellen?

Könnte es möglich sein, dass bei Kopf-Hals-Tumorpatienten Tumorzellen lokal in die umgebende Mund- oder Rachenschleimhaut infiltriert haben, die zu einem positiven Resultat der Hsp70-Detektion beitrugen?

Könnten ätiologisch bedeutsame toxische Einflüsse wie Zigarettenrauch auch bei makroskopisch unauffälliger Schleimhaut zu einer Induktion von Hsp70 beigetragen haben, ebenso wie sie bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen nachgewiesen

---

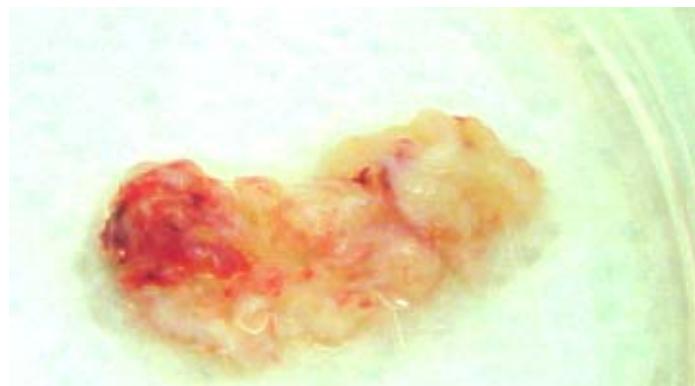
werden konnte (Malusecka et al., 2001). Inwieweit ist eine membranäre Expression von Hsp70 gekoppelt an eine cytosolische Induktion?

Müssten bei einer gegebenen Antikörper-Spezifität von cmHsp70.1, die für jede Charge im Zellliniensystem CX+/CX- belegt worden war, auch andere Ursachen für eine Hsp70-Expression ins Kalkül gezogen werden? Beispielsweise käme auch eine membranäre Expression toxischer Genese in Frage, wenn man den anamnestisch bedeutsamen und häufig anzutreffenden Nikotin- und Alkoholabusus der Tumorpatienten in seine Überlegungen mit einbezieht (Bier et al., 1999a).

Folgeuntersuchungen von Kleinjung et al. (2003) ergaben ein Fehlen der Hsp70-Positivität bei Normalen Mucosa-Biopsien, jedoch einen qualitativ positiven durchflusszytometrischen Befund von Hsp70 auf der Zelloberfläche von Mucosabiopsien von vorbestrahlten Patienten.

Nichtsdestotrotz bildeten die hier gezeigten Ergebnisse die Grundlage für die oben publizierte Arbeit.

### 3.6.2 Repräsentative durchflusszytometrische Analyse einer Kopf-Hals-Tumorbiopsie

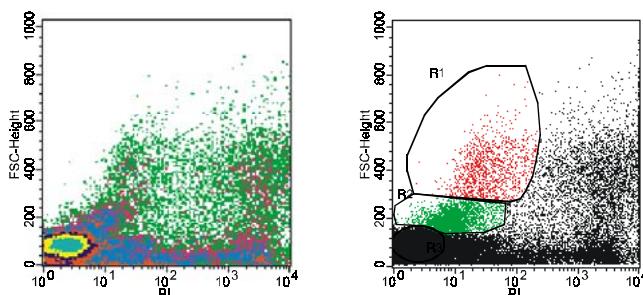


*Abb.59: Makroskopische Ansicht der Kopf-Hals-Tumorbiopsie(OX#45): Oropharynxkarzinom. Tumoröres Gewebe imponierte als helle Gewebeabschnitte (im Bild rechts).*

Bei der Kopf-Hals-Tumorbiopsie handelte es sich um ein zirka 4 cm langes und 1 cm breites Resekta (Abb.59). Der Tumor des Patienten war im Bereich des Oropharynx lokalisiert.

#### 3.6.2.3.1 Durchflusszytometrische Quantifizierung der vitalen Zellpopulationen

Nach manueller Disaggregation des Gewebes und Passage durch das Zellsieb wurden durchflusszytometrisch die Viabilität anhand der Propidiumiodidfärbung überprüft (Abb.60).



*Abb.60: Eingrenzen zweier vitaler Zellpopulationen (R1, R2) anhand der Density- und Dotblots der Parameter FSC und PI.*

Der Densityplot des Vorwärtsscatters, bezeichnet als FSC-Height, und der Fluoreszenzintensität von Propidiumiodid ermöglichte eine Trennung von vitalen, propidiumiodid-negativen Populationen und propidiumiodid-positiven, letalen Zellen und Zelldebris. Aufgrund der Vorerfahrungen wurde die propidiumiodidnegative Population der Zellen mit einem Vorwärtsscatter von weniger als 200 in der oben gezeigten Darstellung ausgeschlossen, bei der es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit überwiegend um Thrombozyten und/oder Erythrozyten handelte. Von Interesse waren die beiden weiteren erkennbaren propidiumiodid-negativen Populationen R1 und R2.

### 3.6.2.3.2 Immunphänotypisierung der eingegrenzten Populationen

Die Immunphänotypisierung quantifizierte in der Zellpopulation R2 folgende Antigenexpression:

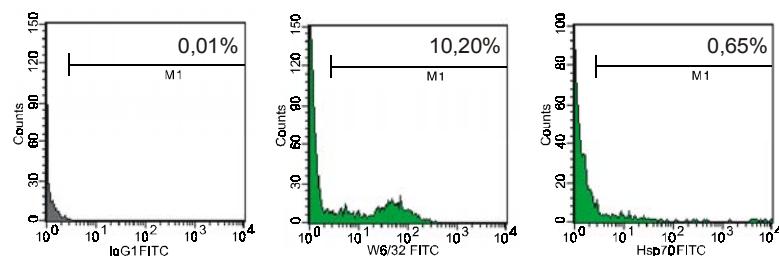


Abb.61: Histogramm-Auswertungen der MHC-Klasse-I- und der Hsp70-Expression der Zellen aus der Population R2 ausgehend vom entsprechenden Isotyp IgG1.

Ausgehend vom entsprechenden Isotyp der FITC-direktkonjugierten Antikörper mit einem Anteil von 0,01% positiven Zellen wurde eine MHC-Klasse I-Expression detektiert, die 10,20% der Zellen umfasste (Abb.61). Für das oberflächenständige Antigen Hsp70 ergab sich ein positiver Anteil von 0,65%.

Hinzu kam die Analyse von Leukozyten über das Antigen CD45, die bei einem quantitativen Resultat von 0,12% bei dem zugehörigen Isotyp 9,97 % der Zellen aus der Population R2 umfasste (Abb.62).

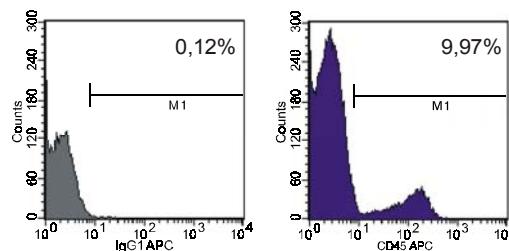


Abb.62: Quantifizierung der Leukozyten der Population R2 über den APC-konjugierten CD45-spezifischen Antikörper.

Es konnte davon ausgegangen werden, dass in der Population R2 hauptsächlich Erythrozyten vorlagen neben CD45- und MHC-Klasse-I-positiven Leukozyten zu einem Anteil von zirka 10%. Die Zellpopulation R2 kam für eine Beurteilung der möglichen Hsp70-Expression nicht in Frage, zumal die als Positivkontrolle erforderliche MHC-Klasse-I-Expression zu niedrig ausfiel.

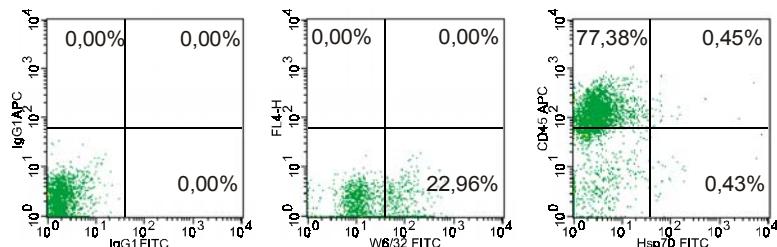


Abb.63: Mehrfachfärbung der vitalen Zellpopulation (R2) aus der Oropharynx-Tumorbiopsie OX#45 mit Isotyp-Kontrollantikörpern, Positivkontrolle und der Gegenüberstellung von CD45 und Hsp70.

Die oben dargestellte Auswertung der Mehrfachfärbung weist mit 22,96% geringfügig höhere Anteile MHC-Klasse-I-positiver Zellen auf (Abb.63). Die Analyse der CD45-Expression belegte, dass für die Zellen in der Region R2 mit 0,45% CD45- und Hsp70-doppelpositiven und 0,43% einfach Hsp70-positiven Ereignissen das Risiko einer Kreuzreaktion beider Antikörper minimiert erschien.

Die Immunphänotypisierung der vitalen Einzelzellen der Zellpopulation R1 ergab mit 40,60% CD45-positiven Zellen einen höheren Anteil an Leukozyten (Abb.64), wenn ein Resultat von 2,48% aus dem Histogramm des zugehörigen Isotyps zugrundegelegt wird.

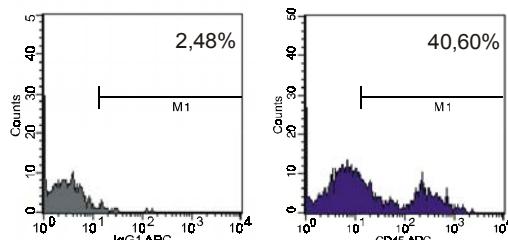
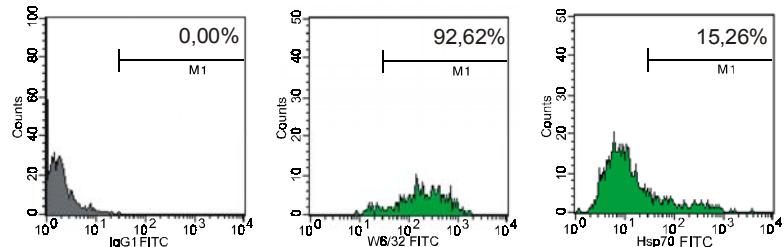


Abb.64: Quantifizierung CD45-positiver vitaler Einzelzellen (OX#45).

Ein ebenfalls deutlich erhöhter Anteil positiver Zellen ergab sich bei der Immunphänotypisierung der Zellen der Region R1 für den Oberflächenmarker MHC-Klasse I, der auf 92,62% der Zellen registriert werden konnte (Abb.65). Der zugehörige Isotyp ließ sich auf 0,00% der Zellen quantifizieren.

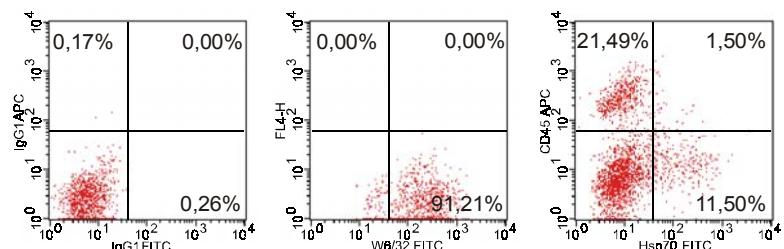
Nach den gleichen Vorgaben wurde auch die Expression von Hsp70 als Oberflächenmarker quantifiziert, welches auf 15,26% der Zellen nachgewiesen werden konnte.



*Abb.65: Immunphänotypische Quantifizierung der MHC-Klasse-I-positiven Ereignisse der vitalen Einzelzellen aus der Zellpopulation R1, ausgehend vom Isotyp (links). Quantifizierung von vitalen Einzelzellen mit oberflächenständiger Hsp70-Expression (OX#45).*

Die Mehrfachfärbung zeigte bei den Zellen der Region R1 sowohl, dass die MHC-Klasse I-Moleküle mit 91,21% praktisch quantitativ vorgefunden werden konnten, als auch, dass die CD45-positiven Leukozyten lediglich zu 1,50% zu einem positiven Resultat bei der Detektion von Hsp70 beitrugen. 21,49% der Zellen ließen sich als CD45-positiv und Hsp70-negativ klassifizieren.

Hsp70-positive, vitale Einzelzellen waren in der Population R1 zu 11,50 % vorhanden (Abb.66).



*Abb.66: Mehrfachfärbung mit Isotypen und MHC-Klasse-I-Identifikation zur Differenzierung zwischen CD45-positiven und Hsp70-positiven Ereignissen (OX#45).*

Die Immunphänotypisierung der vitalen Zellen aus der Oropharynxkarzinom-Biopsie belegte die Präsenz von Hsp70-positiven Einzelzellen, die separat von CD45-positiven Leukozyten waren.

### 3.6.3 Vergleich der Immunphänotypisierung von gepaarten Tumor- und Normalgewebebiopsien

Ein direkter Vergleich von Tumor- und Normalgewebe konnte in einer Gruppe von neun Exemplaren gezeigt werden (Tab.50).

| Durchflusszytometrischer Parameter | Tumor- und zugehörige Normalschleimhautbiopsien aus dem Kopf-Hals-Bereich |   |                    |
|------------------------------------|---|---|--------------------|
|                                    | Tumor   | Normal-mucosa                             | Signifikanz        |
| <b>Viabilität [%]</b>              | <b>2,38</b><br>(0,17-7,53;<br>s=2,62)                                     | <b>6,22</b><br>(0,08-50,34;<br>s=15,60)   | p=0,9102<br>(n.s.) |
| <b>MHC Klasse I [%]</b>            | <b>77,14</b><br>(23,73-99,88;<br>s=23,23)                                 | <b>68,20</b><br>(28,58-97,13;<br>s=21,73) | p=0,1953<br>(n.s.) |
| <b>AS02 [%]</b>                    | <b>22,63</b><br>(3,04-48,23;<br>s=14,32)                                  | <b>9,44</b><br>(0,00-26,41;<br>s=8,30)    | p=0,0625<br>(n.s.) |
| <b>CD45 [%]</b>                    | <b>24,71</b><br>(0,00-56,08;<br>s=20,46)                                  | <b>19,54</b><br>(0,49-56,08;<br>s=19,62)  | p=0,0078 (*)       |
| <b>Hsp70 [%]</b>                   | <b>18,11</b><br>(1,63-57,96;<br>s=19,04)                                  | <b>9,02</b><br>(0,14-40,30;<br>s=12,29)   | p=0,0391 (*)       |

Tab.50: Komparative Analyse gepaarter Normalschleimhaut- und Tumorbiosien aus dem Kopf-Hals-Bereich (n=9), dargestellt die Mittelwerte der in der Immunphänotypisierung gefärbten Zellen (%), in Klammern die zugehörige Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Test nach Wilcoxon berechnet.

Mit durchschnittlich 6,22% vitalen Zellen lag das Normalgewebe in der Gruppe gepaarter Proben geringfügig höher als beider malignen Vergleichsgruppe mit lediglich 2,38%. In beiden Fällen ließen die Standardabweichungen von s=15,60 beziehungsweise s= 2,62 große Streuungen erkennen, wobei die Unterschiede nicht statistisch signifikant ausgeprägt waren (p=0,9102).

Gleches galt für die immunphänotypische Quantifizierung des Bindegewebemarkers AS02 (p=0,0625, nicht signifikant), die durchschnittlich 9,44% (s=8,30) der vitalen Einzelzellen aus Normalgeweben erfasste, jedoch 22,63% (s=14,32) der vitalen Einzelzellen aus Tumorbiosien.

Für die Zelloberflächenantigene MHC Klasse I (p=0,1953) wurden durchschnittlich 68,20% (s=21,73) positive Zelle aus Normalgewebe und 77,14% (s=23,23) aus Tumorbiosien ermittelt.

Leukozyten wurden in der Population vitaler Einzelzellen über ihr Antigen CD45 markiert. Dieses Antigen wurde bei Normalbiopsien durchschnittlich auf 19,54 % der vitalen Zellen nachgewiesen, bei Tumorbiopsien auf 24,71%. Mit p=0,0078(\*) wurde ein statistisch signifikanter Unterschied errechnet.

Die peritumorale leukozytäre Infiltration stellte ein quantitatives Unterscheidungskriterium dar.

Zum einen zeigten die unauffälligen Schleimhautbiopsien makroskopisch eine ausgeprägte Kohärenz, so dass die manuelle Disaggregation verminderte Ausbeuten an vitalen Einzelzellen lieferte. Eine Adsorption von Primär- und Sekundärantikörper an die überwiegend vorliegenden letalen Zellen kann nicht ausgeschlossen werden und zu einem verminderten Ansprechen der Antikörper gegenüber den verbliebenen Zellen führen. Die nachgewiesene Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche vitaler Einzelzellen wurde trotz quantitativer Unterschiede als qualitativ positiver Marker herangezogen.

Durchflusszytometrisch war auf vitalen Einzelzellen in der Tumorentität der Kopf-Hals-Tumore keine reduzierte Expression von MHC-Klasse I-Molekülen festzustellen. Die geschilderten Ergebnisse lassen vermuten, dass entgegen einer bei anderen Entitäten postulierten tumoralen MHC-Klasse I - Downregulation (Pantel et al., 1991; Ritz et al., 2001) bei den acht untersuchten Fällen dieser Mechanismus nicht in Betracht kommt.

### 3.6.3.1 Quantitativer Vergleich der Hsp70-Expression

Eine direkte Gegenüberstellung der Hsp70-Expression war im Bereich der Kopf-Hals-Tumore in neun Fällen möglich.

| <i>Durchflusszytometrisches Resultat</i> | <i>Tumorbiopsien</i> | <i>Normalmucosa</i> |
|--|----------------------|---------------------|
| Hsp70-Expression > 5,00%                 | 7                    | 3                   |
| Hsp70-Expression < 5,00%                 | 2                    | 6                   |
| insgesamt untersucht                     | 9                    | 9                   |

Tab.51: Qualitative Bewertung der durchflusszytometrischen Resultate von Tumor- und zugehörigen Normalgewebe-Analysen.

In drei von neun untersuchten Normalgeweben (33%) wurde durchflusszytometrisch ein Anteil von mehr als 5,00% Hsp70-positiven Zellen detektiert (Tab.51).

Bei zwei der neun malignen Gewebeanalysen unterschritt der Anteil von Hsp70-positiven Zellen den Schwellenwert von 5,00% (Tab.50).

Das Maximum der Hsp70-Detektion bei HNO-Normalgeweben lag bei 40,30% positiven Zellen (Abb.67).

Die Abbildung unten zeigt den Vergleich der Einzelmesswerte zur Hsp70. Bei den Normalgewebebiopsien traten Messwerte gehäuft zwischen 0,00% und 5,00% auf (Abb.67).

Bei den zugehörigen Tumoriopsien lagen die Messwerte zwischen 0,00 und 57,96% Hsp70-positiven vitalen Einzelzellen.

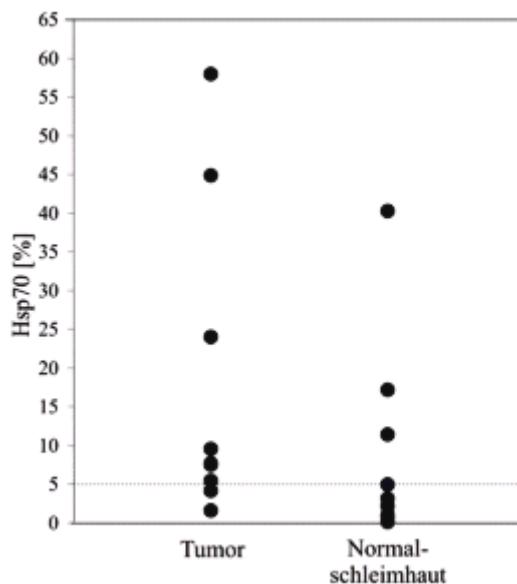


Abb.67: Gegenüberstellung der Hsp70-Expression auf der Zelloberfläche vitaler Einzelzellen aus Normalgewebe und zugehörigem Tumor. Beide Gruppen gepaarter Proben unterschieden sich mit  $p=0,0391$  signifikant in ihrer Hsp70-Expression.

Ein gradueller Unterschied in der Expression von Hsp70 auf vitalen Einzelzellen aus Tumor- und Normalgewebebiopsien wurde gesehen, wobei trotz der geringen Fallzahl ( $n=9$ ) eine statistische Signifikanz ermittelt werden konnte ( $p=0,0391$ ), welche die Plausibilität des Schwellenwertes von 5,00% für die durchflusszytometrische Analyse stützt.

Inwiefern tumorbiologisch eine Detektion von mehr als 5,00% Hsp70-positiven Einzelzellen aus bedeutsam ist, konnte aus der limitierten Fallzahl von neun untersuchten Tumor- und Normalgeweben nicht abgeleitet werden.

Untersuchungen an humanen malignen Zelllinien von Gehrmann et al. (2002) beschrieben eine Induzierbarkeit der *membranären* Expression von Hsp70 durch die antineoplastischen Agenzien Taxol und Vincristin, die mit den Mikrotubuli interagieren. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Einwirkung von toxischen Substanzen und der *membranären* Expression von Hsp70. Umgekehrt formuliert: Möglicherweise kann der durchflusszytometrisch festgestellte Anteil dieser Hsp70-positiven Einzelzellen ein Gradmesser sein für die Einwirkung von toxischen Substanzen.

Bei Kopf-Hals-Tumorpatienten sind nicht nur Alkohol und Zigarettenrauch als anamnestisch bedeutsame Noxen zu nennen, sondern eine die iatrogene Applikation von Zytostatika oder die lokale Bestrahlung (Bier et al., 1999a; 1999b; Haas et al., 1999).

Es sollte klinisch abgeklärt werden, inwiefern derartige Einflüsse konkret bei den Patienten der hier untersuchten Biopsien zugetroffen haben, zumal Kleinjung et al. (2003) von einer Hsp70-Negativität von Normalgewebe ausgingen, jedoch eine Hsp70-Positivität bei vorbestrahlten Patienten sichteten.

### 3.6.3.2 Berechnungen zur Validität der durchflusszytometrischen Analyse an Kopf-Hals-Tumor- und Normalgeweben

Primäres Ziel war die qualitative durchflusszytometrische Erfassung von Hsp70 als Oberflächenantigen auf Einzelzellen aus den Tumorbiopsien. Die Darstellung des Messergebnisses in Histogrammen oder Dotblots ermöglichte weitere quantitative Aussagen über die Verteilung und Häufigkeit einer Antigendetektion.

Wie bei anderen Tumorentitäten wurde mit Messwerten zwischen 0,00 bis 5,00% ein grenzwertiger Bereich vorgegeben. Derartige Messwerte konnten auch bei Immunquantifizierungen des Isotyps gesehen werden. Im Falle des diagnostisch verwandten Antikörpers würde dies einem unspezifisch-positiven Ergebnis entsprechen. Um das Risiko für derartige Überschneidungen zu reduzieren, wurde erst bei einem Überschreiten eines Schwellenwerts von 5,00% in der betreffenden Histogramm-Auswertung das durchflusszytometrische Resultat als positiv eingestuft.

| <i>Durchflusszytometrisches<br/>Resultat</i> | <i>Normalgewebe-<br/>biopsien</i> | <i>Tumorgewebe-<br/>biopsien</i> |
|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| Hsp70-Expression < 5,00%                     | 11                                | 16                               |
| Hsp70-Expression > 5,00%                     | 11                                | 28                               |
| insgesamt untersucht                         | 22                                | 44                               |

Tab.52: Verteilung der Hsp70-Expression von Kopf-Hals-Tumorbiopsien ( $n=44$ ) und Normalgewebebiopsien ( $n=22$ ) bei einem Schwellenwert von 5,00% durchflusszytometrisch positiven Zellen.

Bei den 44 Tumorbiopsien der Entität der Kopf-Hals-Tumore zeigten 28 (64%) ein Resultat von mehr als 5,00% Hsp70-positiven Zellen, 16 Tumoranalysen enthielten einen geringeren Anteil Hsp70-positiver Einzelzellen (Tab.52).

Aus 22 insgesamt untersuchten nicht-malignen Geweben zeigten je elf FACS-Analysen eine Hsp70-Expression von mehr bzw. weniger als 5,00% (Tab.52).

Aus der qualitativen Bewertung der durchflusszytometrischen Analysen konnte für die Analysenmethode eine Sensitivität von 64% bei einer Spezifität von lediglich 50% errechnet werden. Entsprechend lagen der negative Vorhersagewert bei 72% und der positive Vorhersagewert bei 41% (Tab.53).

| <i>Validität der durchflusszytometrischen Analyse<br/>von Hsp70 auf Kopf-Hals-Tumor- und<br/>Normalgewebebiopsien</i> |     |
|---|-----|
| Sensitivität  | 64% |
| Spezifität  | 50% |
| negativer Vorhersagewert  | 72% |
| positiver Vorhersagewert  | 41% |

Tab.53: Kennzahlen zur Validität der durchflusszytometrischen Analysenmethode an Kopf-Hals-Tumoren.

Jene Messresultate demonstrierten, dass oberflächenständiges Hsp70 mit jener Methode sowohl auf Tumor- als auch auf Normalgewebe gefunden wurde. Dementsprechend genügte eine Spezifität von 50% nicht, um oberflächenständiges Hsp70 als tumorspezifisch zu ermitteln.

Seitens klinischer und pathologischer Routinediagnostik werden im allgemeinen eine Spezifität und eine Sensitivität von mehr als 95% gefordert (Lamerz et al., 2001), die mit jener Methodik nicht erlangt werden konnte. Weiter zu prüfen sind die Betrachtung von vitalen Teilpopulationen, die mit Hilfe von AS02 und CD45 näher beschrieben werden können. Daneben ist der direktkonjugierten Variante des Hsp70-spezifischen Antikörpers cmHsp70.1 der Vorzug zu geben. Beide Maßnahmen verfolgen das Ziel, Spezifität und Sensitivität weiter zu erhöhen.

### 3.6.3.3 Qualitative Bewertung der durchflusszytometrischen Resultate der Hsp70-Expression auf Kopf-Hals-Tumorbiopsien

In sechs der neun Normalgewebebiopsien blieb der Anteil Hsp70-positiver Zellen unterhalb 5,00%, während die zugehörigen malignen Gewebebiopsien bei manchen Fällen höhere Anteile von vitalen Einzelzellen mit Hsp70-Expression auf ihrer Oberfläche aufwiesen.

| <i>untersuchte Gewebeart</i>  | <i>Biopsien mit &gt; 5,00% Hsp70 positiv</i> | <i>insgesamt untersucht</i> | <i>Hsp70-positiv [%]</i> |
|-------------------------------|--|-----------------------------|--------------------------|
| <b>Kopf-Hals-Primärtumore</b> | 28   | 44                          | 64                       |
| Mundhöhlenkarzinom            | 5  | 9                           | 56                       |
| Oropharynxkarzinom            | 14   | 18                          | 78                       |
| Hypopharynxkarzinom           | 4  | 6                           | 67                       |
| Larynxkarzinom                | 5  | 11                          | 45                       |
| <b>Lymphknotenmetastasen</b>  | 2  | 6                           | 33                       |

Tab.54: Ergebnisübersicht über die durchflusszytometrische Untersuchung an Kopf-Hals-Tumorbiopsien, Lymphknotenmetastasen.

Den höchsten Anteil an Hsp70-positiven Proben wiesen die untersuchten Oropharynxkarzinome mit 14 von 18 positiven Biopsien (78%) auf. Es folgten Hypopharynxkarzinome mit vier von sechs Hsp70-positiven Fällen (67%), Mundhöhlenkarzinome mit fünf von neun Hsp70-positiven Tumorbiopsien (56%) und Larynxkarzinome mit fünf von elf Hsp70-positiven Biopsien (Tab.54).

Insgesamt zeigte die durchflusszytometrische Analyse in 28 von 44 unbehandelten Kopf-Hals-Tumorbiopsien (64%) eine Expression von Hsp70 auf mehr als 5% der vitalen Einzelzellen, die als Hsp70-positiv interpretiert wurden.

### 3.6.4 Potenzielle klinische Relevanz

Im Rahmen der Untersuchung von Normalschleimhautbiopsien sowohl von Tumor- als auch von Nicht-Tumorpatienten zeigten die Ergebnisse auf, dass die Detektion von Hsp70-positiven Einzelzellen nicht limitiert waren, wie anfangs postuliert wurde. Als Induktoren sind toxische, infektiöse oder inflammatorische Einflüsse zu prüfen, die auch für ein membranständiges Hsp70 in Frage kommen (Malusecka et al., 2001).

Die molekulare Ätiologie der Karzinogenese von Kopf-Hals-Tumoren ist ebenso unklar wie der molekulare Mechanismus der hier untersuchten Oberflächenlokalisierung des Hitzeschockproteins Hsp70.

Im Hinblick auf die klinische Bedeutung der membranären Lokalisation von Hsp70 ist denkbar, dass ein positives Resultat bei der makroskopisch unauffälligen Schleimhaut das Hitzeschockprotein Hsp70 als früh detektierbaren, molekularen Marker ansehen lässt, der eine Vorschädigung der Schleimhaut indiziert. Malusecka et al. (2001) haben bei dem Bronchialkarzinom gezeigt, dass zytosolisches Hsp70 umso stärker induziert vorliegt, je stärker der Zigarettenkonsum der Tumorpatienten stattgefunden hatte. Gehrmann et al. (2002) demonstrierten experimentell bei humanen Tumorzelllinien eine Induzierbarkeit von oberflächenständigem Hsp70 durch die Zytostatika Vincristin und Taxol.

Klinisch relevant ist der Befund von Hsp70 auf Tumorzellen und auf Zellen aus makroskopisch unauffälliger Mund- und Rachenschleimhaut insofern, als Kopf-Hals-Tumore zu Rezidiven neigen. Daneben wird eine Feld-Karzerisierung (Field-Cancerization) diskutiert, die eine parallele synchrone Entstehung von Primärtumoren im Kopf-Hals-Bereich umschreibt (Jang et al., 2001; Braakhuis et al., 2003).

Seitens der molekularen Onkologie ist der Stellenwert von Hsp70 auch in diesem Zusammenhang weiter zu prüfen.

Trotz vorgefundener individueller Diversität eignet sich die Durchflusszytometrie, um selektiv weitere Oberflächenantigene zu charakterisieren, die therapeutisch ausgeschöpft werden könnten.

Ähnlich wie es derzeit mit dem gegen den oberflächenständigen EGF-Rezeptor gerichteten Antikörper Cetuximab auch bei Kopf-Hals-Tumoren geschieht (Sridhar et al., 2003), ließe sich das Hitzeschockprotein Hsp70 als an der Zelloberfläche detektiertes Molekül therapeutisch ausnützen.

## 3.7 Akute myeloische Leukämie

### 3.7.1 Analyse von Knochenmarksaspiraten mit hämatologisch unauffälliger Hämatopoese

Für den Vergleich mit akuten malignen Knochenmarkserkrankungen wurde das Knochenmarksaspirat (KM#9) zugrundegelegt, bei dem im Rahmen einer Nachuntersuchung nach einer Leukämie eine hämatologisch normal verlaufende Hämatopoese vorgegeben werden konnte.

Nach Waschschritten der Zellen wurde in der Trypanblaufärbung eine quantitative Viabilität gesehen und die Zellen ebenso wie bei der Analyse von akuten myeloischen Leukämien (AML) üblich, mit dem Panel an laserfarbstoffkonjugierten myeloischen Markern CD45 und CD33 inkubiert. Die Oberflächenpräsenz von MHC Klasse I und Hsp70 wurde indirekt mit PE-konjugierten Sekundärantikörpern quantifiziert.

#### 3.7.1.1 Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von nicht-leukämischem Knochenmark

##### 3.7.1.1.1 Streulichteigenschaften der untersuchten Zellen

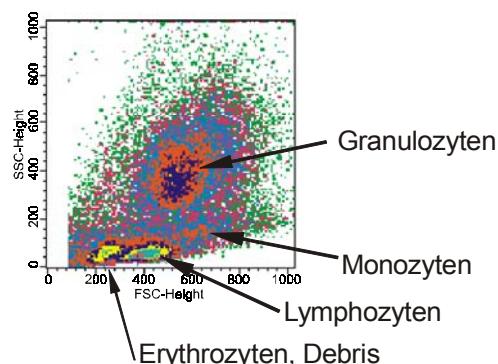


Abb.68: Charakterisierung hämatopoetischer Zellen anhand ihrer Streulichteigenschaften.

Der Densityplot zeigte die Streulichteigenschaften der untersuchten Zellen (Abb.68). Restlich verbliebene nicht lysierte Erythrozyten waren als Population mit dem geringsten Vorwärts- und Seitwärtsscatter zu erkennen. Innerhalb der Population war neben möglicherweise vorhandenen Thrombozyten zusätzlich von enthaltenem Zellbruchstücken (Debris) auszugehen, die als Artefakte während der Zentrifugations- und Resuspensionsschritte der Zellen auftreten konnten, da dort Scherkräfte auf die Zellen einwirkten.

Wie beschrieben (Terstappen et al., 1990; 1991; Rothe und Schmitz, 1996; Campana et al. 2000) waren anhand ihrer Streulichteigenschaften die Populationen der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten abzugrenzen.

### 3.7.1.1.2 Immunphänotypisierung der Granulozyten

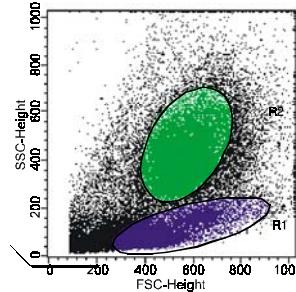


Abb.69: Eingrenzung der mononukleären Zellen (R1) und der Granulozyten (R2) nach ihren Streulichteigenschaften.

Für die immunphänotypische Analyse wurden die Granulozyten als Zellpopulation R2 den Monozyten und Lymphozyten gegenübergestellt, letztere beiden Zellarten als mononukleäre Zellen (MNC) zusammengefasst und als Zellpopulation R1 bezeichnet. Die Population R1 umschloss 36,98%, die Population R2 33,41% der durchflusszytometrisch registrierten Ereignisse (Abb.69).

Die beiden Populationen wurden getrennt voneinander immunphänotypisch charakterisiert und in Histogrammdarstellungen ausgewertet.

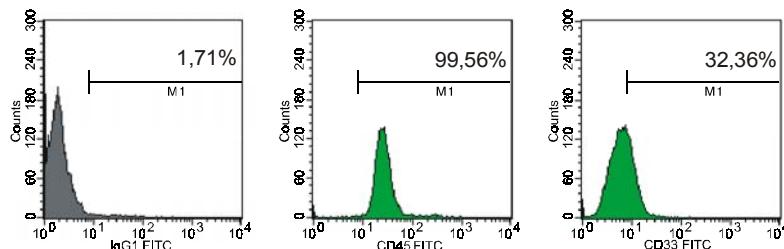


Abb.70: Immunphänotypisierung der Granulozyten (Population R2) nach dem Isotyp IgG1 FITC: Expression von CD45 und CD33 anhand von Histogrammen.

Für die Granulozyten als Zellen in der Region zeigte nach Quantifikation des zugehörigen Isotyps und seiner Bindung an 1,71% der Zellen ein Resultat von 99,56% CD45-positiven Zellen sowie 32,36% CD33-positiven Zellen (Abb.70). Das Vorkommen beider Marker sind auf Granulozyten beschrieben (Roitt et al., 1995), das durchflusszytometrische Resultat den Erwartungen gemäß.

Die indirekte durchflusszytometrische Analyse ermittelte mit 99,53% positiven Zellen Klasse eine annähernd quantitative Detektion von MHC-Klasse-I-Molekülen (Abb.71).

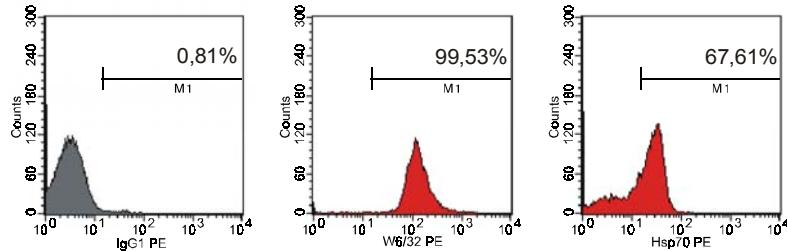


Abb.71: Indirekte durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker MHC Klasse I (W6/32) und Hsp70 (über cmHsp70.1) auf den Zellen der Population R2.

Ein gleichfalls positives Resultat wurde mit 67,61% positiven Zellen für die indirekt nachgewiesene Bindung des Antikörpers cmHsp70.1 an die Granulozyten gemessen (Abb.71, Abb.72).

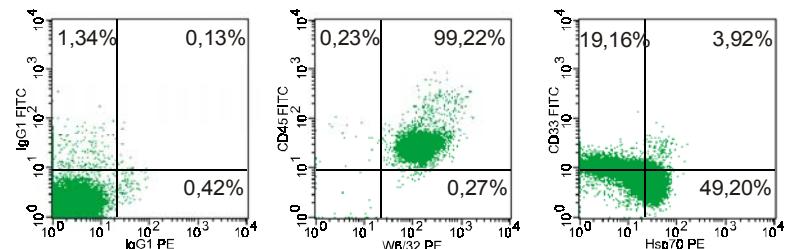


Abb.72: Mehrfachfärbung der Population R2: Dotblotanalysen des Isotyps IgG1 PE / IgG1 FITC, W6/32 PE / CD45 FITC und Hsp70 PE / CD33 FITC.

Die Auswertung der Doppelfärbung bestätigte mit 99,22% MHC-Klasse-I- und zugleich CD45-doppelpositiven Zellen in der Region R2 weitgehend das quantitative Resultat aus den Histogrammen. Geringer als im oben gezeigten Histogramm fiel die quantitative Auswertung der CD33-Detektion mit lediglich 19,16 einfach positiven und 3,92% CD33- und Hsp70-doppelpositiven Zellen in der Dotplot-Analyse aus. Mit 49,20% wurde ein großer Anteil der Zellen der Region R2 im Hsp70-positiven Bereich detektiert.

Die Lage der anti-CD33- und anti-Hsp70-markierten Zellpopulation unterschied sich durch ihr Einreichen in alle Quadranten des Dotblots von der homogenen Verteilung der CD45-MHC-Klasse-I-Anfärbung. Für die als durchflusszytometrische Region R2 zusammengefassten Granulozyten zeigte der CD33-Hsp70-Dotplot ein inhomogenes Expressionsmuster an mit CD33- und Hsp70-positiven, CD33-positiven und Hsp70-negativen und Hsp70-positiven und zugleich CD33-negativen Granulozyten. Dies würde einen wenig plausiblen Befund ergeben. Wegen der intakten Negativkontrollen der Isotypantikörper und der eindeutigen Lage der Positivkontrolle mit anti-CD45 und W6/32 erschien ein Artefakt wenig wahrscheinlich.

Aus immunologischen Gesichtspunkten, nämlich der Expression von Immunoglobulinrezeptoren an der Zelloberfläche der Granulozyten, wie etwa CD32 und CD64, könnte man vermuten, dass entweder der unkonjugierte Antikörper cmHsp70.1 oder der PE-konjugierte Antikörper aus dem zweiten Färbeschritt von den Granulozyten gebunden worden ist. Das beschriebene inhomogene Verteilungsmuster in der

durchflusszytometrischen Detektion von CD33 und Hsp70 sprach für nicht für eine spezifische, Epitop-Paratop-vermittelte Markierung der Granulozyten, sondern für ein davon abweichende, unspezifische Wechselwirkung.

Wegen der dargelegten unspezifischen Reaktivität der Granulozyten konnte der Befund nicht als „Hsp70-positiv“ eingestuft werden.

### 3.7.1.1.3 Immunphänotypisierung der mononukleären Zellen

Wie für die Untersuchung von akuten leukämischen Proben relevant, wurden auch im Falle der hier geschilderten Knochenmarksanalyse die mononukleären Zellen (MNC) als Zellpopulation R1 immunphänotypisch charakterisiert (Abb.73):

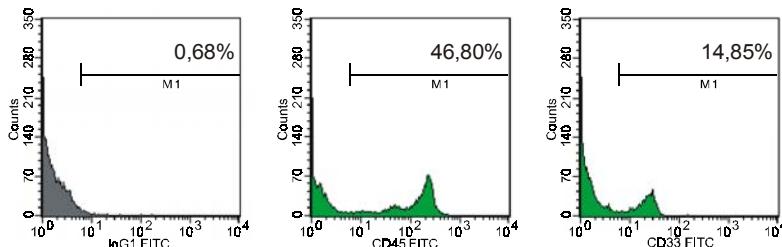


Abb.73: Immunphänotypisierung der MNC (Population R1): Isotyp IgG1 FITC, CD45 FITC und CD33FITC anhand von Histogrammen.

Hierbei wurden 46,80% der MNC als CD45-positiv charakterisiert und 14,85% als CD33-positiv (Abb.73). Während der detektierte Wert der CD45-Expression erniedrigt erschien, korrelierte die Detektion von 14,85% CD33 mit der klinischen Vorgabe eines nicht-leukämischen Knochenmarks.

Definitionsgemäß wären in einem pathologischen Fall mindestens 20% der MNC-Zellen immunphänotypisch als positiv zu quantifizieren, um von einer Assoziation des Markers mit der Leukämie ausgehen zu können (Campana und Behm, 2000).

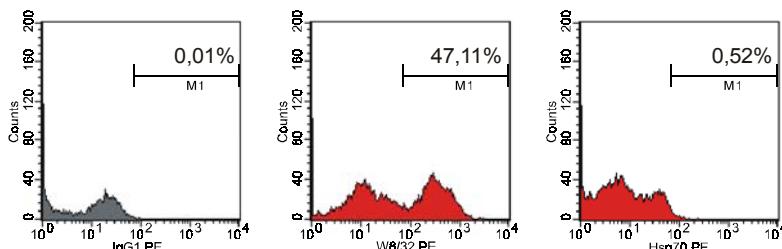


Abb.74: Indirekte durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker MHC Klasse I (W6/32) und Hsp70 (über cmHsp70.1) auf den Zellen der MNC (Population R1).

Die Identifikation von MHC-Klasse-I-Molekülen errechnete sich ausgehend von der Negativkontrolle des Isotyps mit 0,01% zu 47,11% (Abb. 74).

Das experimentell ermittelte Resultat unterschritt die theoretisch erwartete quantitative Expression. Es kamen zwei mögliche Ursachen in Betracht: Zum einen wurde der Marker im Histogramm des Isotyps (0,01%) sehr vorsichtig gesetzt, um nicht den abgebildeten Peak als falsch-positiv ermittelte Zellen mit einzufassen. Zum anderen war denkbar, dass der unkonjugierte Primärantikörper W6/32 während der Inkubation unterschiedlich affin gegenüber Granulozyten und mononukleären Zellen reagierte. Dies würde sich in einer unterschiedlich starken Durchschnittsfluoreszenz zeigen.

Trotz verminderter Detektion auf 47,11% der MNC konnte die MHC-Klasse-I-Erfassung als Positivkontrolle für die Analyse eines Oberflächenantigens fungieren.

Das nach gleichen Kriterien ermittelte Hsp70-Resultat von 0,52% (Abb.74) kam quantitativ der Negativkontrolle nahe.

Die Auswertung der Mehrfachfärbung bestätigte mit 43,74% den doppelpositiven CD45- und MHC-Klasse-I-Befund. Im selben Dotplot war eine Auf trennung der MNC deutlich erkennbar, wobei mehr als 50% der Zellen doppel-negativ blieben.

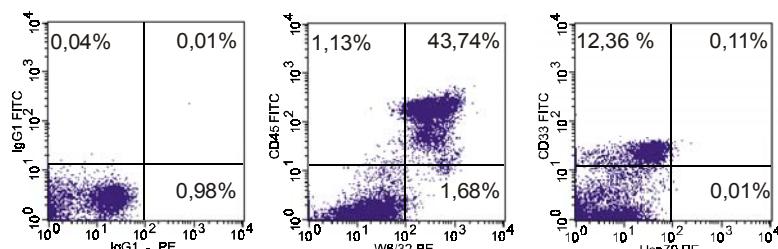


Abb.75: Mehrfachfärbung der MNC (R1): Dotblotanalysen des Isotyps IgG1 PE / IgG1 FITC, W6/32 PE / CD45 FITC und Hsp70 PE / CD33 FITC.

Wie bei der Untersuchung von Knochenmarkszellen erwartet, ließen sich myeloide Zellen anhand der Immunphänotypisierung ihres Oberflächenantigens CD33 zu 12,36% in der Auswertung des Dotblots quantifizieren (Abb.75).

Gemäß der Auswertung des Dotblots waren Hsp70-positive Zellen zu 0,11% als doppelpositive Ereignisse errechnet. Die Menge einfach Hsp70-positiver Zellen blieb mit 0,01% sogar unterhalb derjenigen des Isotyps mit 0,98%.

### 3.7.1.1.4 Bewertung der durchflusszytometrischen Analyse des nicht-malignen Knochenmarksaspirats

Zusammenfassend ergaben sich bei der durchflusszytometrischen Analyse der mononukleären Zellen bezüglich der Hsp70-Expression mit 0,52% im Histogramm und 0,12% im Dotplot quantitative Resultate, die unterhalb des Schwellenwerts von 5,00% angesiedelt waren und die zu einer Hsp70-negativen Einstufung führten.

Für die weiteren durchflusszytometrischen Analysen zeigte die Analyse wichtige Hinweise:

1. Es war von Bedeutung, die Granulozyten zu charakterisieren und sie wegen ihres potenziellen unspezifischen Bindungsvermögens im Falle der Leukämie-Untersuchungen möglichst auszuschließen. Bei den Untersuchungen von Knochenmarksaspiraten und peripheren Blutproben wurde dies durch die Dichtegradientenzentrifugation bewerkstelligt, welche die Granulozyten und einen Großteil der Thrombozyten von den mononukleären Zellen abtrennte.
2. Bei den Analysen von Einzelzellen aus soliden Gewebebiopsien bestand keine Möglichkeit zur Dichtegradientenzentrifugation, da sich ein Verlust von Einzelzellen zusätzlich ungünstig auswirken könnte. In diesem Falle wurden Granulozyten als CD45-positive Leukozyten markiert und separat analysiert.
3. Es wurde erwartet, dass unspezifische Bindungsphänomene bei direkt-konjugierten Antikörpern vermindert auftreten. Deren Verwendung war zu bevorzugen. Separate Kontrollschrifte waren in jedem Einzelfall erforderlich.

### 3.7.1.2 Quantitative Auswertung der Analyse von nicht-leukämischem Knochenmark

#### 3.7.1.2.1 Analyse von leukozytären Antigenen auf Aspiraten mit normaler Hämatopoiese

Ehe ein etwaiger Befund von Hsp70 auf leukämischen Blasten als potenzieller pathologischer Marker eingestuft werden kann, galt es, Knochenmarksaspirate mit normaler Hämatopoiese als nicht-maligne Vergleichsgruppe zu untersuchen.

Das Myelogramm von gesunden Knochenmarksaspiraten enthält Lymphozyten (zirka 12% des zellulären Anteils), Monozyten (zirka 1%) sowie normalen myeloiden Progenitoren, d.h. Myeloblasten und Monoblasten (zusammen 2,6%), Promyelozyten zu 9,2% und Myelozyten mit 13,1%. Metamyelozyten als Vorstufe der Granulozyten werden mit 9,8% angegeben (Theml, 1998).

Nach ihren unterschiedlichen Streulichteigenschaften wurden innerhalb der im Scatterdiagramm sichtbaren Populationen zunächst die Lymphozyten, die sich durch niedrigen Vorwärts- und niedrigen Seitwärtsscatter auszeichnen, und die Monozyten mit höherem Vorwärtsscatter und gleichfalls niedrigem Seitwärtsscatter, als mononukleare Zellen (MNC) zusammengefasst (Loken et al., 1987; 2000). Myeloide und monozytoide Vorstufen finden sich ebenfalls innerhalb dieser Population wieder.

| <i>Klinische Diagnose</i>                      | <i>Mononukleäre Zellen</i>                | <i>Leukozytäre Oberflächenmarker</i>      |  |  |
|--|---|---|--|--|
|  | <b>MNC [%]</b>                            | <b>CD45 [%]</b>                           | <b>CD13 [%]</b>                          | <b>HLA DR [%]</b>                        |
| Knochenmarksaspirate mit normaler Hämatopoiese | <b>33,76</b><br>(10,89-70,51;<br>s=16,17) | <b>56,89</b><br>(36,26-97,32;<br>s=23,75) | <b>20,88</b><br>(16,01-25,75;<br>s=4,87) | <b>32,85</b><br>(27,97-37,00;<br>s=3,72) |

Tab.55: Immunphänotypisierung von Knochenmarksaspiraten mit normaler Hämatopoiese: Dargestellt sind die durchschnittlichen Messresultate aus elf Immunphänotypisierungen unter Angabe des Streubereichs und der Standardabweichung (s).

Als nicht-maligne Vergleichsgruppe standen elf Knochenmarksaspirate zur Verfügung. In neun Fällen handelte es sich um AML-Leukämie-Patienten, deren Leukämie in kompletter klinischer und morphologischer Remission (CR) war. Bei zwei Patienten konnte eine akute myeloische Leukämie oder eine andere maligne Erkrankung ausgeschlossen werden. Morphologisch und immunzytometrisch lag der Anteil unreifer Blasten definitionsgemäß unter 5%. Das Myelogramm entsprach dem einer normalen Hämatopoiese.

Die Immunphänotypisierung umfasste wie bei den akuten myeloischen Leukämien die mononukleären Zellen (MNC), die sich bei normaler Hämatopoiese aus der Population der Lymphozyten, der Monozyten sowie zu einem geringen Anteil aus unreifen myeloiden, lymphoiden und monoiden Vorstufen zusammensetzte.

Mit direktkonjugierten monoklonalen Antikörpern wurden das Oberflächenantigen CD45 als Pan-Leukozytenmarker, CD13 als myeloider Marker und HLA DR als Marker für Progenitoren analysiert. Mit indirekt konjugierten Antikörpern wurde die MHC Klasse I-Expression und eine etwaige Hsp70 untersucht.

Eine Übersicht über die immunphänotypische Quantifizierung der Oberflächenantigene auf Zellen, die aus nicht-malignem Knochenmark stammten, liefert Tab.55.

In den Knochenmarksaspiraten von gesunden Spendern (n=2) und Patienten mit AML in kompletter klinischer Remission (n=9) wurden nach ihren Streulichteigenschaften durchschnittlich 33,76 % mononukleäre Zellen eingegrenzt. Diese enthielten die unreifen myeloide Vorstufen, Monozyten und Lymphozyten.

Als gemeinsames Merkmal zeigen Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten eine membranäre Expression von LCA (CD45). Die Immunphänotypisierung ergab durchschnittlich 56,89% CD45-positive Zellen.

Der Befund der breiten Expression des leukozytären Marker LCA (CD45) in direktkonjugierter Färbung diente dazu, die durchflusszytometrische Analysenmethode abzusichern.

Als Marker für myeloide und monozytoid Zellen wurde die oberflächenständige Aminopeptidase N (CD13) immunzytometrisch quantifiziert und auf durchschnittlich 20,88% der monozytoiden Zellen detektiert. Legt man eine gemeinsame Expression von CD13 auf den myeloiden Vorstufen der Monoblasten, Myeloblasten, Myelozyten, Metamyelozyten, sowie den reifen Monozyten zugrunde (Boll, 1991), liegt der durchflusszytometrisch ermittelte Anteil CD13-positiver Zellen innerhalb dieses Bereiches.

Als dritter leukozytärer Immunmarker wurde HLA DR herangezogen. HLA DR war auf durchschnittlich 32,85% der Zellen nachweisbar. Das Antigen HLA DR erfasste sowohl unreife myeloide Vorstufen der Myeloblasten und Monoblasten, deren Gehalt bei normaler Hämatopoiese unterhalb 5% liegt. (Beutel und Ganser, 1999)

Der Befund der HLA DR-Expression lässt sich vermutlich als infektiös oder inflammatorisch bedingte, reaktive Erhöhung von HLA DR begreifen, zumal aktivierte Lymphozyten, die aufgrund eines infektiösen oder inflammatorischen Geschehen induziert werden können, zugleich vorübergehend verstärkt HLA DR-Moleküle exprimierten.

Die diagnostische Abklärung eines solchen unklaren Geschehens mag den klinische Anlass für eine Knochenmarksaspiration gegeben haben. Indes wurde keine Veränderung des Myelogramm festgestellt, die mit einem malignen Geschehen in Verbindung zu bringen wäre.

Insofern wurde diese Knochenmarksaspirate als nicht-maligne Kontrollgruppe herangezogen, denen die Knochenmarksaspirate und periphere Blutproben mit diagnostisch abgesicherter akuter myeloischer Leukämien gegenübergestellt werden konnten.

### 3.7.1.2.2 Indirekt erfasste Oberflächenmarker MHC Klasse I und Hsp70

Die Oberflächenantigene MHC Klasse I und Hsp70 wurden in indirekter immunzytometrischer Färbung auf der Zelloberfläche der mononukleären Zellen von nicht-leukämischen Knochenmarksaspiraten bestimmt.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab einen durchschnittlichen Anteil von 85,70% MHC-Klasse I-positiven Zellen. Die Streuung des Messwertbereichs erstreckte sich von 57,18 bis 98,92%. Sie deutete auf eine ausgeprägte individuelle Heterogenität der Aspirate (Tab.56).

| <i>Klinische Diagnose</i>                     | <i>indirekt quantifizierte Oberflächenantigene</i> |                                       |
|---|--|---------------------------------------|
|   | <b>MHC Klasse I [%]</b>                            | <b>Hsp70 [%]</b>                      |
| Knochenmarksaspirate mit normaler Hämatopoese | <b>85,70</b><br>(57,18-98,92;<br>s=18,17)          | <b>3,53</b><br>(0,26-9,46;<br>s=2,93) |

Tab.56: Immunphänotypisierung der nicht-malignen Vergleichsgruppe (n=10): Durchschnittlicher Anteil detekтирter MHC Klasse I- und Hsp70-positiver mononukleärer Zellen mit Angabe des Streubereichs und der Standardabweichung (s).

Eine Hsp70-Expression wurden auf durchschnittlich 3,53% der mononukleären Zellen gemessen (Tab.56). Die Einzelwerte lagen zwischen 0,26 und 9,46% (s= 2,91). Es handelt sich um die absolut gemessenen Werte aus der Histogrammauswertung.

Bei den Fällen mit höherer Hsp70-Expression wurden zugleich hohe Messwerte für den als Negativkontrolle zugrundegelegten Isotyp-Antikörper beobachtet. Die Differenz zwischen Hsp70-positiven Zellen und den für die Isotypen positiven Zellen lag in allen zehn Fällen unterhalb 5%.

Es musste angemerkt werden, dass die durchflusszytometrische Auswertung der Histogramme keinen absoluten Nullwert vorgab, sondern eine relative Aussage zuließ gegenüber der registrierten Fluoreszenz des Isotyp-Antikörpers.

Das durchflusszytometrische Messergebnis der Hsp70-Expression auf mononukleären Zellen innerhalb der nicht-malignen Knochenmarksaspirate korrelierte mit den klinisch-diagnostischen Vorgaben bei einer normalen Hämatopoese, welche in beiden Fällen unterhalb von 5,00% lagen.

### 3.7.2 Analysen von leukämischen Aspiraten

#### 3.7.2.1 Repräsentative multiparametrische durchflusszytometrische Analysen zur Hsp70-Expression von akuten myeloischen Leukämien

Zugrundegelegt wurde mit dem Aspirat AL#108 ein Exemplar einer akuten myelomonoytären Leukämie, die morphologisch als AML M4 eingestuft war. Ein blastärer Anteil von mehr als 30% war vorgegeben. Zum Zeitpunkt der Entnahme des Aspirats hatte die Patienten keine antineoplastische Chemotherapie erhalten.

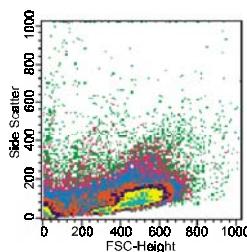


Abb.76: Densityplot (FSC/SSC) der MNC mit zwei erkennbaren Populationen.

Der Densityplot zeigt die nach der Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen mononukleären Zellen (Abb.76). Darin waren im zwei Populationen erkennbar. Eine wies einen niedrige Seitwärts- und relativ hohen Vorwärtsscattereigenschaften auf, diese machte einen großen Anteil ausmachte an der insgesamt analysierten Zellzahl aus. Mit geringfügig niedrigerem Seitwärtsscatter und gleichfalls geringerem Vorwärtsscatter ließ sich eine zweite Population abgrenzen.

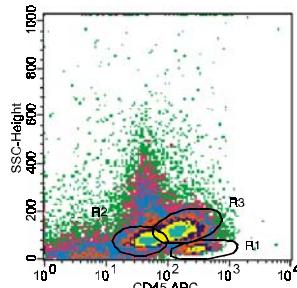
#### 3.7.2.1.1 Analyse der Zellpopulationen nach der CD45-Intensität und dem Seitwärtsstreulicht

Gemäß der FAB-MIC-Vorgaben (Bennett et al. , 1985a) und der EGIL-Klassifikation (Bene et al., 1995) wurde die Immunphänotypisierung der mononukleären Zellen anhand der Dichte der CD45-Expression und des Seitwärtsscatters vorgenommen.

Der Densityplot bildete drei distinkte Populationen ab (Abb.140). Als Zellpopulation R1 wurden die Zellen mit hohen FSC-Werten und geringem Seitwärtsscatter eingegrenzt. Diese machte einen Anteil von 7,70% der durchflusszytometrisch analysierten, mononukleären Zellen (MNC) aus.

Es war davor auszugehen, mit diesen Streulichteigenschaften überwiegend die Monozyten umschrieben zu haben (Rothe und Schmitz, 1996). Während der zelluläre Durchmesser der Monozyten bis zu 20 $\mu$ m reichen kann, ist derjenige der Lymphozyten mit bis zu 12 $\mu$ m geringer (Hildebrand et al., 1998). Durchflusszytometrisch weisen die Lymphozyten einen geringeren Seitwärtsscatter als die Monozyten auf (Rothe und Schmitz, 1996; Campana und Behm, 2000). Im vorliegenden Fall wurde die Population

R2 mit einem Anteil von 30,96% der registrierten Zellen zur Charakterisierung der Lymphozyten herangezogen.



*Abb.77: Density-Blot (CD45/Seitwärtsstreulicht): Innerhalb der mononukleären Zellen wurden drei unterschiedliche Populationen (R1, R2, R3) gesehen und separat immunphänotypisch charakterisiert.*

Abweichend von normal ausreifendem Knochenmark ließ sich eine dritte Zellpopulation erkennen, deren Vorwärtsscatter zwischen den beiden erstgenannten angesiedelt war, wobei das Seitwärtsstreulicht mäßig intensiver ausgeprägt war (Abb.77). Vor allem innerhalb dieser als Region R3 bezeichneten Population, die zu 76,27% der durchflusszytometrisch registrierten Zellen beitrug, der waren die maligne entarteten, myeloiden blastären Zellen zu suchen.

Zur Determination der akuten myeloiden Leukämie wurden die myeloiden Marker CD13, CD33 und CD117, jeweils FITC-direktkonjugiert eingesetzt. Hinzu kam eine Gegenfärbung mit anti-HLA DR-spezifischen PerCP-konjugierten Antikörpern.

Wegen der hämatologisch vorgegebenen Diagnose der akuten myelomonoytären Leukämie (AML M4) wurde zusätzlich die Expression von CD14 immunphänotypisch überprüft. Eine Färbung mit den betreffenden Isotyp-Antikörpern bildete die Negativkontrolle.

Eine mögliche Hsp70-Expression wurde innerhalb der im CD45-SSC-Diagramm eingegrenzten Populationen (R1, R2, R3) quantifiziert und im Rahmen der Mehrfachfärbung mit der Verteilung der leukämieassoziierten myeloiden beziehungsweise monozytären Immunmarker verglichen.

### 3.7.2.1.1 *Immunphänotypisierung der monozytoiden Population (R1)*

Die Auswertung der Dotblots der Mehrfachfärbung konnte in der monozytoiden Zellpopulation R1 4,33% einfach CD13-positive und 14,64% einfach HLA DR-positive Zellen ermitteln. Der Anteil der CD13- und HLA DR-doppelpositiven Zellen lag bei 1,61%. Bei der Gegenfärbung von HLA DR und CD33 stellten sich 16,95% einfach HLA DR-positive Zellen gegenüber 0,49% doppelpositiven und 0,11% einfach Hsp70-positiven Ereignissen dar.

Die geschilderten quantitativen Resultate legten nahe, dass myeloide Zellen mit einer Expression von CD13 und CD33 innerhalb der Region R1 kaum anzutreffen waren.

Eine Expression von HLA DR bei Monozyten wurde beschrieben (Rothe und Schmitz, 1996).

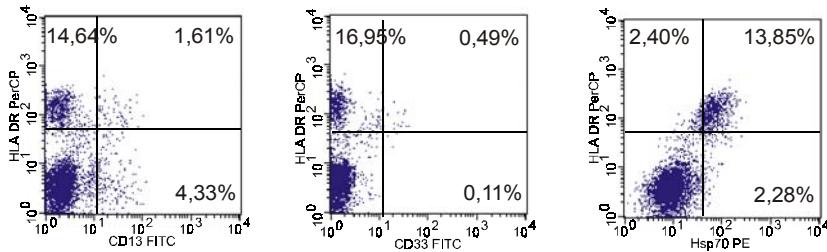


Abb.78: Mehrfachfärbung der FACS-Population R1: Dotblots der Gegenfärbung zu CD13 FITC / HLA DR PerCP, CD33 FITC / HLA DR PerCP und Hsp70 / HLA DR PerCP.

Mit 13,85% HLA DR- und Hsp70-doppelpositiven Ereignissen gegenüber 2,40% einfach HLA DR- und 2,28% einfach Hsp70-positiven Zellen wurde eine Hsp70-positive Population detektiert (Abb.78).

Eine Koexpression des myeloiden Markers CD13 und Hsp70 wurde immunphänotypisch detektiert auf 1,86% sowie auf 0,14% der CD33-positiven Zellen. Einfach CD13-positive Ereignisse traten zu 3,91% auf, einfache CD33-positive zu 0,44% (Abb.79).

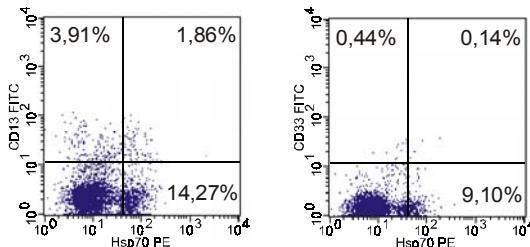


Abb.79: Mehrfachfärbung der FACS-Population R1: Dotblots mit Hsp70 PE / CD13 FITC und Hsp70 PE / CD33 FITC.

Die Hsp70-positiven Zellen aus der Zellpopulation R1 stellten sich mit 14,27% bzw. 9,10% als separate Population dar (Abb.79).

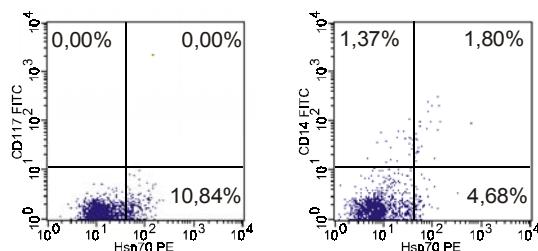


Abb.80: Mehrfachfärbung der FACS-Population R1: Dotblots der Immunphänotypisierung von Hsp70 PE / CD117 FITC bzw. Hsp70 / CD14 FITC.

Das AML-assoziierte Antigen CD117 (Campana und Behm, 2000) konnte innerhalb der Ereignisse der Region R1 gar nicht detektiert werden (Abb.80), für das monozytoiden Antigen CD14 waren 1,37% einfach CD14-positiv und 1,80% doppelpositiv. 10,84% beziehungsweise 4,68% wurden als einfach Hsp70-positive Ereignisse quantifiziert.

In diesem Fall war eine quantitativ positive Expression von Hsp70 auf Zellen innerhalb der untersuchten und vorwiegend monozytären Zellpopulation messbar. Die Präsenz von Hsp70 war nicht an die Expression der myeloiden Antigene CD13, CD33 und CD117 gebunden. Ebenso wenig wurde eine vollständige Koexpression von Hsp70 mit CD14 als monozytärem Antigen beobachtet. Eine weitgehend übereinstimmende Expression wurde bei HLA DR und Hsp70 im Sinne einer doppelpositive Population registriert.

Es musste eingeschränkt werden, dass die Expression von HLA DR keineswegs spezifisch ist für akute myeloide Leukämien. Sie kann vielmehr auch bei Monozyten auftreten, wenn eine Aktivierung vorliegt, ohne dass eine Assoziation mit der malignen Erkrankung besteht (Roitt et al., 1997).

Ginge man von einer mit der Leukämie assoziierten Expression von oberflächenstündigem Hsp70 bei der hier vorliegenden myelomonozytären Leukämie aus, so würde oben geschilderte Analyse eine maligne Subpopulation identifiziert haben, die zumindest mit den untersuchten myeloiden und monozytären Markern nicht fassbar war.

### 3.7.2.1.1.2 Immunphänotypisierung der lymphoiden Population (R2):

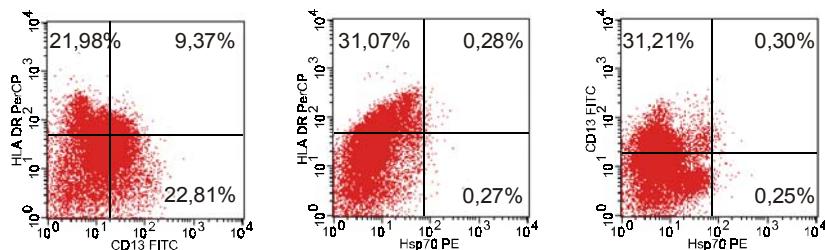


Abb.81: Mehrfachfärbung der FACS-Population R2: Dotblotdarstellungen CD13 FITC / HLA DR PerCP, Hsp70 PE / Hsp70 PE und Hsp70 PE / CD13 FITC.

Die Immunphänotypisierung der Zellen, die als Region R2 zusammengefasst waren, führte zu einer Identifikation von jeweils 22,81% einfach CD13-positiven und 0,27% einfach CD33-positiven Zellen (Abb.81). HLA DR-positive Zellen waren zu 21,98% beziehungsweise 31,07% quantifiziert worden. Als HLA DR- und CD13-positive Zellen war in der Region R2 ein Anteil von 9,37% anzutreffen. Für die Analyse des myeloiden Antigens CD33 ergab sich ein Anteil von 0,28% Hsp70- und CD33 doppelpositiven Zellen.

Bei der Immunphänotypisierung von Hsp70 und HLA DR zeigte sich ein doppelpositiver Anteil von nur 0,30%, während einfach HLA DR-positive Zellen zu 31,21% präsent waren. Zugleich ergab sich mit einem einfach Hsp70-positiven Anteil von lediglich 0,25% ein quantitativer Befund, der sich mit einem fehlenden immunzytometrischen Nachweis einer Hsp70-Expression in der lymphoiden Population (Region R2) verbinden ließ.

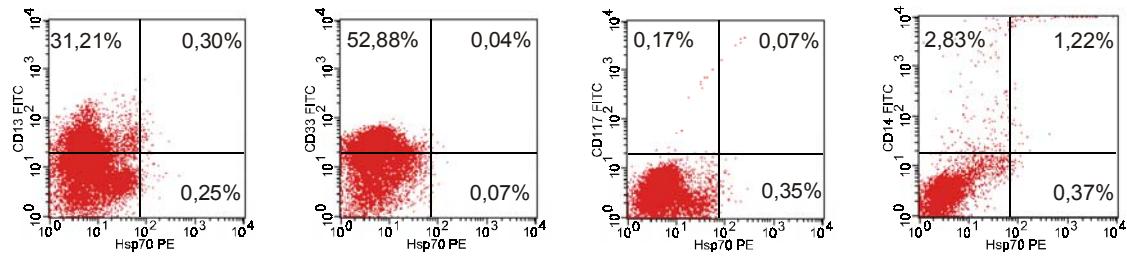


Abb.82: Mehrfachfärbung der FACS-Population (R2): Dotblotdarstellungen Hsp70 PE / CD13 FITC, Hsp70 PE / CD33 FITC, Hsp70 PE / CD117 FITC und Hsp70 PE / CD14 FITC.

Das qualitativ negative durchflusszytometrische Resultat bezüglich der fehlenden Hsp70-Detektion erbrachten auch die Gegenfärbungen (Abb.82) mit den FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD13 mit 0,30% doppel- und 0,25% einfach Hsp70-positiven Ereignissen, 0,04% doppelpositiven und 0,07% einfach Hsp70-positiven Ereignissen bei der Bestimmung von CD33. In der Gegenfärbung mit CD117 wurden 0,35% Hsp70-einfach-positive Zellen gezählt, gegenüber 0,07% CD117- und Hsp70-positiven und 0,17% einfach CD117 positiven Zellen. Gegen das monozytoide Antigen CD14 schließlich ergaben sich 1,22% CD14-und Hsp70-positive Zellen neben 0,37% einfach Hsp70-positiven Ereignissen und 2,83% separaten, CD14-einfachpositiven Zellen.

Die als 31,21% CD13-positiven beziehungsweise 52,88% CD33-positiven Zellen deuteten auf einen Befund von myeloider Progenitorzellen neben den erwarteten lymphoiden Zellen hin (Abb.82). Über die Dignität der CD13-, CD33- und HLA DR-positiven Zellen in der Region R2 konnten leider keine Angaben gemacht werden.

Wichtig für eine Bewertung der oberflächenständigen Hsp70-Expression war, dass in keiner der durchgeführten Doppelfärbungen ein quantitativ positives Resultat nachweisbar war, indem der durchflusszytometrische Schwellenwert von 5,00% durchwegs deutlich unterschritten worden war.

### 3.7.2.1.1.3 Immunphänotypisierung der blastären Population (R3):

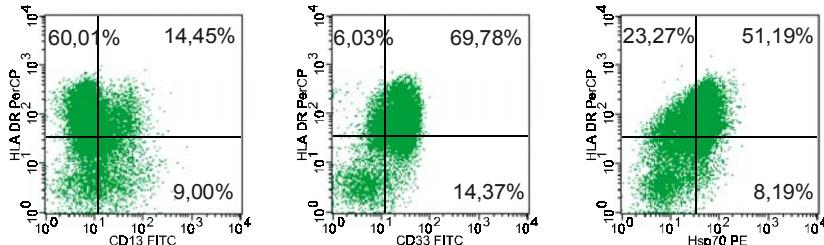


Abb.83: Mehrfachfärbung der Population (R3): Dotblotdarstellungen CD13 FITC / HLA DR PerCP, CD33 FITC / HLA DR PerCP neben Hsp70 PE / HLA DR PerCP.

Ein deutlich unterschiedliches Bild ergab die Immunphänotypisierung der postuliertenblastären Population R3 (Abb.83):

Neben einem geringen Anteil doppelnegativer Ereignisse waren die aufgezeichneten Zellen der Region R3 mehrheitlich als jeweils eine Population erkennbar, die sowohl für den myeloiden Marker CD13 und HLA DR als auch für CD33 und HLA DR im doppelpositiven Areal der Dotblots angesiedelt war. Der einfach-positive Nachweis des myeloiden Antigens CD13 konnte auf 60,01% der Zellen geführt werden, wobei 14,45% der Zellen als CD13- und HLA DR-doppelpositiv identifiziert wurden. 9,00% wurden als HLA DR-negativ und CD13-positiv quantifiziert. CD33-einfach positiv waren 14,37% der Zellen, wobei zusätzlich 69,78% HLA DR- und CD33-doppelpositive Zellen nachgewiesen werden konnten. Zu 6,03% reichte die Zellpopulation in das Areal der HLA DR-positiven und CD33-negativen Determination. Für die oberflächenständige Expression von Hsp70 ließ sich ein Anteil von 51,19% dem HLA-DR- und Hsp70-doppelpositiven Bereich zuschreiben, während 8,19% der Zellen einfach Hsp70-positiv klassifiziert wurden und 23,27% als einfach HLA DR-positiv. Auch in diesem Fall lag eine durchflusszytometrische Population vor, die für beide Immunmarker mehrheitlich im doppelpositiven Areal angesiedelt war.

Neben HLA DR wurde die Mehrfachfärbung für die myeloiden Marker CD13, CD33, CD117 und CD14 ausgewertet (Abb.84):

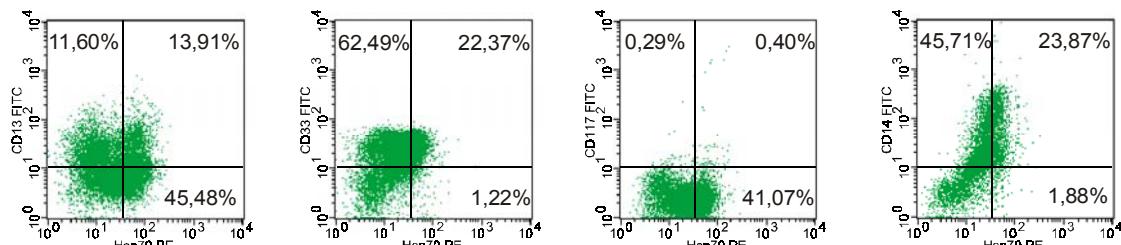


Abb.84: Mehrfachfärbung der FACS-Population (R3): Dotblotdarstellungen Hsp70 PE / CD13 FITC, Hsp70 PE / CD33 FITC, Hsp70 PE / CD117 FITC und Hsp70 PE / CD14 FITC.

In direkten Vergleich mit dem Immunmarker CD13 lagen 13,91% der Zellen als doppelpositiv vor und 11,60% als einfach CD13-positiv. Es dominierten 45,48% der Zellen als einfach Hsp70-positiv.

Daneben wurden 62,49% der wahrscheinlich blastären Zellen als einfach 62,49%-positiv charakterisiert. 22,37% der eingegrenzten Zellen waren im CD33- und Hsp70-doppelpositiven Areal lokalisiert. Einfach Hsp70-positive Ereignisse wurden zu 1,22% gezählt.

Das Oberflächenantigen CD117 ließ sich mit einem quantitativen Resultat von 0,29% einfach positiven und 0,40% doppelpositiven Ereignissen im Dotblot Hsp70-CD117 praktisch nicht immunphänotypisch quantifizieren. Die vermutete blastäre Population wies jedoch ähnlich wie in den parallelen Immunphänotypisierungen oben in 41,07% ein einfach Hsp70-positives Resultat auf.

Ebenfalls Hsp70-positiv konnte die Doppelfärbung mit CD14 gewertet werden. Die Population war zu 45,71% im einfach CD14-positiven Bereich lokalisiert und zu 1,88% im einfach Hsp70-positiven Quadranten. Zu 23,87% lagen CD14- und Hsp70-doppelpositive Zellen vor.

Die Hsp70-Expression ließ sich im Bereich der Population R3 als qualitativ und quantitativ deutlich Hsp70-positiv beschreiben.

Eine hohe Übereinstimmung der positiven Hsp70-Expression war messbar im Vergleich mit dem Immunmarker HLA DR. Eine partielle Koexpression konnte auch mit den myeloiden Markern CD13 und CD33 sowie CD14 belegt werden, wobei ein Nachweis von CD117 negativ verlief.

Die vorliegende durchflusszytometrische Analyse der akuten myelomonoytären Leukämie zeigte im Bereich R3 eine immunphänotypische Diversität. Diese betraf die jeweils detektierbare partielle Koexpression der myeloiden Marker CD13, CD33 neben HLA DR und CD14.

Es konnte die für das Hitzeschockprotein Hsp70 in seiner Verwendung als diagnostisch relevanter leukämieassoziierten Immunmarker notwendige qualitative Übereinstimmung (Rothe und Schmitz, 1996; Campana und Behm, 2000) der Expression mit den etablierten Markern CD13, CD33, CD14 und HLA DR gezeigt werden. Gleichzeitig deutete sich sowohl in der Verteilung dieser leukämieassoziierten Marker als auch in der Verteilung der detektierten oberflächenständigen Hsp70-Expression an, dass keine der erwähnten Marker homogen verteilt sind und damit als leukämiespezifisch bezeichnet werden könnten.

Über diese diagnostische Schwierigkeit berichteten Kern et al. (2003), die darauf hinwiesen, dass häufig mehr als eine klonale leukämische Population anzutreffen ist, die sich einheitlich mit leukämie-assoziierten Immunphänotypen beschreiben ließe.

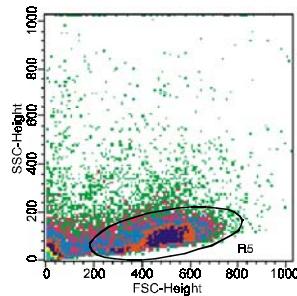
Für die hämatologische Routine könnte Hsp70 als Oberflächenmarker als zusätzliches diagnostisches Tool an Bedeutung gewinnen.

Durch die weitere Untersuchung des Verteilungsmusters von Hsp70 auf myeloiden Zellen könnten darüber hinaus ätiologische Zusammenhänge maligner hämatologischer Erkrankungen diskutiert werden.

### 3.7.2.1.2 Immunphänotypisierung nach den Scattereigenschaften

Die Immunphänotypisierung der zugrundegelegten Leukämie erfolgte zum einen nach dem CD45/SSC-Diagramm, zum anderen nach der Darstellung des Vorwärts- gegen den Seitwärtsscatter (FSC-SSC).

Die folgende Darstellung diente dazu, beide Methoden exemplarisch zu vergleichen, da ein Teil der auf die oberflächenständige Expression von Hsp70 durchflusszytometrisch untersuchten Leukämien am FACStar-Gerät analysiert worden waren, das mit lediglich drei Fluoreszenzkanälen auf die Farbstoffe FITC, PE und PerCP limitiert war. In diesen Fällen erfolgte die Eingrenzung mononukleärer Zellen anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften.



*Abb.85: Eingrenzung mononukleärer Zellen (R5) anhand ihrer Streulichteigenschaften im Scatterblot..*

Der Densityplot (Abb.85) der aus dem Aspirat isolierten mononukleären Zellen (MNC) zeigte zwei nebeneinanderliegende Populationen niedrig-granulärer Zellen, die sich in ihren Vorwärtsstreulichteigenschaften unterschieden und die in Folge gemeinsam als mononukleäre Zellen (MNC) durchflusszytometrisch analysiert wurden. Mit der Region R5 wurden 76,65% der registrierten Ereignisse als MNC zusammengefasst. Diese unterschieden sich in ihrem Vorwärtsscatter (FSC) merklich von den Zelltrümmern im linken unteren Randbereich der FSC-SSC-Darstellung, die durchflusszytometrisch grenzwertig niedrige Vorwärts- und Seitwärtsscatterwerte aufwiesen.

Um das Risiko einer Kreuzreaktion mit Debris zu reduzieren, wurde das im Densityplot erkennbare untere Limit des Vorwärtscatters ausgewählt. Nach oben hin ebenfalls limitiert wurde das Seitwärtsstreulicht der mononukleären Zellen, da davon auszugehen war, dass ein erhöhter Seitwärtsscatter, d.h. eine erhöhte Granularität, von Zellen herrühren könnte, die möglicherweise rupturierte Zellmembranen und damit veränderte Oberflächenstrukturen aufweisen könnten.

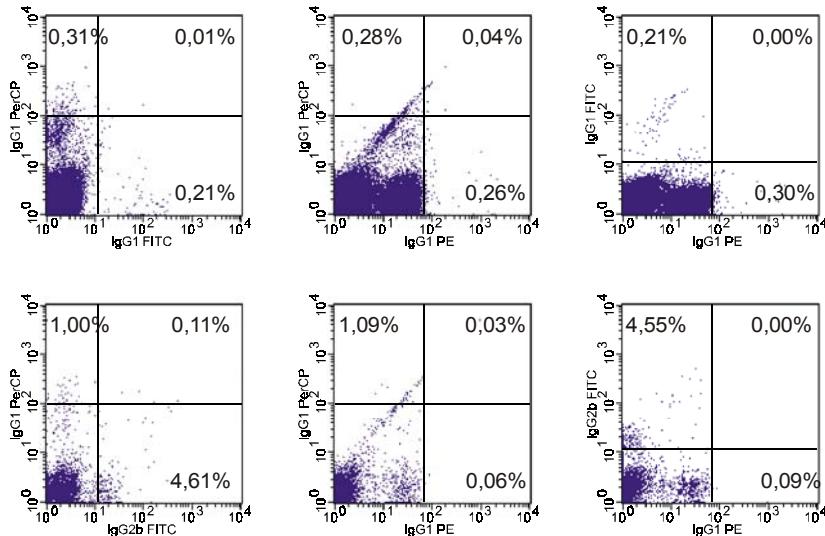


Abb.86: Mehrfachfärbung der Region R5: Dotblotdarstellungen der Fluoreszenzintensitäten der Isotyp-Antikörper.

Für die Immunphänotypisierung (Abb.86) wurden die entsprechenden Isotyp-Antikörper als Negativkontrollen zugrundegelegt, wobei neben den FITC- und PerCP-direkt konjugierten IgG1-Isotypen zusätzlich FITC-konjugierter IgG2b-Isotyp eingesetzt wurde für die Bestimmung von CD14. Für Hsp70 war der indirekt PE-markierte Isotyp IgG1 PE relevant.

Ihr Bindungsmuster stellen die Dotblots dar. Auffällig war bei IgG1 PerCP und bei IgG1 PE das Auftreten von zwei Populationen im jeweils doppelnegativen Quadranten der Dotblots. Hinzu kam ein gering ausgeprägtes Einstreuen einer dritten Population PerCP-positiver Ereignisse zu 0,28% und 1,09%.

Letzteres deutete möglicherweise auf eine unspezifische Bindung. Das durchflusszytometrische Bild könnte jedoch auch durch die durchflusszytometrische Diversität der integrierten Populationen hervorgerufen worden sein, die mit einem unterschiedlichen Bindungsverhalten nicht nur die indirekte PE-Markierung betroffen hatte, sondern auch der eingesetzten PerCP-konjugierten Isotyp-Antikörper.

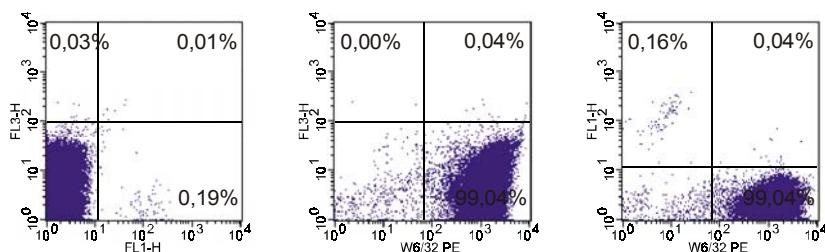


Abb.87: Untersuchung der MHC-Klasse-I-Expression gemessen als W6/32 PE, Gegenüberstellung der Dotblots benachbarter Fluoreszenzen (FL1, FL3).

Ein einheitliches Bild ergab sich im Hinblick auf die detektierten MHC-Klasse I-Moleküle auf mehr als 99% der Zellen (Abb.87).

Die praktisch quantitativ detektierte MHC-Klasse-I-Expression diente als Positivkontrolle für den Nachweis von weiteren Oberflächenantigenen. Zusammen mit der Betrachtung der Quantifizierung der Isotyp-Antikörper konnte ein Rahmen für die Analyse der myeloiden Marker gesetzt werden:

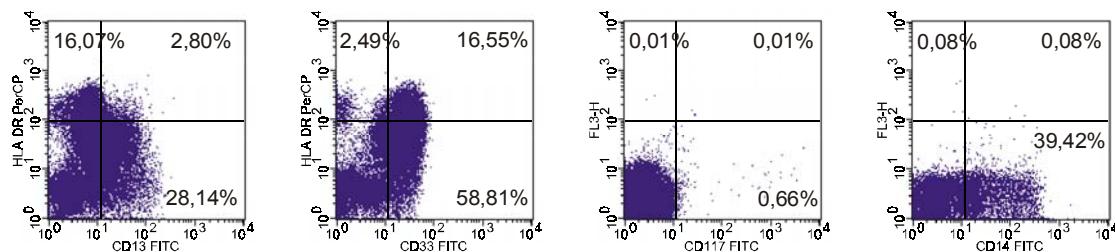


Abb.88: Mehrfachfärbung der FACS-Population (R5): Dotblotdarstellungen CD13 FITC / HLA DR PerCP, CD33 FITC / HLA DR PerCP, CD117 FITC / FL3 sowie CD14 FITC / FL3.

Bei der Mehrfachfärbung von CD13 und HLA DR zeigten die Dotblots (Abb.88) ein heterogenes Bild mit einer HLA DR-einfachpositiven Population (16,07%) und einer zweiten einfach CD13-positiven Population (28,14%). Mit 2,80% lagen doppelpositive Ereignisse vor. Zu 16,07% konnte die Population als HLA DR-einfach-positiv gewertet werden.

In der Doppelfärbung mit CD33 und HLA DR zeigte sich eine kleine Population HLA DR- positiver Zellen (2,49%), wobei der Großteil der Zellen als homogene Population mit 58,81% als CD33-positiv und HLA DR-negativ quantifiziert wurde. Zu 16,55% war eine Koexpression von CD33 und HLA DR quantifiziert worden.

Eine distinkte zweifach negative Population wurde ebenfalls in der CD33-HLA DR-Darstellung gesehen. Hier wurde vermutet, dass die Expression von CD33 auf den untersuchten leukämischen Blasten möglicherweise nicht quantitativ detektiert werden konnte.

Der Nachweis von CD117 verlief mit insgesamt 0,67% positiven Ereignissen negativ. Als monozytoider Marker konnte CD14 auf insgesamt 39,50% identifiziert werden.

Die Mehrfachfärbungen jener direktkonjugierten leukämieassoziierten Marker mit cmHsp70.1 führten zu folgenden quantitativen Resultaten bei der nach FSC-SSC eingegrenzten MNC (Abb.89):

Eine Koexpression von HLA DR und Hsp70 konnte auf 2,82% der Zellen determiniert werden, wobei mit zusätzlich 3,21% einfach Hsp70-positiven Zellen ein Gesamtanteil von 6,03% Hsp70-positiven Zellen quantifiziert wurde.

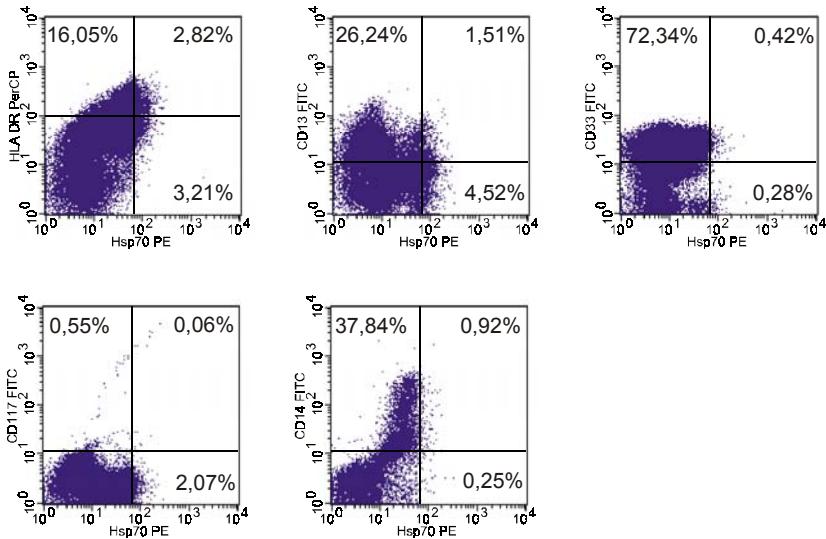


Abb.89: Mehrfachfärbung der FACS-Population (R5): Dotblotdarstellungen Hsp70 PE / HLA DR PerCP, Hsp70 PE / CD13 FITC, Hsp70 PE / CD33 FITC, Hsp70 PE / CD117 FITC und Hsp70 PE / CD14 FITC.

Eine Koexpression von CD13 und Hsp70 wurde auf 1,51% der Zellen quantifiziert, wobei mit 26,24% CD13-einfach positive Zellen gemessen wurden. Im Dotplot wurde eine Aufspaltung in eine CD13-positive, Hsp70-negative und eine CD13-positive und partiell Hsp70-positive Population beobachtet. Daneben wurden einfach Hsp70-positive Ereignisse zu 4,52% gemessen.

In der Folge ergaben die Doppelfärbungen 72,34% einfach CD33-positive Zellen, 0,55% CD117-positive Ereignisse und 37,84% einfach CD14-positive MNC. In den Mehrfachfärbungen mit CD33, CD117 und CD14 waren Hsp70-positive Ereignisse in geringem Umfang positiv, wobei die vorgegebenen Kontrollantikörper zu insgesamt 0,70% Hsp70-positiven Zellen bei der Mehrfachfärbung mit CD33, 2,13% Hsp70-positiven Zellen bei der Analyse von CD117 und insgesamt 1,17% Hsp70-positiven Zellen ergeben hatte.

Im Falle der CD13- und HLA DR-Analyse überschritt der Anteil Hsp70-positiver Zellen mit 6,03% den festgelegten Schwellenwert von 5,00% und führte in diesen Fällen zu einem Hsp70-positiven Resultat der oberflächenständigen Expression von Hsp70 bei den MNC des leukämischen Knochenmarksaspirats.

### 3.7.2.1.3 Analyse nach Histogrammen

Falls eine Koexpression von oberflächenständigem Hsp70 mit den oben gezeigten leukämieassoziierten Markern vorausgesetzt werden konnte, ließ sich eine Expression von Hsp70 immunphänotypisch auch anhand von Histogrammen quantifizieren.

Der Nachteil lag in den mangelnden Informationen zur möglichen Koexpression leukämischer Marker, der Vorteil in einer gut erkennbaren Abgrenzung vom Histogramm des Isotyps.

Für die immunphänotypische Quantifizierung zugrundegelegt wurde wiederum die nach Streulichteigenschaften quantifizierten mononukleären Zellen der Region R5.

In der eindimensionalen Darstellung der Histogramme errechneten sich die gleichen Resultate in gleicher Höhe, wenn die Quantifikation nach denselben Maßstäben erfolgte:

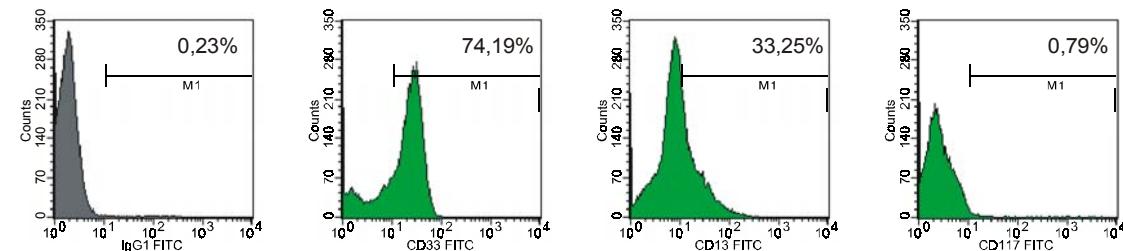


Abb.90: Auswertung der Immunphänotypisierung der Zellpopulation (R5) in Histogrammen: IgG1 FITC, CD33 FITC, CD13 FITC, CD117 FITC.

Die Basis für die Quantifikation mit FITC-konjugierten Antikörpern bildete das Resultat des Isotyps IgG1 FITC mit 0,23%. 74,19% der MNC waren CD13-positiv, 33,25% CD33-positiv und 0,79% CD117-positiv (Abb.90).

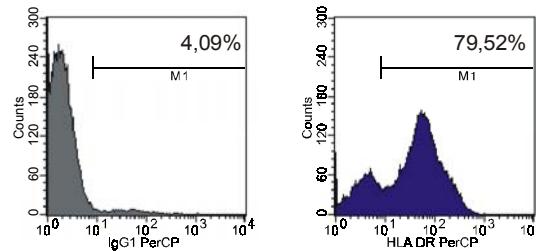


Abb.91: Auswertung der Immunphänotypisierung der Zellpopulation (R5) im Histogrammblot: IgG1 PerCP, HLA DR PerCP.

Nach einem Resultat des Isotyps von 4,09% ließ sich die HLA DR-Expression auf 79,52% der Zellen wiederfinden (Abb.91).

Für die mit PE-konjugiertem sekundären Antikörpern vorgenommene indirekte Markierung zeigte sich eine heterogene Bindung der Antikörper. Es waren zwei Populationen innerhalb der MNC zu unterscheiden mit einem unterschiedlich

ausgeprägten Bindungsverhalten, das sich bereits gegenüber dem Isotyp zeigte. Für diese Beobachtungen kamen zwei Erklärungen in Betracht: Einerseits lagen mit lymphoiden, monozytoiden und myeloiden Zellen in der Population der MNC unterschiedliche Zellen vor, die möglicherweise auch zu quantitativ unterschiedlicher Antikörperbindung von Isotyp-Antikörper und weiteren Antikörpern geführt hatte.

Andererseits mochte das biphasische Histogramm auch auf eine mögliche zusätzliche Bindungsstelle an Zellen einer Subpopulation der MNC im indirekt konjugierten Detektionssystem zurückzuführen sein, an welcher der sekundäre PE-konjugierte anti-Maus-Antikörper nicht über sein Paratop gebunden hatte.

Bei der Auswertung der Immunphänotypisierung in den Histogrammen wurde dieselbe Quantifikation vorgenommen, wie sie in oben dargestellten Dotblots zum Einsatz kam. Im Histogramm wurde dieser Maßstab als M3 verzeichnet und führte zu folgenden Ergebnissen:

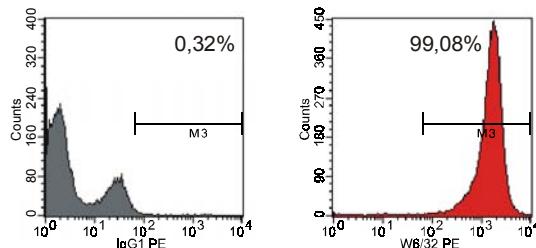


Abb.92: Quantifizierung der Histogramme IgG1 PE und W6/32 PE unter Ausschluss der zweiten Population im Histogramm IgG1 PE.

Schloss man für die Wertung positiver Ereignisse die Population mit intensiverer Fluoreszenzemission aus, so ergab sich bei den verbleibenden Zellen einem Isotyp von 0,32% ein Anteil von 99,08% MHC Klasse I-positiven Zellen (Abb.92).

Während die immunphänotypische Bestimmung des Isotyps im Histogramm zu zwei Peaks geführt hatte, wies die Immunphänotypisierung mit W6/32 eine weitgehend einheitliche Expression von MHC-Klasse I-Molekülen auf (Abb.93).

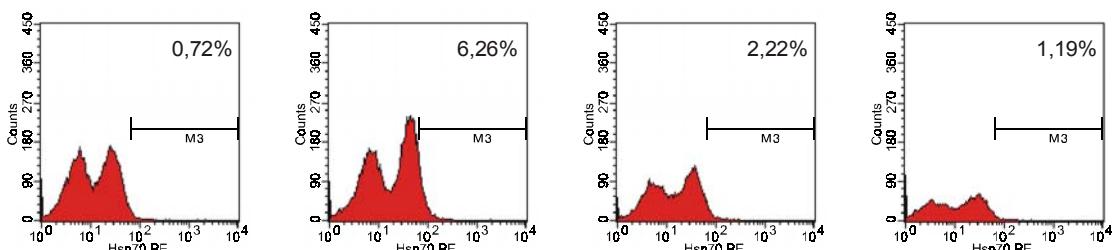


Abb.93: Quantifizierung der Hsp70-Expression (Hsp70 PE) anhand der Histogramme der oben gezeigten Mehrfachfärbungen.

Bei der nach gleichen Kriterien durchgeführten Immunphänotypisierung mit cmHsp70.1 zeigten sich 0,72%, 6,26%, 2,22% und 1,19% Hsp70-positive Zellen (Abb.93).

Quantitative Unterschiede waren nach den experimentell parallel durchgeführten Inkubationen der Zellen mit Antikörper erkennbar, sie deuteten auf eine Labilität des Messsystem mit dem indirekt markierten Primärantikörpers cmHsp70.1 oder auf eine Chargeninhomogenität jenes Antikörpers. Diese könnte durch eine Optimierung der Aufreinigung des Antikörpers aus den Hybridom-Überständen verbessert werden sowie durch eine Direktkonjugation mit FITC, um die Inkubation mit Sekundärantikörper (Goat anti-Maus-IgG) einzusparen.

### 3.7.2.1.4 Vergleich der immunphänotypischen Analyse

Die Wertung der nach FSC/SSC determinierten mononukleären Zellen (MNC) führte zu einem grenzwertigen Resultat, wenn die Auswertung der Histogramme nach denselben quantitativen Vorgaben durchgeführt wurde wie bei der Analyse nach Dotblots. Nach dieser Auswertung wurde in drei von vier Histogrammen eine Expression unterhalb von 5,00% gemessen.

Ein Histogramm wies mit 6,26% Hsp70-positiven Zellen ein Resultat oberhalb des Schwellenwerts auf.

Vergleicht man die durchflusszytometrischen Auswertungen nach CD45-SSC und FSC-SSC, so fiel auf, dass die quantitativen Resultate der allein nach ihren Streulichteigenschaften identifizierten mononukleären Zellen (MNC) geringer ausfielen als diejenigen aus der Auswertung derselben Messungen nach CD45-SSC.

Der Umfang der membranständigen Hsp70-Expression war jedoch nicht ausreichend hoch, um in der Immunphänotypisierung der MNC, die sich an den Streulichteigenschaften (FSC, SSC) orientierte und dort die MNC als Population bestimmte, in allen parallelen Analysen gleichfalls zu einem Überschreiten des Schwellenwerts von 5,00% zu führen. Dies wurde in lediglich einer Mehrfachfärbung registriert.

Das ambivalente Ergebnis zeigte die Heterogenität der lymphoiden, myeloiden und monozytoiden hämatopoetischen Zellen auf, bei der eine allgemeine Immunphänotypisierung der MNC mit grenzwertigem Resultat durch Folgeuntersuchungen präzisiert werden musste.

Mit der Eingrenzung mononukleärer Zellen nach CD45-SSC stand eine sensitive analytische Methode zur Verfügung, die eine separate Analyse von lymphoiden, myeloiden und monozytoiden Populationen gestattete.

Eine Expression auf durchflusszytometrisch charakterisierten lymphoiden Zellen konnte praktisch ausgeschlossen werden.

In der Dotplot-Quantifizierung der blastären und monozytären Populationen konnte ein Überschreiten des Schwellenwerts von 5,00% beobachtet werden, wenn die Dotblots CD45/SSC zugrundegelegt worden waren. Das Hsp70-Resultat war sowohl bei myeloid-blastären Population mit 23,59% als Minimum Hsp70-positiver Zellen in der Mehrfachfärbung als auch bei der monozytoiden Population mit 6,48% als Minimum höher als auch bei der monozytoiden Populationen als bei der lymphoiden

Partialpopulation mit maximal 1,59%, so dass eine Hsp70-positiven Wertung der immunphänotypischen Expression gerechtfertigt schien.

### 3.7.2.2 Exemplarische Darstellung einer leukämischen Analyse in Zweifachfärbung

Als klinische Vorgaben konnten für das Knochenmarksaspirat (AL#85) folgende Information eingeholt werden: Diagnose AML M5a, 90% unreife leukämische Blasten.

#### 3.7.2.2.1 Eingrenzen mononukleärer Zellen

Gemäß ihrer Scattereigenschaften wurden die mononukleären Zellen (MNC) als diejenigen Zellpopulationen mit geringem Seitwärtsstreulicht eingegrenzt. Im vorliegenden Fall umfassten die MNC zwei Populationen unterschiedlicher Zellgröße, die aus den unterschiedlich großen Vorwärtsstreuichtwerten (FSC) abgeleitet werden konnte.

Eine dritte Population, deren Vorwärtsscatter denjenigen der beiden anderen Populationen unterschritt, wurde ebenso wenig eingeschlossen wie der Anteil an Zellen mit hohem Seitwärtsscatter, der auf eine veränderte, möglicherweise zerstörte Zellmembranstruktur hinwies.

Die als MNC immunphänotypisch charakterisierten Zellen des Knochenmarksaspirats machten einen Anteil von 36,87% der aufgezeichneten Ereignisse aus (Abb.94).

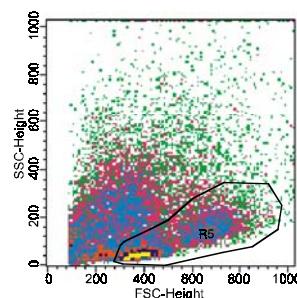


Abb.: FSC-SSC-Densityplot des leukämischen Knochenmarksaspirats AL#85 mit Eingrenzung der mononukleären Zellen (R5).

#### 3.7.2.2.2 Immunphänotypisierung der eingegrenzten Population

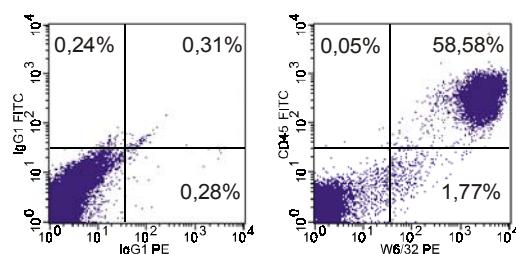


Abb.95: Immunphänotypisierung der MNC aus AL#85. links: Dotblotanalysen der Isotypen IgG1 PE / IgG1 FITC (Negativkontrolle), rechts: W6/32 PE / CD45 PE (Positivkontrolle).

Die quantitative Analyse der Immunphänotypisierung wurde vorgenommen ausgehend vom Dotplot der Isotypen IgG1 PE / IgG1 FITC. Für IgG1 FITC waren 0,24% Ereignisse positiv, für IgG1 PE 0,28%. Im doppelpositiven Quadranten waren 0,31% gezählt worden (Abb.95).

Dem wurde die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker MHC Klasse I (über W6/32) und CD45 gegenübergestellt, die neben 0,05% einfach CD45- und 1,77% einfach W6/32-postiven Ereignissen mit 58,58% doppelpositiven Ereignissen die Mehrheit der MNC als positiv für bei Marker identifizieren konnte.

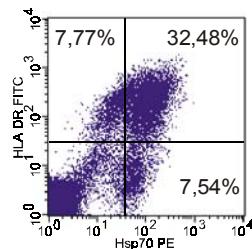


Abb.96: Immunphänotypisierung der MNC der Oberflächenantigene HLA DR FITC / HSP70 PE.

Mit dem leukozytären Marker HLA DR zeigte eine Verteilung von 7,77% einfach HLA DR- beziehungsweise 7,54% Hsp70-positiven Zellen. Die genannten Zellen waren als eigenständige Populationen im Dotplot abgrenzbar. Die Mehrheit von 32,48% der MNC der Zellpopulation R5 wies ein doppelpositives Resultat auf.

Bei der durchflusszytometrische Analyse des leukämischen Knochenmarks AL#85 verlief der Nachweis des leukämieassoziierten Markers CD33 negativ. Das Hitzeschockprotein Hsp70 wurde ebenfalls durchflusszytometrisch als Antigen an der Zelloberfläche detektiert. Eine Koexpression mit HLA DR wurde für Hsp70 ermittelt, wenngleich eine separate HLA DR-positive und Hsp70-negative Population sowie eine HLA DR-negative, Hsp70-positive Population erkennbar waren.

Die durchflusszytometrische Analyse belegte einen qualitativ und quantitativ positiven Nachweis von MNC mit oberflächenstündigem Hsp70. Aufgrund der hämatologischen Vorgaben von 90% leukämischen Zellen im Knochenmark war der Befund von Hsp70 mit hoher Wahrscheinlichkeit den leukämischen Zellen zuzuordnen.

Immunphänotypisch konnte eine Koexpression von HLA DR und Hsp70 gezeigt werden.

Bezüglich unserer Zielsetzung, d.h. der Detektion von Hsp70, war das leukämische Knochenmark AL#85 als „Hsp70-positiv“ einzustufen.

### 3.7.3 Quantitative durchflusszytometrische Untersuchungen akuter myeloischer Leukämien

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Detektion von Hsp70 auf der Zelloberfläche leukämischer Blasten und die Untersuchung der Verteilung der Expression von Hsp70 innerhalb klinisch distinkter Formen der akuten myeloischen Leukämie.

Zu diesem Zweck wurde die Population der mononukleären Zellen und mit ihnen die malignen Zellen anhand ihrer Scattereigenschaften und zugleich anhand ihrer Expression myeloider Marker CD33 oder CD13 und HLA DR detektiert und quantifiziert. Diese Zellpopulation wurde immunphänotypisch auf ihre Hsp70-Expression an der Zelloberfläche überprüft.

Den klinischen Einteilungen wurde Rechnung getragen und die durchflusszytometrisch untersuchten akuten myeloischen Leukämien unterschieden in *de novo* AML, therapieinduzierte *sekundäre* Leukämien, *rezidivierende* und *persistierende* akute *myeloische* Leukämien.

Die Immunphänotypisierung maligner hämatologischer Erkrankungen mit Hilfe der Durchflusszytometrie stellt ein Verfahren dar, das in der klinischen Diagnostik routinemässig angewendet wird.

Die Standards der Französisch-Amerikanisch-Britischen Kooperationsgruppe (FAB) zur Klassifizierung akuter myeloischer Leukämien geben die zytosolisch lokalisierte Myeloperoxidase (MPO) sowie die Oberflächenantigen CD33, CD13, CDw65 und CD117 vor. Mindestens zwei der genannten Antigene müssen zu mehr als 20% auf den leukämischen Blasten zu finden sein, damit die Diagnose der akuten myeloischen Leukämie gestellt werden kann (Bennett et al., 1976; 1985a; 1985b; 1991).

#### 3.7.3.1 *De novo* akute myeloische Leukämie

Die neu diagnostizierte, unbehandelte, *de novo* akute myeloische Leukämie bildete den Ausgangspunkt für die Untersuchungen von Hsp70 auf der Oberfläche maligner Zellen. Die Fallzahl von insgesamt 80 *de novo* AML-Patienten ließ einen Vergleich der Marker-Expression und dem mikroskopisch-morphologischen vorliegenden Subtyp nach der Französisch-Amerikanisch-Britischen Nomenklatur zu (Bennett et al. 1976; 1985a; 1985b; 1991).

##### 3.7.3.1.1 Durchflusszytometrische Quantifizierung mononukleärer Zellen

Im Gegensatz zur normalen Hämatopoese sind unreife Blasten stark vermehrt. Bei leukämischem Knochenmark ist die normale Hämatopoese überlagert, bisweilen fast vollständig verdrängt von unreifen leukämischen Blasten (Lübbert, 2002; Büchner, 2000).

Gemäß des Konsensus-Protokolls zur Immunphänotypisierung akuter Leukämien von Rothe und Schmitz (1997) wurden die mononukleären Zellen (MNC) herangezogen. Nach ihren Streulichteigenschaften waren die leukämischen Blasten innerhalb der Lymphozyten und Monozyten gebildeten Population der mononukleären Zellen angeordnet.

Während der Anteil der MNC in der nicht-malignen Kontrollgruppe bei 33,36% lag, betrug der Anteil mononukleärer Zellen bei der de novo AML im Durchschnitt 59,23%. Dies gab die leukämieassoziierte Vermehrung blastärer Zellen wieder. Die Messwerte für die mononukleären Zellen lagen zwischen 3,47% und 98,32%. Innerhalb der mikroskopisch-diagnostisch vorgegebenen FAB-Subtypen der de novo akuten myeloischen Leukämie waren die graduellen Unterschiede mit  $p=0,7185$  statistisch nicht signifikant (Tab.57).

| <i>Bezeichnung der de novo AML nach FAB</i> | <i>Mononukleäre Zellen</i>                   | <i>Oberflächenmarker</i>                     |   |   |
|---|--|--|---|---|
|   | <b>MNC [%]</b>                               | <b>CD33 [%]</b>                              | <b>CD13 [%]</b>                             | <b>HLA DR [%]</b>                             |
| M1  | <b>56,76</b><br>(18,71-95,38;<br>$s=24,42$ ) | <b>35,31</b><br>(0,41-93,41;<br>$s=33,60$ )  | <b>32,83</b><br>(8,75-81,12;<br>$s=25,36$ ) | <b>27,30</b><br>(0,30-71,21;<br>$s=24,24$ )   |
| M2  | <b>59,59</b><br>(3,47-88,79;<br>$s=27,31$ )  | <b>25,02</b><br>(0,12-79,29;<br>$s=23,75$ )  | <b>34,76</b><br>(0,72-65,32;<br>$s=19,69$ ) | <b>36,27</b><br>(0,77-86,19;<br>$s=30,32$ )   |
| M3  | <b>54,62</b><br>(11,47-91,92;<br>$s=28,99$ ) | <b>50,12</b><br>(27,43-88,17;<br>$s=25,13$ ) | <b>19,16</b><br>(0,00-69,29;<br>$s=23,67$ ) | <b>17,07</b><br>(1,68-85,63;<br>$s=30,70$ )   |
| M4, M4eo                                    | <b>54,96</b><br>(8,72-<br>98,32; $s=28,58$ ) | <b>36,47</b><br>(0,90-89,75;<br>$s=28,09$ )  | <b>31,36</b><br>(2,23-71,36;<br>$s=23,17$ ) | <b>54,53</b><br>(16,48-88,33;<br>$s=20,27$ )  |
| M5  | <b>69,58</b><br>(43,78-95,21;<br>$s=21,92$ ) | <b>30,82</b><br>(5,51-67,82;<br>$s=22,96$ )  | <b>26,73</b><br>(3,59-62,35;<br>$s=22,49$ ) | <b>66,37</b><br>(12,13-93,65;<br>$s=26,37'$ ) |
| M6  | <b>79,92</b><br>(77,21-82,62;<br>$s=2,71$ )  | <b>n.d.</b>                                  | <b>n.d.</b>                                 | <b>n.d.</b>                                   |
| M0  | <b>82,57</b><br>(78,69-86,44;<br>$s=3,87$ )  | <b>n.d.</b>                                  | <b>n.d.</b>                                 | <b>35,25</b><br>(21,49-49,01;<br>$s=13,76$ )  |
| Mx  | <b>59,89</b><br>(59,01-60,77;<br>$s=0,88$ )  | <b>25,05</b><br>(1,46-48,64;<br>$s=23,59$ )  | <b>11,58</b><br>(9,16-14,00;<br>$s=2,42$ )  | <b>n.d.</b>                                   |
| <i>de novo AM L gesamt</i>                  | <b>59,23</b><br>(3,47-98,32;<br>$s=26,37$ )  | <b>33,18</b><br>(0,12-93,41;<br>$s=28,71$ )  | <b>29,85</b><br>(0,72-81,12;<br>$s=22,92$ ) | <b>38,58</b><br>(0,30-93,65;<br>$s=29,94$ )   |
| Signifikanz<br>(AML M0 - M6)                | <b>p = 0,7185 (n.s.)</b>                     | <b>p = 0,5053 (n.s.)</b>                     | <b>p = 0,7333 (n.s.)</b>                    | <b>p = 0,0079 (**)</b>                        |

Tab.57: Anteil mononukleärer Zellen aus Aspiraten der de novo AML und deren Immunphänotypisierung anhand der myeloiden Marker CD33, CD13 und HLA DR mit Angabe des durchschnittlichen Anteils positiver Zellen, Streubereich und Standardabweichung ( $s$ ).

### 3.7.3.1.2 Erfassung von CD33 auf der Oberfläche leukämischer Blasten

Die leukämischen Blasten wurden nicht ausschließlich aufgrund ihrer Lage im Scatterbild identifiziert, sondern vor allem über die Expression myeloider Oberflächenantigene.

Als der bei allen Subtypen der AML zu 75% und mehr anzutreffende myeloide Marker gilt das Antigen p67 aus der Familie der Sialinsäure-abhängigen Zell-Adhäsionsmoleküle, CD33 (Campana und Behm, 2000). Im Rahmen der Mehrfachfärbung wurde dieses Antigen durchflusszytometrisch mitbestimmt und quantifiziert. Individuellen Unterschiede hinsichtlich der CD33-Expression mit einem Minimum von 0,12% und einem Maximum von 93,41% waren bei der *de novo* AML zu beobachten ( $s=28,71$ ). Die graduellen Unterschiede in der Intensität der Merkmalsexpression von CD33 waren innerhalb der Subtypen der *de novo* akuten myeloischen Leukämie mit  $p=0,5053$  nicht signifikant (Tab.57)

### 3.7.3.1.3 Durchflusszytometrische Erfassung von CD13 auf leukämischen Blasten

Als weiterer myeloider Oberflächenmarker für die akute myeloische Leukämie wurde die Aminopeptidase N (CD13) auf den mononukleären Zellen immunphänotypisch charakterisiert. Dieses Oberflächenantigen ist wie CD33 nicht spezifisch für myeloide Zellen. Der myeloide Marker CD13 wird ferner auf Granulozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, Stromazellen im Knochenmark und Osteoklasten präsentiert. Für die akute myeloische Leukämie wird eine Prävalenz von 71% von CD13 angegeben (Bradstock et al. 1994).

Die Erfassung von CD13 wurde mit anderen myeloiden Markern kombiniert, um den myeloiden Ursprung der untersuchten Leukämiezellen zu belegen und eine mögliche Hsp70-Expression der mit den bekannten myeloischen Markern beschriebenen malignen Blasten zuordnen zu können.

Bei den *de novo* akuten myeloischen Leukämien ergab sich eine Expression von CD13 auf durchschnittlich 29,85% der mononukleären Zellen (Tab.57). Der minimale erfasste Messwert betrug 0,72%, das Maximum CD13-positiver Zellen lag bei 81,12%, wie der Tabelle zu entnehmen ist. Bei allen mikroskopisch nach FAB klassifizierten Leukämien war der durchschnittliche Anteil CD13-positiver Zellen oberhalb von 20%. Lediglich die akute Promyelozytenleukämie (CD13) stellte mit durchschnittlich 19,16% CD13-positiven Zellen eine Ausnahme dar.

Ein positives Resultat für CD13 konnte bei allen FAB-Subtypen beobachtet werden. Der Anteil positiver Zellen lag auch hier jeweils oberhalb zwanzig Prozent. Eine Ausnahme stellten die Leukämiezellen der *de novo* akuten Promyelozytenleukämie dar mit einer Expression von CD13 auf durchschnittlich 19,16%.

Die Expression von CD13 war innerhalb der Subgruppen der *de novo* AML mit  $p=0,7333$  statistisch nicht signifikant unterschiedlich (Tab.57).

### 3.7.3.1.4 Immunphänotypische Quantifizierung von HLA DR auf leukämischen Blasten

Als dritter Oberflächenmarker wurde HLA DR auf den leukämischen Blasten quantifiziert. HLA DR wird von myeloiden und lymphoiden Stammzellen exprimiert, das Molekül gilt auch als Aktivierungsmarker und kann auf adulten Monozyten nachgewiesen werden. Zwar tragen nur etwa 10% der betroffenen Promyelozyten das Antigen HLA DR, doch weisen die übrigen Subtypen der akuten myeloischen Leukämie eine Prävalenz von über 75% auf (Campana und Behm, 2000; Lazarchick et al., 1998). HLA DR war dennoch geeignet, um die maligne Population immunphänotypisch einzugrenzen.

Die *de novo* akute myeloische Leukämie zeigte eine Expression von HLA DR auf durchschnittlich 38,58% der MNC (Tab.57). Die Einzelwerte lagen zwischen 0,30% und 93,65% ( $s=29,94$ ).

Bei den *de novo* AML M1, M2, M4 und M5 wurde eine HLA DR Expression auf jeweils deutlich mehr als 20% der MNC gefunden, die am stärksten bei der akuten myelomonoytären (AML M4, M4 eo) und der akuten Monoblastenleukämie (AML M5) ausgeprägt war.

Für die Expression von HLA DR ergab sich mit  $p=0,0079(*)$  ein statistisch signifikanter Unterschied innerhalb der morphologisch determinierten Subtypen der *de novo* AML.

Die sechs Fälle der akuten Promyelozytenleukämie (AML M3) wiesen mit durchschnittlich 17,07% positiven Zellen einen verminderten Anteil HLA DR-tragender Zellen auf.

Diese Beobachtung deckte sich mit den Ergebnissen von Bradstock et al. (1994) und Khalidi et al. (1998), die eine verminderte bzw. fehlende Expression von HLA DR bei der akuten Promyelozytenleukämie beobachteten.

Die myeloiden Oberflächenmarker CD13, CD33 und HLA DR wurden im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse der akuten myeloischen Leukämie eingesetzt, um die Population der malignen leukämischen Blasten immunphänotypisch zu identifizieren. Anhand der Mehrfachfärbung mit den standardmäßig diagnostisch verwandten Immunmarkern CD33, CD13 und HLA DR wurde eine mögliche Expression von Hsp70 der malignen Population überprüft.

Obwohl in der Literatur ein klonaler Charakter für humane Leukämien beschrieben worden ist, etwa von Novell und Hungerford für die chronische myeloische Leukämie (1960) und von Fialkow et al. für die akute myeloische Leukämie (1987), gibt es Arbeiten auf dem Sektor der Immunphänotypisierung, die neben Übereinstimmungen in der qualitativen Markerexpression einiger myeloider Marker ebenso Unterschiede in Markerspektrum und Intensität der Expression feststellten (Terstappen et al., 1991; 1992).

Mit anderen Worten: Der Immunphänotyp muss individuell bestimmt werden. Der von der FAB-Kooperation vorgegebene immunzytometrisch Nachweis von mindestens zwei der myeloiden Antigene (Myeloperoxidase, CD33, CD13, CDw65 oder CD117) ist für die Diagnosestellung der akuten myeloischen Leukämie notwendig.

Im Rahmen experimenteller Studien können weitere Antigene bedeutsam sein, wie etwa CD2 zur Determination der akuten Promyelozytenleukämie, CD14 und CD15 zur Determination einer monozytoiden Differenzierung (Terstappen et al., 1992; Campana und Behm, 2000).

### 3.7.3.1.5 MHC-Klasse I-Expression

In indirekter Färbung wurde die MHC-Klasse I-Expression quantifiziert und als Positivkontrolle für die nachfolgende immunphänotypische Erfassung von Hsp70 verwendet. Eine quantitative Expression von MHC-Klasse I-Molekülen war auf allen Subtypen der de novo AML detektierbar.

Ihre quantitative Expression unterschied sich nicht signifikant ( $p=0,7879$ ), wenngleich individuelle Schwankungen erkennbar waren, die zu einer betragsmäßig großen Standardabweichung ( $s=28,18$ ) führten.

Bei allen untersuchten Subtypen der de novo AML lag der durchschnittliche Anteil MHC Klasse I positiver Zellen bei über 60%, wenngleich individuelle Unterschiede in der Merkmalsexpression zu den gezeigten großen Standardabweichungen führten (Tab.58). Der durchschnittliche Anteil der durchflusszytometrisch detektierten MHC-Klasse I-tragenden Zellen betrug 70,07%. Das Minimum waren 0,61%, das Maximum 99,21% Die Standardabweichung ( $s=28,18$ ) ließ ähnlich wie bei anderen durchflusszytometrischen Analysen auf ausgeprägte individuelle Unterschiede schließen.

Die akute myeloische Leukämie zeichnet sich ebenso wie andere maligne Neoplasien durch eine verstärkte Proliferation unreifer Zellen und eine Zunahme der Anaplasie aus. Diese könnte sich immunzytometrisch unter Umständen durch eine graduell veränderte MHC-Klasse I-Expression abzeichnen. Es können im Zuge der malignen Entartung Veränderungen der Antigendichte von MHC-Klasse I-Molekülen eintreten. Eine Down-Regulation von MHC-Klasse I-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen, wie für Tumorzellen anderer Entitäten beschrieben (Pantel et al., 1991; Feenstra et al., 1999; Ritz et al., 2001), konnte in diesem experimentellen Setting mit einer Einzelanalyse pro Patient nicht beobachtet werden.

Hierzu wäre u.a. eine vergleichende Analyse der MHC-Klasse I-Molekülen auf malignen und nicht-malignen hämatopoetischen Zellen eines Aspirats erforderlich. Da die in diesem Setting eingesetzten Marker CD33, CD13, HLA DR auch auf nicht-malignen Zellen vorkommen, ist eine Eingrenzung schwierig.

Für die hier bearbeitete Fragestellung galt der Nachweis der myeloiden Marker CD33, CD13 und HLA DR nach Maßgabe der klinischen Diagnostik als Einschlusskriterium zur durchflusszytometrischen Determination der malignen leukämischen Zellpopulation.

### 3.7.3.1.6 Detektion von Hsp70 auf der Zelloberfläche leukämischer Blasten

Die Expression der leukämie-assoziierten Marker CD33, CD13 oder HLA DR auf den leukämischen Blasten wurde belegt, sowie die Intaktheit der Zelloberfläche sowohl anhand der quantitativen Expression von MHC Klasse I-Expression, als auch anhand der durch das Ausbleiben der Anfärbung mit Propidiumiodid gezeigten Viabilität.

Mit Hilfe des murinen monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1 wurde in indirekter durchflusszytometrischer Analyse folgende Expression von Hsp70 auf der Zelloberfläche festgestellt (Tab.58): Durchschnittlich war der Anteil Hsp70-positiver leukämischer Blasten 22,55%, das Maximum betrug 98,00%, das Minimum Hsp70-positiver MNC betrug 0,00% ( $s= 22,21$ ). Die am stärksten ausgeprägte Expression von Hsp70 an der Zelloberfläche wurde bei der akuten Monoblastenleukämie (AML M5) mit durchschnittlich 32,64% und bei der akuten Myeloblastenleukämie mit Ausreifung (AML M2) mit durchschnittlich 27,49%. Ein geringerer Anteil von 19,66% Hsp70-positiver MNC fand sich auf mononukleären Zellen der akuten myelomonozytären Leukämie (AML M4). Die akute Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung (AML M1) enthielt durchschnittlich 17,42% Hsp70-positive Zellen. Die beiden Exemplare der akuten myeloischen Leukämie mit minimaler Differenzierung (AML M0) wiesen eine durchschnittliche Expression von lediglich 14,76% auf.

Die morphologisch nicht charakterisierten Leukämien (Mx) zeigten eine durchschnittliche Expression von 13,80%. Leider kann keine Aussage über den Differenzierungsgrad gemacht werden.

Innerhalb der *de novo* akuten myeloischen Leukämie verhielten sich die Subtypen der akuten myeloischen Leukämie mit  $p=0,2552$  statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

Ausgeprägte individuelle Unterschiede der einzelnen Exemplare führten auch bei dem immunzytometrisch bestimmten Oberflächenantigen Hsp70 zu großen Standardabweichungen. Diese unter Umständen tumorbiologisch relevanten Unterschiede zwischen den Vertretern einer klinischen Subgruppe der *de novo* akuten myeloischen Leukämie mögen dazu beigetragen haben, dass sich statistisch mit  $p=0,2552$  keine Signifikanz abzeichnete. Eine Expression von Hsp70 auf der Zelloberfläche war bei allen morphologisch unterschiedenen Formen der *de novo* akuten myeloischen Leukämie nachweisbar.

Die Ergebnisse ließen folgern, dass die Hsp70-Expression mit dem leukämischen Immunphänotyp assoziiert sein kann - unabhängig davon, welches Differenzierungs- oder Reifungsstadium bei der myeloischen Leukämie vorliegt.

### 3.7.3.1.7 Qualitative Analyse der Hsp70-Expression

Als Schwellenwert für den Gehalt an Blasten im Knochenmark gilt ein Anteil von 5% (Bennett et al. 1976). Bei einem blastären Anteil zwischen 5% und 30% handelt es sich um eine myelodysplastische Erkrankung (MDS) und oberhalb von 30% um eine akute Leukämie. Die Immunphänotypisierung gibt für ein leukämieassoziiertes Antigen 20% als Schwellenwert an, ab dem das Expressionsprofil eines Markers als positiv diagnostiziert wird (Bennett et al., 1991).

In unserem Falle schien ein niedrigerer Schwellenwert von 5,00% angemessen, um eine Expression von Hsp70 zu erfassen. Auch bei Fällen mit geringerer membranärer Expression sollte über eine Immuntherapie, d.h. eine spätere NK-Zell-basierte zelluläre Therapie diskutiert werden können.

Legt man einen Schwellenwert von 5% zugrunde, so wiesen 59 von 80 leukämischen Aspiraten (74%) der *de novo* AML mit einem Nachweis von Hsp70 auf mehr als 5% der mononukleären Zellen ein positives Resultat auf.

Mit 18 von 19 untersuchten Aspiraten (94%) war die akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung (AML M2) derjenige Subtyp mit dem am häufigsten positiven durchflusszytometrischen Resultat.

Die *de novo* akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung (AML M1) wies mit zwölf von siebzehn getesteten Hsp70-positiven Biopsien (71%) eine ebenfalls hohe Frequenz positiver Analysen auf.

Die dritthäufigste Hsp70-Expression fand sich bei der akuten monoblastären / monozytären Leukämie (AML M5) mit sieben von zehn positiven Fällen (70%), gefolgt von der myelomonozytären Leukämie (AML M4 einschließlich AML M4eo) mit 14 von 22 positiven Aspiraten (64%).

Bei der *de novo* akuten myeloischen Leukämie mit minimaler Differenzierung (AML M0) und der akuten Erythroleukämie (AML M6) führte die durchflusszytometrische Analyse bei jedem untersuchten Aspirat zu einem positiven Befund membranärer Hsp70-Expression. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl ( $n=1$  bzw.  $n=2$ ) für die jeweilige Gruppe muss das initial vorgefundene Ergebnis an weiteren Aspiraten bestätigt werden.

In die Darstellung mitaufgenommen wurden drei mikroskopisch nicht charakterisierte *de novo* AML-Aspirate, von denen zwei ein positives durchflusszytometrisches Hsp70-Resultat aufwiesen.

Sechs Aspirate einer akuten Promyelozytenleukämie (AML M3) konnten immunphänotypisiert werden, von denen zwei eine Hsp70-Expression auf mehr als fünf Prozent der untersuchten FACS-Population aufwiesen. Der Anteil von 33% Hsp70-positiver Aspirate erschien im Vergleich zu den anderen Subtypen der *de novo* AML vermindert.

| Bezeichnung der de novo AML nach FAB | indirekt quantifiziertes Oberflächenantigen |  | Frequenz Hsp70-positiver Aspirate |
|--------------------------------------|---|--|-----------------------------------|
|                                      | MHC Kl.I [%]                                | Hsp70 [%]                                |                                   |
| M1                                   | <b>71,46</b><br>(0,61-99,00;<br>s=31,98)    | <b>17,42</b><br>(0,19-93,57;<br>s=23,69) | <b>12 / 17</b><br>71 %            |
| M2                                   | <b>73,94</b><br>(7,17-98,2;<br>s=26,92)     | <b>27,49</b><br>(0,00-64,77;<br>s=18,19) | <b>18 / 19</b><br>94 %            |
| M3                                   | <b>79,52</b><br>(43,54-97,72;<br>s=20,04)   | <b>20,54</b><br>(1,53-76,60;<br>s=28,08) | <b>2 / 6</b><br>33 %              |
| M4, M4eo                             | <b>70,78</b><br>(17,00-99,21;<br>s=24,30)   | <b>19,66</b><br>(0,46-69,04;<br>s=18,71) | <b>14 / 22</b><br>64 %            |
| M5                                   | <b>60,55</b><br>(15,00-99,03;<br>s=32,37)   | <b>32,64</b><br>(0,97-98,00;<br>s=28,61) | <b>7 / 10</b><br>70 %             |
| M6                                   | <b>20,33</b><br>(2,55-38,1;<br>s=17,78)     | <b>19,86</b><br>(6,95-32,82;<br>s=12,94) | <b>1 / 1</b><br>100%              |
| M0                                   | <b>84,91</b><br>(83,4-86,41;<br>s=1,51)     | <b>14,76</b><br>(9,74-19,77;<br>s= 5,02) | <b>2 / 2</b><br>100 %             |
| Mx                                   | <b>48,67</b><br>(19,56-79,36;<br>s=24,44)   | <b>13,80</b><br>(4,78-30,00;<br>s=11,48) | <b>2 / 3</b><br>67 %              |
| de novo AM L gesamt                  | <b>70,07</b><br>(0,61-99,21;<br>s=28,18)    | <b>22,55</b><br>(0,00-98,00;<br>s=22,21) | <b>59 / 80</b><br>74 %            |
| Signifikanz (AML M0 - M6)            | <b>p = 0,7879 (n.s.)</b>                    | <b>p = 0,2552 (n.s.)</b>                 | <b>p = 0,0753 (n.s.)</b>          |

Tab.58: Durchschnittliche Expression von MHC Klasse I und Hsp70 auf der Zelloberfläche mononukleärer Zellen der de novo AML, aufgeschlüsselt nach mikroskopisch-diagnostischen Kriterien der FAB unter Angabe des Wertebereichs (Minimum-Maximum) und der zugehörigen Standardabweichung (s).

Für die Frequenz Hsp70-positiver Fälle errechnete sich mit p=0,0753 kein statistisch signifikanter Unterschied innerhalb der Subtypen der de novo AML M0 bis M6.

Nichtsdestotrotz konnte die an der leukämischen Zelllinie K562 *in vitro* beobachte Lokalisation von Hsp70 auf der Zelloberfläche (Multhoff et al., 1995) an den 74% der unbehandelten de novo akuten myeloischen Leukämien bestätigt werden.

Ein positives Resultat der Hsp70-Expression wurde bei allen mikroskopisch differenzierten Subgruppen beobachtet und erschien innerhalb der de novo nicht limitiert oder bevorzugt.

### 3.7.3.1.8 Prognostische Relevanz der membranären Hsp70-Expression

Bei leukämischen Erkrankungen ist die molekulare Diagnostik im Gegensatz zu soliden Tumoren weit vorangeschritten. Das Ausmaß der genetischen Schädigungen, die bei den malignen Zellen feststellbar sind, wurde in umfangreichen Analysen mit dem Verlauf der leukämischen Erkrankung korreliert.

Bei den leukämie-assoziierten Karyotyp-Anomalien wurden drei Gruppen mit prognostisch günstigen, intermediären und ungünstigen Eigenschaften unterschieden.

Für die Untersuchungen zur Hsp70-Expression interessierte, ob sich eine Verbindung zur prognostischen Abschätzung herstellen ließe.

Nach ihrem Karyotyp wie zwölf der de novo AML-Aspirate prognostische günstige karyotypische Merkmale auf, 51 intermediäre und 17 prognostisch ungünstige.

Die Expression von Hsp70 umfasste 23,27% der prognostisch günstigen, 22,24% der prognostisch intermediären und 22,97% der prognostisch ungünstigen Aspirate (Tab.59). Die Unterschiede waren mit  $p=0,9573$  statistisch nicht signifikant.

Zum gleichen Ergebnis kam die Betrachtung der relativen Häufigkeit Hsp70-positiver Aspirate. Acht (67%) der prognostisch günstigen Fälle, 39 (76%) der intermediären und zwölf (71%) der prognostisch ungünstigen de novo akuten myeloischen Leukämien wiesen ein qualitativ positives durchflusszytometrisches Hsp70-Resultat auf. Die Unterschiede in der Frequenz waren mit  $p=0,7431$  statistisch nicht signifikant.

| Prognostische Einteilung<br>der de novo AML | Hsp70-Expression                     |                          |
|---|--------------------------------------|--------------------------|
|   | Hsp70 [%]                            | Frequenz<br>(Hsp70 > 5%) |
| günstig                                     | 23,27<br>(1,00-76,60;<br>$s=25,11$ ) | 8 / 12<br>67%            |
| intermediär                                 | 22,24<br>(0,00-93,57;<br>$s=20,31$ ) | 39 / 51<br>76%           |
| ungünstig                                   | 22,97<br>(0,97-98,00;<br>$s=25,28$ ) | 12 / 17<br>71%           |
| Signifikanz                                 | $p = 0,9573$ (n.s.)                  | $p = 0,7431$ (n.s.)      |

Tab.59: Hsp70-Expression auf prognostisch unterschiedenen de novo akuten myeloischen Leukämien mit Angabe der durchschnittlichen Messwerte, Minimal- und Maximalwerte einschließlich Standardabweichung ( $s$ ) und Angabe der Frequenz Hsp70-positiver Aspirate (Hsp70 > 5,00%)

### 3.7.3.2 Sekundäre akute myeloische Leukämie

Neben neu diagnostizierten und unbehandelten *de novo* akuten myeloischen Leukämien ging bei fünfzehn Patienten dem Ausbruch einer akuten myeloischen Leukämie ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) voraus, das sich u.a. durch einen im Vergleich zu gesundem Knochenmark erhöhten Blastenanteil von 5 bis 20 % auszeichnet. Diese Ausreifungsstörung entsteht ohne erkennbare Ursachen oder durch eine frühere stattgehabte antineoplastische Chemotherapie eines Tumorerkrankung.

Die Untersuchungen an den *de novo* akuten myeloischen Leukämien haben gezeigt, dass die myeloiden Marker, die mit der malignen blastären Population assoziiert sind, mit Ausnahme der fehlenden oder geringen Expression von HLA DR bei der akuten Promyelozytenleukämie keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Aus diesem Grunde und wegen des Gesamtstichprobenumfangs von N=15 wurden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zusammengefasst und auf eine Unterscheidung nach morphologisch orientierten FAB-Stadien verzichtet.

Im allgemeinen wird einer sekundären akuten myeloischen Leukämie ein prognostisch ungünstigerer Verlauf zugeschrieben. Bezuglich der karyotypischen Anomalien und der immunzytometrischen Charakterisierung gelten die gleichen Kriterien wie für die *de novo* AML.

Die Immunphänotypisierung erfolgte unter identischen Bedingungen wie bei *de novo* AML-Aspiraten. Nach der Französisch-amerikanisch-britischen Kooperation (FAB) gelten dieselben diagnostischen immunzytometrischen Vorgaben für die myeloiden Marker CD33, CD13, CDw65, CD117 (Bennett et al., 1976; 1985a; 1991). Bei den sekundären akuten myeloischen Leukämien wurden die oberflächenständigen Antigene CD33, CD13, HLA DR, MHC Klasse I neben Hsp70 immunzytometrisch quantifiziert.

#### 3.7.3.2.1 Immunphänotypisierung myeloider Marker auf sekundären akuten myeloischen Leukämien.

Die unten stehende Tabelle gibt die Resultate aus den Immunfärbungen mit den direktkonjugierten Immunmarkern CD33, CD13 und HLA DR von fünfzehn *sekundären* akuten myeloischen Leukämien wieder:

Bei den *sekundären* akuten myeloischen Leukämien stellte sich ein ähnliches Bild wie bei den *de novo* AML dar (Tab.60): Durchschnittlich konnten 58,38% der Zellen als mononuklear eingegrenzt werden. Der Anteil liegt ähnlich hoch wie bei der *de novo* AML mit 59,23% und deutlich über dem MNC-Anteil aus Aspiraten mit normaler Hämatopoiese (33,36%).

Als myeloide Marker wurden CD33 auf durchschnittlich 8,12%, CD13 auf 38,90% und HLA DR auf 35,29% der MNC detektiert. Während eine breite Expression von der CD13 und HLA DR gesehen wurde, fiel der Anteil CD33-positiver MNC mit 8,12 % vergleichsweise gering aus. Ursächlich hierfür ist möglicherweise ein Anteil an Aspiraten mit niedriger oder fehlender Expression von CD33.

| Klinische Subgruppe der akuten myeloischen Leukämie | Mononukleäre Zellen                      | Oberflächenmarker                      |  |  |
|---|--|--|--|--|
|   | MNC [%]                                  | CD33 [%]                               | CD13 [%]                                 | HLA DR [%]                               |
| sekundäre akute myeloische Leukämie                 | <b>58,38</b><br>(0,24-97,53;<br>s=28,78) | <b>8,12</b><br>(3,42-15,82;<br>s=4,81) | <b>38,90</b><br>(5,85-72,74;<br>s=27,31) | <b>29,17</b><br>(0,99-85,79;<br>s=31,19) |

Tab.60: Immunphänotypisierung sekundärer akuter myeloischer Leukämien: Durchschnittlicher Anteil mononukleärer Zellen (MNC) und deren durchschnittlicher Anteil, der für die myeloiden Marker CD33, CD13 und HLA DR ein positives durchflusszytometrisches Resultat lieferte.

Um die Einflüsse von individuellen Unterschieden in der Expression myeloider Marker auszugleichen, wurde die mononukleäre Zellpopulation, welche die malignen leukämischen Blasten enthielt, zugleich mit CD13, CD33 und HLA DR identifiziert.

### 3.7.3.2.2 Oberflächenmoleküle MHC Klasse I und Hsp70

Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen MHC Klasse I und gegen Hsp70 wurde die Expression der Antigene auf der Zelloberfläche der mononukleären Zellen indirekt durchflusszytometrisch analysiert.

Die durchschnittliche MHC-Klasse I-Expression betrug 59,36% (Tab.61). Die Messwerte lagen zwischen 0,80% und 99,00% (s=32,83) und ließen eine große Streuung erkennen. Die MHC-Klasse I-Expression lag geringfügig niedriger als bei der *de novo* AML mit durchschnittlich 70,07%.

Eine Down-Regulation von MHC-Molekülen (Pantel et al., 1991, Feenstra et al., 1999; Ritz et al., 2001) konnte in einzelnen Fällen der sekundären akuten myeloischen Leukämie anhand der Messergebnisse in Erwägung gezogen werden.

| Klinische Subgruppe der akuten myeloischen Leukämie | indirekt quantifiziertes Oberflächenantigen |  | Frequenz Hsp70-positiver Aspirate |
|---|---|--|-----------------------------------|
|   | MHC Klasse I [%]                            | Hsp70 [%]                                |                                   |
| sekundäre akute myeloische Leukämie                 | <b>59,36</b><br>(0,80-99,00;<br>s=32,83)    | <b>27,96</b><br>(1,00-89,46;<br>s=30,05) | <b>12 / 15</b><br>80 %            |

Tab.61: Immunphänotypisierung von sekundären akuten myeloischen Leukämien (sAML): Nachweis von MHC-Klasse I und Hsp70 auf der Zelloberfläche mononukleärer Zellen der sAML mit Angabe des durchschnittlichen positiven Anteils, Minimum, Maximum und der zugehörigen Standardabweichung (s) sowie der Anzahl der Aspirate mit einer Hsp70-Expression auf mehr als 5,00% der MNC.

Für die Expression von Hsp70 auf der Oberfläche mononukleärer Zellen wurden Einzelwerte zwischen 1,00 % und 89,46% gemessen. Der durchschnittliche Anteil mononukleärer Zellen, auf deren Oberfläche Hsp70 immunzytometrisch detektiert werden konnte, betrug 27,96% (s=30,05).

Legt man einen Schwellenwert von 5% zugrunde, so wiesen zwölf der fünfzehn Aspirate ein positives Hsp70-Resultat auf. Dies entspricht einer Frequenz von 80%.

### 3.7.3.2.3 Evaluation der prognostischen Relevanz der membranären Hsp70-Expression für die Prognostik für die sekundäre akute myeloische Leukämie

Die untersuchten sekundären akuten myeloischen Leukämien ließen sich nach ihrem Karyotyp in sechs intermediäre und neun prognostisch ungünstige Leukämien unterscheiden. Die durchschnittliche Hsp70-Expression betrug 42,08% in der ersten mit fünf von sechs (83%) Hsp70-positiven Aspiraten und 6,79% in der zweiten Gruppe mit sieben von neun (78%) Hsp70-positiven Aspiraten (Tab.62).

Mit  $p=0,0771$  bei der Immunphänotypisierung von Hsp70-positiven Zellen sowie  $p=0,9051$  bei der relativen Häufigkeit Hsp70-positiver Aspirate ( $>5\%$  Hsp70) waren die Unterschiede in beiden Fällen statistisch nicht signifikant.

Sekundäre akute myeloische Leukämien mit prognostisch günstigem Karyotyp standen nicht zur Verfügung.

| Prognostische Einteilung<br>der sekundären AML | Hsp70-Expression                            |                          |
|--|---|--------------------------|
|  | Hsp70 [%]                                   | Frequenz<br>(Hsp70 > 5%) |
| intermediär                                    | <b>42,08</b><br>(1,71-89,46;<br>$s=31,59$ ) | <b>5 / 6</b><br>83 %     |
| ungünstig                                      | <b>6,79</b><br>(1,00-12,00;<br>$s=3,65$ )   | <b>7 / 9</b><br>78 %     |
| Signifikanz                                    | <b>p = 0,0771 (n.s.)</b>                    | <b>p = 0,9051 (n.s.)</b> |

Tab.62: Expression von Hsp70 auf prognostisch unterschiedlichen sekundären akuten myeloischen Leukämien mit Durchschnittswert, Minimum, Maximum, Standardabweichung(s) sowie der Angabe der relativen Häufigkeit Hsp70-positiver Aspirate.

### 3.7.3.3 Rezidivierende akute myeloische Leukämie

Bei etwa der Hälfte der AML-Patienten wird nach dem Erzielen einer kompletten klinischen Remission (CR) durch die Induktionstherapie mit einem späteren Rezidiv der akuten myeloischen Leukämie gerechnet (Burnett, 2002). Nach einem Absinken desblastären Anteils auf unter 5% kommt es bei dem Rezidiv zu einem Wiederanstieg auf über 30% unreifer Blasten im Myelogramm und damit zum einem Wiederaufflammen der akuten myeloischen Leukämie.

Im Rahmen der Hsp70-Untersuchung konnte leukämisches Knochenmark von zehn Patienten mit rezidivierter akuter myeloischer Leukämie untersucht werden.

### 3.7.3.3.1 Quantifizierung der mononukleären Zellen und deren Expression leukämieassozierter Antigene

Die durchflusszytometrische Analyse ergab 66,85% mononukleäre Zellen mit einer Expression von des myeloiden Markers CD33 auf durchschnittlich 20,48% der MNC, CD13 auf 43,23% und HLA DR auf 32,29%. Die Streubereiche und Standardabweichungen sind der Tab. 63 zu entnehmen.

| Klinische Subgruppe der akuten myeloischen Leukämie | Mononukleäre Zellen                       | Oberflächenmarker                        |  |   |
|---|---|--|--|---|
|   | MNC [%]                                   | CD33 [%]                                 | CD13 [%]                                 | HLA DR [%]                                |
| rezidivierende akute myeloische Leukämie            | <b>66,85</b><br>(28,44-96,13;<br>s=24,96) | <b>24,45</b><br>(7,55-76,64;<br>s=22,10) | <b>43,23</b><br>(2,25-85,86;<br>s=33,03) | <b>32,29</b><br>(10,52-78,68;<br>s=27,54) |

Tab.63: Durchflusszytometrische Bestimmung der myeloiden Antigene CD33, CD13 und von HLA DR auf mononukleären Zellen aus Aspiraten der rezidivierten akuten myeloischen Leukämie mit Angabe des durchschnittlichen Anteils positiver Zellen, des Streubereichs und der Standardabweichung (s).

### 3.7.3.3.2 Immunphänotypische Quantifizierung von MHC Klasse I-Molekülen und Hsp70 bei der rezidivierten akuten myeloischen Leukämie

Die durchflusszytometrische Analyse (Tab.64) der rezidivierten akuten myeloischen Leukämie ergab MHC-positive mononukleäre Zellen zu durchschnittlich 61,52%. Die Quantifizierung mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1 ergab im Schnitt 23,78% Hsp70-positive mononukleäre Zellen in Knochenmarksaspiraten, bei denen ein Rezidiv der akuten myeloischen Leukämie diagnostiziert wurde. Die registrierten Maximal- und Minimalwerte sowie die Standardabweichung zeigt Tab.64 :

| Klinische Subgruppe der akuten myeloischen Leukämie | indirekt quantifiziertes Oberflächenantigen |  | Frequenz Hsp70-positiver Aspirate |
|---|---|--|-----------------------------------|
|   | MHC Klasse I [%]                            | Hsp70 [%]                                |                                   |
| rezidivierende akute myeloische Leukämie            | <b>61,52</b><br>(12,00-95,13;<br>s=31,51)   | <b>23,78</b><br>(3,63-99,20;<br>s=27,18) | <b>8 / 10</b><br>80 %             |

Tab.64: Durchflusszytometrisch ermittelte Expression von MHC-Klasse I-Molekülen und Hsp70 auf der Zelloberfläche von Blasten der rezidivierten akuten myeloischen Leukämie.

Bei einem Schwellenwert von 5% Hsp70-positiven mononukleären Zellen war ein positives durchflusszytometrisches Resultat in acht von zehn untersuchten Fällen nachweisbar (Tab.69).

### 3.7.3.4 Persistente akute myeloische Leukämie

Bei *persistenten* akute Leukämien führte die antineoplastische Chemotherapie allenfalls zu einer partiellen Remission, wobei die leukämischen Blasen anhaltend einen Anteil von mehr als 30% ausmachten. Aus dieser diagnostischen Gruppe der akuten myeloischen Leukämie standen drei Aspirate für die immunphänotypische Analyse zur Verfügung.

#### 3.7.3.4.1 immunphänotypische Quantifizierung leukämie-assozierter myeloischer Marker

Nach ihren Scattereigenschaften wurden durchschnittlich 54,37% mononukleäre Zellen charakterisiert. Die Immunphänotypisierung myeloider Antigene lieferte für CD33 auf 33,18%, für CD13 auf 12,54% und für HLA DR auf 47,61% der mononukleären Zellen ein positives Resultat (Tab.65).

| Klinische Subgruppe der akuten myeloischen Leukämie | Mononukleäre Zellen<br>MNC [%]               | Oberflächenmarker                           |   |  |
|---|--|---|---|--|
|   |  | CD33 [%]                                    | CD13 [%]                                    | HLA DR [%]                                   |
| <i>persistierende</i> akute myeloische Leukämie     | <b>54,37</b><br>(28,41-94,81;<br>$s=28,98$ ) | <b>33,18</b><br>(1,59-79,35;<br>$s=33,38$ ) | <b>12,54</b><br>(11,42-13,66;<br>$s=1,12$ ) | <b>47,61</b><br>(10,45-84,76;<br>$s=37,16$ ) |

Tab.65: Durchflusszytometrische Quantifizierung der mononukleären Zellen (MNC) und deren Antigenexpression von CD33, CD13 und HLA DR. Angegeben sind die Mittelwerte, Minima, Maxima und Standardabweichungen der durchflusszytometrischen Analysen.

#### 3.7.3.4.2 Expression von MHC Klasse I und Hsp70 auf der Zelloberfläche

Die Oberflächenmoleküle MHC Klasse I wurden im Mittel auf 71,53% der MNC identifiziert. Hsp70 wurde auf 43,32% der Zellen detektiert. Die Streubereiche, Minimal- und Maximalwerte einschließlich Standardabweichung gibt die Tabelle wieder (Tab.66).

Bewertet man die quantitativen Befunde der Hsp70-Expression nach dem Schwellenwert von 5%, so wies jede der drei Aspirate (100%) der persistenten AML ein qualitativ positives Ergebnis mit einem Hsp70-Befund auf mindestens 5% der MNC auf.

| Klinische Subgruppe der akuten myeloischen Leukämie | indirekt quantifiziertes Oberflächenantigen |   | <b>Frequenz Hsp70-positiver Aspirate</b> |
|---|---|---|--|
|   | MHC Klasse I [%]                            | Hsp70 [%]                                 |  |
| <i>persistierende akute myeloische Leukämie</i>     | <b>71,53</b><br>(24,30-99,38;<br>s=33,57)   | <b>43,32</b><br>(16,12-59,05;<br>s=19,31) | <b>3 / 3</b><br>100 %                    |

Tab.66: Durchflusszytometrische Charakterisierung der myeloiden Antigene CD33, CD13 und von HLA DR auf mononukleären Zellen aus Aspiraten der persistenten akuten myeloischen Leukämie mit Angabe des durchschnittlichen Anteils positiver Zellen, des Streubereichs, der Standardabweichungen (s) und der Frequenz Hsp70-positiver Aspirate (> 5% Hsp70).

### 3.7.3.4.3 Prognostische Relevanz der membranären Hsp70-Expression für die rezidivierte und persistente akuten myeloischen Leukämie

Die Rezidive und persistente akuten myeloischen Leukämien ließen sich zu zwei Exemplaren mit günstigem Karyotyp, sieben mit prognostisch intermediärem und vier mit prognostisch ungünstigem Karyotypprofil zusammenfassen.

Bei den prognostisch günstigen Fällen lag die durchschnittliche Expression von Hsp70 bei 43,09% (1 von 2 Fällen positiv, 50%) (Tab.67), bei den prognostisch intermediären Fällen bei 61,52% (7 von 7 Fällen positiv, 100%) und bei den prognostisch ungünstigen bei 71,53% (drei von vier Fällen positiv, 75%). Die Unterschiede in der Expression von Hsp70 waren mit p= 0,0685 bzw. 0,1829 statistisch nicht signifikant.

Der Karyotyp gilt klinisch neben der initialen Leukozytose und dem Alter als wichtiges prognostisches Kriterium (Lübbert, 2002). Eine Tendenz zur vermehrten Expression bei intermediären und ungünstigem karyogenetischen Risikoprofil wurde für die Hsp70-Expression gesehen, konnte jedoch statistisch nicht abgesichert werden.

Diese Resultate zur prognostischen Relevanz von Hsp70 bei akuten myeloischen Leukämien deckte sich mit den Untersuchungen von Legrand et al. (2000), die in univariater Analyse eine bedingte günstige prognostische Relevanz in der Ausprägung eines „panmyeloiden Immunphänotyps“, d.h. aller myeloiden Antigene CD13, CD33, CDw65, CD117 gesehen hatten. In der multivariaten Analyse zeigte sich eine Unterlegenheit der Aussagefähigkeit der prognostischen Relevanz anhand der Markerexpression.

Ins Kalkül müssen weitere klinische Risikofaktoren, wie Alter und Leukosegrad gezogen werden (Legrand et al., 2000).

Dem Karyotyp kommt als molekularem onkologischen Marker eine eigenständige prognostische Bedeutung zu (Slovac et al., 2000) die in diagnostischer Hinsicht gegenüber der Antigen-Detektion überwiegt.

| Prognostische Einteilung der rezidivierten und persistenten AML | Hsp70-Expression                          |                          |
|---|---|--------------------------|
|   | Hsp70 [%]                                 | Frequenz (Hsp70 > 5%)    |
| giinstig  | <b>43,09</b><br>(2,55-99,03;<br>s=26,69)  | <b>1 / 2</b><br>50%      |
| intermediär   | <b>61,52</b><br>(12,00-95,13;<br>s=31,51) | <b>7 / 7</b><br>100%     |
| ungünstig   | <b>71,53</b><br>(24,30-99,38;<br>s=33,57) | <b>3 / 4</b><br>75%      |
| Signifikanz   | <b>p = 0,0685 (n.s.)</b>                  | <b>p = 0,1829 (n.s.)</b> |

Tab.67: Expression von Hsp70 auf prognostisch unterschiedlichen rezidivierten und persistenten akuten myeloischen Leukämien mit Durchschnittswert, Minimum, Maximum, Standardabweichung (s) sowie der Angabe der relativen Häufigkeit Hsp70-positiver Aspirate.

### 3.7.3.5 Vergleich der Markerexpression zwischen klinisch distinkten Subtypen

#### 3.7.3.5.1 Expression leukämieassozierter Marker bei klinisch-diagnostischen Subgruppen der akuten myeloischen Leukämie

Wie die im folgenden abgebildete Tabelle zeigt, waren weder der Anteil mononukleärer Zellen, noch die Unterschiede der Markerexpression von CD33, CD13 und HLA DR statistisch signifikant (Tab.68).

Man kann daraus folgern, dass die Merkmale bei allen Subtypen der akuten myeloiden Leukämie ähnlich verhalten.

| Klinische Subgruppe der akuten myeloischen Leukämie | Mononukleäre Zellen      | Oberflächenmarker        |                          |                          |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|   |                          | CD33 [%]                 | CD13 [%]                 | HLA DR [%]               |
| de novo akute myeloische Leukämie                   |                          |                          |                          |                          |
| sekundäre akute myeloische Leukämie                 |                          |                          |                          |                          |
| rezidivierende akute myeloische Leukämie            | <b>p = 0,8767 (n.s.)</b> | <b>p = 0,3684 (n.s.)</b> | <b>p = 0,7663 (n.s.)</b> | <b>p = 0,7786 (n.s.)</b> |
| persistierende akute myeloische Leukämie            |                          |                          |                          |                          |

Tab.68: Signifikanz der durchflusszytometrischen Parameter MNC, CD33-, CD13- und HLA DR-Expression bei klinisch-diagnostisch distinkten Formen der akuten myeloischen Leukämie.

### 3.7.3.5.2 Membranäre Expression von MHC Klasse I und Hsp70 bei klinisch-diagnostischen Subgruppen der akuten myeloischen Leukämie

| Klinische Subgruppe der akuten myeloischen Leukämie | indirekt quantifiziertes Oberflächenantigen |                   | Frequenz Hsp70-positiver Aspirate |
|---|---|-------------------|-----------------------------------|
|   | MHC Klasse I [%]                            | Hsp70 [%]         |                                   |
| <i>de novo</i> akute myeloische Leukämie            |   |                   |                                   |
| <i>sekundäre</i> akute myeloische Leukämie          |   |                   |                                   |
| <i>rezidivierende</i> akute myeloische Leukämie     | p = 0,6067 (n.s.)                           | p = 0,4480 (n.s.) | p = 0,7089 (n.s.)                 |
| <i>persistierende</i> akute myeloische Leukämie     |   |                   |                                   |

Tab.69: Signifikanz der durchflusszytometrischen Parameter von MHC-Klasse I und Hsp70 auf der Oberfläche leukämischer Blasen der akuten myeloischen Leukämie bei klinisch-diagnostisch unterschiedlichen Subtypen.

Ebenso wie bei den bekannten leukämie-assoziierten Markern CD33, CD13 und HLA DR wurde auch die Ausprägung der MHC-Klasse I- und Hsp70-Expression statistisch überprüft.

Wie in der Tab.69 dargestellt, waren sowohl die prozentualen Anteile MHC Klasse I- und Hsp70-positiver Zellen als auch die Häufigkeit „Hsp70-positiver Aspirate“ jeweils statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

Aus den oben dargestellten Resultaten kann abgeleitet werden, dass Hsp70-positive Aspirate bei allen klinisch relevanten Subtypen der akuten myeloischen Leukämie wiedergefunden wurde. Sie unterschieden sich weder in ihrer absoluten Anzahl Hsp70-positiver Zellen statistisch signifikant noch in der relativen Häufigkeit Hsp70-positiver Aspirate, wenn ein Schwellenwert von 5,00% Hsp70-positiver Zellen zugrunde gelegt wurde.

### 3.7.3.6 Vergleich der Expression von Hsp70 bei der akuten myeloischen Leukämie und bei nicht-leukämischen Knochenmarksaspiraten

Anhand der durchflusszytometrischen Untersuchungen an mononukleären Zellen von gesunden Spendern und von Patienten mit AML in kompletter Remission konnte beobachtet werden, dass die durchschnittliche detektierte Expression von Hsp70 5% nicht überstieg.

Dieser quantitative immunzytometrische Befund korrelierte mit der mikroskopischen Differentialblutbildanalyse, die bei den Patienten Blasen ebenfalls zu höchstens 5% auswies.

Anders bei den akuten myeloischen Leukämien: Dort überstieg der morphologisch determinierte Anteil der Blasen 30%. Nicht in allen Fällen, jedoch bei über 74% der de

novo AML, 67% der sekundären akuten myeloischen Leukämien, 80% der rezidivierten akuten myeloischen Leukämien und 100% der persistierenden Leukämien war eine Expression von Hsp70 auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch auf mindestens 5% der MNC nachweisbar.

Es wurde nicht untersucht, inwiefern der mikroskopisch ermittelte und diagnostisch wichtige Anteil blastärer Zellen mit der Hsp70-Expression korrelierte.

Die klinische Relevanz der Merkmalsexpression von Hsp70 wurde anhand der Gegenüberstellung von nicht-leukämischen Knochenmarksaspiraten mit normal verlaufender Hämatopoese und leukämischen Aspiraten mit aberrant hohenblastären Anteilen analysiert.

Die durchflusszytometrisch ermittelten durchschnittlich Hsp70-positiven Zellen der *de novo* AML verhielten sich mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von  $p=0,0005(*)$  statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber den nicht-malignen Vergleichsanalysen (Tab.70). Bei den sekundären akuten myeloischen Leukämien betrug der Unterschied  $p=0,0108(*)$ , bei den rezidivierten AML-Fällen  $p=0,0006(*)$  und bei den persistierenden akuten myeloischen Leukämien  $p=0,0055(*)$ .

Ein gleichfalls statistisch signifikanter Unterschied wurde bei dem Vergleich der Häufigkeit Hsp70-positiver Aspirate bei der *de novo* akuten myeloischen Leukämien und nicht-malignen Vergleichsproben beobachtet mit  $p=0,0300(*)$ .

| Vergleich von akuten Leukämien mit Aspiraten normaler Hämatopoese | Signifikanz      |                       |
|---|------------------|-----------------------|
|   | Hsp70 [%]        | Frequenz (Hsp70 > 5%) |
| <i>de novo</i> akute myeloische Leukämie                          | $p = 0,0005 (*)$ | $p = 0,0300 (*)$      |
| sekundäre akute myeloische Leukämie                               | $p = 0,0108 (*)$ | $p = 0,641$ (n.s.)    |
| rezidivierende akute myeloische Leukämie                          | $p = 0,0006 (*)$ | $p = 0,1149$ (n.s.)   |
| persistierende akute myeloische Leukämie                          | $p = 0,0055 (*)$ | $p = 0,1927$ (n.s.)   |

Tab.70: Signifikanz der Hsp70-Expression und relative Häufigkeit Hsp70-positiver durchflusszytometrischer Resultate bei klinischen Subgruppen der akuten myeloischen Leukämie.

Keine signifikanten Unterschiede ergab der Vergleich der Häufigkeiten Hsp70-positiver Aspirate bei der *sekundären* AML  $p=0,641$ , bei der *rezidivierten* AML  $p=0,1149$  und bei der *persistenten* AML  $p=0,1927$ , als ein statistischer Vergleich mit dem Chiquadrat-Mehrfeldertest durchgeführt wurde.

Die statistischen Berechnungen legten nahe, dass der Anteil Hsp70-positiver Zellen ein Kriterium darstellte, in welchem sich die *akuten malignen* von den *nicht-malignen* Aspiraten signifikant unterschieden haben.

Während bei der *de novo* AML auch die Häufigkeit signifikant unterschiedlich ausgeprägt war, zeigte sich dies bei den weiteren klinischen Subtypen der AML lediglich im Hinblick auf den quantitativen Umfang der Hsp70-Expression.

Die insgesamt grenzwertig geringen Stichprobenumfänge bei den sekundären, rezidivierten und persistenten akuten myeloischen Leukämien mochten zu einem nicht-signifikanten Ergebnis beigetragen haben.

Dennoch konnte aus dem Vergleich der Gruppen maligner und nicht-maligner Aspirate eine Tumorassoziation der membranären Expression von Hsp70 abgeleitet werden.

### 3.7.3.7 Validität der durchflusszytometrischen Hsp70-Analyse bei akuten myeloischen Leukämien

Anhand der 59 von 80 Hsp70-positiven *de novo* AML-Aspiraten ergab sich eine Sensitivität von 74% (Tab.76). Aus den zwölf von 15 Hsp70-positiven Aspiraten der sekundären akuten myeloischen Leukämien errechnete sich eine Sensitivität von 80%, ebenso aus acht von zehn rezidivierten akuten myeloischen Leukämien. Die drei Stichproben der persistierenden akuten myeloischen Leukämie wiesen jeweils eine Hsp70-Expression von mehr als 5,00% der MNC auf und ergaben eine Sensitivität von 100% (Tab.71).

| Klinische Subgruppe der akuten myeloischen Leukämie | Hsp70-Immunphänotypisierung |            |                            |                            |
|---|-----------------------------|------------|----------------------------|----------------------------|
|   | Sensitivität                | Spezifität | positiver prädiktiver Wert | negativer prädiktiver Wert |
| <i>de novo</i> akute myeloische Leukämie            | 74 %                        | 64 %       | 94 %                       | 25 %                       |
| sekundäre akute myeloische Leukämie                 | 80 %                        | 64 %       | 75 %                       | 70 %                       |
| rezidivierende akute myeloische Leukämie            | 80 %                        | 64 %       | 67 %                       | 78 %                       |
| persistierende akute myeloische Leukämie            | 100 %                       | 64 %       | 43 %                       | 100 %                      |

Tab.71: Validität der durchflusszytometrischen Hsp70-Bestimmung bei der akuten myeloischen Leukämie.

Die Spezifität ergab aus sieben von elf Hsp70-negativen Knochenmarksanalysen von Leukämiepatienten in kompletter klinischer Remission (CR) und Vergleichsproben ohne maligne Erkrankung eine Spezifität von 64%.

Die positiven prädiktiven Werte lagen zwischen 43% und 94%, die negativen prädiktiven Werte der durchflusszytometrischen Hsp70-Analyse.

Um die immunphänotypischen Resultate zur Expression von Hsp70 auf der Oberfläche von leukämischen Blasten der akuten myeloischen Leukämie weiter abzusichern, wäre

eine weitergehende Untersuchung von nicht-malignen Vergleichsproben erforderlich, wie beispielsweise inflammatorische Prozesse miteinschließen.

Die Spezifität der Analyse ließe sich ferner steigern, indem der direktkonjugierte Antikörper auch im Falle der leukämischen Analysen zum Einsatz gebracht wird.

### 3.7.4 Potenzielle klinische Relevanz

Die durchflusszytometrischen Analysen bestätigten die membranäre Expression von Hsp70 bei leukämischen Knochenmarksaspiraten der AML, wie sie von Multhoff et al. (1997a) auf der humanen leukämischen Zelllinie K562 beschrieben wurde.

Zugleich zeigten sich signifikant höhere Anteile Hsp70-positiver Zellen bei leukämischen Aspiraten im Vergleich zu nicht-malignen Vergleichsproben, die auf eine Assoziation von Hsp70 mit der akuten Leukämie schließen ließen.

Bekannte leukämie-assozierter myeloide Marker sind insofern limitiert, als sie alle ebenso auf nicht-malignen Zellen vorkommen können (Rothe und Schmitz, 1996), wobei durchflusszytometrisch die diagnostische Aussagefähigkeit in der Beschreibung quantitativer oder qualitativer aberranter Expressionsmuster liegt (Campana und Behm, 2000; Plata et al., 2000).

Die vorliegende Untersuchung konnte zeigen, dass die Hinzunahme von Hsp70 ein diagnostisch hilfreiches, zusätzliches Tool sein kann, um anhand der quantitativen Expression von Hsp70 als Oberflächenmarker Aussagen zur Dignität der Zellen zu gewinnen. Eine Koexpression der myeloiden Marker CD33, CD13 sowie HLA DR mit Hsp70 konnte durchflusszytometrisch anhand von Mehrfachfärbungen belegt werden.

Die Frage nach der ausschließlichen Expression von Hsp70 auf Zellen, die immunphänotypisch anhand ihrer vorgegebenen leukämieassoziierten Antigene charakterisiert waren, musste offen bleiben.

Vielmehr zeigte sich in der analytischen Praxis eine bekannte Diversität sowohl in der quantitativen Merkmalsausprägung aller untersuchten Antigene CD13, CD33, CD117, HLA DR und MHC Klasse I (Terstappen et al., 1991; 1992).

Einzig die Quantifizierung der HLA DR-Moleküle führte zu einem signifikant unterschiedlichen Resultat innerhalb der de novo akuten myeloischen Leukämien. Dieser Befund war im wesentlichen auf die Untersuchung des AML-Subtyp der Promyelozytenleukämie (AML M3) zurückzuführen, für welche eine verminderte Expression von HLA DR publiziert ist (Campana und Behm, 2000).

In mehreren Analysen konnte dem Karyotyp (Grignardi et al., 1993; Bloomfield et al., 1998; Grimwade et al., 1998; 2001; Slovac et al., 2000) eine –teils unabhängige– klinisch-prognostische Relevanz beigemessen werden. Im Hinblick auf die prognostische Relevanz von membranständigem Hsp70 konnte eine tendenzielle Zunahme bei intermediären und ungünstig eingestuften Leukämien beobachtet werden, welche nicht signifikant war. Die 1-Jahres-Überlebensrate war bei Hsp70-positiven

akuten myeloischen Leukämien vermindert, was als weiteres Indiz für eine ungünstige Prognose gewertet werden könnte (Gehrman et al., 2003).

Weitere klinische relevante Risikofaktoren stellen unter anderem aus dem Erkrankungsalter, dem FAB-Subtyp der Leukämie, der Leukozytose dar (Harrison, 1999; Lübbert, 2002).

Legrand et al., 2000 ermittelten eine bedingt günstigere Prognose bei akuten myeloischen Leukämien, bei welchen die fünf myeloiden Antigene Myeloperoxidase, CD13, CD33, CDw65 und CD117 koexprimiert sind.

Die Bedeutung der Expression einzelner molekularer Marker im Hinblick auf die Prognose im Rahmen des klinischen Gesamtgeschehens („clinical outcome“) wurde kontrovers beurteilt (Campos et al., 1992; 1993; De Nully Brown et al., 1997; Legrand et al., 2000).

Der klinisch diagnostische Nutzen der Durchflusszytometrie der AML wird neben der hämatologischen Diagnostik vor allem in der Kontrolle des Verlaufs der Erkrankung gesehen und in der Detektion einer minimalen Resterkrankung (MRD) (Campana und Pui, 1995; Campana und Coustan-Smith, 1996; Liu Lin et al., 1999; Kern und Schnittger, 2003). Die Integration des Hsp70-spezifischen Antikörpers cmHsp70.1 in ein hämatologisches Routinepanel würde einen zusätzlichen diagnostischen Benefit erbringen.

Die Besonderheit des oberflächenständigen Hitzeschockproteins Hsp70 darin, dass es zugleich als therapeutische Zielstruktur fungieren kann. Multhoff et al. (1997b) zeigten, dass Hsp70 als Zielstruktur für natürliche Killerzellen in Frage kommt. Zusammen mit den geschilderten Resultaten zur membranständigen Expression bei der akuten myeloischen Leukämie (Hantschel et al., 2000, Gehrman et al., 2003) ergibt sich eine Basis für eine zelluläre, d.h. NK-Zell-basierte, aktive Immuntherapie gegen Hsp70-positive akute myeloide Leukämien.

Ebenso wäre möglich, den Hsp70-spezifischen Antikörper cmHsp70.1 als Therapeutikum im Rahmen einer passiven Immuntherapie einzusetzen. Ein derartiges Wirkprinzip wird praktisch angewendet in der therapeutischen Gabe des CD33-spezifischen Antikörpers Gemtuzumab-Ozogamicin bei der akuten Promyelozytenleukämie (Larson et al., 2002; Tomblyn und Tallman, 2003). Die hohe Frequenz von Hsp70-positiven AML-Aspiraten (Hantschel et al., 2000; Gehrman et al., 2003) lässt an eine Ausschöpfung dieses Therapieprinzips ebenfalls denken.



## 4 Zusammenfassung

In laborexperimentellen Arbeiten von Multhoff und Botzler wurde eine Lokalisation des Hitzeschockproteins Hsp70 auf der Zelloberfläche von humanen Tumorzelllinien entdeckt. Die Präsenz des Hitzeschockproteins Hsp70 auf der Zelloberfläche humaner Tumorzelllinien geht einher mit der Erkennung durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und einer antitumoralen Immunantwort (Multhoff et al., 1995; 1997b).

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die klinische Relevanz der Expression des Hitzeschockproteins 70 kDa (Hsp70) als oberflächenständigen Marker für maligne Tumore zu ermitteln.

Während für die Analyse von Oberflächenantigenen auf Tumorzelllinien biochemische und mikroskopische Methoden verfügbar waren, galt es, die Durchflusszytometrie, die für die Analyse von Einzelzellen ausgelegt ist, nicht nur für die Untersuchung von leukämischem Knochenmark heranzuziehen, sondern vor allem ihre Anwendbarkeit zur Analyse von soliden Tumor- und Normalgeweben zu prüfen.

Evaluiert werden mussten die Präparation von Einzelzellen, die Auswahl der mituntersuchten Oberflächenantigene sowie die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen, die eine Aussage zur Oberflächenexpression von Hsp70 auf Tumorzellen ermöglichten.

### Durchflusszytometrische Analyse von soliden Gewebebiopsien

Für die durchflusszytometrische Analyse von Gewebebiopsien wurden Einzelzellen durch kurzeinwirkende, nicht-enzymatische, manuelle Disaggregation aus den Gewebebiopsien isoliert. Die Vitalität korrelierte mit der Konsistenz des Gewebes, wobei entitätenübergreifend aus medullären Karzinomen höhere Anteile vitaler Zellen als aus einfachen beziehungsweise szirrhösen Karzinomen präpariert werden konnten. Erhöhte Anteile vitaler Zellen wurden auch gegenüber Normalgewebe desselben Organs beobachtet.

Die Detektion von MHC-Klasse I-Molekülen auf den vitalen Zellen diente als Positivkontrolle für die ebenfalls immunphänotypische Analyse des Hitzeschockproteins Hsp70 als Oberflächenantigen. Ein Vergleich von Tumor- und Normalgewebe ergab einen signifikant höheren Anteil der MHC-Klasse I-Expression bei malignen Aspiraten (78,08% gegenüber 66,48% ( $p=0,011^*$ )). Bindegewebige Anteile wurden immunphänotypisch mit dem Fibroblastenmarker AS02 quantifiziert, wobei dieser Marker im Durchschnitt bei malignen (11,90%) und nicht-malignen Biopsien (11,01%) keine signifikanten Unterschiede zeigte ( $p=0,4328$ ). Unterschiedlich indes verhielten sich die über ihr Oberflächenantigen CD45 quantifizierten Leukozyten, die bei nichtmalignen Biopsien 14,14% und bei Tumoren im Mittel 23,73% der Zellen ausmachten ( $p=0,0248^*$ ).

Durchschnittlich 6,94% betrug der Anteil Hsp70-positiver vitaler Einzelzellen aus malignen kolorektalen Biopsien im Vergleich zu nicht-malignen kolorektalen Biopsien mit 2,28% ( $p<0,0001^*$ ).

Zusätzlich wurden tumorinfiltrierende Leukozyten über ihren Marker CD45 und bindegewebige Anteile mit dem spezifischen Antikörper AS02 charakterisiert. Die Expression des letzteren Markers korrelierte mit der makroskopisch definierten Karzinomart bei den untersuchten Tumorentitäten des kolorektalen Karzinoms, des Magenkarzinoms und des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms.

Von insgesamt 159 untersuchten kolorektalen Tumorbiopsien wiesen 73 eine durchflusszytometrisch detektierte Expression von Hsp70 auf mehr als 5,00% der Zellen auf. Dies entspricht einer Sensitivität von 46%.

Aus 66 von 69 Hsp70-negativen untersuchten kolorektalen Normalschleimhautbiopsien ergab sich eine Spezifität von 96%.

Operable hepatische Metastasen kolorektaler Karzinome konnten in die durchflusszytometrische Untersuchung miteingeschlossen werden, wobei 12 von 22 eine Hsp70-Expression auf der Zelloberfläche von mehr als 5% der Einzelzellen zeigten. Hieraus errechnete sich eine Sensitivität von 55%, die bei den Metastasen der fortgeschrittenen kolorektalen Tumore eine leichte Zunahme der Hsp70-Expression gegenüber den kolorektalen Primärtumoren andeutete.

Innerhalb der Gruppe gastrointestinaler Tumore wurden auch Magenkarzinome untersucht, wobei elf von 24 Biopsien eine Expression des Hitzeschockproteins auf mehr als 5% der Einzelzellen aufwiesen. Die Sensitivität entspricht derjenigen der kolorektalen Karzinome mit 46%.

Aufgrund der Hsp70-positiv getesteten humanen Bronchialkarzinomzelllinie LX (Botzler et al., 1996) wurden Bronchialkarzinobiopsien durchflusszytometrisch analysiert.

Es konnte eine Hsp70-Expression auf mehr als 5,00% der Einzelzellen bei 56 der 74 nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome ermittelt werden, was zu einer Sensitivität von 76% führte. Nach ihrer histologischen Klassifikation wiesen bronchiolo-alveoläre Karzinome mit vier von vier untersuchten Biopsien den höchsten Anteil Hsp70-positiver Biopsien auf, gefolgt von Plattenepithelkarzinomen (29 von 34, entsprechend 85%) und den Adenokarzinomen (14 von 22, entsprechend 64%). Eine Oberflächenexpression von Hsp70 konnte auch bei vorbehandelten nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen beobachtet werden, wobei in sieben von neun (78%) der untersuchten Proben mehr als 5,00% Hsp70-positive Zellen detektiert wurden.

Auf dem Sektor der Kopf-Hals-Tumore konnten 44 Biopsien untersucht werden, von denen 28 Tumore mindestens 5% Hsp70-positive Einzelzellen enthielten. Zur Verwendung als oberflächenständiger Tumormarker für Kopf-Hals-Tumore ergab sich bei einem Cut off-Value von 5,00 eine Spezifität von 50% und eine Tumorsensitivität von 64%.

---

Die vorliegende Arbeit möchte zeigen, dass die durchflusszytometrische Analyse auch auf Einzelzellen aus soliden Geweben angewandt werden kann, um Oberflächenantigene zu identifizieren und zu quantifizieren.

#### Durchflusszytometrische Analyse von Knochenmarksaspiraten und peripheren Blutproben

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) wurden die Oberflächenantigene MHC-Klasse I und Hsp70 in indirekter Konjugation durchflusszytometrisch analysiert und mit den myeloiden Markern CD33, CD13 oder HLA DR kombiniert, um eine etwaige membranständige Hsp70-Expression dem malignen Immunphänotyp zuordnen zu können.

Die Detektion von Hsp70 auf der Zelloberfläche leukämischer Zellen zeigte einen signifikanten Unterschied gegenüber nicht-malignen Vergleichsproben, d.h. Knochenmark oder periphere Blutproben gesunder Spender: *de novo* AML ( $p=0,0006^*$ ), *sekundäre* AML ( $p=0,0113^*$ ), *rezidivierende* AML ( $p=0,0005^*$ ) und *persistierende* AML ( $p=0,035^*$ ). Legte man einen Schwellenwert von 5,00% für die membranäre Expression von Hsp70 zugrunde, so ergab sich bei der *de novo* akuten myeloischen Leukämie (AML) eine Sensitivität von 74% bei einer Spezifität von 80%. Ein Hsp70-Befund wurde unabhängig vom mikroskopisch definierten Subtyp der AML nach FAB und der karyotypisch definierten Prognostik vorgefunden. Gleichfalls positive Resultate lieferte die durchflusszytometrische Analyse zur Hsp70-Expression von therapiebedingten, *sekundären* und *rezidivierten* akuten myeloischen Leukämien, jeweils mit einer Sensitivität von 80% sowie *persistenteren* akuten myeloischen Leukämien mit einer festgestellten Sensitivität von 100%.

Neben seiner Möglichkeiten für einen pathologischen und diagnostischen Einsatz kommt das oberflächenständige Hitzeschockprotein Hsp70 auch für eine antitumorale Immuntherapie in Frage.

Der positive Nachweis der Hsp70-Expression auf malignen Einzelzellen konnte somit nicht nur auf humanen Tumorzelllinien, sondern auch auf Tumorzellen aus Tumorbiopsien bestätigt werden. Gegenüber nicht-malignen Vergleichsproben desselben Organs unterschieden sich maligne Tumore durch eine deutlich verstärkte Hsp70-Expression.



## Bibliographie

1. Abrams J., Doyle L.A., Aisner J.: *Staging, prognostic factors, and special considerations in small-cell lung cancer.* Semin Oncol **1988**; 15: 261-277
2. Allgayer H., Heiss M.M.: *Minimal residual disease in solid cancer. Prognostic value and therapeutic consequences.* Fortschr Med Orig. **2001**; 119:1-4
3. Allgayer H.: *Molecular regulation of urokinase-receptor gene expression as one potential concept for molecular staging and therapy.* Recent Results Cancer Res. **2003**; 162:15-30.
4. Almadori G., Galli J., Cadoni G., Bussu F., Maurizi M.: *Human papillomavirus infection and cyclin D1 gene amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: biologic function and clinical significance.* Head Neck **2002**; 24: 597-604
5. Baisse B., Bouzourene H., Saraga E.P., Bosman F.T., Benhatar J.: *Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma.* Int J Cancer 2001; 93: 346-352
6. Baldus S.E., Schneider P.M., Monig S.P., Zirbes T.K., Fromm S., Meyer W., Glossmann J., Schuler S., Thiele J., Holscher A.H., Dienes H.P.: *p21/waf1/cip1 in gastric cancer: associations with histopathological subtypes, lymphonodal metastasis, prognosis and p53 status.* Scand J Gastroenterol **2001**; 36:975-980
7. Becker K., Böttcher K., Bumm R., Dittler H.J., Fink U., Janetschek P. et al. *Magenkarzinome.* In: Roder J.D., Hrsg.. Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. München: **1997**; 116-139.
8. Becker N., Wahrendorf J.: *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland/ Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republic of Germany 1981-1990,* Springer, Berlin, 3.Aufl., **1998**.
9. Bene M., Bernier M., Castoldi G., Faure G., Knapp W., Ludwig W., Matutes E, Orfao A, van't Veer M.: *Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias.* Haematologia **1999**; 84: 1024-1034
10. Bene M.C., Bernier M., Casasnovas R.O., et al.: for the European Group of the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL): *Proposal for the immunological classification of acute leukemias.* Leukemia. **1995**; 9: 1783-1786

11. **Bennett J.M.**, Catovsky D., Daniel M.T., et al.: *Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7): a report of the French-American-British (FAB) Cooperative Group.* Ann. Intern Med. **1985b**; 103:460-462
12. **Bennett J.M.**, Catovsky D., Daniel M.T., et al.: Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). Br J Haematol. 1991; 78:325- 329
13. **Bennett J.M.**, Catovsky D., Daniel M.T., et al.: *Proposals for the classification of the acute leukemias: French-American-British (FAB) cooperative group.* Br. J. Haematol. **1976**; 33:451-458
14. **Bennett J.M.**, Catovsky D., Daniel M.T., et al.: *Proposed revised criteria for the classification of the acute leukemias: a report of the French-American-British (FAB).* Cooperative Group. Ann. Intern Med. **1985a**; 103: 620-625
15. **Bier H.**, Ganzer U., Müller R.P.: *Oropharynxkarzinom.* In: Schmitt G. (Hrsg.): Onkologie systematisch. Uni-med, Bremen, **1999a**: 256-261.
16. **Bier H.**, Ganzer U., Schnabel T.: *Hypopharynxkarzinom.* In: Schmitt G., Hrsg.. Onkologie systematisch, Uni-med, Bremen, 1999b: 262-265.
17. **Bishop P.C.**, Myers T., Robey R., Fry D.W., Liu E.T., M.V., Blagosklonny., Bates S.E.: *Differential sensitivity of cancer cells to inhibitors of the epidermal growth factor receptor family.* Oncogene **2002**; 21: 119-127
18. **Böcker W.**, Denk H., Heitz Ph.U.: *Pathologie*, , Urban & Fischer, München, 2. Aufl., 2001: S. 17
19. **Bodmer W.F.**, Bailey C.J., Bodmer J., Bussey H.J., Ellis A., Gorman P., Lucibello F.C., Murday V.A., Rider S.H., Scambler P., et al.: *Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5.* Nature **1987**; 328: 614-6
20. **Bokemeyer C.**, Kollmannsberger C., Burkart C., Lamberts R., Grund K. E., Pereira P., Günther E., Plasswilm L., Hebart H., Sökler M., Käfer G., Wehrmann M., Keller-Matschke K., Zittel T., Koch G.: **Magenkarzinom.** [www.medizin.uni-tuebingen.de/itz/itzgrup.html](http://www.medizin.uni-tuebingen.de/itz/itzgrup.html) vom 25.12.02
21. **Borowitz M.J.**, Guenther K.L., Shults K.E., Stelzer G.T.: *Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right angle light scatter to gate on leukemic blasts in three color analysis.* Am J Clin Pathol **1993**; 100: 534-540
22. **Borrow J.**, Goddard A.D., Gibbons B., Kata P., Swirsky D., Floretos T., Dube L., Winfield D.A., Kingston J., Hagemeijer A., Rees K.H.J., Lister T.A., Solomon E.: *Diagnosis of acute promyelocytic leukemia by RT-PCR: detection of PML-RARA and RARA-PML fusion transcripts.* Br J Hematol **1992**; 82: 529-540

- 
23. **Botzler C.**, Ellwart J., Gunther W., Eissner G., Multhoff G.: *Synergistic effects of heat and ET-18-OCH<sub>3</sub> on membrane expression of hsp70 and lysis of leukemic K562 cells.* Exp Hematol **1999**; 27(3):470-478.
24. **Botzler C.**, Issels R., Multhoff G.: *Heat shock protein 72 cell surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells.* Cancer Immunol Immunother **1996**; 43: 226-230
25. **Botzler C.**, Li G., Issels R.D., Multhoff G.: *Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response.* Cell Stress Chaperons **1998a**; 3: 6-11
26. **Botzler C.**, Schmidt J., Luz A., Jennen L., Issels R., Multhoff G.: *Differential Hsp70 plasma-membrane expression on primary human tumors and metastases in mice with severe combined immunodeficiency.* Int J Cancer **1998b**; 77(6):942-948.
27. **Braakhuis B.J.**, Tabor M.P., Kummer J.A., Leemans C.R., Brakenhoff R.H.: *A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications.* Cancer Res. **2003**; 63:1727-1730
28. **Brabender J.**, Danenberg K.D., Metzger R., Schneider P.M., Park J., Salonga D., Hölscher A., Danenberg P.: *Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer Is correlated with survival.* Clin Cancer Res **2001**; 7: 1850-1855
29. **Browman G.P.**, Hodson D.I., Mackenzie R.J., Bestic N., Zuraw L.,(Cancer Care Ontario Practice Guideline Initiative Head and Neck Cancer Disease Site Group): *Choosing a concomitant chemotherapy and radiotherapy regimen for squamous cell head and neck cancer: A systematic review of the published literature with subgroup analysis.* Head Neck **2001**; 23: 579-589
30. **Buccheri V.**, Shetty V., Yoshida N., Morilla R., Matutes E., Catovsky D.: *The role of an anti-myeloperoxidase antibody in the diagnosis and classification of acute leukemia: a comparison with light and electron microscopy cytochemistry.* Br. J. Haematol **1992**; 80: 62-68
31. **Büchner T.**: *Akute myeloische Leukämie.* In: Ostendorf P. , Seeber S., Hämatologie, Onkologie. **1997**: S. 463-474
32. **Büchner T.**, Lechner K., Schwarzinger I.: *Akute myeloische Leukämie (AML).* In: Kompendium Internistische Onkologie, Springer-Verlag, Berlin, **1999b**

- 
33. **Bunn P.A.**, Helfrich B., Soriano A.F., Franklin W.A., Varella-Garcia M., Hirsch F.R., Baron A., Zang C., Chan D.C.: *Expression of Her-2/neu in human cancer cell lines by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and its relationship to in vitro cytotoxicity by trastuzumab and chemotherapeutic agents*. Clin Cancer Res **2001**; 7(10):3239-3250
  34. **Campana D.**, Behm F.: *Immunophenotyping of leukemia*. J Immunol Methods **2000**; 243: 59-75
  35. **Campana D.**, Coustan-Smith E.: *The use of flow cytometry to detect minimal residual disease in acute leukemia*. Eur J Histochem **1996**; 40 Suppl 1:39-42.
  36. **Campana D.**, Pui C.: *Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodological resistance P-advances and clinical significance*. Blood **1995**; 85: 1416-1434
  37. **Campos L.**, Guyotat D., Archimbaud E., et al.: *Clinical significance of multidrug glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis*. Blood **1992**; 79: 473-476
  38. **Campos L.**, Rouault J.P., Sabido O., et al.: *High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy*. Blood **1993**; 81: 3091-3096
  39. **Carter N.P.**, Ormerod M.G.: *Introduction to the principles of flow cytometry*. In: Ormerod M.G.: Flow cytometry. Oxford University Press, Oxford, 3. Auflage, **2000**, 1-22
  40. **Chant I.D.**, Rose P.E., Morris A.G.: *Analysis of heat-shock protein expression in myeloid leukaemia cells by flow cytometry*. Br J Haematol **1995**; 90: 163-168
  41. **Ciocca D.R.**, Clark G.M., Tandon A.K., Fuqua S.A., Welch W. J., McGuire W.L.: *Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast-cancer: Prognostic implications*. J Natl. Cancer Inst. **1993**; 85: 570-574
  42. **Clauß G.**, Finze F.R., Partzsch L.: *Statistik für Soziologen, Pädagogen Psychologen und Mediziner*, Deutsch, Frankfurt a.M., 2. Aufl., 1995
  43. **Coca S.**, Perez-Piqueras J., Martinez D., Colmenarejo A., Saez M.A., Vallejo C., Martos J.A., Moreno M.: *The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma*. Cancer **1997**; 79: 2320-2328
  44. **Conover W.J.**: *Practical Non-parametric Statistics*, 2.Auflage. **1980**
  45. **Corver W.E.**, Koopman L.A., van der Aa J., Regensburg M., Fleuren G.J., Cornelisse C.J.: *Four-color multiparameter DNA flow cytometric method to study phenotypic intratumor heterogeneity in cervical cancer*. Cytometry. **2000**; 39: 96-107

46. **Danesi D.T.**, Spano M., Fabiano A., Altavista P., Pasqualetti P., Toscano M.G., Antonini F., Catalano P., Mecozzi A., Picconi A., Daffina A., Cucchiara G.: *Flow cytometric DNA ploidy, p53, PCNA, and c-erbB-2 protein expressions as predictors of survival in surgically resected gastric cancer patients.* Cytometry **2000**; 42:27-34
47. **De Nully Brown P.**, Jurlander J., Pedersen-Bjergaard J., Victor M.A., Geisler C.H.: *The prognostic significance of chromosomal analysis and immunophenotyping in 117 patients with de novo acute myeloid leukemia.* Leuk Res **1997**; 21: 985-991
48. **De The H.**, Chomienne C., Lanotte N., Degos L., Dejean A.: *The t(15 ;17) translocation fuses the retinoic acid receptor  $\alpha$  to a novel transcribed locus.* Nature **1990**; 347: 558-561
49. **Duffy M.J.**: *Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful?* Clin Chem **2001**; 47: 624-630
50. **Eaden J.A.**, Abrams K.R., Mayberry J.F.: *The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta analysis.* Gut **2001**; 48: 526-535
51. **Eder M.**, Gedigk P. (Hrsg.): *Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie.* Springer, Heidelberg, 33. Auflage, **1990**, 275-281
52. **Eggstein S.**, Manthey G., Hirsch T., Baas F., Specht B.U., Farthmann E.H.: *Raf-1 kinase, epidermal growth factor receptors, and mutant Ras proteins in colonic carcinomas.* Dig Dis Sci **1996**; 41: 1069-1075
53. **Elbim C.**, Gastal C., Gougerot-Pocidalo M.A.: *Evaluation of tests recommended by the CDC for the determination of CD4+ T lymphocytes in patients infected by the human immunodeficiency virus.* Pathol Biol (Paris) **1994**; 2: 830-835
54. **Erickson P.**, Gao J., Change K.S., Look T., Whisenant E., Raimondi S., Lasher R., Trujillo J., Rowley J.D., Drabkin H.: *Identification of breakpoints in t(8;21) AML and isolation of a fusion transcript with similarity to drosophila segmentation gene runt.* Blood **1992**; 80: 1825-1831
55. **Farkas B.**; Hantschel M.; Magyarlaki M.; Becker B., Scherer K.; Landthaler M.; Pfister K.; Gehrmann M.; Gross C.; Mackensen A.; Multhoff G.: *Heat shock protein 70 membrane expression and melanoma-associated marker phenotype in primary and metastatic melanoma.* Melanoma Res **2003**; 13: 147-152
56. **Fathi Z.**, Way J.W. Corjay M.H., et al: *Bombesin receptor structur and expression in human lung carcinoma cell lines.* J Cell Biochem **1996**; 24: 237-246
57. **Fearon F.R.**, Vogelstein B.: *A genetic model for colorectal tumorigenesis.* Cell **1990**; 61: 759-767

58. Feenstra M., Veltkamp M., van Kuik J., Wiertsema S., Slootweg P., van den Tweel J., de Weger R., Tilanus M.: *HLA class I expression and chromosomal deletions at 6p and 15q in head and neck squamous cell carcinomas.* *Tissue Antigens.* **1999;** 54: 235-245.
59. Feige S., Polla B.: *Heat shock proteins: the hsp70 family.* *Experimentia* **1994;** 50: 979-984
60. Feinstein A., Gelfman N., Yesner R. : *The diverse effects of histopathology on manifestations and outcome of lung cancer.* *Chest* **1974;** 66: 225-229
61. Fenoglio C.M., Kaye G.I., Pascal R.R., Lane N.: *Defining the precancerous tissue of ordinary large bowel carcinoma. Implications for cancer prevention.* In: Sommers S.C., Rosen P.P. (Hrsg.): *Path Annual Appleton Century Crofts.* **1977;** 12: 87-116
62. Ferrarini M., Heltai S., Zocchi MR., Rugarli C.: *Unusual expression and localization of Heat shock proteins in human tumor cells.* *Int. J. Cancer* **1992;** 51: 613-619
63. Ferrarini M., Pupa S.M., Zocchi M.R., Rugarli C., Ménard S.: *Distinct pattern of hsp72 and monomeric laminin receptor expression in human lung cancers infiltrated by γδ T lymphocytes.* *Int J Cancer* **1994;** 486-490
64. Fialkow P., Singer J., Raskind H., et al. : *Clonal development, stem cell differentiation and clinical remission in acute nonlymphocytic leukemia.* *New Engl. J. Med.* **1987;** 317: 468- 473
65. Fialkow P.: *Use of genetic markers to study cellular origin and development of tumors in human females.* *Advanc. Cancer Res.* **1972;** 15: 191-226
66. Ficarella C., Cannita K., Ricevuto E., Toniato E., Fusco C., Sinopoli N.T., De Galitiis F., Di Rocco Z.C., Porzio G., Frati L., Gulino A., Martinotti S., Marchetti P.: *P16 hypermethylation contributes to the characterization of gene inactivation profiles in primary gastric cancer.* *Oncol Rep* **2003;** 10:169-173
67. Fielding L.P., Arsenault P.A., Chapuis P.H., Dent O., Gatright B., Hardcastle J.D., Hermanek P. et al: *Clinicopathological staging for colorectal cancer: An International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT).* *J Gastroenterol Hepatol* **1991;** 6: 325-344
68. Freeman H.J.: *Colorectal cancer complicating Crohn's disease.* *Can J Gastroenterol* **2001;** 15: 231-216
69. Gandour-Edwards R., Trock B.J., Gumerlock P., Donald PJ.: *Heat shock protein and p53 expression in head and neck squamous cell carcinoma.* *Otolaryngol Head Neck Surg* **1998;** 118: 610-615.

- 
70. **Gao B.**, Tsan MF.: *Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages*. J Biol Chem. **2003**; 278: 174-179
71. **Gehrman M.**, Pfister K., Hutzler P., Gastpar R., Margulis B., Multhoff G.: *Effects of antineoplastic agents on cytoplasmic and membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) levels*. Biol Chem **2002**; 383: 1715-1725
72. **Gehrman M.**, Schmetzer H., Eissner G., Haferlach T., Hiddemann W., Multhoff G.: *Membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) in acute myeloid leukemia: a tumor specific recognition structure for the cytolytic activity of autologous NK cells*. Haematologica **2003**; 88: 474-476
73. **Geneser F.**: *Histologie*, Deutscher Ärzteverlag, Köln, **1990**
74. **Gerbes A.**, Helmberger T., Schauer R., Waggershauser T., Stangl M., Jüngst D., Bilter M., Rau H.G., Schalhorn A.: *Primäre und sekundäre Lebermalignome*. In: Heiss MM: Manual Gastrointestinale Tumoren - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 6. Aufl., Carl Zuckschwerdt Verlag, München; **2001**: 147-165
75. **Giorgi J.V.**: *Characterization of T lymphocyte subset alterations by flow cytometry in HIV disease*. Ann N Y Acad Sci **1993**; 677:126-37
76. **Graeven U.**, Schmiegel W.: *Das Kolonkarzinom*. Internist **2000**; 41: 876-885
77. **Grignardi R.**, Fagliolo M., Ferrucci P.P., Alcalay M., Pelicci, P.G.: *The molecular genetics of acute myeloid leukemia*. Blood Reviews **1993**; 7: 87-93
78. **Grimwade D.**, Walker H., Olover P., Wheatley K., Harrison C., Harrison G., Rees J., Hann I., Stevens R., Burnett A., Goldstone A.: *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in 1612 AML patients entered into the MRC AML 10 trial*. Blood 1998; 92: 2322-2333
79. **Grimwade D.**, Walter H., Harrison G., et al: *The predictive value of hierarchical cytogenetics classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML 11 trial*. Blood **2001**; 98(5): 1312-1320

- 
80. **Gross C.**, Hansch D., Gastpar R., Multhoff G.: *Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94*. Biol Chem **2003**; 384:267-79
  81. **Gross C.**, Koelch W., DeMaio A., Arispe N., Multhoff G.: *Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B*. Biol Chem **2003**; 278: 41173-41181
  82. **Haas I.**, Ganzer U., Roth S.L. *Larynxkarzinom*. In: Schmitt G. (Hrsg.): Onkologie systematisch. Unimed-Verlag, Bremen, 1999: 265-270.
  83. **Hamakawa H.**, Fukizumi M., Bao Y., Sumida T., Onishi A., Tanioka H., Sato H., Yumoto E.: *Genetic diagnosis of micrometastasis based on SCC antigen mRNA in cervical lymph nodes of head and neck cancer*. Clin Exp Metastasis **1999**; 17:593-599
  84. **Han H.**, Landreneau R.J., Santucci T.S. Tung M.Y., Macherey R.S., Shackney S.E., Sturgis C.D., Raab S.S.: *Prognostic value of immunhistochemical expression of p53, HER-2/neu*. Hum Pathol **2002**; 33: 105-110
  85. **Hantschel M.**, Pfister K., Jordan A., Scholz R., Andreesen R., Schmitz G. et al.: *Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients*. Cell Stress Chaperones **2000**; 5(5):438-442.
  86. **Harris N.L.**, Jaffe E.S., Diebold J., Flandrin G., Mueller Hermelink K., Vardiman J., Lister T.A. Bloomfield C.D., *World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the clinical advisory committee meeting – Airlie House, Virginia, November 1999*. J Clin Oncol **1999**; 117: 3835-3849
  87. **Harrison T.R.**: *Harrison's Innere Medizin*. 14. Aufl.: McGraw-Hill, **1999**.
  88. **Hartenstein R.**, Henrich M.: *Behandlung maligner Körperhöhlenergüsse und intraperitoneale Chemotherapie*. In: Huhn D, Hermann R, Hrsg.s. Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen. München: Urban & Fischer, **2001a**: 481-494.
  89. **Hartenstein R.**: *Tumore im Kopf-Hals-Bereich*. In: Huhn D, Herrmann R (Hrsg.): Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen. München: Urban & Fischer, **2001b**: 200-214.
  90. **Hartl F.U.**, Hayter-Hartl M.: *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science **2002**; 295: 1852-1858
  91. **Havemann K.**, Schulte H.D., Granetzny A., Abratt R.P.: *Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom*. In: Schmitt G, Hrsg.. Onkologie systematisch. Bremen: Uni-med, **1999**: 188-195.

92. Hartl F.U.: *Molecular chaperons in protein folding*. Nature **1996**; 381: 571-580
93. Heiss M.M., Becker K., Böttcher K., Bumm R., Dittler H.J. et al: *Magenkarzinome*. In: Heiss MM: Manual Gastrointestinale Tumoren – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 6. Aufl., Carl Zuckschwerdt Verlag, München; **2001**: 117-138
94. Heiss M.M., Simon E.H., Beyer B.C., Gruetzner K.U., Tarabichi A., Babic R., Schildberg F.W., Allgayer H.: *Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow*. J Clin Oncol. **2002**; 20: 2005-16
95. Helmbrecht K., Zeise E., Rensing L.: *Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review*. Cell Prolif. **2000**; 33: 341-365
96. Herbst R.S., Shin D.M.: *Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy*. Cancer **2002**; 94: 1593-1611
97. Hermann R.: *Bronchialkarzinom*. In: Huhn D., Hermann R. (Hrsg.): Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen. München: Urban & Fischer, **2001**: 215-226.
98. Heyll A., Söhngen D., Aul C.: *Leukämien*. In: Schmitt G.(Hrsg.): Onkologie systematisch. Uni-med, Bremen, **1999**: 61-69.
99. Hildebrandt H.(Ltg. der Wörterbuch-Redaktion des Verlages): *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, de Gruyter, 258. Auflage, **1998**
100. Hözl D., Klamert A., Schmidt M.: *Krebs-Häufigkeiten, Befunde und Behandlungsergebnisse*. W. Zuckschwerdt Verlag, München, **1996**
101. Ishigami S., Natsugoe S., Tokuda K., Nakajo A., Che X., Iwashige H., Aridome K., Hokita S., Aikou T.: *Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma*. Cancer **2000**; 88: 577-583
102. Jacobs C., Lyman G., Velez-Garcia E., et al.: *A phase-III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents and in combination for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck*. J Clin Oncol **1992**; 10: 257-263
103. Jang S.J., Chiba I., Hirai A., Hong W.K., Mao L.: *Multiple oral squamous epithelial lesions: are they genetically related?* Oncogene. **2001**; 20:2235-2242.
104. Ji S.Q., Hua Y.W., Zhuang J., Gao Y., Kong Y., Han S.L., Shao Y.F.: *Significance of COX-2, p53, proliferating cell nuclear antigen and nm23 expressions in gastric cancer and its behavior*. Ai Zheng **2002**; 21: 619-624

105. **Kaiser U.**, Schilli M., Haag U., et al: *Expression of bcl-2 protein in small cell lung cancer*. Lung Cancer **1996**; 15:31-40
106. **Kakizuta L.**, Miller W.H., Umesono K., Warrel R.P., Frankel S.R., Murty V.V.V.S., Dmitrovsky E., Evans R.M.: *Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR $\alpha$  with a novel putative transcription factor, PML*. Cell **1991**; 66: 663-674
107. **Kapranos N.**, Kominea A., Konstantopoulos P.A., Savva S., Artelaris S., Vandoros G., Sotiropoulou-Bonikou G., Papavassiliou A.G.: *Expression of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in gastric carcinomas and adjacent normal, metaplastic, and dysplastic gastric mucosa, and its prognostic significance*. J Cancer Res Clin Oncol **2002**; 128: 426-32
108. **Karnak D.**, Ulubay G., Kayacan O., Beder S., Ibis E., Oflaz G.: *Evaluation of Cyfra21-1: A potential marker for non-small cell lung cancer*. Lung **2001**; 179: 57-65
109. **Kaur J.**, Das S.N., Srivastava A., Ralhan R.: *Cell surface expression of 70 kDa heat shock protein in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathological features*. Oral Oncol **1998**; 34(2):93-98.
110. **Keller G.**, Rudelius M., Vogelsang H., Grimm V., Wilhelm M.G., Mueller J., Siewert J.R., Hofler H.: *Microsatellite instability and loss of heterozygosity in gastric carcinoma in comparison to family history*. Am J Pathol **1998**; 152: 1281-1289
111. **Kern W.**, Danhauser-Riedl S., Ratei R., Schnittger S., Schoch C., et al.: *Detection of minimal residual disease in unselected patients wth acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry to define leukemia-associated immunophenotypes and determine their frequencies in normal bone marrow*. Haematologica **2003**; 88: 646-653
112. **Kern W.**, Schnittger S.: *Monitoring of acute myeloid leukemia by flow cytometry*. Curr Oncol Rep. **2003**; 5: 405-412.
113. **Kimura H.**, Yamaguchi Y.: *Adjuvant immunotherapy with interleukin-2 and lymphokine activated killer cells after noncurative resection of primary lung cancer*. Lung Cancer **1995**; 13: 31-44
114. **Kleinjung T.**, Arndt O., Feldmann H.J., Bockmühl U., Gehrmann M., Zilch T., Pfister K., Schönberger J., Marienhagen J., Eilles C., Rossbacher L., Multhoff G.: *Heat shock protein 70 (Hsp70) membrane expression on head-and-neck cancer biopsy – a target for natural killer (NK) cells*. Int J Radiation Oncol Biol Phys **2003**; 57: 820-826
115. **Knapp W.**, Strobl H., Majdic O.: *Flow cytometry of cell surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis*. Cytometry **1994**; 18: 187- 198

116. **Koenders P.G.**, Peters W.H., Wobbes T., Beex L.V., Nagengast F.M., Benraad T.J.: *Epidermal growth factor receptor levels are lower in carcinomatous than in normal colorectal tissue.* Br J Cancer **1992**;65: 189-192
117. **Koyama S.**, Koike N., Adachi S.J.: *Fas receptor counterattack against tumor-infiltrating lymphocytes in vivo as a mechanism of immune escape in gastric carcinoma.* Cancer Res Clin Oncol **2001**; 127: 20-26
118. **Krämer K.J.**: *Paper, Poster und Projekte.* Uehlin, Schopfheim, **1998**
119. **Krystal G.W.**, Birrer M., Way J., et al: *Multiple mechanisms for transcriptional regulation of the myc gene family in small cell lung cancer.* Mol Cell Biol **1988**; 8: 3373-3381
120. **Krystal G.W.**, Hines S.J., Organ C.P.: *Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor.* Cancer Res **1996**; 56: 370-376
121. **Lagiadèr F.**: *Checkliste Viszerale Chirurgie*, Thieme, Stuttgart, 7. Aufl., **1998**
122. **Lamerz R.**, Hasholzner U., Stieber P.: *Immunologische Diagnostik und Tumormarker.* In: *Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums.* Leitlinien des Tumorzentrums München **2000**; <http://www.uni-muenchen.de/TZMuenchen> vom 14.04.2002
123. **Lamerz R.**, Stieber P., Borlinghaus P., Schmid L.: *Tumormarker.* In: Heiss M.M.: *Manual Gastrointestinale Tumoren*, , W. Zuckschwerdt, München, 6. Auflage, **2001**
124. **Lamy P.**, Greniert J., Kramar A., Pujol J.L.: *Progastrin releasing peptide, neuron specific enolase and chromogranin A as serum markers of small cell lung cancer.* Lung Cancer **2000**; 29: 197-203
125. **Larson R.A.**, Boogaerts M., Estey E., Karanes C., Stadtmauer E.A., et al.: *Antibody-targeted chemotherapy of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse using Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin).* Leukemia **2002**; 16: 1627-1636
126. **Laurén P.**: *The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification.* Acta. Pathol. Microbiol. Scand **1965**; 64: 31-43
127. **Le Beau M.M.**, Laeson R.A., Bitter M.A., Vardiman J.W., Golomb H.M., Rowley J.D., *Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia: a unique cytogenetic-clinico-pathological association.* New Engl J Med **1983**; 309:630-636

128. **Lee H.S.**, Choi S.I., Lee H.K., Kim H.S., Yang H.K., Kang G.H., Kim Y.I., Lee B.L., Kim W.H.: *Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability*. Mod Pathol **2002**;15: 632-640
129. **Legrand O.**, Perrot J.Y., Baudard M., Cordier A., Leutier R., Simonin G., Zittoun R., Casadevall N., Marie J.P.: *The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: Proposal of a prognostic score*. Blood **2000**; 96:870-877
130. **Lentrodt R.**, Frommhold H., Guttenberger R.: *Mundhöhlenkarzinom*. In: Schmitt G, (Hrsg.): Onkologie systematisch. Uni-med, Bremen, **1999**: 253-256.
131. **Lindquist S.**, Craig E.A.: *The heat-shock proteins*. Annu. Rev. Genet. **1988**; 22 : 631-677
132. **Liu C.**, Park M., Tsao M.S.: *Overexpression of c-met proto-oncogene but not epidermal growth factor receptor or c-erbB-2 in primary human colorectal carcinomas*. Oncogene. **1992**; 7: 181-185
133. **Liu Lin J.A.**, Tohal K.: *Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: Methodologies, clinal and biological significance*. Br J Hematol **1999**; 106:578-590
134. **Liu P.**, Tarle S.A., Hajra A., Claxton D.P., Marlton P., Freedman M., Siciliano., Collins F.S.: *Fusion between transcription factor CBF $\beta$ /PEBP 2 $\beta$  and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia*. Science **1993**; 261: 1041-1044
135. **Liu S.**, Zhang B., Zhang S.: *Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR), platelet growth factor receptor (PGFR) and insulin growth factor-1 receptor (IGF-1R) on lung cancer cells*. Zhonghua Jie He He Hu Ci Za Zhi **1998**; 21(12):733-4
136. **Liu X.**, Ye L., Wang J., Fan D.: *Expression of heat shock protein 90 beta in human gastric cancer tissue and SGC7901/VCR of MDR-type gastric cancer cell line*. Chin Med J (Engl) **1999**; 112:1133-1137
137. **Liu X.P.**, Tsushima K., Tsushima M., Oga A., Kawauchi S., Furuya T., Sasaki K.: *Expression of p53 protein as a prognostic indicator of reduced survival time in diffuse-type gastric carcinoma*. Pathol Int **2001**;51: 440-444
138. **Liu Yin J. A.**: *Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: Methodologies, clinical and biological significance*. Br J Hematol **1999**; 106: 578-590
139. **Loken M.R.**, Green C.L. ,Wells D.A.: *Flow sorting*. In: Ormerod M.G.: Flow Cytometry. Oxford University Press, Oxford, 3. Auflage, **2000**, 47-60
140. **Loken M.R.**, Shah VO, Dattilio K.L., Civin C.I.: *Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development*. Blood **1987**; 70(5):1316-24

141. **Lübbert M.**: *Akute myeloische Leukämie (AML)*. In: Berger D.P., Engelhardt R., Mertelsmann R.(Hrsg.): Das Rote Buch – Hämatologie und Internistische Onkologie. Ecomed-Verlagsgesellschaft, Landsberg, 2 Aufl., **2002**
142. **Lynch H.T.**, de la Chapelle A.: *Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer*. J Med Genet, **1999**; 36 : 801-818
143. **MacDonald H.R.**, Engers H.D., Cerottini J.C., Brunner K.T.: *Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro*. J Exp. Med. **1974**; 140: 718-722
144. **Maehara Y.**, Oki E., Abe T., Tokunaga E., Shibahara K., Kakeji Y., Sugimachi K.: *Overexpression of the heat shock protein HSP70 family and p53 protein and prognosis for patients with gastric cancer*. Oncology **2000**; 58:144-151
145. **Maitra A.**, Amirkhan R.H., Saboorian MH, et al.: *Survival in small cell lung carcinoma is independent of Bcl-2 Expression*. Hum Pathol **1999**; 30:712-717
146. **Malusecka E.**, Zborek A., Krzyzowska-Gruca S., Krawczyk Z.: *Expression of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in primary non-small cell lung carcinomas. An immunohistochemical study*. Anticancer Res **2001**; 21: 1015-21
147. **McKay J.A.**, Murray L.J., Curran S., Ross V.G., Clark C., Murray G.I., Cassidy J., McLeod H.L.: *Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases*. Eur J Cancer **2002**; 38: 2258-2264
148. **Melioli O.**, Ratto G.B., Ponte M., et al.: *Treatment of stage IIIB non-small cell lung cancer with surgery followed by infusion of tumor infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: a pilot study*. J Immunother **1996**; 19: 224- 230
149. **Messa C.**, Russo F., Caruso M.G. Di Leo A.: *EGF, TGF-alpha, and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma*. Acta Oncol **1998**; 37: 285-289
150. **Meyer H.J.**, Jähne J, Stahl M, Wilke HJ. *Magenkarzinom*. In: Schmitt G. (Hrsg.): Onkologie systematisch. Uni-med, Bremen, **1999**: 212-217.
151. **Michils A.**, Redivo M., Zegers de Beyl V., de Maertelaer V., Jacobovitz D., Rocmans P., Duchateau J. : *Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma*. Lung Cancer **2001**; 33: 59-67
152. **Miyaki M.**, Konishi M., Tanaka K., et al.: *Germline mutation of MHS6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Nat Genet **1997** ; 17: 271-2
153. **Moisio A.L.**, Sistonen P., Weissenbach J., de la Chapelle A., Peltomaki P. : *Age and origin of two common MLH1 mutations predisposing to hereditary colon cancer*. Am J Hum Genet; **1996**: 59: 1243-1251

154. **Monig S.P.**, Eidt S., Zirbes T.K., Stippel D., Baldus S.E., Pichlmaier H.: *p53 expression in gastric cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance*. Dig Dis Sci **1997**; 42: 2463-2467
155. **Moser C.**, Schmidbauer C., Gurtler U., Gross C., Gehrman M., Thonigs G., Pfister K., Multhoff G.: *Inhibition of tumor growth in mice with severe combined immunodeficiency is mediated by heat shock protein 70 (Hsp70)-peptide-activated, CD94 positive natural killer cells*. Cell Stress Chaperones **2002**; 7: 365-73
156. **Möslein G.**, Tester D.J., Lindor N.M., et al.: *Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer*. Hum Mol Genet **1996**; 5: 763-769
157. **Mountain C.F.**: *A new international staging system for lung cancer*. Chest **1986**; 89: 225-233
158. **Multhoff G.**, Botzler C., Wiesnet M., Eissner G., Issels R.: *CD3- large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kD heat shock protein on human sarcoma cells*. Blood **1995a**; 86(4):1374-1382.
159. **Multhoff G.**, Botzler C., Wiesnet M., Muller E., Meier T., Wilmanns W. et al.: *A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells*. Int J Cancer **1995b**; 61(2):272-279.
160. **Multhoff G.**: *Heat shock protein 72 (HSP72), a hyperthermia-inducible immunogenic determinant on leukemic K562 and Ewing's Sarkoma cells*. Int J Hyperthermia **1997a**; 13: 39-48
161. **Multhoff G.**, Botzler C., Jennen L., Schmidt J., Ellwart J., Issels R.; *Heat shock protein 72 on tumor cells – a recognition structure for natural killer cells*. J Immunol **1997b**; 4341-4349
162. **Multhoff G.**, Mizzen L., Winchester C.C., Milner C.M., Wenk S., Eissner G., et al: *Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells*. Exp Hematol **1999**; 27(11):1627-1636.
163. **Multhoff G.**, Pfister K, Botzler C, Jordan A, Scholz R, Schmetzer H et al. *Adoptive transfer of human natural killer cells in mice with severe combined immunodeficiency inhibits growth of Hsp70-expressing tumors*. Int J Cancer **2000**; 88(5):791-797.
164. **Multhoff G.**, Pfister K., Gehrman M., Hantschel M., Gross C., Hafner M. et al.: *A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity*. Cell Stress Chaperones **2001**; 6: 337-344.

165. **Muto A.**, Mori S., Matsushita H., Awaya N., Ueno H., Takayama N., Okamoto S., Kizaki M., Ikeda Y.: *Serial quantification of minimal residual disease of t(8 ;21) acute myelogenous leukemia with RT-competitive PCR assay*. Br J Hematol **1996**; 95:85-94
166. **Nakashima T.**, Yano G., Hayashi I., Katsuta Y.: *Epithelial membrane antigen and S-100 protein-labeled cells in primary and metastatic laryngeal carcinomas*. Head Neck **1992**; 14: 445-451
167. **Naruke T.**, Goya T., Tsuchiya R., Suemasu K.: *Prognosis and survival in resected lung carcinoma based on the new international staging system*. J Thorac Cardiovasc Surg **1988**; 96: 440-447
168. **Neubauer A.**: *Akute myeloischen Leukämie und myelodysplastisches Syndrom*. In: Huhn D., Hermann R.: Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen, Urban & Fischer Verlag, München, 4. Aufl. **2001**: 147-157
169. **Niederle N.**, Wolf M., Abratt P.: *Kleinzeliges Bronchialkarzinom*. In: Schmitt G, Hrsg.. Onkologie systematisch, Uni-med, Bremen, **1999**: 185-188.
170. **Nigam A.K.**, Savage F.J., Boulos P.B., Stamp G.W., Liu D., Pignatelli M.: *Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer*. Br J Cancer. **1993**; 68: 507-14.
171. **Nowell P.**, Hungerford D.: *A minute chromosome in human chronic granulocyte leukemia*. Science **1960**; 132: 1497- 1501
172. **O'dwyer P.J.**, Benson A.B.: *Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer*. Semin Oncol **2002**; 29: 10-17
173. **Ormerod M.G.**: *Analysis of DNA – general methods*. In: Ormerod M.G.: Flow cytometry. Oxford University Press, Oxford, 3. Auflage, **2000**, 83-98
174. **Otto F.**, Englhardt R.: Lebermetastasen. In: Berger D.P., Engelhardt R., Mertelsmann R.: Das rote Buch Hämatologie und Internistische Onkologie. Ecomed, 2. Auflage, 2002: 759-761
175. **Pantel K.**, Schlimok G., Kutter D., Schaller G., Genz T., Wiebecke B., Backmann R., Funke I., Riethmuller G.: *Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells*. Cancer Res. **1991**; 51: 4712-4715.

176. **Pezzela F.**, Turley H., Kuzu I., et al: *Bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma*. N Engl J Med **1993**; 329: 690-694
177. **Plata E.**, Choremis-Papadopoulou H., Viglis V., Yataganas X.: *Flow-cytometric detection of minimal residual disease with atypical antigen combinations in patients with de novo acute myeloid leukemia*. Ann Hematol **2000**; 79: 543-546
178. **Posner M.R.**, Mayer R.J.: *The use of serologic tumor markers in gastrointestinal malignancies*. Hematol/Oncol Clin N Am **1994**; 8: 533-553
179. **Preiß J.**, Dornhoff W., Hagmann F.G., Schmieder A.(Hrsg.): *Onkologie 2002/03 – Empfehlungen zur Therapie*, W. Zuckschwerdt, München, 11. Auflage, **2002**.
180. **Richardson G.E.**, Johnson B.E.: *The biology of lung cancer*. Semin Oncol **1993**; 20:105-127
181. **Riede U.-N.**: *Taschenatlas der allgemeinen Pathologie*. Thieme, Stuttgart, **1998**
182. **Ritz U.**, Momburg F., Pilch H., Huber C., Maeurer M.J., Seliger B.: *Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma*. Int J Oncol. **2001**; 19: 1211-1220.
183. **Rocco A.**, Schandl L., Nardone G., Tulassay Z., Staibano S., Malfertheiner P., Ebert M.P.: *Loss of expression of tumor p16(INK4) protein in human primary gastric cancer is related to the grade of differentiation*. Dig Dis **2002**; 20: 102-105
184. **Rodriguez-Bigas M.A.**, Boland C.R., Hamilton S.R., et al.: *A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome; meeting highlines and Bethesda guidelines*. J Natl Cancer Inst **1997**; 89: 1758-1762
185. **Roitt I.M.**, Brostoff J., Male D.K.: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Thieme, Stuttgart, 3. Auflage, **1995**
186. **Roncucci L.**, Pedroni M., Fante R., Di Gregorio C., Ponz de Leon M.: *Cell kinetic evaluation of human colonic aberrant crypts. (Colorectal Cancer Study Group of the University of Modena and the Health Care District 16, Modena, Italy)*. Cancer Res **1993**; 53: 3726-3729
187. **Roncucci L.**, Stamp D., Medline A., Cullen J.B., Bruce W.R.: *Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon*. Hum Pathol **1991**; 22: 287-294
188. **Rothe G.**, Schmitz G.: *Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis*. Leukemia **1996**; 10(5):877-895.

189. **Rubio Bueno P.**, Naval Gias L., Garcia Delgado R., Domingo Cebollada J., Diaz Gonzalez F.J.: *Tumor DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the oral cavity and tongue base.* Head Neck **1998**; 20: 232-239
190. **Rüschoff J.**, Mehringer S., Beyser K., Dietmaier W., Langner C., Bocker T., Kullmann F.: *Correlation between histological and molecular mechanisms of carcinogenesis in stomach cancer.* Verh Dtsch Ges Pathol **1999**; 83: 71-78
191. **Saalbach A.**, Aust G., Haustein U.F., Herrmann K., Anderegg U.: *The fibroblast-specific MAb AS02: a novel tool for detection and elimination of human fibroblasts.* Cell Tissue Res. **1997**; 290: 593-9
192. **Schalhorn A.**: *Gastrointestinale Tumore.* In: Huhn D., Hermann R., (Hrsg.): Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen. Fischer, München, **2001b**: 227-281.
193. **Schalhorn A.**, Siebeck M., Bumm R., Gross M., Günther B., et al: *Kolonkarzinome.* In: Heiss MM: Manual Gastrointestinale Tumoren - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 6. Aufl., Carl Zuckschwerdt Verlag, München; **2001a**: 215-243
194. **Schiltz P.M.**, Beutel L.D., Nayak S.K., Dillman R.O.: *Characterization of tumor-infiltrating lymphocytes derived from human tumors for use as adoptive immunotherapy of cancer.* J Immunother **1997**; 20: 377-86
195. **Schlecht N.F.**, Franco E.L., Pintos J., Negassa A., Kowalski L.P., Oliveira B.V.; et al.: *Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil.* Am J Epidemiol **1999**; 150(11):1129-1137.
196. **Schmidt U.W.**, Porschen R.: *Kolonkarzinom.* In: Schmitt G., Hrsg.. Onkologie systematisch. Uni-med, Bremen, **1999**: 220-224.
197. **Schmidt U.W.**, Werner J.D., Döker R.: *Rektosigmoidkarzinom.* In: Schmitt G., Hrsg.. Onkologie systematisch. Uni-med, Bremen, **1999**: 225-230.
198. **Schmitz G.**, Rothe G., Ruf A., Barlage S., Tschope D., Clemetson K.J. et al.: *European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function.* Thromb Haemost **1998**; 79(5):885-896.
199. **Schoch C.**, Haferlach T.: *Cytogenetics in acute myeloid leukemia.* Curr Oncol Rep **2002**; 4(5): 390-397
200. **Sekido Y.**, Fong K.M., Minna J.D., *Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer.* Biochim Biophys Acta **1998**; 1978: F21-F59
201. **Senn H.J.**, Drings P., Gläus A., Jungi W.F., Pralle H.B., Sauer R., et al.: *Checkliste Onkologie.* Thieme, Stuttgart, 4.Aufl., **1998**.

202. **Shanahan F.**: *Relation between colitis and colon cancer*. Lancet **2001**; 357: 246-247
203. **Shimomoto H.**, Hasegawa Y., Nozaki Y., Takagi N., Shibagaki T., Nakao A., Shimokata K.: *Expression of tumor necrosis factor receptors in human lung cancer cells and normal lung tissues*. Am J Respir Cell Mol Biol **1995**; 13:271-278
204. **Shin B.K.**, Wang H., Yim A.M., Le Naour F., Brichory F, Jang JH, et al.: *Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function*. J Biol Chem **2003**; 278:7607-7616.
205. **Siegel S.**, Castellan N.J.: *Non-parametric Statistics for the Behavioral Sciences*, 2.Auflage, **1988**
206. **Sisk E.A.**, Bradford C.R., Jacob A., Yian C.H., Staton K.M., Tang G., Harris M.O., Carey T.E., Lancaster WD, Gregoire L.: *Human papillomavirus infection in "young" versus "old" patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head Neck **2000**; 22: 649-657
207. **Sisk E.A.**, Soltys S.G., Zhu S., Fisher S.G., Carey T.E., Bradford C.R.: *Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma*. Head Neck **2002**; 24: 841-849
208. **Slovac M.L.**, Kopecky K.J., Cassileth P.A., et al: *Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group / Eastern Cooperative Oncology Group study*. Blood **2000**: 96(13): 4075-4083
209. **Smith M.T.**, Zang L., Wang Y., Hayes R.B., Wiemels J. et al: *Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene*. Cancer Research. **1998**; 98: 2176-2181
210. **Song J.**, Takeda M., Morimoto R.I.: *Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth*. Nat. Cell Biol. **2001**; 3: 276-282
211. **Stevens A.**, Lowe J.: *Pathologie*. Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden, **1997**
212. **Strachan T.**, Read A.P.: *Human molecular genetics*, Oxford, Spektrum, **1996**
213. **Sugarbaker P.H.**, Gunderson L.L., Witten R.E.: *Colorectal cancer*. In: DeVita V. T., Hellman S., Rosenberg S.A. (Hrsg.): *Cancer – Principles and Practise of Oncology*., Lippincott, Philadelphia, 2.Aufl., **1985**, S. 795-864
214. **Sutherland D.R.**, Keating A., Nayar R., Anania S., Stewart A.A.: *Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry*. Exp. Hematol. **1994**; 22: 1003-1010

215. **Suzuki S.**, Takahashi T., Nakamura S., Koike K., Ariyoshi Y., Takahashi T., Ueda R.: *Alterations of integrin expression in human lung cancer*. Jpn J Cancer Res. **1993**; 84: 168-174.
216. **Takahama Y.**, Yamada Y., Emoto K., Fujimoto H., Takayama T., Ueno M., Uchida H., Hirao S., Mizuno T., Nakajima Y.: *The prognostic significance of overexpression of the decoy receptor for Fas ligand (DcR3) in patients with gastric carcinomas*. Gastric Cancer **2002**; 5: 61-68
217. **Takahashi T.**, Nau M.M., Chiba I., et al: p53. *A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer*. Science **1989**; 246: 491-494
218. **Tamura Y.**, Peng P., Liu K., Daou M., Srivastava P.K.: *Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations*. Science **1997**; 278 :117-120
219. **Tang R.**, Beuvon F., Ojeda M., Mosseri V., Pouillart P., Scholl S.: *M-CSF (monocyte colony stimulating factor) and M-CSF receptor expression by breast tumour cells: M-CSF mediated recruitment of tumour infiltrating monocytes?* J Cell Biochem **1992**; 50:350-356
220. **Terstappen L.W.**, Safford M., Loken M.R.: *Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation*. Leukemia **1990**; 4(9):657-63
221. **Terstappen L.W.**, Konemann S., Safford M., Loken M.R., Zurlutter K., Buchner T., et al.: *Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part 1. Significance of light scattering properties*. Leukemia **1991**; 5(4):315-321.
222. **Terstappen L.W.**, Safford M., Konemann S., Loken M.R., Zurlutter K., Buchner T., Hiddemann W., Wörmann B.: *Flow Cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis*. Leukemia **1992**; 6: 70-80.
223. **Thalhammer-Scherrer R.**, Mitterbauer G., Simonitsch I., Jaeger U., Lechner K., Schneider B., Fonatsch C., Schwarzinger I.: *The immunophenotype of 325 adult acute leukemias: relationship to morphologic and molecular classification and proposal for a minimal screening program highly predictive for lineage discrimination*. Am J Clin Pathol **2002**; 117: 380-389
224. **Theml H.**: *Taschenatlas der Hämatologie*, Thieme, Stuttgart, 4. Auflage, **1998**
225. **Thomas C.**: *Histopathologie*, Schattauer, Stuttgart, 12. Aufl., **1998**.
226. **Thomas C.**: *Makropathologie*, Schattauer, Stuttgart, **2002**
227. **Thomas G.J.**, Speight P.M.: *Cell adhesion molecules and oral cancer*. Crit Rev Oral Biol Med. **2001**;12: 479-98.

228. **Tomblyn M.R.**, Tallman M.S.: *New developments in antibody therapy for acute myeloid leukemia*. Semin Oncol. **2003**; 30: 502-508.
229. **Uemura N.**, Okamoto S., Yamamoto S., Matsumura N., Yamaguchi S., Yamakido M. et al.: *Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer*. New Engl J Med **2001**; 345: 784-789
230. **Vaczi A.**, Laszlo V., Pallinger E., Orso E., Rothe G., Schmitz G. et al.: *Detection of histamine and histidine decarboxylase in human platelets by flow cytometry*. Inflamm Res **2001**; 50 Suppl 2: S91-S92.
231. **Vargas-Roig L.M.**, Gago F.E., Tello O., Aznar J.C., Ciocca D.R.: *Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy*. Int J. Cancer **1998**; 79: 468-475
232. **Vasen H.F.**, Mecklin J.P., Meera Khan P., Lynch H.T.: *The international collaborative group on hereditary non polyposis colorectal (ICG-HNPCC)*. Dis Colon Rect, **1991**; 34: 424-425
233. **Viale M.**, Ferrini S., Serrano S., Serrano D., Ardizzone A., Nicolin A.: Peripheral blood and tumor infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer: analysis at the population and clonal level. *Tumori* **1990**; 76: 488-494.
234. **Viallet J.**, Sausville E.A.: *Involvement of signal transduction pathways in lung cancer biology*. J Cell Biochem **1996**; 24: 228-236.
235. **Villegas F.R.**, Coca S., Villarrubia V.G., Jimenez R., Chillon M.J., Jareno J., Zuil M., Callol L.: *Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer*. Lung Cancer **2002** Jan;35(1):23-28
236. **Walther E.K.**, Dahlmann N., Gorgulla H.T.: *Tumor markers in the diagnosis and follow-up of head and neck cancer: role of CEA, CA 19-9, SCC, TK, and dTTPase*. Head Neck **1993**; 15: 230-235
237. **Wickner S.**, Maurizi M.R., Gottesman S.: *Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins*. Science **1999**; 286: 1888-1893
238. **Willman C.L.**: *Targeted AML therapy: New biologic paradigms and therapeutic opportunities*. Leukemia **2001**; 15: 690-694

239. **Wistuba I.I.**, Berry J., Behrens C., et al: *Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer*. Clin Cancer Res **2000**; 6: 2604-2610
240. **Wistuba I.I.**, Gazdar A.F., Minna J.D.: *Molecular genetics of small cell lung cancer*. Semin Oncol **2001**; 28: 3-13.
241. **Wittekind C.**, Meyer H.J., Bootz F.: *Klassifikation maligner Tumoren*, Springer, Heidelberg, New York, 6. Auflage, **2002**
242. **Wittekind C.**, Wagner G.: *TNM-Klassifikation maligner Tumore*, Springer, Heidelberg, New York, 5. Auflage, **1997**
243. **Wu M.S.**, Shun C.T., Sheu J.C., Wang H.P., Wang J.T., Lee W.J., Chen C.J., Wang T.H., Lin J.T.: *Overexpression of mutant p53 and c-erbB-2 proteins and mutations of the p15 and p16 genes in human gastric carcinoma: with respect to histological subtypes and stages*. J Gastroenterol Hepatol **1998**; 13: 305-310
244. **Xiao K.**, Liu W., Qu S., Sun H., Tang J.: *Study of heat shock protein HSP90 alpha, HSP70, HSP27 mRNA expression in human acute leukemia cells*. J Tongji Med Univ **1996**; 16: 212-6
245. **Yamaguchi K.**, Aoyagi K., Urakami K., et al.: *Enzyme-linked immunoabsorbant assay of progastrin-releasing peptide for small cell lung cancer patients in comparison with neuron-specific enolase measurement*. Jpn J Cancer Res **1995**; 86: 698-705
246. **Yamazaki N.**, Kawamoto K., Hori Y., Kumazawa H., Yamashita T., Kumazawa T.: *Experimental and clinical evaluation of DNA ploidy with use of double staining of keratin/DNA by flow cytometer in head and neck tumor*. Acta Otolaryngol Suppl **1993**; 500: 149-153.
247. **Zur H.H.**: *Papillomavirus infections-a major cause of human cancers*. Biochim Biophys Acta **1996**; 1288: 55-78.



## Abkürzungsverzeichnis

|       |   |
|-------|---|
| APC   | Allophycocyanin   |
| CD    | Cluster of differentiation  |
| CX    | Colorectal carcinoma  |
| ED    | extensive disease   |
| EGFR  | Epidermal Growth Factor Receptor                                  |
| ES    | Ewing's Sarkoma   |
| FACS  | Fluoreszenz activated cell sorter                                 |
| FITC  | Fluoreszein-Isothiocyanat   |
| Fl.   | Fluoreszenzkanal  |
| FSC   | Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)                              |
| Hsp   | Hitzeschockprotein  |
| Ig    | Immunglobulin   |
| IGF 1 | Insulin-like Growth factor 1                                      |
| IGF 2 | Insulin-like Growth factor 2                                      |
| LD    | limited disease   |
| LX    | Lung carcinoma  |
| MHC   | Major histocompatibility complex                                  |
| MNC   | Mononuclear cells (Mononukleäre Zellen)                           |
| NK    | Natürliche Killerzelle  |
| NSCLC | Non Small Cell Lung Cancer (Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom) |
| PDGF  | Platelet-derived Growth factor                                    |
| PE    | Phycoerythrin   |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein                                     |
| SCF   | Stem cell factor  |
| SCLC  | Small Cell Lung Cancer (Kleinzepteliges Bronchialkarzinom)        |
| SSC   | Seitwärtsscatter (Seitwärtsstreulicht)                            |



## Anhang