

Analyse der Immundysregulation bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biologin Jane Katrin Hunger

geboren am 24.09.1978
in Wolfenbüttel

Juli 2006

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum von September 2003 bis April 2006 in der Abteilung Hämatologie, Hämostaseologie und Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. Helmut Holtmann

Tag der Promotion: 31. Juli 2006

Die Neugier steht immer an erster Stelle
eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei

Zusammenfassung

Immuntherapeutische Behandlungskonzepte stellen mit dem wachsenden Verständnis der zellulären und molekularen Immunantwort einen viel versprechenden Ansatz bei der Behandlung von Krebserkrankungen, wie der akuten myeloischen Leukämie (AML), dar. Weitgehend unklar ist jedoch, warum die immunologische Erkennung und Zerstörung der Leukämiezellen durch T-Zellen im Patienten nur unzureichend funktioniert. Es gibt verschiedene Mechanismen, wie sich die Leukämiezellen dem Immunsystem entziehen können: (1) durch eine unvollständige Aktivierung der T-Zellen durch die Leukämiezellen; (2) durch die Sezernierung von löslichen, immunsuppressiven Faktoren durch die Leukämiezellen, was unter anderem zu (3) der Induktion von anergen und/oder regulatorischen T-Zellen führen kann. Ziel dieses Projektes war die Identifizierung molekularer und zellulärer Mechanismen dieser Dysregulation des Immunsystems bei AML-Patienten.

Im Zentrum dieser Arbeit stand der Einfluss primärer AML-Blasten auf die Funktion gesunder T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass AML-Blasten direkt über Zell-Zellkontakt, aber auch indirekt über lösliche Faktoren die Homeostase von T-Zellen beeinflussen. Primäre AML-Blasten sind vermutlich in der Lage, eine effektive anti-Tumorantwort zu unterdrücken, indem sie die Proliferation und Produktion der T_H1 -Zytokine IL-2 und IFN- γ inhibieren und die T-Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretieren. Dieser Effekt lässt sich durch die Zugabe von exogenem IL-2 nicht wieder aufheben. Außerdem werden die T-Zellen durch den Kontakt mit AML-Blasten zur Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 angeregt.

Weiterhin wurde erstmals ein Genexpressionsprofil von $CD4^+$ T-Zellen aus AML-Patienten erstellt und mit dem gesunder Spender verglichen. Anhand des Genexpressionsprofils von *ex vivo* $CD4^+$ T-Zellen aus AML-Patienten konnten einige Schlüsselgene identifiziert werden, die bei der Regulation des Zellzyklus (z.B. *cdk4*, *PTMA*, *Id2*), der Apoptose (z.B. *Bcl-2*, *Bax*) oder der Signaltransduktion (z.B. *Txk*) involviert sind. Außerdem wurden Moleküle differentiell exprimiert, die eine Rolle während der Immunantwort spielen (z.B. *CTLA-4*), unter anderem auch verschiedene Chemokine und Chemokinrezeptoren (z.B. *RANTES*, *CXCL10*, *CCR2*). Gene, die für natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen charakteristisch sind (z.B. *FoxP3*, *GITR*), waren hier nicht betroffen. Einige der regulierten Gene konnten die funktionellen *in vitro* Daten unterstützen.

Durch eine nähere Betrachtung der primären AML-Blasten konnte bestätigt werden, dass diese nahezu keine kostimulatorischen Moleküle besitzen, sodass eine ausreichende Aktivierung der T-Zellen somit vermutlich nicht stattfinden kann. Durch Ausdifferenzierung der primären AML-Blasten zu Zellen mit einem dendriten-ähnlichem Phänotyp (AML-DCs) kann diese periphere Toleranz zum Teil überwunden werden, da die AML-DCs die kostimulatorischen Moleküle hochregulieren und in der Lage sind, im Gegensatz zu den primären AML-Blasten, T-Zellen zu stimulieren, sowie ihre zytotoxischen Eigenschaften zu induzieren.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt werden, dass einer der Mechanismen, der zu einer ineffektiven anti-Tumor Immunantwort in AML-Patienten führt, die Induktion einer adaptiven Toleranz (*in vivo* Anergie) der T-Zellen durch chronische Antigenstimulation sein könnte. Diese Anergie wird vermutlich durch eine unzureichende Aktivierung der T-Zellen durch die Leukämiezellen, sowie über die Produktion löslicher immunsuppressiver Faktoren durch die Leukämiezellen induziert. Zusätzlich scheinen die anergen T-Zellen nicht nur funktionell inaktiviert zu sein, sondern sie unterdrücken möglicherweise auch andere T-Zellen über einen Zytokin-vermittelten Prozess (*bystander suppression*).

Schlagerworte: T-Zellen, Toleranz, akute myeloische Leukämie

Abstract

Although leukemic cells express tumor-associated antigens, suppression of an effective T cell immune response is a well known phenomenon in acute myeloid leukemia (AML). In principle, the malignant cells may escape immune surveillance by (1) incomplete T cell activation due to the absence of costimulatory molecules on the leukemic cell types, (2) secretion of soluble immunosuppressive factors, which may lead among others to (3) induction of anergic and/ or regulatory T cell phenotypes. In this thesis the underlying cellular and molecular mechanisms of immunosuppression is analysed.

The centre of this thesis was the examination of the effect of primary AML-blasts on the function of normal T-cells. It could be demonstrated that primary AML modulate T-cell homeostasis mainly in a cell-contact dependent manner and to a minor degree via soluble factors. Primary AML-blasts are able to suppress T-cell proliferation and production of the Th1 cytokines IL-2 and IFN- γ . This effect is not reversible by the addition of exogenous IL-2. Cell-cycle analyses demonstrated that soluble factors from leukemic cell supernatants may inhibit the cell-cycle entry of T cells after mitogenic stimulation with an arrest in G0/G1 phase. Furthermore, T-cells that were in contact with AML-blasts, are stimulated to produce the immunosuppressive cytokine IL-10.

Additionally, the molecular profile of CD4⁺ T cells isolated from untreated AML patients was compared to those of healthy volunteers. Interestingly, the molecular profile could identify a profound dysregulation of molecules involved in the regulation of cell-cycle (i.e., cdk4, PTMA, Id2), apoptosis (i.e., Bcl-2, Bax) or signal transduction (i.e., Txk). In addition, genes important for the immune response (i.e., CTLA-4), especially various chemokines/-receptors (i.e., RANTES, CXCL10, CCR2) were dysregulated, whereas the expression pattern of genes specific for regulatory T cells (i.e., FoxP3, PD-1, GITR) were broadly unaffected. Several genes found to be regulated in CD4⁺ T-cells of AML-patients could support the functional *in vitro* data.

Analyses of the primary AML-blasts could confirm that they express less to nearly no costimulatory molecules, indicating that an effective activation of T-cells could presumably not occur. The *in vitro* differentiation of these primary AML-blasts to cells with an dendritic-like phenotype (AML-DC) could partly overcome the peripheral tolerance of T-cells, because AML-DCs upregulate their costimulatory molecules and are able, in contrast to primary AML-blasts, to stimulate T-cells and to induce their cytotoxic properties.

In summary, one can hypothesize that one of the mechanisms leading to an ineffective anti-tumor immune response in AML-patients, could be the induction of an adaptive tolerance (*in vivo* anergy) of T-cells through a chronic antigen stimulation by AML-blasts. This anergy is supposedly induced by an insufficient activation due to the absence of costimulatory molecules, as well as by immunosuppressive factors produced by AML-blasts. But the anergic T-cells do not seem to be only functionally inactivated: they probably are able to suppress other T-cells via a cytokine-based process (bystander suppression).

Keywords: T cells, tolerance, acute myeloid leukemia

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	T-Lymphozyten	1
1.1.2	Antigen-präsentierende Zellen (APCs).....	2
1.1.3	Die Interaktion zwischen T-Zellen und APCs.....	3
1.2	T-Zell Toleranz	4
1.2.1	Zentrale und periphere T-Zell Toleranz.....	4
1.2.2	T-Zell Anergie	5
1.2.3	Regulatorische T-Zellen	6
1.3	Tumore und das Immunsystem.....	7
1.3.1	Mechanismen der Immunevasion durch Krebszellen.....	8
1.4	Akute myeloische Leukämie (AML).....	9
1.4.1	AML als Modellerkrankung für T-Zelldysfunktion	11
1.5	Aufgabenstellung.....	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Blutproben.....	14
2.1.2	Zelllinien.....	14
2.2	Molekularbiologische Methoden	15
2.2.1	Agarosegelelektrophorese.....	15
2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA mit Trizol	15
2.2.3	Isolierung von Gesamt-RNA mit dem „ <i>RNeasy Mini Kit</i> “	16
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	16
2.2.5	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	16
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.2.6.1	Standard-PCR zur Amplifikation der AML-Marker	17
2.2.7	Realtime RT-PCR	18
2.2.7.1	Erstellen einer <i>Primer</i> matrix	18
2.2.7.2	Durchführung der Realtime RT-PCR	19
2.2.8	cDNA-Synthese für die <i>Microarray</i> -Technologie (1.Runde).....	20
2.2.9	Aufreinigung von cDNA	21
2.2.10	<i>In vitro</i> Transkription (1. Runde).....	21
2.2.11	cDNA-Synthese (2.Runde).....	22
2.2.12	<i>In vitro</i> Transkription mit Markierungsreaktion (2.Runde).....	23
2.2.13	Fragmentierung.....	24
2.3	Methoden der <i>Microarray</i> -Technologie	25
2.3.1	Der <i>Human T_{reg} Chip</i>	25
2.3.2	Hybridisierungsmix und Hybridisierungsbedingungen	26
2.3.3	Posthybridisierung und Cy5-Streptavidin-Färbung	27
2.3.4	Auswertung der Rohdaten eines <i>Microarrays</i>	28
2.3.5	Normalisierung von <i>Microarray</i> -Daten.....	29
2.3.6	Signifikanz-Analyse.....	29
2.3.7	Cluster-Analyse	29
2.4	Zellbiologische Methoden	30
2.4.1	Kulturbedingungen eukaryontischer Zellen.....	30

2.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
2.4.3	Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs).....	31
2.4.4	Zellzahlbestimmung.....	31
2.4.5	Generierung von Leukämiezellen mit dendritischer Differenzierung	31
2.4.6	Kokulturbedingungen zur Analyse von T-Zellen	32
2.4.7	Gewinnung von Zellkulturüberständen primärer AML-Blasten	32
2.4.8	Proliferationstest	33
2.4.8.1	„Mixed lymphocyte reaction“	33
2.4.8.2	Proliferation von T-Zellen nach Kultur in AML-Zellkulturüberständen.....	33
2.4.9	Stimulation autologer T-Zellen mit AML-DCs	34
2.4.10	Zytotoxizitätsnachweis	34
2.4.11	Zellzyklus-Analysen	35
2.5	Zelluläre Immunologie	36
2.5.1	Immunomagnetische Separation von Zellenpopulationen.....	36
2.5.2	Durchflusszytometrie.....	36
2.5.2.1	Intrazelluläre FACS-Analyse von IL-2 und IFN- γ	37
2.5.2.2	Separation von CD4 ⁺ T-Zellen aus AML-Patienten.....	38
2.5.3	„Fluorescence in-situ hybridisation“ (FISH)	38
2.5.4	ELISPOT	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Generierung von AML-DCs und ihr Einfluss auf T-Zellen	40
3.1.1	<i>in vitro</i> Differenzierung zu AML-DCs	40
3.1.2	Überprüfung des leukämischen Ursprungs der AML-DCs	43
3.1.3	Testung des immunogenen Potentials der AML-DCs	44
3.1.4	Testung der T-Zell-Stimulationskapazität von AML-Blasten und –DCs.....	44
3.1.5	Zytotoxizität von T-Zellen nach Kokultur mit AML-DCs	46
3.2	Funktionelle <i>in vitro</i> Analyse der T-Zelldysfunktion bei AML	47
3.2.1	Proliferation nach allogenem „priming“ mit AML-Blasten	47
3.2.2	Untersuchungen mit AML-Zellkulturüberständen	48
3.2.2.1	Produktion der T _H 1-assoziierten Zytokine IL-2 und IFN- γ	49
3.2.2.2	Zellzyklusanalysen.....	52
3.2.3	Expression von IL-10 als immunregulatorisches Zytokin.....	53
3.2.3.1	ELISPOT zur Analyse der IL-10 Produktion	53
3.3	Differentielle Genexpressionsanalyse von CD4 ⁺ T-Zellen aus AML-Patienten	54
3.3.1	Qualität der verwendeten cRNA-Sonden	55
3.3.2	Qualität der verwendeten <i>Custom</i> -Arrays.....	55
3.3.3	Identifizierung und Beschreibung der differenziell exprimierten Gene	56
3.3.4	Quantitative Realtime RT-PCR	60
4	Diskussion	61
4.1	Generierung von AML-DCs und ihr Einfluss auf T-Zellen	61
4.1.1	<i>in vitro</i> Differenzierung zu AML-DCs und ihre stimulatorische Kapazität	62
4.1.2	Überprüfung des immunogenen und zytotoxischen Potentials der AML-DCs ...	64
4.2	Funktionelle <i>in vitro</i> Analyse der T-Zelldysfunktion bei AML	66
4.2.1	<i>in vitro</i> „priming“ von allo genen T-Zellen mit leukämischen Blasten.....	67
4.2.2	Experimente mit Zellkulturüberständen	67
4.3	Differentielle Genexpressionsanalyse von CD4 ⁺ T-Zellen aus AML-Patienten	68
4.4	Schlussfolgerungen.....	72

4.5	Ausblick und klinische Relevanz.....	75
5	Literaturverzeichnis	77
6	Anhang	87
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	87
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	89
6.3	Tabellenverzeichnis	89
6.4	Publikationen	90
6.5	Lebenslauf.....	91
6.6	Danksagung	92
6.7	Erklärung	94

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem verteidigt den Organismus gegen Infektionen durch eindringende Mikroorganismen, und es besitzt die Fähigkeit, entartete körpereigene Zellen zu eliminieren. Im Laufe der Evolution hat das Immunsystem umfassende Schutzmechanismen entwickelt, die aus einem fein abgestimmten System verschiedener zellulärer und humoraler Komponenten bestehen. Alle zellulären Komponenten stammen von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Eine Vielzahl unterschiedlicher weißer Blutkörperchen (Leukozyten) ist für eine effektive Immunantwort erforderlich, darunter Makrophagen und dendritische Zellen, die Teil des angeborenen Immunsystems sind, sowie die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems. Die Lymphozyten unterteilen sich in zwei Hauptgruppen: B- und T-Lymphozyten. Sie zirkulieren im Blut und in der Lymphe. Man findet sie außerdem in den peripheren lymphatischen Geweben, wie Milz, Lymphknoten und in den mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben (Peyer'sche Plaques und Tonsillen).

Bei einer Immunreaktion muss gewährleistet sein, dass diese sich ausschließlich gegen Strukturen richtet, die für den eigenen Organismus fremd oder schädlich sind. Eine der Hauptaufgaben des Immunsystems besteht also darin, zwischen Selbst und Nichtselbst, bzw. zwischen gesunden Zellen und Tumorzellen zu unterscheiden. Fehler in diesem System können zur Entwicklung von Autoimmun- oder Krebserkrankungen führen [1].

1.1.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten (oder T-Zellen) sind für eine Form der Abwehr zuständig, die als zelluläre Immunität bezeichnet wird. Während die humorale Immunantwort der B-Zellen ihren Schutz auf extrazelluläre Bereiche des Körpers erstreckt, können mit Hilfe der zellulären Immunantwort Erreger bekämpft werden, die bereits in das Innere von Zellen vorgedrungen sind. Ebenso können auch transformierte körpereigene Zellen erkannt und eliminiert werden.

Die T-Zellen entstehen im Knochenmark, reifen aber im Thymus. Jede T-Zelle trägt einen spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR). Anders als die Antikörper der B-Zellen können die T-Zell-Rezeptoren freie Antigene im Körper nicht erkennen, sondern ausschließlich in Form kurzer Peptidfragmente, die auf der Oberfläche von

körper eigenen Zellen (antigen-präsentierenden Zellen) präsentiert werden. Man unterscheidet drei funktionelle Hauptpopulationen von T-Zellen: Zytotoxische T-Zellen und zwei Typen von T-Helferzellen, die T_H1 - und T_H2 -Zellen. Alle drei Arten von T-Zellen erkennen Antigene, die von unterschiedlichen zellulären Kompartimenten stammen: Charakteristisch für zytotoxische T-Zellen ist die Expression des CD8-Korezeptors ($CD8^+$ T-Zellen). Im Gegensatz zu den T-Helferzellen, die sich durch Expression des CD4-Korezeptors auszeichnen, sind sie unmittelbar an der Abwehr beteiligt: sie erkennen und töten mit Viren infizierte oder entartete Zellen direkt. $CD4^+$ T-Zellen können zu zwei Arten von Effektorzellen differenzieren: T_H1 -Zellen (inflammatorische T-Zellen) aktivieren die keimtötenden Eigenschaften von Makrophagen, T_H2 -Zellen (T-Helferzellen) regen naive antigenspezifische B-Zellen dazu an, Antikörper zu produzieren, und lösen somit eine humorale Immunantwort aus.

Die komplexen Interaktionen zwischen den Zellen des Immunsystems werden durch verschiedene Zytokine vermittelt. Sie werden als Antwort auf verschiedene Stimuli von Zellen abgegeben und beeinflussen dadurch das Verhalten anderer Zellen. Zytokine binden an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen und lösen somit Veränderungen in der betroffenen Zelle aus, wie z.B. Proliferation, Wachstum, Differenzierung oder Apoptose. Interleukin 2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ), die von T_H1 -Zellen sezerniert werden, spielen eine zentrale Rolle bei der Proliferation von T-Zellen. Die Unterdrückung von Immunantworten wird zum Beispiel über die Zytokine Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 10 (IL-10) vermittelt, die von T_H2 -Zellen produziert werden [1].

1.1.2 Antigen-präsentierende Zellen (APCs)

Hat eine Zelle ein Pathogen über Phagozytose aufgenommen, bzw. ist ein Pathogen aktiv in die Zelle eingedrungen, werden Fragmente des Antigens von intrazellulären Glykoproteinen, den MHC (*major histocompatibility complex*)-Molekülen, gebunden. Dieser Molekülkomplex wird in die Plasmamembran der Zelle integriert und auf der Oberfläche der antigen-präsentierenden Zelle (APC) präsentiert. Die spezifischen T-Zellrezeptoren erkennen diese von MHC und Antigenfragment gebildete Kombination aus Selbst und Fremd. $CD8^+$ T-Zellen erkennen Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden auf der Oberfläche der infizierten Zellen präsentiert werden. Peptide von Pathogenen, die sich in intrazellulären Vesikeln vermehren, und solche, die

von extrazellulären Krankheitserregern stammen, werden von MHC-Klasse-II-Molekülen an die Zelloberfläche transportiert und den $CD4^+$ T-Helferzellen präsentiert.

Zu den wichtigsten professionellen APCs gehören die dendritischen Zellen (DCs). Man findet sie in den meisten Körpergeweben, z.B. der Haut, im Respirationstrakt oder in den lymphatischen Geweben. Unreife DCs wandern vom Blut in die Gewebe und verbleiben dort, bis sie auf ein Pathogen/Antigen treffen, das sie entweder phagozytisch oder makropinozytisch aufnehmen, prozessieren und Teile davon den T-Zellen präsentieren. Während dieses Prozesses reifen die DCs heran und wandern zu den Lymphknoten, wo sie die bei weitem stärksten Stimulatoren naiver T-Zellen sind [1].

1.1.3 Die Interaktion zwischen T-Zellen und APCs

Nachdem die T-Zellen ihre Entwicklung im Thymus abgeschlossen haben, gelangen sie ins Blut und von dort aus in die peripheren lymphatischen Organe. Sie zirkulieren solange im Blut und in der Lymphe, bis sie auf ihr spezifisches Antigen in Form eines MHC-Fremdpeptid-Komplexes treffen, den sie aufgrund ihres spezifischen T-Zell-Rezeptors erkennen können. Es sind jeweils nur wenige T-Zellen spezifisch für ein bestimmtes Antigen. Bei einer Infektion müssen sich diese wenigen Zellen innerhalb kurzer Zeit stark vermehren. Um also eine effiziente Immunantwort gewährleisten zu können, müssen antigenspezifische naive T-Zellen stimuliert werden, zu proliferieren und zu Effektorzellen zu differenzieren, die sich dann aktiv an der Bekämpfung von Krankheitserregern beteiligen können. Die Aktivierung naiver T-Zellen erfordert zwei unabhängige stimulatorische Signale. Die Bindung des spezifischen TCR an den von der APC angebotenen Peptid-MHC-Komplex liefert das erste stimulatorische Signal. Dies allein reicht aber für eine effiziente T-Zell-Aktivierung nicht aus. Hierfür wird zusätzlich ein kostimulatorisches Signal von einer spezialisierten APC benötigt. Die Aktivierung des kostimulatorischen Rezeptors CD28 auf der Oberfläche der naiven T-Zelle erfolgt durch Bindung an verschiedene Moleküle auf der APC (CD40, CD80, CD86). Erst wenn die Stimulation des TCR und des CD28-Moleküls erfolgt sind, differenziert eine naive T-Zelle zu einer aktivierten T-Effektorzelle. Da das antigenspezifische (Peptid-MHC-TCR) und das kostimulatorische Signal bei der Aktivierung simultan von derselben Zelle vermittelt werden müssen, können nur professionelle APCs, also hauptsächlich DCs und Makrophagen, die primäre T-Zellaktivierung auslösen. Weiterhin exprimieren aktivierte T-Zellen mit CD28

verwandte Oberflächenproteine, wie z.B. CTLA-4, wodurch die Kostimulation der T-Zelle modifiziert werden kann. Die wichtigste Konsequenz der T-Zell-Stimulation ist der Eintritt der naiven Zellen in die G1-Phase des Zellzyklus und gleichzeitig die Initiation der IL-2 Synthese [1].

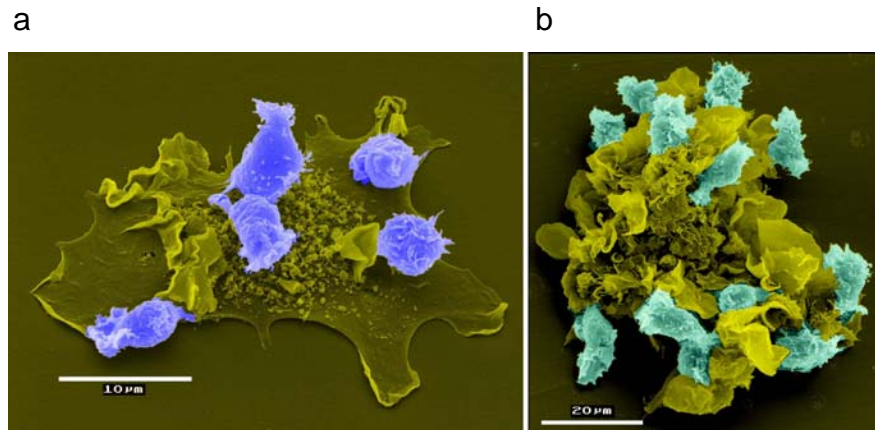


Abbildung 1: Interaktion von DCs mit T-Zellen. Die elektronenmikroskopischen Abbildungen zeigen die Interaktion von a) einer unreifen und b) einer reifen DC mit autologen T-Zellen. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Kurt Dittmar, GBF Braunschweig.

1.2 T-Zell Toleranz

Eine Hauptaufgabe des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden, sowie zwischen harmlosen und pathogenen Antigenen. Normalerweise reagiert das Immunsystem nicht gegen körpereigene oder harmlose Moleküle, eine Eigenschaft, die als immunologische Toleranz bezeichnet wird. Diese Toleranz ist notwendig für den Schutz vor Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungen und Allergien. Sie stellt allerdings ein Problem bei Tumorerkrankungen dar (vgl. 1.3). Es gibt verschiedene Mechanismen, um Toleranz zu induzieren, darunter die Deletion von autoreaktiven Zellen, die Induktion von Anergie und die aktive Unterdrückung einer Immunantwort durch regulatorische T-Zellen (T_{reg}) [1].

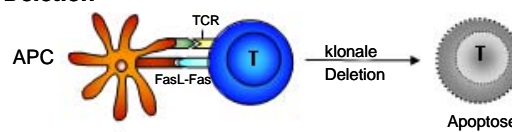
1.2.1 Zentrale und periphere T-Zell Toleranz

Die Fähigkeit des Immunsystems zur Unterscheidung zwischen fremden Antigenen und Selbstantigenen ist eine von vielen herausragenden Fähigkeiten des Immunsystems. Die Grundlage hierfür ist die so genannte zentrale Toleranz, die durch klonale Deletion autoreaktive T-Zellen noch während ihrer Entstehung im Thymus durch negative Selektion und Apoptose-Induktion beseitigt.

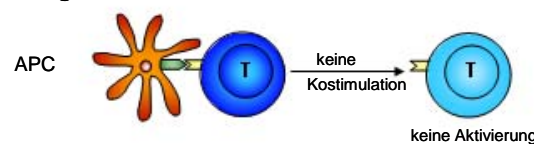
Einige autoreaktive T-Zellen entkommen jedoch diesem Selektionsprozess. Diese T-Zellen tragen einen T-Zellrezeptor, der stark an ein körpereigenes Peptid bindet, das an ein MHC-Molekül gebunden auf der Oberfläche einer APC präsentiert wird. Die Aktivität der autoreaktiven T-Zellen wird in der Peripherie sowohl passiv als auch aktiv unterdrückt (periphere Toleranz). Die autoreaktiven T-Zellen können funktionell inaktiviert (Anergie) oder beim Zusammentreffen mit Selbst-Antigen in der Peripherie deletiert werden [2]. Spezialisierte regulatorische T-Zellen (T_{reg}) vermögen zudem, die Aktivierung und Proliferation der autoreaktiven T-Zellen aktiv zu unterdrücken [3].

Periphere Toleranz

Deletion



Anergie



Suppression

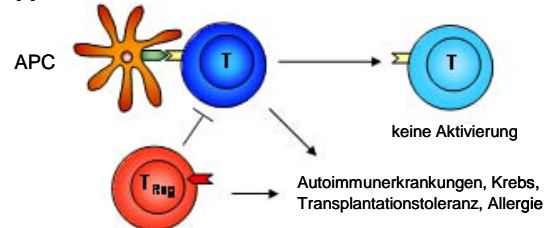


Abbildung 2: Periphere Toleranzmechanismen. Dargestellt sind verschiedene Mechanismen, die in der Peripherie zu immunologischer Toleranz führen. Modifiziert aus [4].

1.2.2 T-Zell Anergie

Die Anergie ist ein inaktives Stadium der T-Zellen, das durch das Unvermögen der Zellen gekennzeichnet ist, als Antwort auf einen antigenen Stimulus zu proliferieren. Anergie ist ein Mechanismus, der *in vivo* zur peripheren Toleranz führt, das heißt zur Unterdrückung einer Immunantwort gegen körpereigene Antigene. Man unterscheidet dabei die klonale Anergie und die adaptive Toleranz (*in vivo* Anergie). Erstere stellt einen prinzipiellen Wachstumsblock dar, der durch unzureichende T-Zellaktivierung ausgelöst wird und nicht unbedingt im Verlust der Effektorfunktionen resultiert. Wird diese T-Zelle im Folgenden vollständig aktiviert, kann sie ihre Funktionen auch wieder aufnehmen. Die adaptive Toleranz wird meistens *in vivo* durch eine Stimulation ohne

Kostimulation initiiert. Wie bereits erwähnt, erfordert die Aktivierung naiver T-Zellen zwei unabhängige Signale, die die T-Zelle von derselben APC erhalten muss: Die Bindung des spezifischen TCR an den von der APC angebotenen Peptid-MHC-Komplex und die Bindung des kostimulatorischen Rezeptors CD28 auf der Oberfläche der naiven T-Zelle. Gewöhnliche Gewebezellen exprimieren zwar auch Peptid-MHC-Komplexe, sie exprimieren jedoch in der Regel nicht das für die Kostimulation notwendigen Oberflächenmoleküle. Bindet eine T-Zelle an einen dieser Peptid-MHC-Komplexe, so erhält diese T-Zelle nur ein Aktivierungssignal. Das Ausbleiben des kostimulatorischen Signals kann zu einer unzureichenden Aktivierung und damit zum Zustand der adaptiven Toleranz (*in vivo* Anergie) der T-Zelle führen [5]. Selbst wenn die anerge T-Zelle danach auf eine APC mit kostimulatorischen Eigenschaften trifft, die das spezifische Antigen der T-Zelle präsentiert, verbleibt sie im anergen Zustand. Weiterhin ist dieser Zustand nicht IL-2-reversibel. Dieser Mechanismus trägt somit zur peripheren Selbsttoleranz gegen eigene Gewebeantigene bei.

Eine wichtige Eigenschaft aneurer T-Zellen ist ihr Unvermögen, IL-2 zu produzieren und nach Kontakt mit ihrem Antigen zu proliferieren und zu funktionsfähigen Effektorzellen zu differenzieren, was zur Reaktionsunfähigkeit von T-Zellen gegenüber eigenen Gewebeantigenen beiträgt. Aneerge T-Zellen sind zwar in oben genannter Weise funktionell inaktiv, sie können allerdings trotzdem eine suppressive Fähigkeit gegenüber anderen T-Zellen besitzen [6]. Die Unterdrückung erfolgt allerdings nicht über T/T-Zell-Interaktionen, sondern das Ziel der aneuren T-Zellen sind die APCs. Indem die aneuren T-Zellen die APCs so regulieren, dass sie ihre Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung verlieren, regulieren sie aktiv Immunantworten [7]. Aneerge T-Zellen verfügen über eine breite Palette an Regulationsmechanismen, die je nach Situation kombiniert oder einzeln eingesetzt werden können [5].

1.2.3 Regulatorische T-Zellen

Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind reife $CD4^+$ -T-Helferzellen, die die Fähigkeit besitzen, nach spezifischer Aktivierung andere T-Zellen in ihrer Proliferation zu inhibieren und dadurch Immunantworten zu unterdrücken. Ihre regulatorischen Eigenschaften entstehen nicht erst in der Peripherie, sondern entwickeln sich bereits im Thymus [8]. Innerhalb der T_{reg} -Zellpopulation gibt es eine große Heterogenität. Ein geeigneter Marker für T_{reg} -Zellen stellt die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) dar, obwohl das Merkmal selbst in keinem Zusammenhang zur

regulatorischen Funktion zu stehen scheint. $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen stellen einen Anteil von ca. 1-3% der peripheren $CD4^+$ -T-Zellen dar. Charakteristisch für $CD4^+CD25^+$ Zellen ist die Expression von CTLA-4 und FoxP3. Sie proliferieren kaum nach TCR Stimulierung *in vitro*, und ihr Wachstum erfolgt nur in Abhängigkeit von exogenem IL-2 [9].

Zwei weitere T-Zell-Subpopulationen (T_{H3} und T_{r1}) gehören zur Gruppe der so genannten induzierbaren regulatorischen T-Zellen (iT_{reg}). Diese ursprünglich anergen T-Zellen bleiben nach einer erneuten TCR-Stimulierung nicht im anergen Zustand (vgl. 1.2.2.1). T_{H3} -Zellen bilden daraufhin IL-4, IL-10 und TGF- β [10], und T_{r1} -Zellen sezernieren TGF- β in einer von IL-10 abhängigen Art und Weise [11]. Durch die Ausschüttung dieser Zytokinprofile sind diese T-Zellen in der Lage, normale sowie autoreaktive T-Zell-Antworten zu unterdrücken. Dieser Mechanismus ist ein weiterer Bestandteil peripherer Immuntoleranz. Induzierbare (iT_{reg}) und natürlich vorkommende T_{reg} -Zellen unterscheiden sich in der Art und Weise ihrer Entstehung und in ihrem Wirkungsmechanismus. Während T_{H3} - und T_{r1} -Zellen durch die Ausschüttung von Zytokinen (TGF- β bzw. IL-10) ihre regulatorische Funktion ausüben, wirken natürliche T_{reg} -Zellen durch einen bislang noch unzureichend verstandenen Mechanismus, der einen Zell/Zell-Kontakt erfordert und scheinbar ohne Zytokine auskommt [12].

1.3 Tumore und das Immunsystem

Das Immunsystem hat nicht nur die Aufgabe, Krankheitserreger zu erkennen und zu zerstören, sondern es kontrolliert außerdem körpereigene Zellen, die entarten, d.h. zu Tumorzellen werden können. T-Zellen stellen als Hauptakteure der adaptiven Immunabwehr die wichtigsten Immunzellen für die Überwachung und Beseitigung von entarteten Zellen bzw. Tumoren dar (*immunosurveillance*) [13, 14]. Im Falle einer Krebserkrankung hat das Immunsystem das Problem der Selbst/ Nichtselbst-Erkennung, da es sich bei den Krebszellen zwar um entartete, aber immer noch um körpereigene Zellen handelt. Es sind bisher zahlreiche Tumorantigene identifiziert worden [15, 16], die von T-Zellen erkannt werden. Man unterscheidet dabei spezifische Tumorantigene, die durch Mutation oder Translokation von zellulären Genen entstehen (z.B. das leukämische Fusionsprotein bcr-abl) und Tumor-assoziierte Antigene (TAAs). TAAs sind Antigene, die auch auf anderen Zellen vorkommen (z.B. Differenzierungsantigene oder normale Antigene, die auf dem Tumor überexprimiert sind). Obwohl diese Tumor-

und Tumor-assoziierten Antigene eine anti-Tumor-Reaktion *in vitro* und *in vivo* auslösen können, entsteht eine spontane Reaktion gegen einen etablierten Tumor nur in Ausnahmefällen. Man kann vermuten, dass die Ausbreitung von Tumorzellen vom Immunsystem nicht als „gefährlich“ angesehen wird. Da Tumorantigene stets mit Selbstantigenen assoziiert sind, ist die Aktivierung tumorantigen-spezifischer T-Effektorzellen und die Präsentation der Tumorantigene sowie die Kostimulation suboptimal. Somit würde eher die Induktion immunregulierender T-Zellen begünstigt, was schließlich zur Tumormunität führt.

Wie genau die komplexen Reaktionen des Immunsystems auf die Entstehung eines Tumors ablaufen, ist noch zu großen Teilen ungeklärt. Wahrscheinlich ist jedoch, dass beide Systeme (Tumorgewebe und Immunsystem) sich gegenseitig beeinflussen. Strausberg [17] nimmt diesbezüglich drei Phasen an, die schließlich zur Immuntoleranz führen: 1. Eliminierungsphase, 2. Gleichgewichtsphase und 3. Tumormunität. In der ersten Phase versucht das Immunsystem, das Tumorgewebe zu beseitigen. Wenn dies nicht möglich ist, tritt die 2. Phase ein, in der sich das Tumorgewebe ständig unter dem Einfluss bzw. Selektionsdruck des Immunsystems befindet und sich durch genetische Veränderungen anpasst. Mehrere „Runden“ der Selektion und Anpassung führen schließlich zu erhöhter Tumormunität und zur 3. Phase, in der sich der Tumor trotz eines intakten Immunsystems ungehindert ausbreiten kann (Toleranz des Immunsystems) [17].

1.3.1 Mechanismen der Immunevasion („*immune escape*“)

Die meisten Tumore unterliegen scheinbar keiner Kontrolle durch das Immunsystem. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass sich bei Mäusen, die keine Lymphozyten besitzen, die Tumorfrequenz kaum von der normaler Kontrolltiere unterscheidet [18]. Dasselbe gilt für Menschen mit einem Mangel an T-Zellen. Da es jedoch möglich ist, eine spezifische anti-Tumor-Immunantwort *in vitro* zu induzieren [19] und vereinzelt auch tumorspezifische T-Zellen *in vivo* gefunden wurden [20], vermutet man, dass die Tumorzellen diverse Mechanismen entwickelt haben, der *immunosurveillance* zu entkommen [21]. Einige dieser Mechanismen sind im Folgenden zusammengefasst:

- Unzureichende Aktivierung von T-Zellen durch den Tumor [22-25]
 - unzureichende oder fehlende Kostimulation durch die Tumorzellen
 - verminderte Expression von MHC-Klasse I/II Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen
 - fehlende Adhäsionsmoleküle der Tumorzellen
 - defekte Antigenpräsentation, z.B. verminderte Expression von TAAs
- Expression immunsuppressiver Moleküle durch den Tumor [26, 27]
 - z.B. Zytokine (TGF- β , IL-10, VEGF)
- Toleranzmechanismen des Immunsystems (vgl. Abbildung 2) [28-32]
 - T-Zell Deletion
 - Induktion von Anergie
 - Regulatorische T-Zellen
- Apoptose-Resistenz/ Tumor Counterattack [33, 34]
 - Expression anti-apoptotischer Moleküle
 - Runterregulierung pro-apoptotischer Moleküle
 - Expression von Todesrezeptorliganden (z.B. CD95L)

Es gibt also eine Vielzahl von Strategien, mit denen sich Tumore dem Immunsystem entziehen können. Eine Hauptursache für das Unvermögen des Immunsystems, die Tumorzellen zu erkennen, ist die Tatsache, dass Tumore aus einem Teil des eigenen Gewebes entstehen, und daher hauptsächlich „Selbstantigene“ tragen, gegen die die T-Zellen tolerant sind. Daher stellen Toleranzmechanismen eine Hauptursache für eine fehlende anti-Tumor-Immunantwort dar.

1.4 Akute myeloische Leukämie (AML)

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine Erkrankung, der eine maligne Entartung von hämatopoetischen Stammzellen oder auch frühen unreifen myeloischen Vorläuferzellen der normalen Blutbildung zugrunde liegt. Die leukämischen Zellen verlieren dabei die Fähigkeit der Ausreifung zu funktionsfähigen Blutzellen, und sie entziehen sich den normalen Kontrollmechanismen von Zellwachstum- und Differenzierung (Differenzierungsblock). Es kommt zur Expansion der leukämischen Zellpopulation und zur Verdrängung der normalen Blutbildung im Knochenmark. Die Folgen sind eine dramatische Verminderung der Erythrozyten,

Leukozyten und Thrombozyten. Die betroffenen Patienten leiden an einer schweren Anämie, haben eine hohe Infektanfälligkeit und neigen zu starken Blutungen. Pro Jahr erkranken etwa 2-3 von 100.000 Menschen an AML, wobei die Erkrankungshäufigkeit mit dem Alter ansteigt. Die bisherige Therapie der AML ist darauf ausgerichtet, die leukämischen Zellen zu zerstören und die normale Blutbildung wieder herzustellen. Mit Hilfe intensiver Chemotherapiekombinationen kann heute bei etwa 60-80% der Patienten die Leukämiezellpopulation vorübergehend unterdrückt werden, sodass eine so genannte Remission, d.h. eine Krankheitsfreiheit vorliegt. In der Mehrzahl aller Fälle kommt es jedoch nach wenigen Monaten bis einigen Jahren zu einem Rückfall (Rezidiv) der Erkrankung mit einem letztlich tödlichen Verlauf. In einigen Fällen erfolgt eine autologe oder allogene Stammzelltransplantation. Eine dauerhafte Krankheitsfreiheit und endgültige Heilung ist derzeit nur bei etwa 30-40% aller intensiv behandelten Patienten erreichbar [35].

Die AML ist keine einheitliche Erkrankung. Eingeteilt wird sie anhand genetischer, immunologischer und äußerer Zellmerkmale. Der Vorschlag der neuen WHO-Klassifikation für akute myeloische Leukämien unterscheidet folgende Kategorien [36]:

- AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Aberrationen (t(8;21)(q22;q22); t(15;17)(q22;q21); inv16(p13;q22); (v;11q23))
- AML mit Myelodysplasie-assoziierten Merkmalen
 - AML mit vorangegangenen MDS (myelodysplastisches Syndrom)
 - AML mit multilineärer Dysplasie ohne vorangegangenes MDS
- AML, therapieassoziiert
 - Assoziation mit Alkylantientherapie
 - Assoziation mit Topoisomerase Typ-II
- AML, nicht anderweitig spezifiziert

Die FAB-Klassifikation (French-American-British) teilt die akuten myeloischen Leukämien vor allem aufgrund äußerer mikroskopisch sichtbarer Merkmale in acht Untergruppen ein (M0 - M7, Abbildung 3) [36]. Nach der Einteilung der Leukämien richtet sich in vielen Fällen auch die Auswahl der Therapie [37].

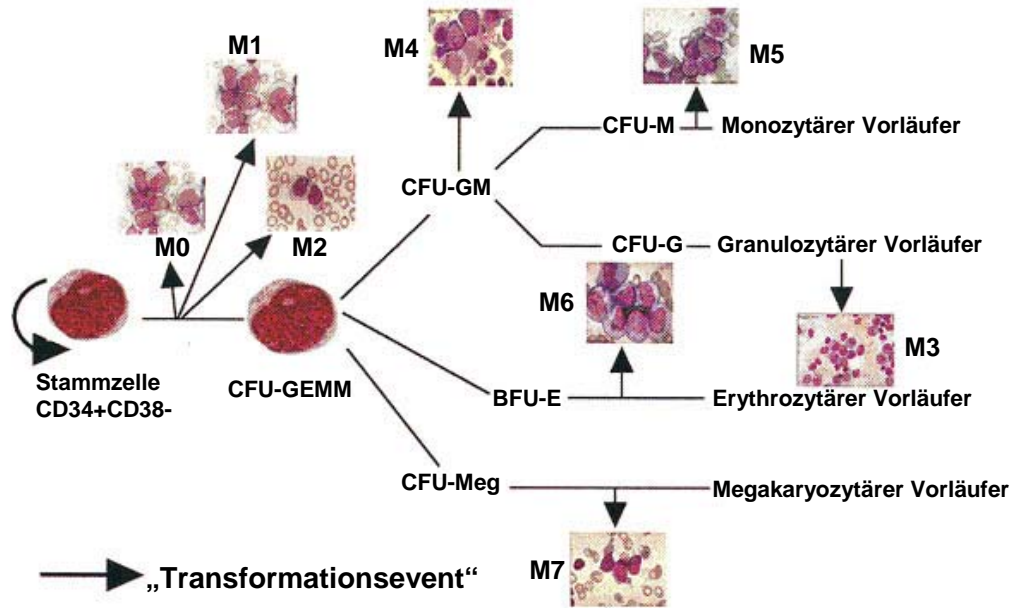


Abbildung 3: Einteilung der AML nach der FAB-Klassifikation. Die FAB-Klassifikation unterteilt die AML in acht verschiedene Gruppen (M0-M7) nach ihrer Abstammung und ihrem Differenzierungsgrad [Q]. CFU-GEMM: colony forming unit der Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten, Makrophagen; CFU-GM: colony forming unit der Granulozyten und Makrophagen; CFU-M: colony forming unit der Makrophagen; CFU-G: colony forming unit der Granulozyten; BFU-E: burst forming unit der Erythrozyten; CFU-Meg: colony forming unit der Megakaryozyten [38].

Tabelle 1: Beschreibung der FAB-Klassifikation

FAB-Klassifikation	AML-Subtyp
M0	AML ohne Ausreifung
M1	AML mit minimaler Ausreifung
M2	AML mit Ausreifung
M3	Akute Promyelozytenleukämie
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M5a	Akute Monoblastenleukämie ohne Ausreifung
M5b	Akute Monoblastenleukämie mit Ausreifung
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute Megakaryozytenleukämie

1.4.1 AML als Modellerkrankung für T-Zelldysfunktion

Bei der AML handelt es sich um eine Krebserkrankung der myeloischen Reihe der Hämatopoese, bei der die T-Zellen nicht direkt von der malignen Transformation betroffen sind. Immunbiologische Untersuchungen der Leukämie-Wirt-Wechselbeziehungen haben gezeigt, dass „*immune escape*“ Mechanismen sowohl die autologe antileukämische Immunantwort als auch immuntherapeutische Behandlungsversuche negativ beeinflussen können [39]. Dabei kommt neben der Antigenmodulation und unzureichender Expression kostimulatorischer Moleküle den humoralen inhibierenden Faktoren sowie insbesondere peripheren Toleranzmechanismen eine große Bedeutung zu [40].

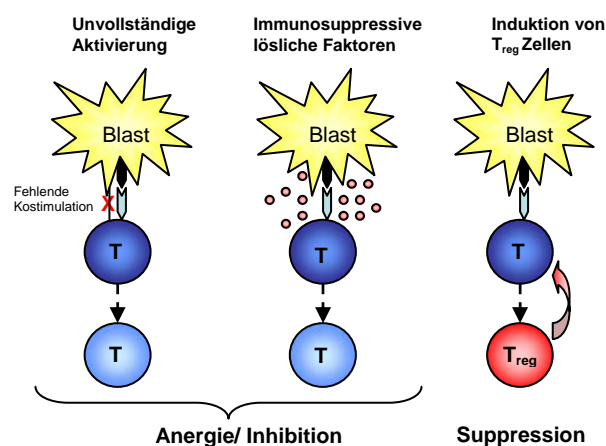


Abbildung 4: Mögliche „*immune escape*“ Mechanismen der AML-Blasten. Blast: primäre AML-Zelle; T: T-Zelle; T_{reg}: regulatorische T-Zelle

Da die Tumorlast bei Leukämiepatienten bis zu 1 kg (= 10^{12} Zellen) betragen kann und die entarteten Zellen in direktem Kontakt zu den peripheren T-Zellen stehen, besteht eine Situation der chronischen Antigen-Stimulation. Verschiedene experimentelle Modellsysteme haben hierfür die antigen-spezifische Immunantwort in der Situation der chronischen Antigen-Stimulation untersucht [41, 42]. Es konnte gezeigt werden, dass periphere Toleranz in T-Zellen nicht nur über klonale Deletion oder Ignoranz, sondern im Wesentlichen über die Induktion von Anergie erzielt wird. Hierbei wurden anerge $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen als regulatorische Zellen identifiziert, die unter anderem über Interleukin-10 eine weitere Aktivierung von naiven T-Zellen verhindern können [41, 42]. Anergie, regulatorische T-Zellen scheinen aber für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion die chronische Stimulation mit ihrem Antigen zu benötigen. Damit sind die Ergebnisse dieser Modellsysteme auch für die immunologische Situation der Leukämie mit leukämie-spezifischer Toleranz autologer

T-Zellen von besonderer Bedeutung. Derartige immunregulatorische Mechanismen, die zur Induktion von leukämie-spezifischer Toleranz führen können, sind bei Leukämie-Patienten bisher nicht untersucht worden.

1.5 Aufgabenstellung

Während konventionelle Therapieansätze immer noch unzureichende Langzeiterfolge in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) hervorbringen, stellen immuntherapeutische Konzepte einen vielversprechenden Ansatz dar. Weitgehend unklar ist jedoch, warum die immunologische Erkennung und Zerstörung der Leukämie-Zellen *in vivo* nur unzureichend funktioniert. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die gestörte T-Zellantwort gegen die Leukämiezellen mit zell- und molekularbiologischen Methoden bei Patienten mit AML untersucht werden. Es wird vermutet, dass potentiell leukämie-reaktive T-Zellen *in vivo* nur unzureichend durch die AML-Blasten aktiviert werden und /oder immunregulatorische Mechanismen zur Induktion von spezifischer peripherer Toleranz führen. Weiterhin sollen im Rahmen dieser Arbeit Leukämiezellen aus peripheren mononukleären Blutzellen *in vitro* zu Leukämiezellen mit dendritischer Differenzierung (AML-DC) generiert werden. Mit Hilfe dieser AML-DCs soll die gestörte Tumor/T-Zellinteraktion im Hinblick auf die Immundysregulation untersucht werden. Die Untersuchung der immunregulatorischen Funktionen schließt funktionelle Untersuchungen (Proliferationsassays, Zytotoxizitätsassay, Zytokinproduktion), sowie eine molekulare Analyse der T-Zellen ein. Im Rahmen dieser Arbeit sollen erstmalig T-Zellen aus AML-Patienten im Vergleich zu T-Zellen gesunder Spender unter Einsatz von cDNA Genexpressions- *Microarrays* differentiell untersucht werden, um so relevante Schlüsselgene und molekulare Mechanismen der Immundysregulation zu identifizieren. Einzelne differentiell exprimierte Kandidatengene sollen mittels Realtime RT-PCR analysiert werden.

Die Identifizierung der molekularen und zellulären Grundlagen peripherer Toleranz und Immunregulation sind Gegenstand aktueller Forschung. Es ist davon auszugehen, dass ein besseres Verständnis der Immunregulation bei Leukämie-Patienten therapeutisch für die Induktion einer effektiven spezifischen Immunantwort genutzt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Blutproben

Das Blut der gesunden Kontrollen stammt von freiwilligen Spendern unterschiedlicher Altersgruppen. Die Entnahme des Blutes der AML-Patienten unterlag dem Ethikvotum der Medizinischen Hochschule Hannover (Nr. 3375). Die Patienten wurden über die Teilnahme an dieser Studie ärztlich aufgeklärt und stimmten der Entnahme und Weiterverarbeitung ihres Blutes schriftlich zu. Die Blutentnahme erfolgte generell unter ärztlicher Aufsicht und unter Verwendung von Einwegspritzen mit Heparin. Die entnommene Blutmenge betrug zwischen 10 und 40 ml. Alle Spender erfüllten bestimmte gesundheitliche Kriterien, um eine möglichst homogene, von individuellen, immunrelevanten, gesundheitlichen Aspekten unbelastete Referenz zu gewährleisten. So durften die Spender keine akuten Entzündungen, Allergien oder Autoimmunerkrankungen aufweisen.

Tabelle 1: Patientencharakteristika

Patient	Sex	Geb.	ED	FAB	Zytogenetik	Blastenanteil
1	m	1931	09/2003	M4	-	75%
2	w	1953	07/2004	M5	FLT3ITD	70%
3	m	1942	03/2001	M2	-	80%
4	w	1960	04/2000	M4eo	inv (16)	80%
5	m	1938	01/1999	M4	-	80%
6	w	1938	04/2000	M2baso	t (8;21)	n.b.
7	w	1948	11/2002	M4eo	inv (16)	32%
8	m	1968	01/2004	M1	-	77%
9	m	1937	04/2004	M2	t (8;21)	67%
10	m	1934	02/2004	M1	-	75%
11	w	1960	03/2003	M2	t (8;21)	40%
12	w	1958	01/2004	M1	-	75%
13	m	1934	07/2004	M5	FLT3ASP	68%
14	w	1939	07/2004	M1	-	89%
15	m	1935	06/2004	M0	-	62%
16	m	1972	06/2004	M1	-	74%
17	w	1934	11/2005	M0	FLT3ITD	89%
18	m	1932	09/2005	M2	-	29%
19	w	1932	01/2004	M7	-	92%
20	w	1968	04/2005	M2	-	n.b.

Erläuterungen: Sex: Geschlecht; m: männlich; w: weiblich; Geb.: Geburtsjahr; ED: Erstdiagnose und Probenentnahme; FAB: FAB (French-American-British)-Klassifikation der Leukämie, Blastenanteil: im peripheren Blut; n.b.: nicht bekannt

2.1.2 Zelllinien

- HL-60: akute myeloische Leukämie FAB-Typ M2

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode um DNA-Fragmente voneinander zu trennen und zu identifizieren. Zur Herstellung eines Gels löst man Agarose (Biozym) durch Aufkochen in TBE-Puffer. Um die DNA sichtbar zu machen, gibt man Ethidiumbromid (Sigma) hinzu, das in die DNA interkaliert und unter UV-Licht sichtbar ist. Beim Erkalten des Gels polymerisiert die Agarose und das Gel wird fest. Die DNA wird nach Zugabe von DNA-Ladepuffer in die Taschen des erkalteten Gels pipettiert und eine Spannung angelegt. Die aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladene DNA läuft im elektrischen Feld zum Pluspol, wobei kleine Fragmente schneller und dadurch weiter im Gel laufen als größere. Durch Vergleich mit einem Größenstandard (*50 bp-DNA Ladder*, Invitrogen) können die erhaltenen DNA-Banden zugeordnet werden. Es wurden für diese Arbeit 2%ige Agarosegele verwendet.

- TBE-Puffer: 10,8 g Tris, 5,5 g Borat, 0,75 g EDTA ► auf 1 l mit H₂O auffüllen; pH = 8,3
- 5x DNA-Ladepuffer: 11 g Sucrose, 9 ml EDTA (0,1 M), 250 µl Bromphenolblau (10% (m/v)) ► auf 10 ml mit H₂O auffüllen.

2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit Trizol

Die Gesamt-RNA wurde mit „*TRIZOL Reagent*®“ (Invitrogen) aus den Zellen isoliert. Dazu wurden die Zellen bei 800xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml *TRIZOL Reagent*® resuspendiert. Während einer 10 minütigen Inkubation wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach Zugabe von 200µl Chloroform (Sigma), 15 sec kräftigem Schütteln, 15 min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (15 min, 14000xg, 4°C) trennte sich das Lysat in eine organische und eine wässrige Phase auf. Die klare, wässrige Oberphase, in der sich die RNA befindet, wurde vorsichtig abgezogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurde nun das gleiche Volumen an Isopropanol (J.T. Baker) hinzugegeben, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 15 min, 14000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Pellet zweimal mit 500 µl 75% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und durch zehnminütiges Erwärmen auf 56 °C in 10-20 µl DEPC-H₂O (Sigma) gelöst.

2.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit

Die Isolierung der RNA aus $< 5 \cdot 10^5$ Zellen erfolgte mit Hilfe von Säulen, an deren Füllmaterial die RNA bindet. Die Durchführung wurde mit Hilfe des „*RNeasy Mini Kit*“ (Qiagen) ausgeführt und erfolgte nach Herstellerangaben. Das Eluat wurde anschließend mit 2 μ l LPA (0,5 μ g/ μ l, Ambion), 50 μ l (0,5 Vol.) 7,5 M NH_4OAc (Sigma) und 375 μ l (2,5 Vol.) vorgekühltem, absoluten EtOH über Nacht bei -70°C gefällt, 45 min bei $14.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert, zweimal durch Zugabe von 80 % EtOH (-20°C) gewaschen und durch zehnmütiges Erwärmen auf 56°C in 10 μ l DEPC- H_2O resuspendiert.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration von RNA/DNA wurde photometrisch über eine OD-Messung bei 260 nm bestimmt (BioPhotometer, Eppendorf). Dazu wurde die Probe 1:100 mit TE verdünnt und gegen TE gemessen. Nur OD_{260} -Werte zwischen 0,1 und 1 sind aussagekräftig, wobei eine $\text{OD}_{260}=1$ ca. 40 μg RNA/ml und 50 μg DNA/ml entspricht. Zur Überprüfung der Reinheit der Probe wurde zusätzlich noch die OD_{280} bestimmt. Für proteinfreie RNA-Proben liegt der Quotient aus $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ zwischen 1,8 und 2,0.

- TE-Puffer (10/1): 0,5 ml Tris-HCl (2 M ; pH 7,4), 20 μ l EDTA (0,5 M; pH 8,0)
 - ▶ auf 100 ml mit H_2O auffüllen

2.2.5 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Durch die Reverse Transkription ist es möglich RNA in cDNA umzuschreiben. Um aus Gesamt-RNA nur die mRNA in cDNA umzuschreiben, verwendet man Oligo-dT-Primer, die an den Poly-A⁺-Schwanz der mRNA binden. In Gegenwart dieser Primer synthetisieren Reverse Transkriptasen die komplementäre DNA. Bis zu 5 μg der Gesamt-RNA werden mit DEPC- H_2O auf 9 μ l aufgefüllt und zunächst für 10 min auf 70°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Anschließend wurde der Ansatz 2 min auf Eis abgekühlt. Nachfolgend wurden 11 μ l eines Synthese-Mix zugegeben und der Ansatz bei 42°C eine Stunde im Thermocycler (T3, Biometra) inkubiert.

Reaktionsansatz:

4 µl	5x First Strand Buffer (Invitrogen)
2 µl	0,1 M DTT (Invitrogen)
1 µl	25 mM dNTPs (Invitrogen)
1 µl	Random-Primer (0,18 µg/µl; Amersham Bioscience)
1 µl	RNase Block (Stratagene, USA)
1 µl	BSA (2,5 mg/ml; Amersham Bioscience)
1 µl	MMLV-RT (Invitrogen)
11 µl	Summe

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reverse Transkriptase durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann man gezielt spezifische DNA-Fragmente in großen Mengen amplifizieren. Die Amplifikation der DNA läuft stets von 5' nach 3' (bezogen auf die *Primer*). Dabei erstellt eine hitzestabile DNA-Polymerase einen komplementären Strang zum *Template*. Der PCR-Prozess besteht aus drei Schritten: 1. Denaturierung (Erhitzen der Probe auf 94-98°C zur Trennung der Doppelstrang-DNA in zwei Einzelstränge); 2. Annealing (Hybridisieren der *Primer* mit dem *Template*); 3. Elongation (Synthese einer doppelsträngigen DNA durch die Polymerase). Es werden ca. 30 PCR-Zyklen durchgeführt, die von einem Thermocycler gesteuert werden. Da die Komplementierung an beiden DNA-Strängen der Ausgangs-DNA abläuft, wird in jedem Zyklus die Menge an DNA verdoppelt (exponentielles Wachstum).

2.2.6.1 Standard-PCR zur Amplifikation der AML-Marker

Die Amplifikation der AML-Marker WT-1, Proteinase-3, RHAMM und PRAME erfolgte nach einem Standardprotokoll mit der Taq-Polymerase von Invitrogen mit folgenden *Primern* (MWG-Biotech GmbH): WT-1: 5'-ATT CAG GAT GTG CGA CGT GTG, 3'-TGG CGG ACT AAT TCA TCT GAC C (403 bp); Proteinase-3: 5'-GAG CCC ACC CAG CAG CAC T, 3'-GAA GAA GTC AGG GAA AAG GCG (419 bp); RHAMM: 5'-CAA AAG GAG GAA CAA GCT GAA AG, 3'-CTT GTT GCT TGA GTT GGT TCT G (474 bp); PRAME: 5'-GTG CTT GAT GGA CTT GAT GTG GCT, 3'-TCA ATA GAG TCC AGC TGC ACC AT (409 bp). Die cDNA wurde mit dem Mastermix im Thermocycler (T3, Biometra) 5 min bei 94°C erhitzt, anschließend

folgten 34 Zyklen von 94°C (45 sec), 61°C (1 min) und 72°C (1 min). Abschließend wurde der Reaktionsansatz für 10 min auf 72°C erhitzt.

Reaktionsansatz:

2 µl	cDNA (1:10)
2 µl	Primermix (5 pmol/µl; MWG-Biotech GmbH)
2 µl	10x Puffer (Invitrogen)
0,6 µl	50 mM MgCl ₂ (Invitrogen)
0,4 µl	10 mM dNTPs (Invitrogen)
0,1 µl	Taq-Polymerase (Invitrogen)
12,9 µl	H ₂ O
<hr/>	
20 µl	Summe

2.2.7 Realtime RT-PCR

Die Realtime RT-PCR ermöglicht die relative Quantifizierung von DNA. Durch den Einsatz von cDNA kann die Expression verschiedener Gene auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die Besonderheit dieser Technik liegt in der Fähigkeit, die Neubildung von DNA mit Hilfe eines speziellen Detektionssystems schrittweise in „Echtzeit“ (*real time*) zu verfolgen. Zur Detektion der neugebildeten DNA wird dem PCR-Ansatz SybrGreen zugesetzt, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Quantität eines PCR-Produktes wird über eine Standardreihe abgeglichen. Um sicherzustellen, dass gleiche Mengen an *Template* eingesetzt werden, erfolgt eine Normalisierung über das *housekeeping*-Gen RPS-9 (ribosomales Protein S9). Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des „*Brilliant SybrGreen Quantitative PCR Core Reagent Kits*“ von Stratagene.

2.2.7.1 Erstellen einer *Primermatrix*

Für die Optimierung einer Realtime RT-PCR ist es erforderlich, das optimale 5'-3'-*Primer*verhältnis zu ermitteln. Dafür wird eine *Primermatrix* erstellt, bei der verschiedene Konzentrationen (50 nM, 300 nM, 900 nM) und Kombinationen beider *Primer* getestet werden. Es werden jeweils 20µl des Reaktionsansatzes als Dublikat in optische PCR-Röhrchen (*MicroAmp*[®], Perkin Elmer) vorgelegt und 30µl MasterMix (Stratagene) hinzugefügt.

MasterMix:

5 µl	10x Puffer
2,5 µl	MgCl ₂
2 µl	dNTPs
8 µl	Glycerol
1,5 µl	DMSO
0,75 µl	Reference dye (1:50)
5 µl	SybrGreen (1:2000)
0,5 µl	Sure Star Taq-Polymerase
4,75 µl	H ₂ O
30 µl	Summe

2.2.7.2 Durchführung der Realtime RT-PCR

Zur Optimierung einer Realtime RT-PCR wird im Vorfeld eine Standard-PCR durchgeführt (siehe 2.2.6.1). Die dabei entstehenden Produkte werden mittels der Gelelektrophorese aufgetrennt und der Verdünnungsfaktor für die cDNA zum Einsatz in der Realtime RT-PCR anhand des Gelfotos abgeschätzt. Eine Verdünnung der cDNA ist zum Teil erforderlich, damit die Signale im linearen Bereich der Standardgerade bleiben. Die *Template*-DNA, sowie die ermittelte *Primer*kombination werden jeweils auf 10µl mit H₂O verdünnt und in der Reaktion eingesetzt. Für die Standardgerade wird ein Mix (T-Mix) aus allen cDNAs hergestellt. Dabei werden Volumina zwischen 3µl und 0,01µl der cDNA eingesetzt. Anschließend werden 30µl des Realtime-PCR-Mix (vgl. 2.2.7.1) hinzugegeben. Die Proben werden mit dem „*GeneAmp PCR System 5700*“ (Perkin Elmer) vermessen.

- Temperaturprotokoll: 10 min (95°C), 40 Zyklen von 15 sec (95°C) und 1 min (55-58°C).

Tabelle 2: Primer für die Realtime RT-PCR

Gen	Sequenz	Größe [bp]	T [°C]
IL-10	5' CCC TAA CCT CAT TCC CCA ACC AC 3' 5' CCG CCT CAG CCT CCC AAA GT 3'	135	58
ID2	5' CACCAGAGACCCGGGCAGAACCAG 3' 5' TTTCACGCACAGCTCAATCTACAG 3'	137	58
CCR4	5' CAG GGG CCT TTT TGT GCT C 3' 5' CAT GGT GGA CTG CGT GTA AGA T 3'	91	54
CCR2	5' GGA TTG CCC CAC TCC AAA AAC C 3' 5' GAC TGG CTT CAG GGG CTC TGC 3'	135	54
CTLA-4	5' TGC AGC AGT TAG TTC GGG GTT GTT 3' 5' CTG GCT CTG TTG GGG GCA TTT TC 3'	128	58
RPS-9	5' CGC AGG CGC AGA CGG TGG AAG C 3' 5' CGA AGG GTC TCC GCG GGG TCA CAT 3'	92	58

2.2.8 cDNA-Synthese für Microarray-Technologie (1.Runde)

Als erster Schritt einer linearen Amplifikation der mRNA wurde diese in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Als Ausgangsmaterial wurde die Gesamt-RNA aus ca. 150.000 Zellen eingesetzt. Als *Primer* für die Erststrang-cDNA-Synthese, die einer reversen Transkription entspricht, wurde ein T7dT₂₃-Primer (5'-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT V-Wobbles-3') eingesetzt. Dieser 63 Nukleotide lange *Primer* besitzt an seinem 3'-Ende einen Oligo-dT-Bereich und am 5'-Ende zusätzlich eine Promotorregion für eine T7-RNA-Polymerase. Durch den Oligo-dT-*Primer* wird gewährleistet, dass ausschließlich mRNA-Moleküle von einer *primer*abhängigen reversen Transkriptase (*SuperScript II*, Invitrogen) in cDNA umgeschrieben werden, da eukaryontische mRNAs einen Poly-A-Schwanz besitzen. Folgender Reaktionsansatz wurde für die Erststrang-cDNA-Synthese verwendet:

Reaktionsansatz für das Primer-Annealing:

x µl	total-RNA
11 – x µl	DEPC-Wasser (Invitrogen)
1 µl	T7dT ₂₃ Primer (100 pmol/µl, Eurogentec bzw. Metabion)
12 µl	Summe

Der Ansatz wurde im Thermocycler 10 min auf 70 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA-Moleküle zu beseitigen und anschließend 10 min auf Eis abgekühlt. Dabei können sich die Oligo-dT-Primer an die Poly-A-Regionen der mRNA-Moleküle anlagern. Anschließend wurden zum Ansatz 8 µl folgenden Mastermixes zugegeben:

Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese:

4 µl	5x First Strand Buffer (Invitrogen)
1 µl	10 mM dNTP-Mix (Invitrogen)
2 µl	0,1 M DTT (Invitrogen)
1 µl	200 U/µl Superscript II (reverse Transkriptase; Invitrogen)
8 µl	Summe

Der Ansatz wurde 60 min bei 42 °C inkubiert. Danach wurden für die Zweitstrangsynthese der cDNA 91 µl DEPC-Wasser und 39 µl folgenden Mastermixes zum Reaktionsansatz hinzugefügt:

Reaktionsansatz für die Zweitstrangsynthese:

30 µl	5x Second Strand Buffer (Invitrogen)
3 µl	10 mM dNTP-Mix (Invitrogen)
1 µl	10 U/µl <i>E. coli</i> DNA-Ligase (Invitrogen)
4 µl	10 U/µl DNA-Polymerase I (Invitrogen)
1 µl	2 U/µl RNase H (Invitrogen)
39 µl	Summe

Die RNase H lässt durch teilweisen Abbau der mRNA kurze RNA-Fragmente, die noch an den neusynthetisierten cDNA-Einzelstrang gebunden sind, zurück. Diese RNA-Fragmente dienen der Polymerase I als *Primer* für die Synthese des zweiten cDNA-Stranges. Die Zugabe artifizierlicher *Primer* wird dadurch überflüssig. Der Ansatz wurde bei 16 °C für 2 h inkubiert, anschließend wurden 2 µl T4-DNA-Polymerase (5 U/µl, Invitrogen) zugegeben und für weitere 10 min bei 16 °C inkubiert.

Die T4-DNA-Polymerase hat neben einer 5'→3'-DNA-Polymerase-Aktivität noch eine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität und dient daher zum Abbau kurzer 3'-Überhänge bzw. zum Auffüllen noch bestehender 5'-Überhänge, wodurch die nun doppelsträngige cDNA „glatte Enden“ (engl.: *blunt ends*) erhält. Schließlich wurden 10 µl EDTA (0,5 M) hinzugegeben, um sämtliche Reaktionen zu stoppen.

2.2.9 Aufreinigung von cDNA

Die cDNA wurde im Anschluss nach Zugabe von 2 µl LPA (0,5 µg/µl, Ambion) mit Hilfe einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (81 µl Phenol und 81 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)), zur besseren Phasentrennung unter Verwendung von „PhaseLock GelTM Tubes“ (Eppendorf), aufgereinigt. Durch eine Ethanol-fällung (0,1 Vol. 3 M NaAc (Sigma) und 2,5 Vol. absolutes Ethanol (-20 °C)) wurde die cDNA präzipitiert, zweimal durch Zugabe von je 500 µl 80 % EtOH (-20 °C) gewaschen und das Pellet wurde schließlich nach Trocknung in 8 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

2.2.10 In vitro Transkription (1. Runde)

Da nach der cDNA-Synthese alle cDNA-Moleküle einen T7-Promotor besitzen, können sie mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase in cRNA transkribiert werden. Hierzu wurde das „RibomaxTM Large Scale RNA Production System - T7“ (Promega) verwendet. Während dieser Reaktion findet die erste lineare Amplifikation des ursprünglichen Transkriptoms statt, da die cDNA eines Gens mehrfach von der T7-Polymerase abgelesen werden kann. Die entstehenden cRNA-Moleküle sind in Bezug auf die ursprüngliche mRNA

antisense orientiert und weisen keinen T7-Promotor mehr auf, da dieser nicht mit transkribiert wird. Da es keinen genspezifischen Primer für die Reaktion gibt, sind alle cDNA-Moleküle hinsichtlich ihrer Transkriptionshäufigkeit gleichberechtigt. Auf diese Weise kann verhindert werden, dass die cDNA-Population eines bestimmten Gens exponentiell hochamplifiziert wird. Für die *in vitro* Transkription fand folgender Reaktionsansatz Verwendung:

Reaktionsansatz:

4 μ l	5x T7 Transcription Buffer (Promega)
6 μ l	100 mM rNTP-Mix (Promega)
2 μ l	T7-Enzyme -Mix (enthält T7-RNA Polymerase, Promega)
12 μ l	Summe

Zu diesem Ansatz wurden 8 μ l cDNA aus Abschnitt 2.2.9 gegeben das Reaktionsgemisch wurde im Thermocycler 9 h bei 37 °C inkubiert.

Es folgte die Aufreinigung der nun vorliegenden cRNA aus dem Reaktionsgemisch mit Hilfe des „*RNeasy Mini Kits*“ (Qiagen) und anschließender Ethanolpräzipitation (vgl. 2.2.3). Die cRNA wurde schließlich in 13 μ l DEPC-Wasser aufgenommen und photometrisch vermessen.

2.2.11 cDNA-Synthese (2. Runde)

Aufgrund der geringen Menge an Ausgangsmaterial wurde die erhaltene cRNA aus Abschnitt 2.2.10 in einer zweiten Amplifikationsrunde für eine weitere reverse Transkription eingesetzt. Der prinzipielle Ablauf ist dabei ähnlich, wie in Abschnitt 2.2.8. Statt der T7dT23 *Primer* wurden in diesem Fall allerdings „random Hexamers“ eingesetzt, da die Moleküle des cRNA Pools nun *antisense* orientiert sind und anstatt der Poly-A-Sequenz der mRNA nun eine Poly-U-Sequenz aufweisen. Für die Reaktion wurde maximal 1 μ g cRNA eingesetzt.

Reaktionsansatz für das Primer-Annealing:

x μ l	cRNA (max. 1 μ g)
11 – x μ l	DEPC-H ₂ O (Invitrogen)
1 μ l	1 μ g/ μ l Random Hexamer Primer (Invitrogen)
12 μ l	Summe

Die cRNA wurde zusammen mit den *Primern* 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend 10 min auf Eis abgekühlt. Der Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese ist identisch mit dem aus Abschnitt 2.2.8. Nach 60 min Inkubation bei 42 °C wurde 1 µl RNase H (2 U/µl) zugegeben und weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C. Die RNase, die im Gegensatz zur ersten reversen Transkription nicht zeitgleich mit dem Reaktionsansatz der Zweitstrangsynthese zugegeben wurde, dient in diesem Fall zum vollständigen Abbau des cRNA-Stranges. Hierdurch ist es nun möglich den T7dT₂₃ *Primer* für die Zweitstrangsynthese einzusetzen, da kein cRNA-Strang seine Anlagerung an die Poly-A-Sequenz des neuen cDNA-Stranges mehr blockiert. Dies geschah wiederum durch Inkubation für 10 min bei 70 °C, sowie 10 min auf Eis. Für die Zweitstrangsynthese wurden 92 µl DEPC-Wasser und der folgende Reaktionsansatz hinzugefügt:

Reaktionsansatz für die Zweitstrangsynthese der zweiten cDNA-Synthese:

30 µl	5x Second Strand Buffer (Invitrogen)
3 µl	10 mM dNTP-Mix (Invitrogen)
1 µl	10 U/µl <i>E. coli</i> DNA-Ligase (Invitrogen)
4 µl	10 U/µl DNA-Polymerase I (Invitrogen)
38 µl	Summe

Nach 2 h bei 16 °C wurden 2 µl T4-DNA-Polymerase (10U; Invitrogen) zugegeben und für weitere 10 min bei 16 °C inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die cDNA wurde wie in Abschnitt 2.2.9 beschrieben aufgereinigt und in 12 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

2.2.12 *In vitro* Transkription mit Markierungsreaktion (2.Runde)

Am Ende der zweiten Amplifikationsrunde stand eine weitere *in vitro* Transkription, in der wiederum die T7-RNA-Polymerase und der T7-Promotor des T7dT₂₃-Primers eingesetzt wurde. Dieser letzte Syntheseschritt gewährleistet die Biotin-Markierung der cRNA. Das verwendete *Labeling Kit (Gene Chip Expression 3'-Amplification Reagents for IVT Labeling, Affymetrix)* besteht im Wesentlichen aus der T7-RNA-Polymerase „MEGAscriptTM“ und einem Ribonukleotid-Mix aus den üblichen vier Ribonukleosidtriphosphaten, der zusätzlich noch ein Biotin konjugiertes Uracil-Ribonukleotid-Analogon enthält.

Dieses Pseudouridin wird zufällig während der *in vitro* Transkription anstatt des normalen Uracils in den entstehenden cRNA-Strang inkorporiert und bietet somit die Möglichkeit die cRNA später auf dem *Microarray* zu detektieren. Für die Reaktion wurden 12 µl cDNA aus dem vorigen Abschnitt und der folgende Reaktionsansatz verwendet:

Reaktionsansatz:

4 µl	10x IVT Labeling Buffer (Affymetrix)
12 µl	IVT Labeling NTP-Mix (Affymetrix)
4 µl	IVT Labeling Enzyme-Mix (Affymetrix)
8 µl	RNase freies Wasser
28 µl	Summe

Der Reaktionsansatz wurde 16 h bei 37 °C inkubiert. Die biotinylierte cRNA wurde mit Hilfe des „*RNeasy Mini Kits*“ (Qiagen) aufgereinigt und in 50 µl DEPC-Wasser eluiert. Die Konzentration der erhaltenen cRNA wurde photometrisch ermittelt und ihre Integrität mit Hilfe des Agilent Bioanalyzers qualitativ untersucht.

2.2.13 Fragmentierung

Ein *Microarray*-Experiment hängt maßgeblich von der Effizienz ab, mit der die Hybridisierungssonden an ihre jeweiligen *Targets* binden. Diese Effizienz wiederum wird von der Länge der Sonden beeinflusst und ist aus kinetischen Gründen größer, je kleiner die Sonde ist. Um vergleichbare Hybridisierungskinetiken zu erreichen, ist also eine Standardisierung der Sonden-Längen notwendig.

Dies wird durch Einwirkung eines Kalium- und Magnesium-Ionen enthaltenden Fragmentierungspuffers auf die cRNA erreicht, durch den diese bei hohen Temperaturen in Fragmente mit einer engen Größenverteilung zerfällt. Pro *Microarray* wurden 15 µg biotinylierte cRNA eingesetzt. Das entsprechende Volumen wurde mit 5x Fragmentierungspuffer 1:5 verdünnt. Dieser Fragmentierungsansatz wurde 35 min bei 94 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

- 5x Fragmentierungspuffer: 4 ml Tris-Acetat (1 M; pH 8,1), 0,98 g Kalium Acetat, 0,64 g Magnesium-Acetat ► mit H₂O auf 20 ml auffüllen, sterilfiltrieren

2.3 Methoden der *Microarray*-Technologie

2.3.1 Der *Human T_{Reg} Chip*

Der *Human T_{Reg} Chip* [43] besteht aus einem speziell beschichteten Glasträger (*CodeLink Activated Slide*, Amersham) mit reaktiven Estergruppen und insgesamt 3200 Spots mit einem Durchmesser zwischen 130 und 160 μm . Die Anordnung der Spots auf der Oberfläche lässt mehrere Strukturierungsebenen erkennen. Die kleinste Gliederungsebene besteht aus Gruppen aus 10x10 Spots (Meta-Grid), die wiederum in einer übergeordneten Gruppe aus 4x4 (insgesamt 1600 Spots) der kleineren Gruppen angeordnet sind. Zwei dieser als Array bezeichneten Einheiten bilden schließlich die größte Gruppierungsebene (insgesamt 3200 Spots). Obwohl der *Human T_{Reg} Chip* also eigentlich zwei identische separate Arrays besitzt, sind im Folgenden mit der Bezeichnung „Array“ stets beide Replikate gemeint.

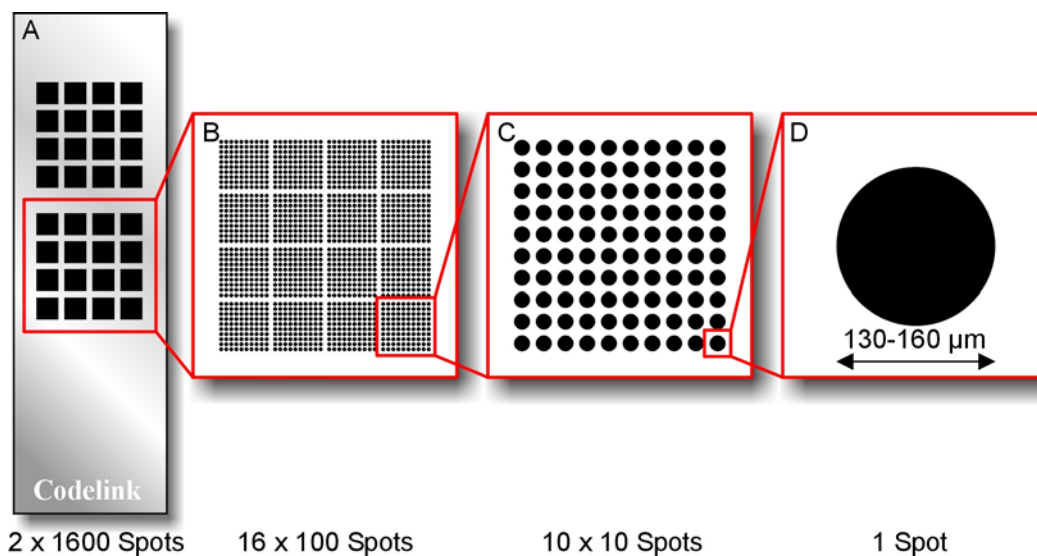


Abbildung 5: Spotting-Muster des *Human T_{Reg} Chip*. A) CodeLink Activated Slide (Originalgröße: 25 x 75 mm) mit zwei Array-Replikaten. B) Array mit 1600 Spots. C) Meta-Grid mit 100 Spots. D) einzelner Spot.

Auf dem Chip sind 350 Testgene, 31 *Housekeeping*-Gene, 5 *spike-in* Kontrollen, 4 bakterielle Hybridisierungskontrollen, zwei 3'-5' Kontrollen und eine Positivkontrolle vertreten. Zwei Negativkontrollen zur Einschätzung eines globalen Hintergrund-Levels, zum einen in Form von „leeren Spots“ und zum anderen in Form von lediglich aus Pufferlösung bestehenden Spots, befinden sich zusätzlich auf dem Chip. Die Hybridisierungskontrollen dienen als *Targets* für artifiziell zugegebene cRNA-Sonden.

Jede der beiden Negativkontrollen und die Positivkontrolle sind mit jeweils insgesamt 16 Spots auf dem Chip vertreten; jedes Oligonukleotid ist mit insgesamt 8 Spots vertreten. Die Reihenfolge der Oligonukleotide ist innerhalb des Spotting-Musters randomisiert. Dadurch wirken sich mögliche lokale Inhomogenitäten oder Artefakte nicht auf alle Spots eines Oligonukleotids aus.

2.3.2 Hybridisierungsmix und Hybridisierungsbedingungen

Bei der Hybridisierung der biotinylierten cRNA-Sonden auf den *Human T_{Reg} Chip* spielen neben der Fragmentlänge der Sonden noch weitere physiko-chemische Faktoren, wie der pH-Wert, die Oberflächenspannung aber auch die Hybridisierungstemperatur eine entscheidende Rolle. Daher wurde ein entsprechendes Puffersystem zur Aufnahme der fragmentierten cRNA verwendet, das den pH-Wert der Hybridisierungslösung für die Dauer der Hybridisierung konstant hält. Durch weitere Zusatzstoffe ist es möglich die Hybridisierungstemperatur herabzusetzen, was der thermischen Degradation der cRNA-Sonden vorbeugt. Für einen *Microarray* wurden 15 µg biotinylierte, fragmentierte cRNA eingesetzt (vgl. 2.2.8 - 2.2.13). Anschließend wurde der folgende Hybridisierungsmix zusammengestellt.

Bestandteile des Hybridisierungsmixes für einen *Microarray*:

x µl	fragmentierte, biotinylierte cRNA (15 µg in max. 36,8 µl Volumen)
60 µl	Pufferkomponente A (Amersham)
100 µl	Pufferkomponente B (Amersham)
2 µl	100x Hybridisierungskontroll-Mix (Amersham)
1,2 µl	Ara-Positivkontrolle
36,8 - x µl	DEPC-Wasser
200 µl	Summe

Der 100x Hybridisierungskontroll-Mix enthält cRNA-Sonden für die Array-internen bakteriellen Hybridisierungskontrollen BioB, BioC, BioD und Cre (siehe unten). Die cRNA-Hybridisierungssonden der Ara-Positivkontrolle wurde in einer Endkonzentration von 18,1 pM zugegeben. Sowohl der 100x Hybridisierungskontrollmix als auch die Ara-Positivkontrolle wurden vor Gebrauch 5 min auf 65 °C erhitzt. Der fertige Mix wurde stark gevortext und 5 min bei 99 °C und im Anschluss 5 min bei 45 °C inkubiert. Eine abschließende Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min diente zur Sedimentation sämtlicher störender Feinstpartikel.

Zugegebene Kontroll-cRNA-Sonden:

Kontrolle	Ursprungskonzentration	Endkonzentration
BioB	30 pM (100x Mix)	0,3 pM
BioC	100 pM (100x Mix)	1 pM
BioD	500 pM (100x Mix)	5 pM
Cre	2000 pM (100x Mix)	20 pM
Ara	3000 pM	18,1 pM

Die Hybridisierung selbst wurde mit Hilfe des „*Lucidea Slide Pro*“ Systems (Amersham Bioscience) durchgeführt. Pro *Microarray* wurden dazu 200 µl Hybridisierungsmix, in dem insgesamt 15 µg der biotinylierten und fragmentierten cRNA enthalten waren, benötigt. Die *Microarrays* wurden dem Hybridisierungsmix in den *Lucidea*-Kammern 16 h lang bei einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt. Währenddessen wurde der Mix ständig von dem Gerät in Bewegung gehalten, um fluiddynamische Totzonen zu vermeiden. Direkt nach Ablauf der 16 h folgten die Arbeitsschritte der Posthybridisierung.

- Hybridisierungspuffer: Hyb Buffer High Volume T7 MEGAscript Komponente A und B, Amersham

2.3.3 Posthybridisierung und Cy5-Streptavidin-Färbung

Ungebundene cRNA und die übrigen Bestandteile des Hybridisierungsmixes müssen nach der Hybridisierung in mehreren stringenten Waschschrinen entfernt werden, um hohe Hintergrundsignale zu vermeiden. Direkt nach der Hybridisierung wurden die *Slides* daher in 0,75x TNT Puffer für eine Stunde bei 46 °C inkubiert. Es folgte die Cy5-Streptavidin-Färbung (1:500 in TNB-Puffer) für die Detektion der biotinylierten cRNA Sonden für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss. Streptavidin bindet sehr spezifisch an die Biotingruppen des in die cRNA-Sonden inkorporierten Pseudouridins. Auf Grund der Konjugation des Proteins mit Cy5, einem Fluoreszenzfarbstoff, lässt sich das auf dem Array gebundene Sondenmaterial durch die fluoreszierenden Eigenschaften (Emissionswellenlänge: 670 nm) des Cy5 quantitativ nachweisen.

Überschüssiges Cy5-Streptavidin wurde in vier weiteren jeweils 5-minütigen Waschschrinen in frischem 1x TNT entfernt. Im letzten Waschschrin wurden die *Slides* nur einige Sekunden lang in 0,05 % Tween getaucht und sofort danach trocken

zentrifugiert (10 min, 1200 rpm). Bei einer Anregungswellenlänge von 694 nm wurden die *Slides* im Laser-Fluoreszenz-Scanner (*ArrayWorx*, Applied Precision) mit einer Auflösung von 10 μm /Pixel und einer Belichtungszeit von 1 sec eingescannt. Nach dem Scannen wurden die *Slides* in dunkler und trockener Umgebung aufbewahrt.

- 1x TNT: 200 ml Tris HCl (1 M; pH 7,6), 60 ml NaCl (5 M), 1 ml Teen 20 ► auf 2 l mit H₂O auffüllen und sterilfiltrieren
- 0,75x TNT: 750 ml 1x TNT, 250 ml H₂O ► sterilfiltrieren
- TNB-Puffer: 522 ml H₂O, 60 ml Tris HCl (1 M; pH 7,6), 18 ml NaOH (5 M) ► auf 60 °C erhitzen; in 0,5 g Schritten insgesamt 3 g „NEN Blocking Reagent“ (Amersham) zugeben und vollständig lösen lassen; 30 min bei 60 °C rühren; noch warm filtrieren (0,88 μm Filter); aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren; vor Gebrauch bei 4 °C auftauen.
- Cy5-Streptavidin Stocklösung: 1 mg Cy5-Streptavidin, 1 ml DEPC-H₂O ► 3x leicht vortexen und 5 min auf Eis; aliquotieren; vor Licht schützen; bei -20 °C aufbewahren; nicht erneut einfrieren

2.3.4 Auswertung der Rohdaten eines *Microarrays*

Die in einer Bilddatei eines *Human T_{Reg} Array*, in Form von Pixeln gespeicherten Farbinformationen, die den Fluoreszenzsignal-Stärken der 3200 Spots entsprechen, wurden mit Hilfe der Software *Image* (Version 5.5, BioDiscovery) in Zahlenwerte konvertiert. Die Zuordnung jedes Spots zum entsprechenden Oligonukleotid und damit zum jeweiligen Testgen erfolgte mit Hilfe einer vom Spotting-Roboter generierten Zuordnungsdatei, in der der Oligonukleotid-Typ jedes Spots sowie dessen Position innerhalb des Spotting-Musters gespeichert sind. Die Software berechnet schließlich für jeden Spot einzeln einen Signalintensitätswert und aus der Umgebung des Spots einen Wert für seinen lokalen Hintergrund und einen Qualitätswert (Flag-Typ). Durch eine lokale Hintergrundkorrektur wurde schließlich der effektive Signalwert eines Spots erhalten. Der prozentuale Anteil der Spots eines *Microarrays* mit einem guten Qualitätswert dient als Güte-Kriterium für einen Array-Versuch und wird als „*present call*“ bezeichnet. Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit der Arrays untereinander wurde eine willkürliche Grenze festgelegt, welche *Microarray*-Experimente mit „*present calls*“ kleiner als 30 % von der weiteren Auswertung ausschloss, da in diesem

Fall von einer suboptimalen cRNA-Synthese bzw. Probenprozessierung ausgegangen werden kann.

2.3.5 Normalisierung von *Microarray*-Daten

Trotz des Versuches, alle *Microarray*-Experimente unter möglichst konstanten und vergleichbaren Bedingungen durchzuführen, sind die gewonnenen Arraydaten vielfach mit multifaktoriellen systematischen Fehlern behaftet. Durch die Normalisierung wird versucht, die systematisch-technischen Unterschiede zwischen verschiedenen *Microarray*-Experimenten zu kompensieren, um die systematisch-biologischen Unterschiede klarer zu erkennen. In diesem Fall wurden alle Daten über den *Microarray* global normalisiert.

2.3.6 Signifikanz-Analyse

Um Unterschiede in Genexpressionsprofilen zu erkennen, wurde die Software „SAM“ (*Significant Analysis of Microarrays* V.2.20, Stanford University Labs) verwendet. Sie führt einen Statistik-Test zur Ermittlung signifikanter Gene aus einem Satz von *Microarray*-Experimenten durch [44]. Der Software wurden normalisierte Array-Daten übergeben. Abhängig von der Fragestellung ist es erforderlich der Software mitzuteilen, welcher experimentellen Gruppe ein *Microarray* angehört. Nur zwischen diesen experimentellen Gruppen sucht die Software nach signifikant regulierten Genen. SAM berechnet mit Hilfe statistischer Methoden die Stärke der Beziehung zwischen dem Expressionslevel eines Gens und der Möglichkeit, dass das Expressionslevel signifikant an eine der angegebenen experimentellen Gruppen gekoppelt ist. Zu den als signifikant gefundenen Genen werden schließlich jeweils *fold changes* zwischen den beiden Gruppen berechnet.

2.3.7 Cluster-Analyse

Die vom SAM-Tool (vgl. 2.3.6) für eine bestimmte Fragestellung als statistisch signifikant ausgewiesenen Gene bedurften einer weiteren Analyse und Strukturierung. Dabei war eine intuitive visuelle Darstellung hilfreich. Zu diesem Zweck wurde die Software „Genesis“ (*Gene Expression Similarity Investigation Suit*, V.1.4.0, *Institute for Genomics and Bioinformatics - Graz University of Technology*) angewendet. Diese Software ordnet durch mathematische Algorithmen *Array*-Experimenten unter dem

Aspekt ihrer Ähnlichkeit zueinander an. Somit werden Einsichten in Beziehungsstrukturen zwischen z.B. zwei Gruppen deutlich.

Durch sogenanntes „*two-dimensional unsupervised hierarchical clustering*“ [45] wurden signifikante Expressionsprofile, die aus verschiedenen angestellten Vergleichen zwischen Array-Daten hervorgingen, visualisiert. Die Stärke der Expression jedes Gens pro Array-Experiment wurde durch eine relative Farbskala (von Rot über Schwarz nach Grün) wiedergegeben, die sich jeweils an der Gesamtheit der eingegebenen Expressionswerte eines Gens orientiert. Die Ähnlichkeiten zwischen Array-Experimenten mit ihren individuellen Genexpressionsprofilen als ganzes betrachtet und zwischen den Expressionstärken unterschiedlicher Gene werden einerseits durch ihre jeweilige Position zueinander und andererseits durch Dendrogramme wiedergegeben. Deren geometrische Maße entsprechen mathematisch berechneten „Distanzen“. In dem entstehenden Bild sind Gene in Zeilen und die Microarrays in Spalten angeordnet.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kulturbedingungen eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen werden bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% in Gewebekulturflaschen im Inkubator (Heraeus) kultiviert. Als Nährmedium wurde RPMI 1640 Zellkulturmedium (GibcoBRL) mit 10% humanem AB-Serum (MHH-Blutbank) oder 10% komplementinaktiviertem FCS (Seromed) und 5 mg/ml Penicillin/Streptomycin (GibcoBRL) verwendet. Das Nährmedium wird im Folgenden RPMI kompl. genannt.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren werden $2 \cdot 10^7$ Zellen in eiskaltem RPMI mit 40% FCS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck) aufgenommen und die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt. Um ein langsames Abkühlen zu gewährleisten, werden die Zellen in Isopropanol zunächst bei -70°C eingefroren und zur Langzeitlagerung anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen werden die Zellen in Kryoröhrchen auf Eis transportiert, schnell in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, mit RPMI und 20% FCS gewaschen und sofort in bereits auf 37°C vorgewärmtes Medium in eine Gewebekulturflasche überführt.

2.4.3 Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen

Die Zellisolierung erfolgt aus heparinisiertem peripheren Blut über Dichtegradientenzentrifugation. Das Blut wird 1:3 mit PBS verdünnt und vorsichtig auf *Ficoll*[®]-*Hypaque* (Dichte 1.077 g/ml; Biochrom) in 50 ml Falcon-Röhrchen überschichtet. Die Röhrchen werden 20 min bei 1800 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wird abgenommen und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen.

- FACS-Puffer: 500 ml PBS (GibcoBRL), 0,5% ml BSA (Sigma), 0,1 M EDTA (Sigma)

2.4.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wird ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit 0,5% Trypanblau (Biochrom) verdünnt und in die Zählkammer gefüllt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der in tote Zellen eindringt, so dass diese blau erscheinen. Die Plasmamembran lebender Zellen ist für den Farbstoff undurchlässig. Die Anzahl der lebenden Zellen in einem Großquadrat, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor 10^4 ergibt die Lebendzellzahl pro Milliliter Zellsuspension.

2.4.5 Generierung von Leukämiezellen mit dendritischer Differenzierung

Die *in vitro* Generierung von myeloischen Leukämiezellen mit dendritischer Differenzierung (AML-DCs) erfolgte direkt aus kryokonservierten mononukleären Zellen der AML-Patienten (Blasten-Anteil >60%). Die Zellen wurden in RPMI kompl. auf eine Zellzahl von 3×10^6 /ml eingestellt und à 3 ml in 6-Loch-Platten (Greiner bio-one) ausgesät (Tag 0). Die *in vitro* Differenzierung erfolgte unter Zugabe von 1000 U/ml GM-CSF (PeproTech) und 800 U/ml IL-4 (PeproTech) an den Tagen 1, 4 und 7. Zur Ausreifung der AML-DCs wurde an Tag 7 200 U/ml TNF- α (PeproTech) zugegeben [optimiert nach 46]. Am Tag +10 wurden die AML-DCs geerntet und ihre Differenzierung, sowie ihre Abstammung vom leukämischen Klon überprüft (Abb.6).

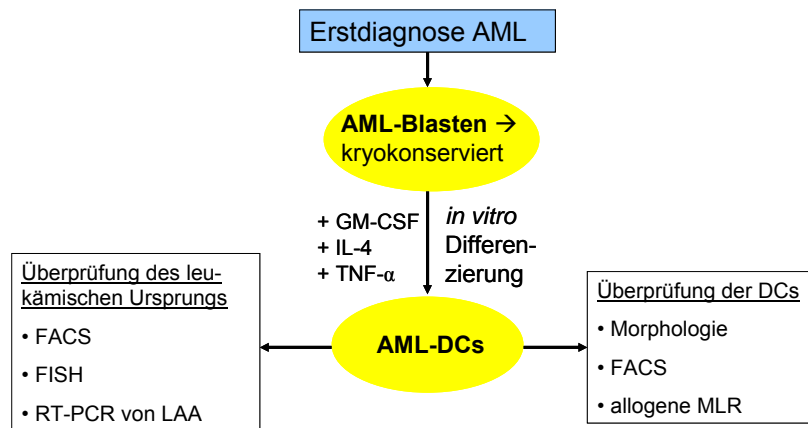


Abbildung 6: Überprüfung der generierten AML-DCs. Die Differenzierung erfolgt mit Hilfe von GM-CSF, IL-4 und TNF- α (vgl.2.4.5). Zur Überprüfung des leukämischen Ursprungs wurden eine FACS-Analyse auf myeloische Oberflächenantigene (CD13,CD33,CD34,HLA-DR) durchgeführt (vgl.2.5.2). Bei Patienten mit einer Tranlokation erfolgte eine FISH-Analyse (vgl.2.5.3) und auf molekularer Ebene wurde der Nachweis auf leukämie-assoziierte Antigene (z.B. WT-1) geführt (vgl.2.2.6.1). Der Differenzierungsgrad wurde morphologisch bestimmt und ebenfalls mittels FACS-Analyse auf Dendriten-marker sowie Kostimulatoren (z.B.CD80) ermittelt (vgl.2.5.2). Desweiteren wurde die Stimulationskapazität in einer „mixed lymphocyte reaction“ (MLR) gezeigt (vgl.2.4.8.1).

2.4.6 Kokulturbedingungen zur Analyse von T-Zellen („Priming“)

Um einen Einfluss von leukämischen Blasten auf T-Zellen untersuchen zu können, wurden aufgereinigte allogene T-Zellen aus gesunden Spendern mit bestrahlten AML-Blasten 7 Tage *in vitro* kokultiviert. Dazu wurden AML-Blasten und als Kontrolle PBMCs desselben Patienten in Remission mit 30 Gy bestrahlt (*GammaCell 2000*, Molsgaard Medical) und je $2 \cdot 10^5$ Zellen in 12-Lochplatten ausgesät. Die Bestrahlung verursacht chromosomale Brüche in der Zelle, sodass diese teilungsunfähig werden. Die normale Stoffwechselaktivität wird jedoch über einen gewissen Zeitraum aufrecht erhalten. Je $2 \cdot 10^6$ allogene T-Zellen wurden anschließend zu der Zellkultur gegeben. Nach einer einwöchigen Kultur wurden die T-Zellen geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einem Proliferationstest (vgl. 2.4.8.1) eingesetzt.

2.4.7 Gewinnung von Zellkulturüberständen primärer AML-Blasten

Um zu überprüfen, ob lösliche immunsuppressive Faktoren, die von leukämischen Zellen produziert werden, einen Einfluss auf T-Zellen haben, wurden die Zellkulturüberstände primärer AML-Blasten gewonnen, um darin anschließend T-Zellen gesunder Spender zu kultivieren. $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml primäre Blasten verschiedener AML-Patienten, sowie als Kontrolle PBMCs gesunder Spender, wurden dafür in 24-Lochplatten für 48 Stunden in RPMI kompl. bei 37°C kultiviert. Die AML-Zelllinie HL-

60 wurde à $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgenommen, zentrifugiert (10min, 1200 rpm) und bei -20°C eingefroren.

2.4.8 Der Proliferationstest

T-Zellen beginnen *in vivo* zu proliferieren, wenn sie ihr spezifisches Antigen erkennen, um in vermehrter Zahl spezifisch gegen das Pathogen vorgehen zu können. Diese Eigenschaft macht man sich unter *in vitro* Bedingungen zu nutze, um antigenspezifische Proliferation von T-Zellen zu induzieren. Der Grad der Reaktionsstärke der T-Zellen auf ihr spezifisches Antigen wird durch Stimulation der T-Zellen in Gegenwart von [^3H]-Thymidin, das in die DNA der sich teilenden Zellen eingebaut wird, verfolgt. Das radioaktiv markierte Nukleotid ist ein schwacher β -Strahler. Man kann nun mittels eines β -Szintillationszählers anhand der Menge der inkorporierten Radioaktivität auf die Intensität der Proliferation der Zellen schließen.

2.4.8.1 „Mixed lymphocyte reaction“

$1 \cdot 10^5$ T-Zellen wurden in einer 96-Loch-Rundbodenplatte in 200 μl RPMI kompl. in Triplikaten mit 30 Gy (*GammaCell 2000*, Molsgaard Medical) bestrahlten Stimulatoren (AML-Blasten oder AML-DCs) in verschiedenen Ratios (1:10, 1:20, 1:40) kokultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen bei 37°C wurde pro Loch 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Thymidin (NEN) zu den Zellen gegeben und diese für weitere 18 Stunden inkubiert. Da [^3H]-Thymidin nur in sich teilende inkorporiert, wird nur die Proliferation der T-Zellen ermittelt. Die Zellen wurden mittels eines Zellerntegerätes (Inotech) lysiert, die DNA auf Glasfaserfiltermatten transferiert und mit Szintillationsflüssigkeit (*Betaplate Scint*, Perkin Elmer) in Folie eingeschweißt. Mit einem β -Szintillationszähler (*1450 Microbeta Trilux*, Wallac) kann nun die Menge an inkorporierter Radioaktivität vermessen und damit Rückschlüsse auf die Proliferation der T-Zellen gezogen werden.

2.4.8.2 Proliferation nach Kokultur in AML-Zellkulturüberständen

$1 \cdot 10^5$ T-Zellen gesunder Spender wurden in 200 μl Zellkulturüberständen primärer AML-Blasten (vgl. 2.4.7) in einer 96-Loch-Rundbodenplatte in Triplikaten ausgesät. Erst nach etwa 4 Stunden erfolgte eine Stimulation mit 10ng/ml PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat; Sigma) und 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin (Sigma), damit eventuelle inhibitorische Moleküle im Zellkulturüberstand auf die T-Zellen wirken können. Nach

einer Inkubationszeit von 4 Tagen bei 37°C wurde pro Loch 1µCi/ml [³H]-Thymidin (NEN) zugegeben. Die weitere Durchführung entspricht Abschnitt 2.4.8.1.

2.4.9 Stimulation autologer T-Zellen mit AML-DCs

Die *in vitro* generierten Leukämie-Zellen mit dendritischer Differenzierung (AML-DCs; vgl. 2.4.5) wurden in einer Kokultur zur Stimulierung autologer T-Zellen eingesetzt, die von demselben Patienten in Remission gewonnen wurden. Die AML-DCs wurden an Tag +10 geerntet, zweimal mit FACS-Puffer (vgl. 2.4.3) gewaschen und mit 30 Gy bestrahlt (*GammaCell 2000*, Molsgaard Medical). $2 \cdot 10^5$ AML-DCs wurden anschließend mit $2 \cdot 10^6$ autologen, non-adhärenenten PBMCs für 10-12 Tage in einer 12-Lochplatte kokultiviert. Als Kontrolle wurden die non-adhärenenten PBMCs ohne AML-DCs kultiviert. Alle drei Tage wurden 20 U/ml rhIL-2 zur Kokultur gegeben. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Effektorzellen über *Ficoll*[®]-*Hypaque* aufgereinigt (vgl. 2.4.3), um tote Zellen zu entfernen und dadurch einen hohen *Background* im Zytotoxizitätsnachweis (vgl. 2.4.10) zu vermeiden.

2.4.10 Zytotoxizitätsnachweis

Die T-Zell-Zytotoxizität wurde mittels "Laktatdehydrogenase *Release-Assay*" (*CytoTox 96 Kit*, Promega) bestimmt. Bei dieser Methode wird mittels einer enzymatischen Reaktion, bei der ein Tetrazoliumsalz in ein Formazanprodukt umgewandelt wird, die quantitative Freisetzung des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) gemessen, welches bei der Zellyse freigesetzt wird.

$1 \cdot 10^4$ LDH-haltige Targetzellen (primäre AML-Blasten) wurden in verschiedenen Target:Effektor-Ratios (1:5, 1:10, 1:20, 1:40) mit den zytotoxischen Effektorzellen (vgl. 2.4.9) in einer 96-Lochplatte à 100 µl in Triplikaten ausgesät. Um einen Hintergrund durch in FCS enthaltenes LDH zu vermeiden, wurde Medium mit 2% humanem Serum (Zytotox-Medium) verwendet. Parallel dazu wurden Effektorzellen und Targetzellen allein ausgesät, um die Spontanfreisetzung zu bestimmen. Zusätzlich wurde die Maximalfreisetzung der Targetzellen induziert, indem ein anionisches Detergenz zu den Targetzellen gegeben wurde. Nach einer sechsständigen Inkubation im Brutschrank wurden die Platten zentrifugiert (200×g, 5 min). 50 µl Überstand wurden geerntet und in eine 96-well-Flachbodenplatte überführt. Zu den Proben wurde 50 µl Substrat zugegeben und die Farbreaktion nach ca. 20 min abgestoppt. Die Extinktion wurde

photometrisch bei 492 nm bestimmt (*Lambda Scan 200e*, BioTek) Die prozentuale Zytotoxizität berechnet sich nach der Formel:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{\text{Experiment} - \text{Effektor-Spontan} - \text{Target-Spontan}}{\text{Target-Maximum} - \text{Target-Spontan}} \times 100$$

2.4.11 Zellzyklus-Analysen

Der Zellzyklus kann in die Mitosephase und die Interphase aufgeteilt werden. Die zeitlich dominante Interphase wird in mehrere Unterphasen eingeteilt. In der G1-Phase (erste Wachstumsphase) vergrößern sich die Zellen und insbesondere ihr Proteinbestandteil. In der folgenden S-Phase (Synthese) kommt es zur DNA-Verdoppelung durch Replikation. In der G2-Phase (zweite Wachstumsphase) akkumuliert ATP (Mitosetrigger), worauf letztlich die M-Phase (Mitose) folgt. In der G1/G0-Phase liegt ein diploider Chromosomensatz vor, der sich bis zum Ende der S-Phase durch Replikation verdoppelt. Nach der Mitose liegt erneut ein diploider Chromosomensatz vor. Durch Bestimmung des DNA-Gehaltes mit einem spezifischen Fluorochrom (Acridine Orange (AO); Sigma) wird die DNA der Einzelzelle durchflusszytometrisch quantifizierbar (vgl. 2.5.2) und mittels linearen DNA-Histogrammes wird eine Zellzyklusanalyse möglich. Die Analyse erfolgte an primären T-Zellen jeweils im unstimulierten und mit 10mg/ml PMA und 1µg/ml Ionomycin stimulierten Zustand, nachdem die Zellen 24 bzw. 48 Stunden in verschiedenen AML-Zellkulturüberständen (vgl. 2.4.7) kultiviert wurden. Für die Färbung wurden $1 \cdot 10^5$ T-Zellen zunächst in 100 µl RPMI kompl. resuspendiert, 500 µl Puffer 1 hinzugegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 µl frisch angesetztes AO in Puffer 2 hinzugegeben und die Probe direkt durchflusszytometrisch vermessen (vgl. 2.5.2).

- Citrat-Phosphat-Puffer (pH 3): 79,5 ml Zitronensäure-Monohydrat-Lösung (4,2 g auf 200 ml H₂O), 20,5 ml Na₂HPO₄-Lösung (2,48 g auf 100 ml H₂O)
- Citrat-Phosphat-Puffer (pH 3,8): 64,5 ml Zitronensäure-Monohydrat-Lösung (4,2 g auf 200 ml H₂O), 35,5 ml Na₂HPO₄-Lösung (2,48 g auf 100 ml H₂O)
- Puffer 1: 100 µl Triton X, 6,85 g Sucrose, 3,58 mg Sodium EDTA, 50 ml Citrat-Phosphat-Puffer (pH 3) ► auf 100 ml mit H₂O auffüllen
- Puffer 2: 0,58 g NaCl, 14,28 ml Citrat-Phosphat-Puffer (pH 3,8) ► auf 100 ml mit H₂O auffüllen und bei 4°C aufbewahren

2.5 Zelluläre Immunologie

2.5.1 Immunomagnetische Separation von Zellpopulationen

Die immunomagnetische Separation ist ein Verfahren, Zellen aufgrund spezifischer Zelloberflächenmoleküle zu separieren. Hierbei kommen magnetische Kügelchen (*MicroBeads*) zum Einsatz, die an spezifische Antikörper gekoppelt sind. Zur Separation einer bestimmten Zellpopulation, werden die Gesamtzellen mit den spezifischen *MicroBead*-gekoppelten Antikörpern inkubiert und anschließend über eine Säule mit einer ferromagnetischen Matrix gegeben. Die markierten Zellen werden im Magnetfeld zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen direkt die Säule passieren und aufgefangen werden können. Nach Inaktivierung des Magnetfeldes können die markierten Zellen ebenfalls eluiert und gesammelt werden. Man unterscheidet dabei zwischen der Positiv-Selektion, bei der die relevanten Zellen direkt markiert werden und der Negativ-Selektion, bei der die irrelevanten Zellen markiert und depletiert werden.

Zunächst erfolgte eine Separation der mononukleären Zellen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (vgl. 2.4.3). Zur Separation von Gesamt-T-Zellen ($CD3^+$ T-Zellen) werden *CD3-Microbeads* (Miltenyi Biotec) in einer Positiv-Selektion verwendet. Zur Isolierung von Subpopulationen wurde zunächst das „*Pan T Isolation Kit II*“ (Miltenyi Biotec) verwendet, bei dem eine Depletion aller irrelevanten Zellen (Monozyten, DCs, B-Zellen, NK-Zellen) stattfindet. Anschließend erfolgte eine Positiv-Selektion mittels *CD4-* bzw. *CD8-MicroBeads* (Miltenyi Biotec). Die Durchführung der Färbung erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 500µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Separation erfolgte automatisch mit dem „*autoMACS*“ (Miltenyi Biotec). Die Reinheit der separierten Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt und betrug >92%.

2.5.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Charakterisierung gefärbter Einzelzellen anhand der Lichtstreuungseigenschaften, sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung. Im Durchflusszytometer (*FACSCalibur*, Beckton Dickinson) findet eine simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität, sowie verschiedener Fluoreszenzfarben statt. Die Messdaten werden mittels der Software „*Cell-QuestTM*“ (Becton Dickinson) digitalisiert und visualisiert. Dabei werden pro Färbung 5×10^4 Zellen in 50µl

FACS-Puffer mit spezifischen fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern in Mikrotiterplatten inkubiert (15 min bei 4°C im Dunkeln). Bei Mehrfachfärbungen werden alle Antikörper zur gleichen Zeit eingesetzt. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (4 min, 1000rpm), der Überstand entfernt, das Sediment gelockert, mit FACS-Puffer gewaschen und die Probe durchflusszytometrisch vermessen.

Tabelle 3: Verwendete Oberflächen-Antikörper:

Antigen	Konjugat	Klon	Firma
CD3	PE	UCHT1	BD Bioscience
CD3	PE-Cy5	HIT3a	BD Bioscience
CD4	FITC	RPA-T4	BD Bioscience
CD4	PE	6D10	ImmunoTools
CD8	PE	MEM-31	ImmunoTools
CD13	FITC	Q20	ImmunoTools
CD33	FITC	HIM3-4	BD Bioscience
CD34	FITC	581	BD Bioscience
HLA-DR	Cy-Chrome™	G46-6	BD Bioscience
CD40	PE	5C3	BD Bioscience
CD80	PE	L307.4	BD Bioscience
CD86	PE	2331 (FUN-1)	BD Bioscience
CD1a	FITC	HI149	ImmunoTools
CD83	FITC	HB15e	BD Bioscience

2.5.2.1 Intrazelluläre FACS-Analyse von IL-2 und IFN- γ

Für den intrazellulären Nachweis von IL-2 und IFN- γ wurden CD3⁺ T-Zellen mittels immunomagnetischer Separation (vgl. 2.5.1) isoliert und à 1*10⁶ Zellen in verschiedenen Zellkulturüberständen (vgl. 2.4.7) in einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät. Die mitogene Stimulation mit 10ng/ml PMA (Sigma) und 1 μ g/ml Ionomycin (Sigma) erfolgte nach ca. 12 h, damit eventuelle inhibitorische Moleküle im Zellkulturüberstand auf die T-Zellen wirken können. Eine Stunde nach Stimulation wurden 10 μ g/ml Brefeldin A (Sigma) hinzugegeben. Brefeldin A wirkt auf den Golgi-Apparat der Zellen und bewirkt ein Zurückhalten der Zytokine in der Zelle (Sekretions-Stop). Nach einer fünfstündigen Inkubation wurden die Zellen 5 min bei 300xg zentrifugiert und mit 200 μ l 4% Paraformaldehyd (PFA, Merck) in PBS für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 200 μ l Saponinlösung für 10 min permeabilisiert. Die für die Färbung verwendeten Antikörper (IFN- γ -PE; IL-2-PE; beide von BD Bioscience) wurden 1:20 in der Saponinlösung verdünnt und die Zellen in 100 μ l 30 min im Dunkeln gefärbt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 300 μ l 4% PFA in PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch vermessen.

- Saponinlösung: 1 ml Saponinlösung (5%ig), 1 ml HEPES (0,5M), 50 ml PBS

2.5.2.2 Separation von CD4⁺ T-Zellen aus AML-Patienten mittels Zellsorter

Die Separation von T-Helferzellen aus AML-Patienten bei Erstdiagnose erfolgte aus logistischen Gründen immer aus kryokonservierten mononukleären Zellen. Die gesunden Kontrollen wurden zur besseren Vergleichbarkeit ebenfalls zunächst kryokonserviert. Da diese Zellen mit Hilfe der *Microarray*-Technologie untersucht werden sollten, war eine sehr gute Reinheit und Vitalität der Zellen notwendig, ohne Kontaminationen mit toten Zellen. Daher wurden in diesem Fall die Zellen durchflusszytometrisch sortiert. Die Zellen wurden aufgetaut, mit 20µl CD4-FITC, 20µl CD3-PE (vgl. 2.5.2) und 80µl FACS-Puffer (vgl. 2.4.3) pro 10⁷ Zellen 30 min bei 4°C gefärbt, mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 500µl FACS-Puffer aufgenommen. Das Sortieren erfolgte durchflusszytometrisch mit Hilfe des „*FACSAria*“ (Becton Dickinson) und die Reinheit der CD4⁺ T-Zellen betrug >96%.

2.5.3 „Fluorescence in-situ hybridisation“ (FISH)

Die Technik der „*fluorescence in-situ hybridization*“ (FISH) erlaubt den Nachweis von Chromosomenveränderungen (z.B. Translokationen) in zytologischen Ausstrichpräparaten von Zellen in der Interphase. Bei dieser Technik werden DNA-Sonden mit bestimmten Markermolekülen markiert, sodass die entsprechenden Chromosomenveränderungen anschließend mikroskopisch lokalisiert werden können. Hier wurde die Translokation t(8,21) mit dem Fusionsprotein AML1/ETO mittels FISH nachgewiesen.

Die Objektträger (*Adhesion Slides*, Bio-Rad) wurden zunächst mit PBS gewaschen und 50µl Zellsuspension aufgegeben. Anschließend wurde mit Methanol-Eisessig (3:1) für 10 min fixiert, die Objektträger 10 min in PBS gewaschen und anschließend getrocknet. 3µl der DNA-Sonde (*LSI AML1/ETO Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe*, Vysis, Inc.) in Hybridisierungspuffer (Vysis, Inc.) (1:20) wurden auf die Felder geben, ein Deckglas aufgelegt und der Objektträger für 90 Sekunden auf einer Heizplatte (94°C) erhitzt. Danach wurde der Objektträger sofort auf einer vorgekühlten Metallplatte abgekühlt, Klebstoff über den Rand des Deckgläschens gegeben, damit die Sonde nicht verdunstet und über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Deckgläschen abgenommen und der Objektträger bei 70°C in SSC-Puffer (Vysis, Inc.) für 10 min gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit 3 µl Propidiumjodid. In normalen Zellen repräsentieren zwei

orange Signale die Kopien von ETO und zwei grüne Signale die Kopien von AML1. Zellen, die das Fusionsprotein AML1/ETO enthalten, zeigen ein oranges Signal (ETO), ein grünes Signal (AML1) und zwei orange/grüne (gelbe) Fusionssignale.

2.5.4 ELISPOT

Mit Hilfe des ELISPOTs können individuelle Zytokin-produzierende Zellen detektiert werden. Zuerst wurden 96 Loch-Nitrocellulose-Platten (*Multiscreen-HA 96*; Millipore) mit anti-IL-10 Erst-Antikörper (5µg/ml; Klon: JES3-9D7; Pharmingen) in einer feuchten Kammer und *Coating-Puffer* bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit PBS + 0,5% Tween und zweimal mit PBS gewaschen. Das Blocken der Nitrozelluloseplatten zur Verhinderung unspezifischer Bindungen erfolgte für 30 min bei 37°C mit 5% BSA in PBS. Nach dem Blocken wurde die Platte zweimal mit PBS + 0,5% Tween und einmal mit PBS gewaschen und 10 min bei 37°C mit Zellkulturmedium (ohne FCS) inkubiert. Die Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungen und in Triplikaten ausgesät ($1 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$) und in einer feuchten Kammer 48 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte 8x mit PBS + 0,5% Tween gewaschen und die Zellen durch Zugabe von dest. H₂O lysiert. Anschließend wurde die Platte mit anti-IL-10 biotinyliertem Zweit-Antikörper in PBS + 1% BSA (5µg/ml; Klon: JES3-12G8; Pharmingen) für 2 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert, gefolgt von 5x Waschen mit PBS + 0,5% Tween und einmal mit PBS. Zur Verstärkung des Signals erfolgte eine Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Avidin (1:400 in PBS mit 1% FCS; Biochrom) für 2 h bei RT in einer feuchten Kammer mit anschließendem Waschen (3x mit PBS). Biotin und Avidin gehen dabei einen starken Komplex ein. Zur Detektion wurde der Substratpuffer hinzugegeben, die Platte nach maximaler Spotentwicklung (5-30 min) mit Leitungswasser gewaschen und über Nacht im Dunkeln getrocknet. Die Frequenz der IL-10-produzierenden Zellen wurde mit Hilfe der *ELISPOT Reader Software 2.5* (Autoimmun Diagnostika) bestimmt.

- Coating-Puffer: 3,8 g NaHCO₃ + 1,93 g Na₂CO₃ ► auf 100 ml mit H₂O auffüllen; pH = 9,6
- AEC-Stock: 100 mg AEC (3-amino-9-ethylcarbazole; Sigma) in 10 ml DMF (Dimethylformamid, Sigma) lösen
- Substratpuffer: 1 ml AEC-Stock + 29 ml Acetat-Puffer (0.1M), sterilfiltrieren und dunkel halten. Anschließend 30% H₂O₂ (1:2000) hinzugeben

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von AML-DCs und ihr Einfluss auf T-Zellen

3.1.1 *in vitro* Differenzierung zu AML-DCs

Die *in vitro* Generierung von Leukämiezellen mit dendritischer Differenzierung (AML-DCs) erfolgt direkt aus den mononukleären Zellen von AML-Patienten mit einem Blastenanteil von >60% aus Proben des peripheren Bluts oder aspirierten Knochenmarks. Aus logistischen Gründen wurde die Differenzierung in den meisten Fällen aus kryokonserviertem Material durchgeführt. Ein Vorgehen zur Generierung von AML-DCs aus kryokonservierten leukämischen Blasten konnte erfolgreich etabliert werden und zeigte keine Nachteile gegenüber der Differenzierung aus frischem Material. Nach einer 10-tägigen Kultur unter Zugabe von 1000U/ml GM-CSF, 800U/ml IL-4 an den Tagen 1, 4 und 7 und zur Ausreifung 200U/ml TNF- α an Tag 7 zeigten die Zellen morphologisch das typische Erscheinungsbild von dendritischen Zellen (Abb.1). Die Lebensfähigkeit der AML-DCs wurde mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung und einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Überprüfung der Differenzierung erfolgte allerdings nicht nur morphologisch, sondern auch über FACS-Analyse und funktionell mittels einer allogenen „mixed lymphocyte reaction“ (MLR). Eine Differenzierung zu AML-DCs war in 70% der Fälle möglich und konnte an Leukämien der FAB-Klassifikationen M0, M1, M2 (M2baso), M4 (M4eo) und M5 gezeigt werden.

Abbildung 7 zeigt die Morphologie von AML-DCs eines Patienten mit einer AML der FAB-Klassifikation M4. Man erkennt deutlich die dendritischen Ausläufer und Plattenadhärenz der vorher in Suspensionskultur wachsenden Zellen.

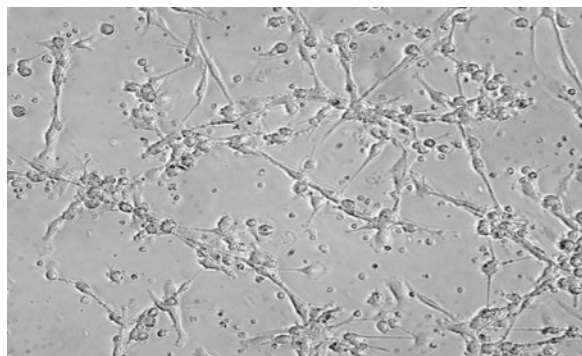


Abbildung 7: Morphologische Überprüfung der Differenzierung zu AML-DCs. Mikroskopische Aufnahme von AML-DCs nach einer 10-tägigen Kultur unter Zugabe der Zytokine GM-CSF, IL-4 und TNF- α . Exemplarisch für einen AML-Patienten der FAB-Klassifikation M4 (Patient 1).

Die FACS-Analyse der leukämischen Blasten zeigte, dass diese bei nahezu allen Patienten negativ für die dendriten-spezifischen Markermoleküle CD1a und CD83 sind, oder diese nur sehr schwach exprimieren. Im Durchschnitt lag die Expression von CD1a bei 1,6% (n=9), von CD83 sogar nur bei 1% (n=9). Die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 auf leukämischen Blasten variierten in ihrer Expression von Patient zu Patient. Die nach Zytokinstimulation gewonnenen AML-DCs wurden im Durchflusszytometer bezüglich ihrer Oberflächenmerkmale erneut charakterisiert. Nach der *in vitro* Differenzierung war ein deutlicher Anstieg der Expression sowohl der Dendritenmarker, als auch der kostimulatorischen Moleküle im Laufe der Kultur zu erkennen. Im Durchschnitt lag die Expression von CD1a nach der *in vitro* Stimulation bei 26,7% (n=9; 11,9% - 42,85%), die Expression von CD83 stieg auf durchschnittlich 18,1% (n=9; 8,17% - 24,75%). Bei den kostimulatorischen Molekülen variierte die Expression nach der *in vitro* Stimulation ebenso wie bei den leukämischen Blasten von Patient zu Patient sehr stark. Es konnte jedoch in allen Fällen, in denen eine Differenzierung zu AML-DCs möglich war, ein Anstieg der Expression der kostimulatorischen Moleküle gezeigt werden.

Abbildung 8 und 9 zeigen die durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern auf leukämischen Blasten, sowie der entsprechenden AML-DCs nach der *in vitro* Differenzierung exemplarisch für zwei verschiedene Patienten mit unterschiedlichen AML-Subtypen. In Abbildung 8 sieht man deutlich die zunehmende Expression des Dendritenmarkers CD1a und des kostimulatorischen Moleküls CD86 eines AML-Patienten der FAB-Klassifikation M4. Bei über 30% der AML-DCs liegt in diesem Fall eine Koexpression beider Moleküle vor.

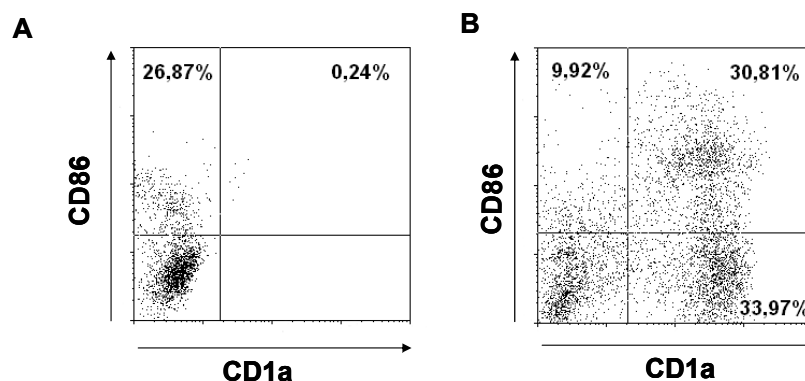


Abbildung 8: FACS-Analyse zur Überprüfung der Differenzierung zu AML-DCs. Durchflusszytometrische Analyse des Dendritenmarkers CD1a und des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD86 von (A) leukämischen Blasten und (B) *in vitro* generierten AML-DCs nach einer 10-tägigen Kultur unter Zugabe der Zytokine GM-CSF, IL-4 und TNF- α . Exemplarischer DotPlot eines AML-Patienten mit einer Leukämie FAB-Klassifikation M4 (Patient 1).

Abbildung 9 zeigt exemplarisch die Hochregulierung der Dendritenmarker, sowie der drei Kostimulatoren CD40, CD80 und CD86 eines AML-Patienten der FAB-Klassifikation M2 nach der *in vitro* Differenzierung zu AML-DCs.

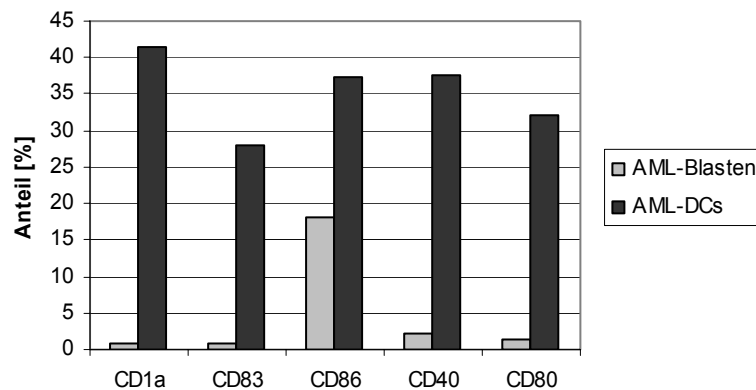


Abbildung 9: FACS-Analyse der Dendritenmarker und Kostimulatoren. Durchflußzytometrische Analyse der Dendritenmarker CD1a und CD83, sowie der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD86, CD40 und CD80 von leukämischen Blasten und *in vitro* generierten AML-DCs nach einer 10-tägigen Kultur unter Zugabe der Zytokine GM-CSF, IL-4 und TNF- α . Exemplarisches Balkendiagramm eines AML-Patienten mit einer Leukämie FAB-Klassifikation M2 (Patient 3).

Um nun die stimulatorische Fähigkeit der generierten AML-DCs mit der von leukämischen Blasten vergleichen zu können, wurde eine „*mixed lymphocyte reaction*“ (MLR) durchgeführt (Abb.10). Dabei wurden sowohl die leukämischen Blasten, als auch die daraus generierten AML-DCs mit 30Gy bestrahlt und als Stimulatoren in verschiedenen Ratios für allogene non-adhärenente mononukleäre Zellen (PBMCs) aus gesunden Spendern eingesetzt. Die Zellen wurden vier bis fünf Tage kokultiviert und anschließend die Proliferation der PBMCs mittels des ^3H -Thymidin-Assays ermittelt.

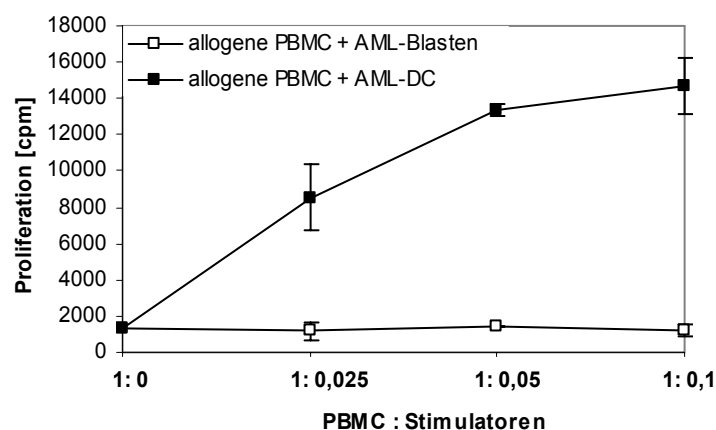


Abbildung 10: „Mixed lymphocyte reaction“ (MLR). Exemplarische MLR eines AML-Patienten mit einer Leukämie FAB-Klassifikation M2 (Patient 3). Allogene PBMCs werden mit bestrahlten allogenen AML-Blasten bzw. AML-DCs in verschiedenen Ratios kokultiviert und Proliferation der PBMCs mittels ^3H -Thymidin analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus Triplikaten für jeden Messpunkt.

Es konnte in allen Fällen (n=9) gezeigt werden, dass die generierten AML-DCs wesentlich besser stimulierten als die leukämischen Blasten, die auch im allogenen System nahezu keine stimulatorische Kapazität aufweisen.

3.1.2 Überprüfung des leukämischen Ursprungs der AML-DCs

Um die Abstammung der *in vitro* differenzierten AML-DCs vom leukämischen Klon zu überprüfen, wurden drei verschiedene Verfahren angewendet: mittels FACS-Analyse myeloischer Vorläuferantigene, über die Expression leukämie-assoziiierter Antigene (LAA's) und im Falle einer chromosomalen Translokation mittels FISH-Analyse.

Anhand einer FISH Analyse kann nachgewiesen werden, ob bei bekannter chromosomaler Translokation diese auch nach der Differenzierung zu AML-DCs noch vorliegt. In diesem Fall kann eine eindeutige Abstammung vom leukämischen Klon gezeigt werden (Abb.11a). Liegt keine chromosomale Translokation vor, kann die Abstammung vom leukämischen Klon indirekt über die konstante Expression myeloischer Vorläuferantigene auf den AML-DCs (Abb.11b) und auf molekularer Ebene durch eine PCR auf das leukämie-assoziierte Antigen (LAA) WT-1 (Wilms' tumor gene 1) (Abb.11c) gezeigt werden. Liegen die myeloischen Oberflächenantigene und/oder das leukämie-assoziierte Antigen WT-1 auch nach der *in vitro* Differenzierung noch vor, kann ebenfalls eine Abstammung vom leukämischen Klon gezeigt werden.

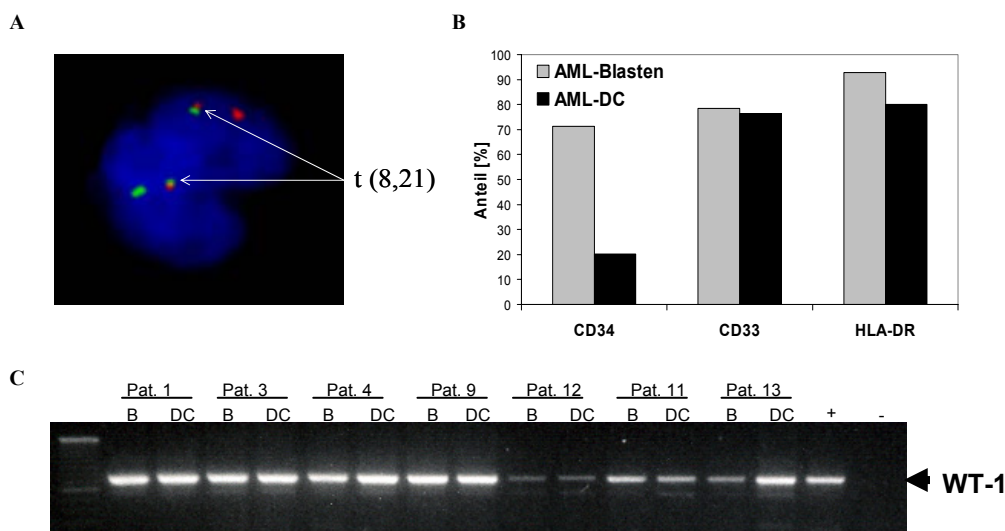


Abbildung 11: Überprüfung des leukämischen Ursprungs der AML-DCs. (A) FISH-Analyse von AML-DCs eines Patienten mit einer t (8;21) Translokation (Patient 6). (B) FACS-Analyse von AML-Blasten und AML-DCs auf die myeloischen Vorläuferantigene CD34, CD33 und HLA-DR von Patient 5. (C) PCR auf das leukämie-assoziierte Antigen WT-1 in AML-Blasten und AML-DCs verschiedener AML Patienten; Positivkontrolle: HL-60 Zelllinie.

3.1.3 Testung des immunogenen Potentials der AML-DCs

Für einen Einsatz der AML-DCs als leukämie-spezifische Stimulatoren wurde in einem weiteren Schritt das immunogene Potential der differenzierten Blasten überprüft. Mittels RT-PCR auf weitere bekannte leukämie-assoziierte Antigene (LAA's) neben WT-1 sollte überprüft werden, ob die AML-DCs die Expression verschiedener LAA's nach der Differenzierung aufrechterhalten. Eine Expression nach Ausdifferenzierung konnte für RHAMM (receptor for hyaluronic acid-mediated motility; CD168) bei 9/9 Patienten und für Proteinase-3 bei 7/9 Patienten gezeigt werden. Das leukämie-assoziierte Antigen PRAME (antigen preferentially expressed in melanoma) exprimierten nur 6/9 Patienten, in 3/6 Patienten wurde die Expression nach Ausdifferenzierung auch beibehalten, bei 2/6 Patienten lag eine Expression nur auf den AML-DCs vor (Abb.12).

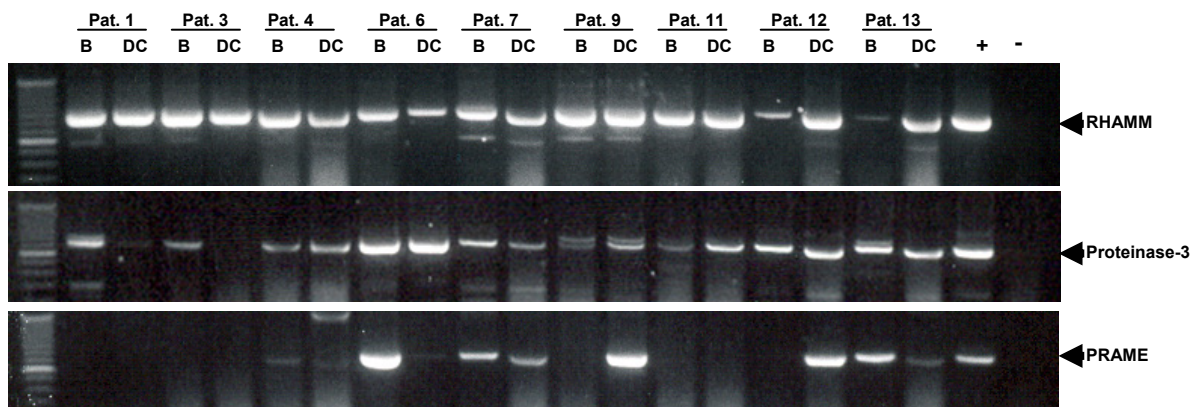


Abbildung 12: RT-PCR auf die leukämie-assoziierten Antigene (LAAs) RHAMM, Proteinase-3 und PRAME. Dargestellt sind jeweils die Produkte der drei verschiedenen LAAs von 9 AML-Patienten aus primären AML-Blasten und nach der *in vitro* Differenzierung zu AML-DCs. B: Blasten; DC: *in vitro* generierte AML-DCs; Pat.: AML-Patient; + : Positivkontrolle HL-60.

3.1.4 Testung der T-Zell-Stimulationskapazität von AML-Blasten und -DCs

Um die AML-DCs als antigenspezifische Stimulatoren für T-Zellantworten einsetzen zu können, musste zunächst überprüft werden, ob sich T-Zellsubpopulationen durch die AML-DCs stimulieren lassen. Ebenso sollte überprüft werden, ob T-Zellsubpopulationen in der Lage sind, sich durch allogene AML-Blasten aktivieren zu lassen. Es wurden also erneut MLRs durchgeführt (n=3), diesmal allerdings mit aufgereinigten allogenen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellsubpopulationen von gesunden Spendern. Als Stimulatoren dienten bestrahlte AML-DCs und AML-Blasten desselben Patienten (Abb.13). Es konnte jeweils der gleiche Effekt beobachtet werden.

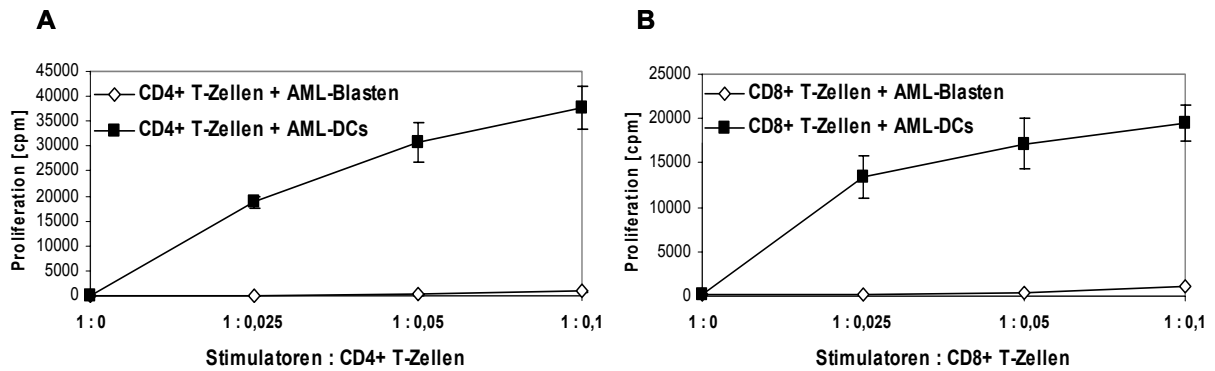


Abbildung 13: Allogene MLR mit T-Zellsubpopulationen. Exemplarische MLR eines AML-Patienten mit einer Leukämie FAB-Klassifikation M4 (Patient 5) mit (A) CD4⁺ T-Zellen als „Responder“ und (B) CD8⁺ T-Zellen als „Responder“ in verschiedenen *Stimulator : Responder* Ratios. Gezeigt sind die Mittelwerte aus Triplikaten für jeden Messpunkt.

Dieses Ergebnis zeigt sehr deutlich, dass sowohl Helfer-T-Zellen (CD4⁺), als auch zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) durch AML-DCs stimuliert werden können, wohingegen AML-Blasten desselben Patienten nahezu keine stimulatorische Kapazität aufweisen. Außerdem war zu erkennen, dass CD4⁺ Helfer-T-Zellen nach Stimulation mit AML-DCs stärker proliferierten als CD8⁺ zytotoxische T-Zellen.

Im nächsten Schritt sollte im Hinblick auf eine Immuntherapie geklärt werden, ob eine Stimulation durch die AML-DCs auch im autologen System möglich ist. Dazu wurden CD3⁺ T-Zellen aus Patienten isoliert, die sich nach erfolgreicher Therapie in kompletter Remission befinden. Die AML-DCs wurden aus kryokonserviertem Material desselben Patienten bei Erstdiagnose der AML generiert und im Vergleich zu AML-Blasten als Stimulatoren in der MLR eingesetzt (Abb.14).

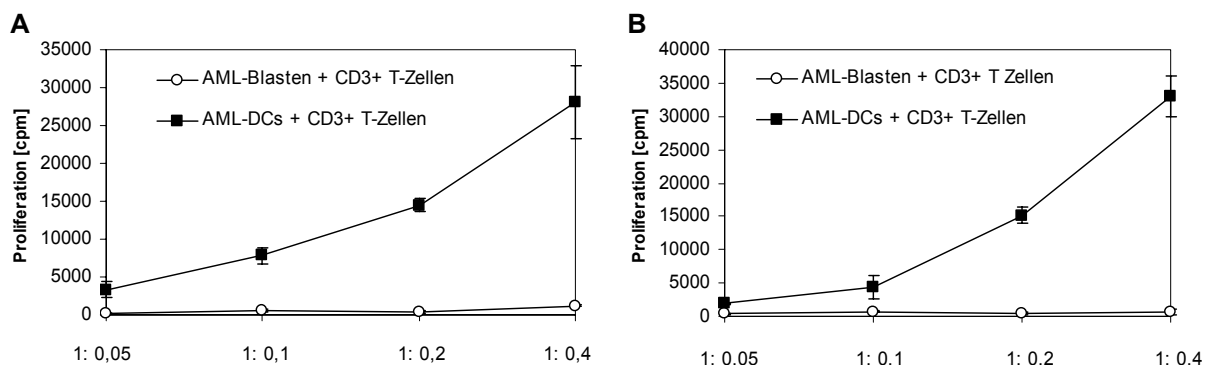


Abbildung 14: Autologe MLR mit CD3⁺ T-Zellen. Bestrahlte AML-DCs und AML-Blasten wurden als Stimulatoren für autologe CD3⁺ T-Zellen vom gleichen Patienten in Remission eingesetzt. (A) Exemplarische autologe MLR von Zellen eines Patienten mit einer M4 Leukämie (Patient 1) (B) Exemplarische autologe MLR von Zellen eines Patienten mit einer M2baso Leukämie (Patient 6). Gezeigt sind die Mittelwerte aus Triplikaten für jeden Messpunkt.

Es konnte hier deutlich gezeigt werden, dass AML-Blasten sowohl im allogenen als auch im autologen System nicht in der Lage sind, eine T-Zellantwort zu induzieren. Nach der *in vitro* Ausreifung der leukämischen Blasten zu AML-DCs konnte in allen Fällen (n=3) auch im autologen System eine Aktivierung der Proliferation von T-Zellen gezeigt werden.

3.1.5 Zytotoxizität von T-Zellen nach Kokultur mit AML-DCs

Wie bereits gezeigt, ist es möglich, eine effektive T-Zellproliferation durch *in vitro* generierte AML-DCs zu erreichen. Im Hinblick auf eine mögliche Immuntherapie soll im Folgenden die Stimulationskapazität der AML-DCs genutzt werden, um eine leukämie-spezifische Reaktion der T-Zellen auszulösen.

Dafür wurde zunächst ein System etabliert, in dem bei autologen T-Zellen durch eine Kokultivierung mit AML-DCs eine zytotoxische Wirkung gegen primäre AML-Blasten induziert wird. Die autologen T-Zellen wurden dabei von AML-Patienten in kompletter Remission gewonnen. Eine 10-tägige Kokultur („priming“) der T-Zellen mit bestrahlten AML-DCs in einem Stimulator-zu-Responder-Verhältnis von 1: 10 unter Zugabe von IL-2 stellte sich dabei als optimal heraus. Die Differenzierung der AML-DCs zeigte sich zu diesem Zeitpunkt unabhängig von einer fortführenden Stimulation mit GM-CSF und IL-4, so dass auf eine weitere Zytokinstimulation verzichtet werden konnte. Die Zytotoxizität der „geprimten“ T-Zellen gegen primäre AML-Blasten als Target wurde anschließend mit der von „ungeprimten“ T-Zellen in einem LDH-Freisetzungstest verglichen. Das Experiment wurde dreimal mit verschiedenen Patienten wiederholt (Abb.15).

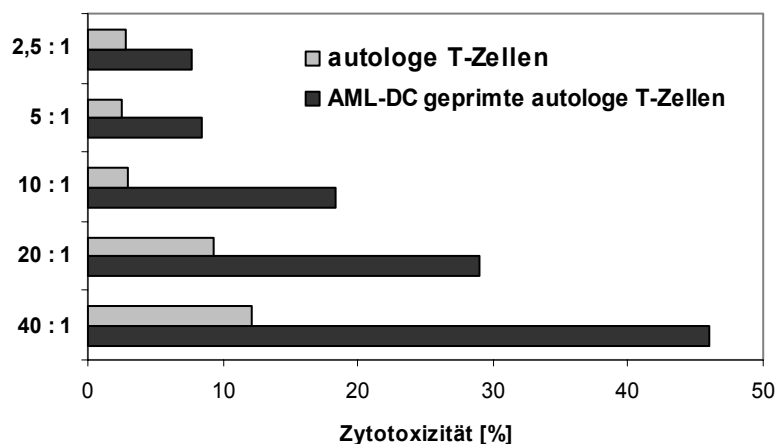


Abbildung 15: Zytotoxische Aktivität nach „priming“ mit AML-DCs. Gezeigt ist die prozentuale Zellyse primärer AML-Blasten durch autologe T-Zellen nach Kokultivierung mit AML-DCs im Vergleich zu autologen T-Zellen, die nicht mit AML-DCs kokultiviert wurden (Patient 9).

Autologe T-Zellen, die nicht kokultiviert waren, zeigten gegenüber den primären AML-Blasten eine geringere Zytotoxizität als die mit AML-DC „geprimten“ T-Zellen (Abb. 15). Bei einem Überschuss von vierzig T-Zellen auf einen AML-Blasten konnte nur eine 12%ige Targetlyse bewirkt werden. Die Kokultivierung mit AML-DCs steigerte die zytotoxische Wirkung gegen die AML-Blasten auf ca. 47%. Bei den anderen zwei Experimenten wurde ein maximaler Überschuss von zwanzig T-Zellen auf einen AML-Blasten angesetzt. Es gab jedoch auch hier einen deutlichen Unterschied in der Targetlyse von AML-DCs geprimten T-Zellen zu autologen T-Zellen, die nicht kokultiviert wurden (12% zu 24% und 14% zu 22%).

3.2 Funktionelle *in vitro* Analyse der T-Zelldysfunktion bei AML

Wie in Kapitel 3.1 gezeigt, können sich AML-Blasten dem Immunsystem entziehen, weil sie nicht in der Lage sind, eine T-Zellantwort zu induzieren. Für diesen „immune escape“- Mechanismus kann es verschiedene Erklärungen geben (siehe Einleitung). Es wird die Hypothese angenommen, dass durch chronische Antigenstimulation eine periphere Toleranz (Anergie) der T-Zellen in AML-Patienten vorliegt. Der Einfluss der AML-Blasten auf T-Zellen wurde im Folgenden funktionell *in vitro* untersucht.

3.2.1 Proliferation nach allogenen „priming“ mit AML-Blasten

In AML-Patienten haben die T-Zellen permanenten Kontakt zu den leukämischen Blasten, d.h. zu ihrem Antigen. Dennoch existiert keine effiziente anti-Tumor Immunantwort. Um den Einfluss der leukämischen Blasten auf T-Zellen näher untersuchen zu können, wurden allogene T-Zellen aus gesunden Spendern mit bestrahlten AML-Blasten *in vitro* kokultiviert, um eine Patienten-ähnliche Situation herzustellen („priming“). Als Vergleich dienten allogene T-Zellen, die mit bestrahlten PBMCs desselben Patienten in kompletter Remission kokultiviert wurden. So konnte der Effekt einer allo-Reaktion ausgeschlossen werden. Nach einwöchiger Kokultur wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Als Stimulation für den Proliferationsassay wurden in diesem Fall ausdifferenzierte AML-DCs desselben Patienten eingesetzt, da die T-Zellen bereits durch einen allo-Stimulus *geprimt* wurden und die Stimulation antigen-spezifisch erfolgen sollte. Dieses Experiment wurde bei n=7 Patienten mit T-Zellen (und T-Zellsubpopulationen) unterschiedlicher gesunder Spender durchgeführt.

In fünf von sieben Experimenten konnte ein inhibitorischer Effekt der AML-Blasten auf T-Zellen gezeigt werden.

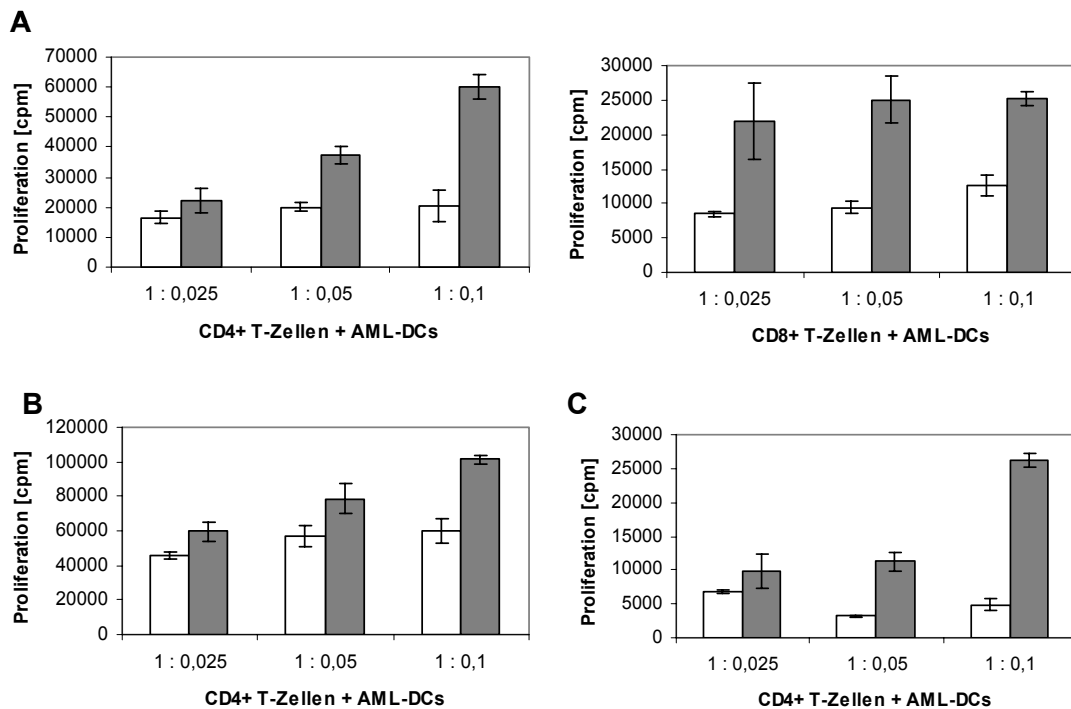


Abbildung 16: MLR nach *in vitro* „priming“ mit AML-Blasten. Allogene T-Zellen wurden 7 d mit bestrahlten AML-Blasten bzw. PBMCs desselben Patienten in Remission kokultiviert und anschließend die Proliferation der T-Zellen mit AML-DCs als Stimulatore in verschiedenen Stimulator : T-Zell-Ratios ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus Triplikaten für jeden Messpunkt mit Standardabweichung. Graue Balken zeigen ein „Priming“ mit AML-Blasten; schwarze Balken ein „Priming“ mit PBMCs. (A) Zellen des FAB-Typs M1 (Patient 9) mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (B) Zellen des FAB-Typs M4 (Patient 5) mit CD4⁺ T-Zellen (C) Zellen des FAB-Typs M4eo (Patient 4) mit CD4⁺ T-Zellen.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass selbst allogene T-Zellen aus gesunden Spendern ein eingeschränktes Proliferationsverhalten zeigen, nachdem sie eine Woche mit leukämischen Blasten kokultiviert wurden.

3.2.2 Untersuchungen mit AML-Zellkulturüberständen

Um die inhibitorischen Eigenschaften der leukämischen Blasten näher untersuchen zu können, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob es sich bei der Inhibition der Proliferation um einen Zellkontakt-abhängigen Effekt handelt, oder ob die Unterdrückung durch lösliche Faktoren induziert wird. Dazu wurde der Zellkulturüberstand von primären AML-Blasten bzw. der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden gewonnen, und die T-Zellen in diesem Zellkulturüberstand kultiviert. Als Kontrolle diente der Überstand von PBMCs, um einen Verbrauch an Kulturmedium auszugleichen. Da kein direkter Kontakt mit den Blasten stattfand, musste in diesem Fall keine „allo-Kontrolle“ (siehe oben) erfolgen und die Stimulation musste nicht mehr

antigen-spezifisch sein. Das Experiment wurde jeweils für 2 verschiedene gesunde T-Zell-Spender durchgeführt, jeweils den Zellkulturüberständen von vier bzw. fünf verschiedenen AML-Patienten, sowie der AML-Zelllinie HL-60.

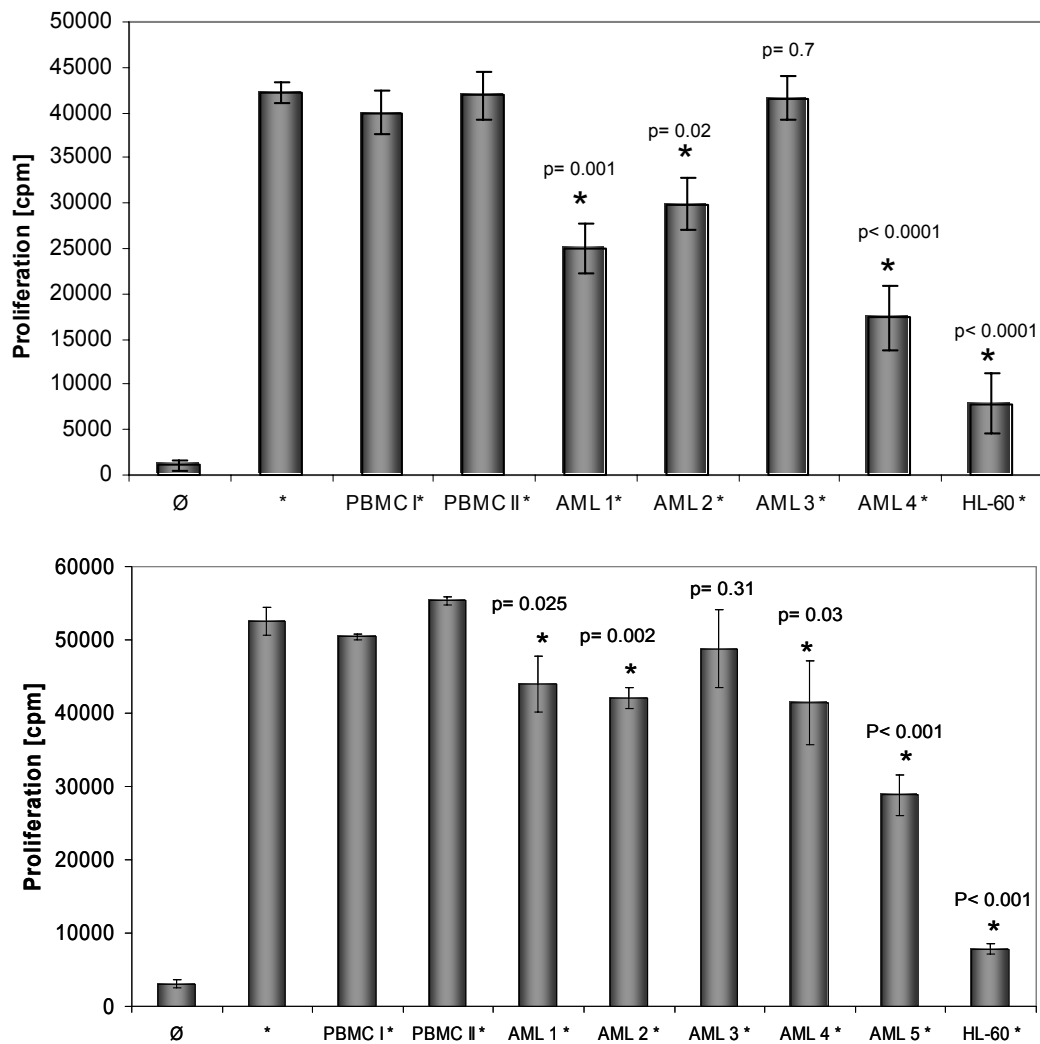


Abbildung 17: Proliferationstest von T-Zellen in verschiedenen Zellkulturüberständen. T-Zellen gesunder Spender wurden 5 Tage im Zellkulturüberstand von AML-Blasten bzw. PBMCs gesunder Spender kultiviert und anschließend die Proliferation nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus Triplikaten für jeden Messpunkt mit Standardabweichung exemplarisch für zwei verschiedene T-Zellspender. Die statistische Signifikanz wurde mit dem student's t-test ermittelt. Ø : keine Stimulation mit PMA/ Ionomycin; * : Stimulation mit PMA/ Ionomycin.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition gesunder T-Zellen durch AML-Blasten zum Teil auch über lösliche Faktoren vermittelt wird.

3.2.2.1 Produktion der T_H1-assozierten Zytokine IL-2 und IFN- γ

Aufgrund des ausreichenden Materials wurde zusätzlich zur Proliferation noch die Produktion von IFN- γ und IL-2 ermittelt. Diese beiden Zytokine sind charakteristisch für aktivierte T-Zellen und stehen für eine T_H1-Effektor Differenzierung von CD4⁺ T-

Zellen. Die T-Zellen gesunder Spender wurden hierfür zunächst für 5 Stunden in den Zellkulturüberständen kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit PMA/Ionomycin über Nacht. Die Messung der Zytokinproduktion erfolgte mittels intrazellulärer FACS Analyse.

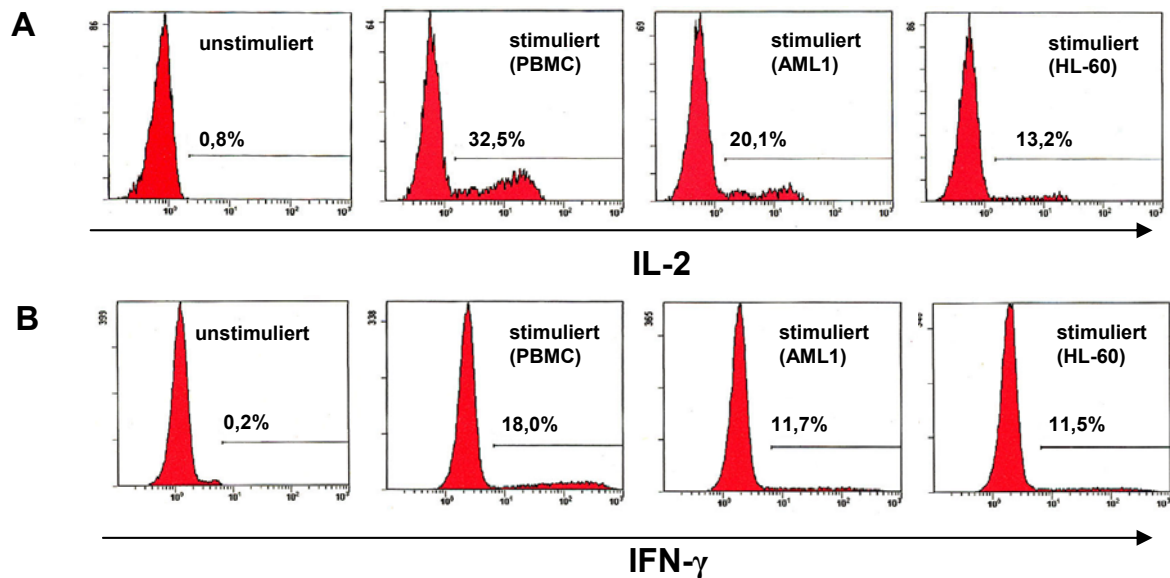


Abbildung 18: Intrazelluläre FACS-Analyse der T_H1-Zytokine IL-2 und IFN- γ . T-Zellen gesunder Spender wurden 24 h im Zellkulturüberstand von primären AML-Blasten, der AML-Zelllinie HL-60 sowie von PBMCs gesunder Spender kultiviert und anschließend die Produktion von IL-2 und IFN- γ nach Stimulation mit PMA/Ionomycin ermittelt. (A) Histogramm Plot für IL-2. (B) Histogramm Plot für IFN- γ . In Klammern ist der jeweilige Zellkulturüberstand, in dem die T-Zellen kultiviert wurden angegeben.

Die Stimulation von T-Zellen mit PMA/Ionomycin induziert die Produktion von IL-2 und IFN- γ . In Anwesenheit des AML-Zellkulturüberstandes ist die Produktion dieser beiden Zytokine inhibiert (IFN- γ : um 35% bei dem Zellkulturüberstand primärer AML-Blasten bzw. 36% bei dem Zellkulturüberstand der Zelllinie HL-60; IL-2: um 38% (AML) bzw. 59% (HL-60)).

Anhand der AML-Zelllinie HL-60 sollte im Folgenden überprüft werden, ob die oben gezeigten Effekte (verminderte Proliferationskapazität, IL-2 und IFN- γ Produktion) dosisabhängig sind. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe des HL-60 Zellkulturüberstands erstellt und erneut die Proliferation und Zytokinproduktion von gesunden T-Zellen untersucht.

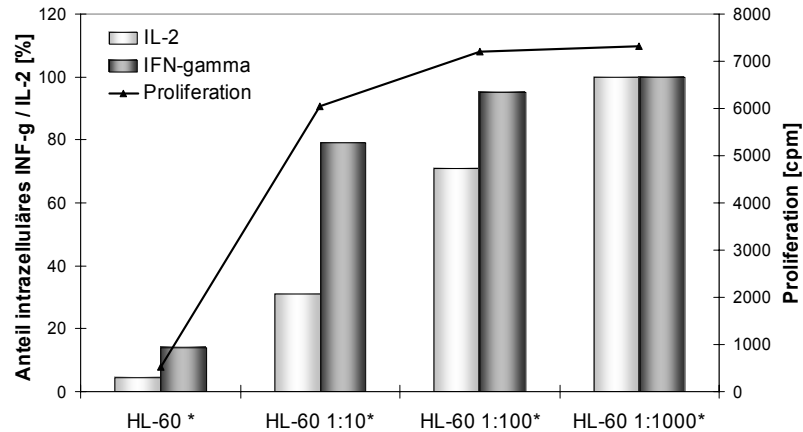


Abbildung 19: Dosisabhängige Untersuchung der Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen in HL-60 Zellkulturüberständen. T-Zellen gesunder Spender wurden in verschiedenen Verdünnungen des Zellkulturüberstands der Zelllinie HL-60 kultiviert und anschließend die Proliferation und Produktion von IL-2 und IFN- γ nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin ermittelt. Die Kurve zeigt die Proliferation (Mittelwerte aus Triplikaten für jeden Messpunkt mit Standardabweichung). * : Stimulation mit PMA/ Ionomycin.

Bei den oben gezeigten Effekten konnte exemplarisch an der Zelllinie HL-60 gezeigt werden, dass die Inhibition sowohl der Proliferation als auch der T_H1-Zytokinproduktion durch lösliche Faktoren im Überstand von AML-Blasten dosisabhängig ist.

Um den anergen Zustand der T-Zellen nach Inkubation im AML-Überstand weiter zu charakterisieren, wurde den Kulturansätzen zusätzlich rhIL-2 zugeführt. In vielen Fällen von Anergie lässt sich das eingeschränkte Proliferationsverhalten von T-Zellen durch die Zugabe von exogenem IL-2 wieder aufheben (IL-2 Reversibilität).

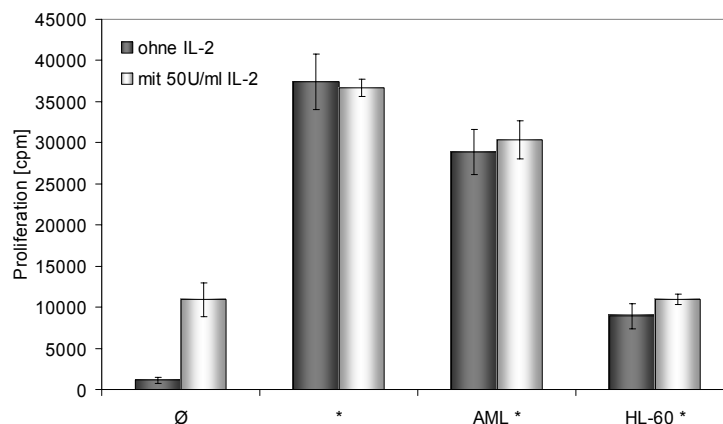


Abbildung 20: Untersuchung zur IL-2 Reversibilität des inhibitorischen Effekts. T-Zellen gesunder Spender wurden in Zellkulturüberständen der Zelllinie HL-60 und eines AML-Patienten kultiviert und anschließend die Proliferation nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten für jeden Messpunkt mit Standardabweichung. * : Stimulation mit PMA/ Ionomycin.

Es konnte gezeigt werden, dass die verminderte Proliferationskapazität nach Kultur in AML-Zellüberständen nicht IL-2 reversibel ist.

3.2.2.2 Zellzyklusanalysen

Naive T-Zellen sind in der G0 Phase des Zellzyklus arretiert, bis sie aktiviert werden und dadurch in den Zellzyklus eintreten. Die Aktivierung von T-Zellen induziert deren Proliferation, Sezernierung von Zytokinen und die zytotoxischen Eigenschaften. Es lag also die Vermutung nahe, dass die inhibitorischen Effekte der AML-Blasten (Proliferation, T_H1 -Zytokine) auf einen Arrest in der G0/G1 Phase des Zellzyklus zurückzuführen sein könnten. Aus diesem Grund wurden im Folgenden Zellzyklusanalysen in dem erfolgreich etablierten *in vitro*-System (AML-Zellkulturüberstände) durchgeführt. Das Ergebnis konnte in drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

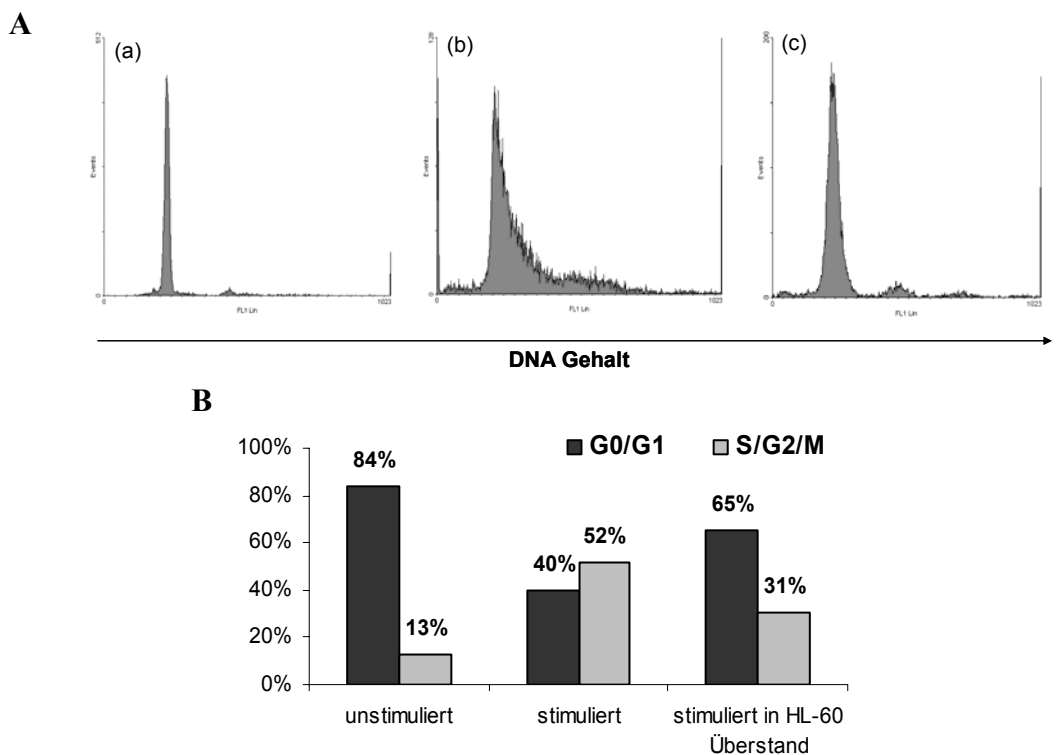


Abbildung 21: Zellzyklusanalysen. T-Zellen gesunder Spender wurden in Zellkulturüberständen der AML-Zelllinie HL-60 oder normaler PBMCs kultiviert und mitogen mit PMA/ Ionomycin stimuliert. (A) Histogramm Plot von (a) unstimulierten und (b) mitogen stimulierten T-Zellen in Zellkulturüberständen normaler PBMCs und (c) von mitogen stimulierten T-Zellen im HL-60 Zellkulturüberstand. (B) Prozentualer Anteil der T-Zellen in der G0/G1- und in der proliferativen Phase (S/G2/M).

Bei den Zellzyklusanalysen ist deutlich zu erkennen, dass die T-Zellen, die im Zellkulturüberstand der AML-Zelllinie HL-60 kultiviert werden, in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretiert sind (65% in G0/G1) gegenüber denselben T-Zellen, die im Zellkulturmedium normaler PBMCs kultiviert werden (40% in G0/G1).

3.2.3 IL-10 als immunregulatorisches Zytokin

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, die in Zellkulturüberständen von AML-Blasten kultiviert wurden, die T_H1 -Zytokine IFN- γ und IL-2 auf Proteinebene herunterregulieren. Im Hinblick auf einen immunregulatorischen Mechanismus war nun zu untersuchen, welchen Einfluss die AML-Zellkulturüberstände auf das Zytokin IL-10 haben, ein Zytokin, das unter anderem von T_H2 und von induzierten regulatorischen T-Zellen (T_R1 -Zellen) vermehrt sezerniert wird.

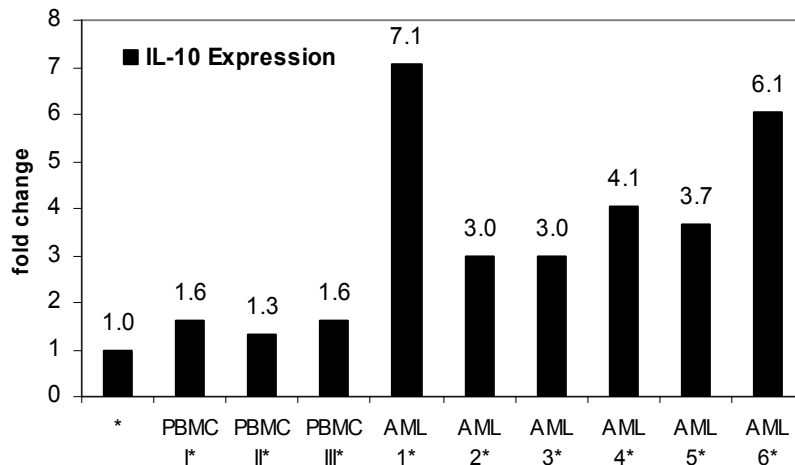


Abbildung 22: Realtime RT-PCR auf IL-10. $CD3^+$ T-Zellen gesunder Spender wurden 5 Tage im Zellkulturüberstand von AML-Blasten (AML 1-6) bzw. PBMCs gesunder Spender (PBMC I-III) unter mitogener Stimulation (gekennzeichnet mit *) kultiviert und anschließend in einer Realtime RT-PCR für IL-10 eingesetzt. Gezeigt sind die *fold changes* bezogen auf die stimulierte Kontrolle in normalem Medium.

Alle der hier analysierten AML-Zellkulturüberstände regulieren die Produktion von IL-10 in normalen T-Zellen hoch.

3.2.3.1 ELISPOT zur Analyse der IL-10 Produktion

Zur Überprüfung der Regulation von IL-10 auf Proteinebene wurde ein ELISPOT mit IL-10 spezifischen Antikörpern durchgeführt. T-Zellen gesunder Spender produzieren vermehrt IL-10, wenn sie mit AML-Blasten *geprint* wurden. Damit konnte die vermehrte Expression von IL-10 auf RNA-Ebene (vgl. 3.2.3) auch auf Proteinebene bestätigt werden.

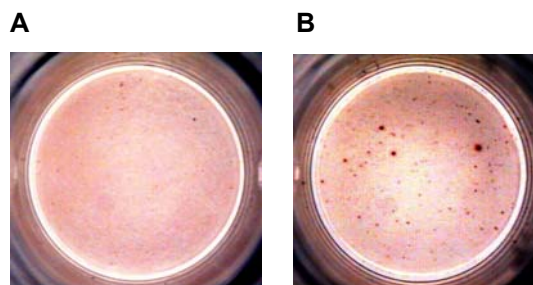


Abbildung 23: ELISPOT zur Überprüfung der IL-10 Produktion. T-Zellen gesunder Spender wurden ohne (A) bzw. mit (B) bestrahlten AML-Blasten kokultiviert und die IL-10-Produktion ermittelt.

3.3 Differentielle Genexpressionsanalyse von CD4⁺ T-Zellen

Die *in vitro* analysierten inhibitorischen Effekte von leukämischen Blasten auf T-Zellen sollen nun direkt an T-Zellen aus AML-Patienten näher untersucht werden. Da die Tumorlast bei Leukämiepatienten bis zu 1 kg betragen kann und sich die entarteten Zellen in direktem Kontakt zu den T-Zellen befinden, war zu vermuten, dass diese T-Zellen auch ein verändertes Genexpressionsprofil gegenüber T-Zellen aus gesunden Probanden zeigen. Zur Analyse des Expressionsprofils kamen so genannte „Custom“-Microarrays zum Einsatz, die die Untersuchung von 350 T-Zell-spezifischen Genen ermöglichen. Diese Versuche wurden in den Räumen der *Array-Facility* der GBF in Braunschweig (Prof. Jan Buer) durchgeführt. Es wurden CD4⁺ T-Zellen von sechs gesunden Probanden mit denen von sieben verschiedenen AML-Patienten verglichen (Tab.4). Die CD4⁺ T-Zellen wurden aus kryokonservierten PBMCs mittels eines „fluorescence-activated cell sorters“ (FACS) isoliert. Die Reinheit der analysierten CD4⁺ T-Zellen lag bei >96% (Abb.23)

Tabelle 4: Zusammenstellung der analysierten Probanden. (A) gesunde Spender. (B) AML-Patienten

A				B				
Spender	Sex	Alter	Reinheit	Patient	Sex	Alter	FAB-Typ	Reinheit
1	W	27	98%	3	m	59	M2	99%
2	W	26	98%	9	m	67	M2	97%
3	M	32	98%	11	w	43	M2	98%
4	M	30	97%	12	w	46	M1	98%
5	W	54	96%	14	w	65	M1	98%
6	M	?	98%	15	m	69	M0	97%
				16	m	31	M1	97%

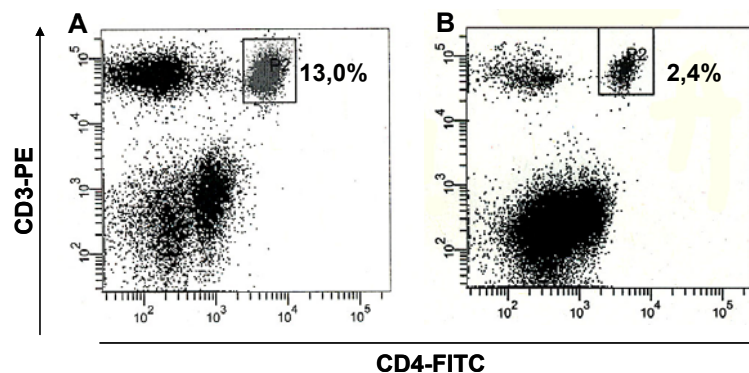


Abbildung 24: Darstellung der zu sortierenden CD4⁺ T-Zellen. (A) gesunde Kontrolle mit einem Anteil an CD4⁺ T-Zellen von 13%. (B) AML-Patient mit einem Anteil an CD4⁺ T-Zellen von 2,4%; Der Grossteil der Zellen besteht aus leukämischen Blasten.

3.3.1 Qualität der verwendeten cRNA-Sonden

Aufgrund der geringen isolierten Zellzahl aus dem kryokonservierten Material erfolgte die Probenaufarbeitung anhand eines RNA-Amplifikationsprotokolls (vgl. 2.2.8-2.2.13). Die fertigen cRNA-Sonden wurden im Agilent Bioanalyzer untersucht.

Abbildung 24 (Teilbild A) zeigt ein typisches Fragmentlängenspektrum der cRNA-Sonden und zeigt, dass die Synthese effizient und linear verlief.

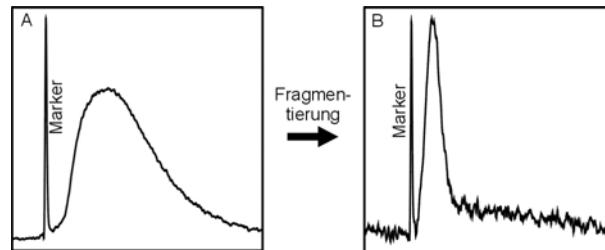


Abbildung 25: Agilent-Analyse fragmentierter, biotinylierter cRNA-Sonden. A) Längenverteilung der cRNA-Sonden vor der Fragmentierung. B) Längenverteilung nach der Fragmentierung.

Nur Proben mit entsprechendem Fragmentlängenspektrum wurden weiter verarbeitet. Der Effekt der Fragmentierung der cRNA-Sonden wird aus Teilbild B ersichtlich. Die Verteilung der Fragmentlängen ist im Vergleich zu Teilbild A deutlich nach links, also zu kleineren Fragmentlängen hin verschoben und fällt deutlich enger aus.

3.3.2 Qualität der verwendeten Custom-Arrays

In Abbildung 25 ist beispielhaft eine als Chip-Chargen-Kontrolle dienende Sybr-Green Färbung eines unhybridisierten Microarrays und ein repräsentativer *Microarray* eines gesunden Spenders dargestellt. In Teilbild A wird eine einheitliche Spotmorphologie sowie ein geringes Hintergrundlevel deutlich. Dadurch wird gewährleistet, dass selbst noch geringe Signalintensitäten nachweisbar sind. Die unterschiedlichen Helligkeitswerte der Spots in Teilbild B spiegeln in direkter Weise die unterschiedlichen Expressionsstärken der 350 Testgene wieder. Arrays mit erhöhtem Hintergrundlevel, Artefakten, uneinheitlichen Spotmorphologien oder anderen optisch eindeutigen Mängeln wurden nicht in die weitere Analyse einbezogen.

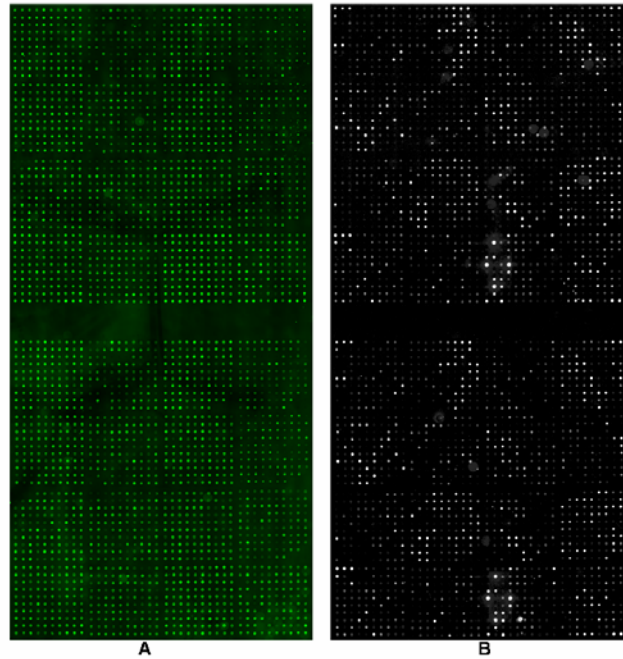


Abbildung 26: Bilder des *Human T_{Reg} Microarrays*. A) Sybr-Green Färbung eines *Human T_{Reg} Chips*. Sybr-Green interkaliert unspezifisch mit den Nukleinsäuren der Oligonucleotide. Zu sehen sind zwei Array-Replikate und die 16 Meta-Grids, aus denen diese jeweils bestehen. B) *Human T_{Reg} Chip* von CD4⁺ T-Zellen eines gesunden Spenders.

3.3.3 Identifizierung und Beschreibung der differenziell exprimierten Gene

Zur Identifizierung von Genen bzw. Gengruppen, die differentiell und statistisch signifikant zwischen CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender und CD4⁺ T-Zellen von AML-Patienten reguliert sind, wurde ein Signifikanz-Permutationstest (SAM, vgl. 2.3.6) mit anschließender hierarchischer Clusteranalyse (vgl. 2.3.7) durchgeführt. Vergleicht man die Arraydaten gesunder Spender mit den Array-Daten der AML-Patienten unter dem Aspekt signifikant regulierter Gene, erhält man nach Clusteranalyse die Abbildung 26. Der Cluster besteht aus insgesamt 38 Genen, von denen 17 positiv und 21 negativ reguliert sind, bezogen auf das Verhältnis „AML/gesund“.

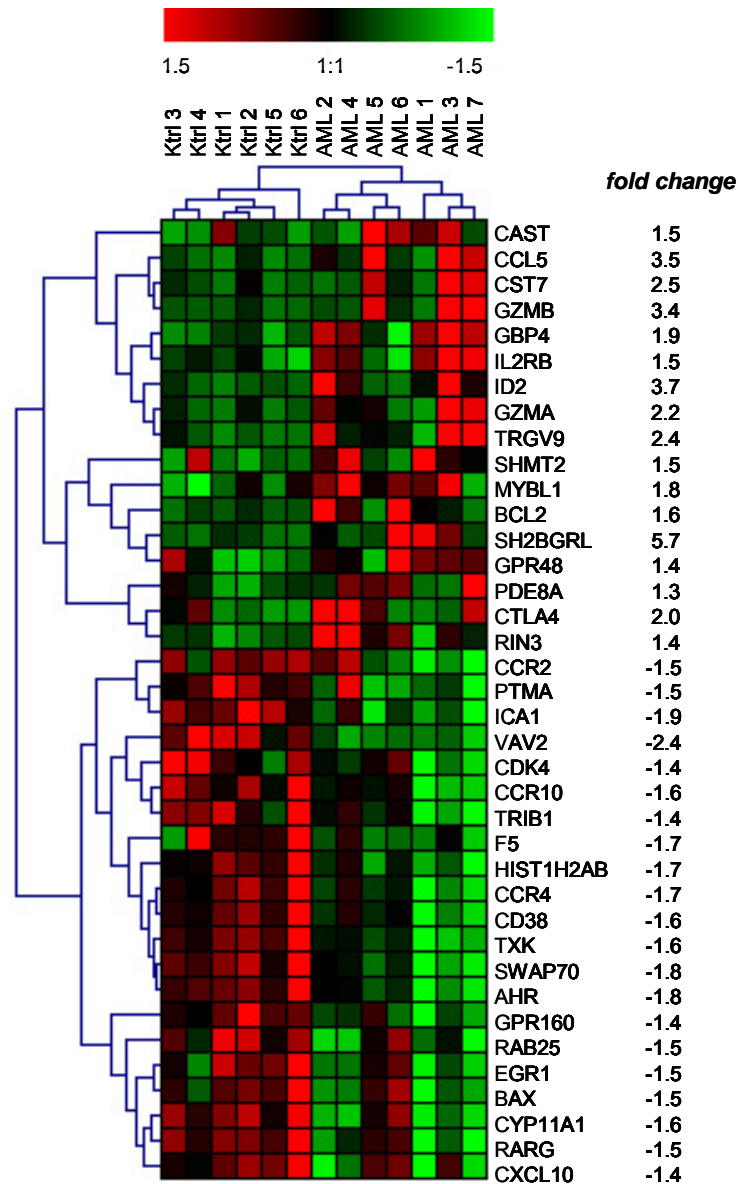


Abbildung 27: Hierarchische Clusteranalyse des signifikanten Genexpressionsprofils von CD4⁺ T-Zellen aus AML-Patienten (AML 1-7) gegen CD4⁺ T-Zellen aus gesunden Kontrollen (Ktrl 1-6). Rechts sind Gen-Akronyme und der *fold change* der Genexpression zwischen den beiden Gruppen angegeben.

Das hierarchische Clustern ergab, dass die durch SAM ermittelten statistisch signifikanten Gene auch den beiden Gruppen zugeordnet werden konnten. Inhomogenitäten im oben gezeigten Cluster kommen durch individuelle Unterschiede sowohl innerhalb der Kontrollgruppe als auch der Patienten zustande.

Es kann deutlich gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen aus AML-Patienten ein verändertes Genexpressionsprofil gegenüber gesunden Spendern aufzeigen. In einem nächsten Schritt wurden die differentiell exprimierte Gene unterschiedlichen funktionellen Gruppen zugeordnet (Abb.27).

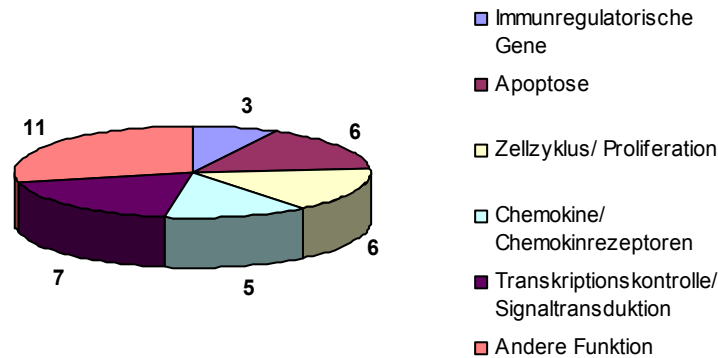


Abbildung 28: Einteilung der 38 differenziell exprimierten Gene in funktionelle Gruppen

Die folgende Tabelle liefert eine erste Beschreibung der zwischen AML-Patienten und gesunden Spendern regulierten Gene:

Tabelle 5: Beschreibung der differenziell exprimierten Gene

Immunregulatorische Gene		
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	<ul style="list-style-type: none"> Negativregulator von T-Zellantworten in der Peripherie Hochregulierung verhindert die Progression durch den Zellzyklus durch die Inhibition von cyclin D3, Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) und CDK6
IL2RB	interleukin 2 receptor, beta	<ul style="list-style-type: none"> hält das Aktivierungsprogramm von T-Zellen unter Kontrolle wichtig für die Aufrechterhaltung der Homeostase
CST7	cystatin F (leukocystatin)	<ul style="list-style-type: none"> codiert für einen glykosylierten Cystein Protease Inhibitor Rolle in der Immunregulation durch die Inhibierung eines einzelnen Targets im hämatopoietischen System Expression des Proteins wurde in verschiedenen Krebszelllinien gefunden
Apoptose		
GZMB	granzyme B (cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	<ul style="list-style-type: none"> Induktion von Apoptose in Zellen bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort (Inhalt von zytotoxischen Granula bei aktivierten T-Zellen) Spontane Expression auf LAA-reaktiven T-Zellen in Patienten mit AML Spielt eine mögliche Rolle bei der Unterdrückung von T-Zellantworten
GZMA	granzyme A (cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	<ul style="list-style-type: none"> T- und NK-Zellspezifische Serinprotease (Inhalt von zytotoxischen Granula bei aktivierten T-Zellen) Wichtig für die spezifische Lyse von Targetzellen
BAX	BCL2-associated X protein	<ul style="list-style-type: none"> Pro-apoptotischer Regulator Involviert in die p53 vermittelte Apoptose BAX und BCL-2 werden während der Apoptose reziprok reguliert
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2	<ul style="list-style-type: none"> Unterdrückt eine Vielzahl von apoptotischen Mechanismen, z.B indem es die Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien verhindert Interagiert mit BAX
CAST	calpastatin	<ul style="list-style-type: none"> Apoptose-Pathway in Neutrophilen Kritisches Element in der pro-apoptotischen Kaskade die zur BAX Aktivierung führt
CD38	CD38 antigen (p45)	<ul style="list-style-type: none"> Induktion von Apoptose durch extrazelluläre Signale Spielt wahrscheinlich <i>in vivo</i> eine Rolle bei der Regulation humoraler Immunantworten
Zellzyklus und Proliferation		
ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	<ul style="list-style-type: none"> Überexpression inhibiert die Proliferation und induziert eine G0/G1 Akkumulation in akuten promyelozytischen Leukämie-Zellen Reguliert TH1/TH2 Balance und den Zellzyklus

CDK4	cyclin-dependent kinase 4	<ul style="list-style-type: none"> Inhibiert basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktoren Wichtig für die G1 Phasen-Progression im Zellzyklus Niedrige Expression ist assoziiert mit einem Arrest in der G1 Phase Aktivität kann Marker für die Zytokin-Empfindlichkeit von T-Zellen sein
PTMA	Prothymosin, alpha	<ul style="list-style-type: none"> PTMA verstärkt die CD4+ T-Zell-vermittelte Proliferation gegen autologe Tumorzellen Erhöhte Expression in der G1-Phase des Zellzyklus Kann assoziiert werden mit einem Erhöhten Bedarf während des G1/S-Überganges
TRIB1	tribbles homolog 1 (Drosophila)	<ul style="list-style-type: none"> Tribbles koordiniert die Proliferation und Zellteilung in Drosophila Humanes tribbles kontrolliert die Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kaskaden (MAPK)
VAV-2	vav 2 oncogene	<ul style="list-style-type: none"> “cytoplasmic guanine nucleotide exchange factors” für Rho-GTPasen → Src-Pathway (Proliferation, Zellzyklus) spielt eine kritische Rolle in der T-Zellentwicklung und Aktivierung unterdrückt TCR-Signale, die zur Induktion des IL-2 Promotors führen
MYBL1	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1 (a-MYB)	<ul style="list-style-type: none"> Der regulatorische Mechanismus von a-myb ist dem von c-myb ähnlich c-myb wird direkt durch einen Zellzyklus-abhängigen Mechanismus in der G1 Phase reguliert A-myb reguliert die BCL-2 Aktivität hoch Wird in ruhenden T-Zellen exprimiert und der Level verringert sich nach Stimulation mit Mitogenen

Chemokine und Chemokinrezeptoren

CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5 (RANTES)	<ul style="list-style-type: none"> Chemoattraktant für Gedächtnis T_H-Zellen und T_H1-Zellen In Entzündungen hochreguliert
CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2	<ul style="list-style-type: none"> Rezeptor für MCP-1, das an der Anti-Tumor Antwort beteiligt ist
CCR4	chemokine (C-C motif) receptor 4	<ul style="list-style-type: none"> Rezeptor u.a. für CCL5 Wird selektiv auf T_H2 Lymphozyten exprimiert
CCR10	chemokine (C-C motif) receptor 10	<ul style="list-style-type: none"> Involviert in T-Zell vermittelte Hautentzündungen Exprimiert von Gedächtnis CD4 und CD8 T-Zellen
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10 IFN-γ induced protein 10	<ul style="list-style-type: none"> Anti-Tumor Aktivität in vivo Hochreguliert durch IFN-γ in entzündlichen Reaktionen Spielt eine Rolle bei der Erzeugung einer Effektor T-Zellantwort

Transkriptionskontrolle/ Signaltransduktion

AHR	aryl hydrocarbon receptor	<ul style="list-style-type: none"> AhR Aktivierung verursacht Apoptose und Zellzyklusarrest
EGR-1	Early growth response 1	<ul style="list-style-type: none"> kontrolliert direkt die TGF-β Genexpression unterdrückt die BCL-2 Promotoraktivität wichtig für die Zytokinkaskade in T-Zellen bei Entzündungen
RARG	retinoic acid receptor, gamma	<ul style="list-style-type: none"> „activation-induced cell death (AICD)“ in peripheren T-Zellen durch Retinsäuren von wird über RARG vermittelt RARG-Antagonisten inhibieren den Zelltod Ligation von RARG inhibiert die Proliferation in PHA-stimulierten T-Zellen
TXK	TXK tyrosine kinase	<ul style="list-style-type: none"> exprimiert in TH1 Zellen reguliert die IFN-γ Produktion in humanen T-Zellen antisense Oligonukleotide von TXK inhibieren spezifisch die IFN-γ Produktion
RIN3	Ras and Rab interactor 3	<ul style="list-style-type: none"> spielt eine wichtige Rolle beim Transport-Weg von der Plasmamembran zu den frühen Endosomen
RAB25	member RAS oncogene family	<ul style="list-style-type: none"> Signaltransduktion in hämatopoietischen Zellen über kleine GTPasen
PDE8A	Phosphodiesterase 8A	<ul style="list-style-type: none"> reguliert die intrazelluläre Konzentration zyklischer Nukleotide Assoziation mit IκappaB-Proteinen

Other function

SHMT2, CYP11A1, HIST1H2AB, GBP4, SH3BGRL, ICA1, SWAP70, F5, TRGV9, GPR160, LGR4

Interessanterweise zeigten die T-Zellen kein Genexpressionsprofil regulatorischer T-Zellen (z.B. FoxP3, PD-1, GITR). Es konnte jedoch eine starke Dysregulierung von Molekülen gefunden werden, die eine Rolle im Zellzyklus (z.B. cdk4, Id2, prothymosin a) oder bei der Apoptose (z.B. Bcl-2, Bax, GZMB) spielen. Ebenso konnten Chemokine und Chemokinrezeptoren identifiziert werden, die wichtig für die Entwicklung, die Homeostase und die Funktion des Immunsystems sind.

3.3.4 Quantitative Realtime RT-PCR

Zur Bestätigung der *Microarray*-Ergebnisse wurde für vier ausgewählte Gene eine quantitative Realtime RT-PCR durchgeführt. Die Werte für jeweils fünf gesunde Kontrollen wurden dafür gemittelt und ein „*fold-change*“ für jeden einzelnen AML-Patienten bezogen auf den Kontrollmittelwert gebildet.

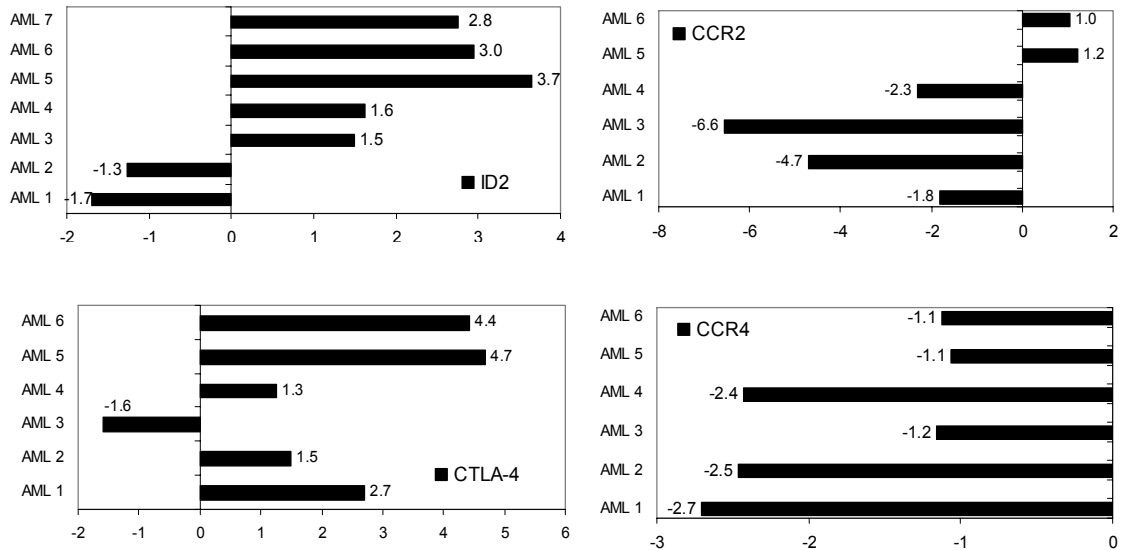


Abbildung 29: Quantitative Realtime RT-PCR. Gezeigt sind die *fold changes* von vier regulierten Genen für jeden einzelnen AML-Patienten bezogen auf den Kontrollmittelwert.

Die Ergebnisse der Realtime RT-PCR bestätigen die Expression auf dem *Microarray*. Sowohl Id2, als auch CTLA-4 sind auf den *Microarrays* hochreguliert, während die beiden Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR4 herunterreguliert sind. Da es sich bei den regulierten Genen auf dem *Microarray* um statistisch signifikante Veränderungen im Genexpressionsprofil handelt, kann es in der Realtime RT-PCR aufgrund von individuellen Unterschieden durchaus bei einzelnen Patienten zu Abweichungen kommen.

4 Diskussion

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine Gruppe von klonalen Erkrankungen mit Transformation einer frühen myeloischen Stamm- bzw. Vorläuferzelle. Wie *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zeigen, ist die immunologische Erkennung und Zerstörung der Leukämie-Zellen durch autologe T-Zellen in der Regel gestört [39]. Verantwortlich hierfür scheint zu sein, dass (A) Leukämie-reaktive T-Zellen *in vivo* nur unzureichend von den leukämischen Blasten aktiviert werden [47] und (B) immunregulatorische Mechanismen zur Induktion von leukämie-spezifischer peripherer Toleranz führen [26]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum besseren Verständnis der Immundysregulation und der Wechselwirkung zwischen myeloischen Leukämie-Zellen und T-Zellen bei Patienten mit AML sowohl funktionell, als auch molekularbiologisch durchgeführt. Neben Kokultorexperimenten bei denen die Proliferation, Zytotoxizität, sowie die Zytokinproduktion untersucht wurde, wurden erstmalig T-Zellen aus AML-Patienten im Vergleich zu T-Zellen gesunder Spender unter Einsatz von cDNA Genexpressions-*Microarrays* differentiell analysiert, um so relevante Schlüsselgene und molekulare Mechanismen, die der Immundysregulation zugrunde liegen könnten, zu identifizieren.

4.1 Generierung von AML-DCs und ihr Einfluss auf T-Zellen

Dendritische Zellen (DCs) entstehen aus hämatopoietischen Vorläuferzellen und gehören zur Gruppe der Leukozyten. Als professionell antigen-präsentierende Zellen (APCs) sind sie auf die Initiierung primärer Immunantworten spezialisiert. Sie spielen unter anderem eine Schlüsselrolle bei der Induktion von antigenspezifischen Immunantworten gegen Tumorantigene [48]. Es konnte gezeigt werden, dass DCs *in vitro* aus Vorläuferzellen des Knochenmarks [49] oder aus Monozyten des peripheren Blutes [50] durch zytokin-induzierte Differenzierung generiert werden können. Diese *in vitro* differenzierten DCs zeigen alle funktionellen und phänotypischen Charakteristika unreifer DCs, die in der Lage sind, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren. Durch mikrobielle Antigene, inflammatorische Zytokine oder CD40L können diese unreifen DCs auch *in vitro* zu reifen DCs ausdifferenziert werden [48].

Einige Gruppen konnten kürzlich zeigen, dass eine *in vitro* Differenzierung ebenso aus myeloischen Blasten von AML Patienten möglich ist [19, 51, 52]. Hintergrund für diese Untersuchungen ist die Tatsache, dass die immunologische Erkennung und

Zerstörung der Leukämie-Zellen durch autologe T-Zellen trotz der Expression von immunogenen leukämie-assoziierten Antigenen gestört ist. Man vermutet, dass leukämie-reaktive T-Zellen *in vivo* nur unzureichend von den leukämischen Blasten aktiviert werden und dass durch eine Ausdifferenzierung der leukämischen Blasten zu DCs eine leukämie-spezifische T-Zellantwort induziert werden kann [19, 47].

4.1.1 *in vitro* Differenzierung zu AML-DCs und ihre stimulatorischen Eigenschaften

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der *in vitro* Ausdifferenzierung von AML-Blasten und ihrer funktionellen Charakterisierung. Wie bereits erwähnt nehmen DCs als professionell antigen-präsentierende Zellen bei der Initiierung einer spezifischen T-Zellantwort eine zentrale Rolle ein [48]. Verschiedene Strategien sind in den letzten Jahren entwickelt worden, um dendritische Zellen zur spezifischen Immuntherapie bei malignen Erkrankungen einzusetzen [53]. Die Differenzierung von AML-Blasten in Zellen mit einem „dendritenähnlichem Phänotyp“ (kurz: AML-DCs) stellt eine von verschiedenen Methoden dar, dendritische Zellen für die Induktion einer leukämie-spezifischen T-Zellantwort einzusetzen. Dabei wird mit der zytokin-induzierten Differenzierung der Leukämiezellen zu AML-DCs der aufwendige Prozess der Antigenselektion und Präsentation [38] umgangen, da die Targetzellen, die bereits das potentielle leukämie-spezifische Antigen in sich tragen, selbst zu antigen-präsentierenden Zellen differenziert werden. Auf diesem Weg kann die schwierige Identifizierung des LAA im Einzelpatienten umgangen werden.

Zur Generierung der AML-DCs konnte eine optimale Zytokinkonzentration ermittelt werden (1000 U/ml GM-CSF, 800 U/ml IL-4, 200 U/ml TNF- α). GM-CSF ist ein Zytokin, auf das myeloische DCs, sowie myeloische Vorläuferzellen reagieren. IL-4 unterdrückt die Entwicklung von Makrophagen und Monozyten aus myelomonozytären Vorläuferzellen [54]. Die Zugabe von TNF- α führt zur Ausreifung der AML-DCs und zur Induktion der T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften [55]. Da die leukämischen Zellen in ihrer Ausdifferenzierung arretiert sind, war eine höhere Zytokingabe erforderlich als z.B. zur Ausdifferenzierung aus Monozyten eingesetzt wird [50]. Eine Differenzierung zu AML-DCs war in 70% der Fälle möglich und zwar unabhängig von FAB-Typ der Leukämie. Die Ergebnisse entsprechen somit der Fachliteratur [19]. In den übrigen 30% der AML-Zellen war entweder keine Ausdifferenzierung zu erkennen, oder die Blasten überlebten nicht in der Zellkultur. Die

Gründe dafür, ob eine Ausdifferenzierung zu AML-DCs bei dem jeweiligen Patienten möglich ist oder nicht, bleiben jedoch unklar.

Es konnte gezeigt werden, dass leukämische Blasten kostimulatorische Moleküle (z.B. CD80, CD86) nur in unzureichender Menge auf ihrer Oberfläche exprimieren und dass eine ausreichende Aktivierung der T-Zellen somit vermutlich nicht stattfinden kann [19, 51]. Die Aktivierung naiver T-Zellen erfordert zwei unabhängige Signale, die die T-Zelle von derselben APC erhalten muss: Die Bindung des spezifischen TCR und die Bindung des kostimulatorischen Rezeptors CD28. Fehlt die Kostimulation, so erhält diese T-Zelle nur ein Aktivierungssignal. Das Ausbleiben des kostimulatorischen Signals kann zu einer unzureichenden Aktivierung und damit zum Zustand der Anergie der T-Zelle führen [56]. Allison *et al.* zeigten, dass die Transfektion von kostimulatorischen Molekülen in nicht-immunogene maligne Zellen diese Zellen zu immunogenen Zellen werden ließ, die eine T-Zellantwort auslösen können [57]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Expression dieser kostimulatorischen Moleküle auch nach Ausdifferenzierung der malignen Zellen zu AML-DCs in allen der hier untersuchten Fälle deutlich hochreguliert wurde. Eine Erhöhung der Kostimulatoren lässt also auch in diesem Fall eine verbesserte Immunogenität erwarten. In der allogenen MLR waren die AML-DCs deutlich bessere Stimulatoren als die primären Blasten, die nahezu keine stimulatorische Kapazität aufwiesen. AML-DCs steigerten die Proliferation der allogenen PBMCs signifikant auch schon bei niedrigen Stimulator/Responder Ratios.

Die fehlende oder unzureichende Kostimulation durch die AML-Blasten stellt eine mögliche Erklärung der ineffizienten Immunantwort in AML Patienten dar. Die AML-DCs sind neben der typischen Morphologie (Abb.7) charakterisiert durch die Expression von kostimulatorischen Molekülen (wie z.B. CD80, CD86, CD40) und Differenzierungsantigenen maturaer dendritischer Zellen (wie z.B. CD1a, CD83; Abb.9). Auch die physiologische Funktion von DCs kann auf die *in vitro* generierten AML-DCs übertragen werden: AML-DCs sind, im Gegensatz zu den primären AML-Blasten, in der Lage, allogene mononukleäre Zellen zu stimulieren (Abb.10).

Für einen Einsatz der AML-DCs als antigenspezifische Stimulatoren für T-Zellantworten musste überprüft werden, ob sich auch aufgereinigte T-Zellsubpopulation ($CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen) von den AML-DCs stimulieren lassen. Die Experimente ergaben, dass sich sowohl T-Helferzellen als auch zytotoxische T-Zellen im allogenen System von den AML-DCs stimulieren lassen, wohingegen die

primären AML-Blasten wieder keine stimulatorische Kapazität aufweisen (Abb.13). Für einen Einsatz der AML-DCs in der Immuntherapie ist es außerdem unerlässlich, dass die Stimulation auch im autologen System funktioniert. Hierfür wurden autologe T-Zellen eingesetzt, die zum Zeitpunkt einer kompletten Remission der bekannten AML gewonnen wurden. Als Stimulatoren dienten primäre AML-Blasten und ausdifferenzierte AML-DCs desselben Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Eine deutliche Stimulation durch die AML-DCs erfolgte auch im autologen System (Abb.14).

4.1.2 Überprüfung des immunogenen und zytotoxischen Potentials der AML-DCs

Die Überprüfung der Abstammung der AML-DCs von den leukämischen Blasten stellt eine Voraussetzung für ihren Einsatz als Immunstimulatoren dar. Durch die Koexpression leukämie-assoziiierter Oberflächenmoleküle (CD33, CD13, CD34) bzw. durch den gleichzeitigen molekularen und/oder zytogenetischen Nachweis von leukämie-spezifischen chromosomalen Translokationen [58] oder Antigenen (z.B. WT-1) konnte diese Abstammung in allen Fällen gezeigt werden (Abb.5). Das Wilm's Tumor Antigen WT-1 ist in der 80% aller AML Patienten exprimiert, sowie in CD34⁺ hämatopoietischen Zellen [59]. Aufgrund dieser hohen Expressionsrate wurde dieses Gen zur Überprüfung der leukämischen Ursprungs herangezogen (Abb.11). WT-1 konnte in nahezu allen der hier untersuchten Fälle (90%) auch nach der Ausdifferenzierung identifiziert werden.

In vitro Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass es möglich ist, eine zytotoxische T-Zellantwort gegen leukämische Blasten zu induzieren [19, 51, 60]. Dabei konnten bisher verschiedene leukämie-assoziierte *Target*-Antigene, gegen die die T-Zellantwort gerichtet ist, identifiziert werden: Insbesondere entstehen durch chromosomale Abberationen (z.B. t(9;22), t(15;17)) der malignen transformierten Zellen [19] neue oder alterierte Genprodukte mit immunogenem Potential. Darüber hinaus existieren auch unabhängig von chromosomalen Veränderungen leukämie-assoziierte Antigene (LAA) wie WT-1 [59], Proteinase-3 [60], PRAME [62] und RHAMM [63], gegen die eine zytotoxische T-Zellantwort induzierbar ist [56]. Das effektive antileukämische Potential von T-Zellen zeigen darüber hinaus auch klinische Ergebnisse mit der Induktion von langanhaltenden Remissionen nach Spender-Lymphozyten Gabe bei Patienten mit Leukämie-Rezidiven nach allogener Stammzell-Transplantation [64].

AML-DCs erhalten die Expression der immunogenen LAAs auch nach der Differenzierung aufrecht und regulieren sie in manchen Fällen sogar hoch (Abb.12). Ikeda *et al.* identifizierten PRAME als Melanom-assoziiertes Tumor-Antigen, das von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden kann [65]. Die Genexpression von PRAME konnte ebenso in 35% der AML Patienten gezeigt werden [62], wohingegen keine Expression in PBMCs oder Knochenmarkszellen gesunder Spender gefunden werden konnte [66]. In dieser Arbeit wurde in 6/9 AML Patienten das LAA PRAME nachgewiesen. RHAMM (CD168) ist der Rezeptor für Hyaluronan und spielt eine wesentliche Rolle im Zellwachstum, der Differenzierung und der Motilität. Dieses Molekül ist in AML Patienten stark exprimiert, während es in PBMCs gesunder Spender nicht zu finden ist [63]. Li *et al.* konnten sogar eine Hochregulierung nach Ausdifferenzierung zu AML-DCs in 50% der Fälle mittels quantitativer realtime RT-PCR beobachten [67]. Hier konnte diese Hochregulierung in einer RT-PCR nur in 2/9 Fällen beobachtet werden, allerdings ist diese Methode auch weniger sensitiv als die quantitative Realtime RT-PCR. Proteinase-3 wird in normalen myeloischen Zellen exprimiert, ist jedoch in einigen Leukämien 2-4-fach überexprimiert [68]. Auch dieses LAA bleibt nach der Ausdifferenzierung zu AML-DCs erhalten. Die Aufrechterhaltung der Expression von LAA stellt eine notwendige Bedingung für den Einsatz von AML-DCs als Stimulatoren für AML-spezifische T-Zellantworten dar. Die AML-DCs präsentieren höchst-wahrscheinlich eine Vielzahl verschiedener und sicherlich noch unbekannter Tumorantigene auf ihrer Oberfläche, die eine zytotoxische T-Zellantwort auslösen können.

Um eine Immunantwort und nicht Toleranz zu induzieren, spielen die APCs auf denen die Tumorantigene präsentiert werden, eine kritische Rolle. In einem weiteren Schritt sollte deshalb nun überprüft werden, ob die T-Zellen sich durch die Stimulation mit AML-DCs zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren lassen, die in der Lage sind, autologe Targetzellen zu lysieren [19, 51, 58]. Dazu wurden T-Zellen mit allogenen AML-DCs kokultiviert und anschließend diese vorstimulierten T-Zellen in einem Zytotoxizitätstest gegen autologe primäre Blasten eingesetzt. Die Kokultur erhöhte dabei die Targetlyse signifikant (Abb.15). Dieses Ergebnis bedeutet, dass eine Stimulation mit AML-DCs eine zytotoxische T-Zellantwort induzieren kann. Allerdings ist bei dieser Methode bekannt, dass nicht bei allen Patienten gleichermaßen die Induktion einer leukämie-spezifischen T-Zellantwort möglich ist [19, 51]. Diskutiert werden hier die unzureichende Differenzierung zu antigenpräsentierenden,

aktivierenden Zellen oder/und der mögliche Verlust der effizienten Präsentation von endogenen LAAs während der *in vitro* Differenzierung. Nach unseren Voruntersuchungen lassen sich diese Vermutungen allerdings nicht bestätigen. Möglicherweise gehen aber auch von den *in vitro* differenzierten AML-DCs, ähnlich wie bei Leukämiezellen bereits gezeigt [69], immunsuppressive, bisher größtenteils nicht genauer identifizierte Signale aus, die eine leukämie-spezifische T-Zellantwort unterdrücken. Es ist auch nicht immer vorraussehbar, ob *in vitro* generierte immuno-therapeutischen Strategien von klinischer Effizienz sind. Die Ausdifferenzierung der malignen Zellen selbst zu APCs ermöglicht jedoch eine große Chance für immuntherapeutische Ansätze. Ein Vorteil dieser Strategie ist sicherlich, dass der Prozess der Antigenselektion und -präsentation umgangen werden kann [49]. Ein Pulsen von DCs mit z.B. Tumorlysat erhöht außerdem die Ausbildung einer nicht gewollten Autoimmunreaktion, da im Tumorlysat auch Selbstantigene, wie Nukleusproteine oder RNA, enthalten sein können [51]. AML-DCs sind daher besser geeignet, eine zytotoxische T-Zellantwort zu induzieren, als DCs, die aus normalen Vorläufern generiert und mit exogenen leukämischen Antigenen gepulst [51].

4.2 Funktionelle *in-vitro* Analyse der T-Zelldysfunktion bei AML

Immunbiologische Untersuchungen der Tumor-/ bzw. Leukämie-Wirt-Wechselbeziehungen haben gezeigt, dass nicht nur eine unzureichende Aktivierung, sondern auch sogenannte „*immune escape*“ Mechanismen sowohl die autologe antileukämische Immunantwort als auch immuno-therapeutische Behandlungsversuche negativ beeinflussen können [39]. Eine Unterdrückung der anti-Tumor T-Zellantwort ist eine Hauptursache für die Immunsuppression, die in einer Vielzahl verschiedener Krebserkrankungen vorliegt [26, 70, 71]. Das Entkommen der malignen Zellen aus der Immunüberwachung („*immune escape*“) kann verschiedene Ursachen haben: (a) eine unzureichenden Aktivierung durch fehlende Kostimulation [22], durch eine verminderte Expression von MHC-Klasse I oder II Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen [23] oder durch eine verminderte Expression von LAAs [25] (siehe 6.1.1); (b) die Sezernierung immunsuppressiver Faktoren durch die Tumorzellen [26, 27] oder (c) die Induktion aneurer [28, 29, 72] bzw. regulatorischer T-Zellen [31]. Derartige immunregulatorische Mechanismen, die zur Induktion von leukämie-spezifischer Toleranz führen können, sind bei Leukämie-Patienten bisher nicht untersucht worden.

Die Identifizierung der molekularen und zellulären Grundlagen peripherer Toleranz, die sich als selektiver Verlust an immunologischer Reaktivität gegen ein bestimmtes Antigen zeigt, ist Gegenstand aktueller Forschung: Verschiedene experimentelle Modellsysteme haben hierfür die antigen-spezifische Immunantwort in der Situation der chronischen Antigen-Stimulation untersucht [40, 41]. Periphere Toleranz in T-Zellen wird dabei nicht nur über klonale Deletion oder Ignoranz, sondern im Wesentlichen über die Induktion von Anergie erzielt. Die Ergebnisse dieser Modellsysteme sind für die immunologische Situation der Leukämie mit leukämie-spezifischer Toleranz autologer T-Zellen von besonderer Bedeutung. Es wird die Arbeitshypothese verfolgt, dass Leukämiezellen eine leukämie-spezifische periphere Toleranz der autologen T-Zellen induzieren können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die zugrundeliegenden immunregulatorischen Mechanismen identifiziert werden.

4.2.1 *in vitro* „priming“ von allogenen T-Zellen mit leukämischen Blasten

In einem ersten Experiment wurden zunächst allogene T-Zellen gesunder Spender mit primären AML-Blasten kokultiviert. Als Kontrolle dienten allogene T-Zellen, die mit PBMCs desselben Patienten in kompletter Remission kokultiviert wurden. Damit wurde der Effekt der allo-Reaktion ausgeschlossen. Dieses Experiment sollte *in vitro* die Situation in AML Patienten simulieren, in denen die T-Zellen in permanentem Kontakt mit den malignen Zellen stehen (chronische Antigenstimulation). Es konnte gezeigt werden, dass allogene T-Zellen ein vermindertes Proliferationsverhalten zeigen, wenn sie sich einige Zeit in Kontakt mit AML-Blasten befanden (Abb.8). Diese Hemmung der T-Zellen kann die Ursache in der fehlenden Kostimulation haben, die die T-Zellen in einen anergen Zustand versetzen könnte [29; siehe 6.1.1].

4.2.2 Experimente mit AML-Zellkulturüberständen

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob diese Unterdrückung der Proliferation ein zellkontakt-abhängiger Prozess ist, oder ob immunsuppressive Faktoren, die von den AML-Zellen produziert werden, eine Rolle spielen [26, 27]. Einige Publikationen dokumentieren, dass Tumorzellen Faktoren produzieren, die in der Lage sind, Zellen des Immunsystems zu inhibieren [26, 27, 73]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Zellkulturüberstände von primären AML-Zellen einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung gesunder T-Zellen nach mitogener Stimulation haben (Abb.9) und dass dieser Effekt dosisabhängig ist, wie Titrationsexperimente mit

Zellkulturüberständen nachwiesen. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von Buggins *et al.*, die einen ähnlichen Effekt mit AML-Zellkulturüberständen beobachten konnten [26]. Die löslichen Faktoren, die sich in den Zellkulturüberständen der AML-Blasten befinden, haben allerdings nicht nur inhibitorische Eigenschaften auf die Proliferation von T-Zellen, sie unterdrücken weiterhin die Produktion der T_H1 -Zytokine IL-2 und IFN- γ , die normalerweise nach T-Zellaktivierung sezerniert werden (Abb. 10). Diese beiden Zytokine werden vornehmlich von T_H1 ($CD4^+$) bzw. T_C1 ($CD8^+$)-T-Zellen produziert, die in der Lage sind, das Tumorwachstum signifikant zu verzögern [74]. Kemp *et al.* zeigen, dass die Fähigkeit, große Mengen an IFN- γ zu produzieren, einen kritischen anti-Tumor Effektormechanismus *in vivo* darstellt. Eine Zugabe von 50U/ml rhIL-2 zur Zellkultur konnte die unterdrückte Proliferation nicht umkehren, ein Effekt, der von der adaptiven Toleranz (*in vivo* Anergie) bekannt ist

Neben den beiden T_H1 -assoziierten Zytokinen IL-2 und IFN- γ , die entscheidend für die Bewältigung der CTL-vermittelten anti-Tumor Immunantwort sind, spielt noch eine zweite Gruppe von Zytokinen eine wichtige Rolle, nämlich die T_H2 -assoziierten immunmodulatorischen Zytokine wie IL-10, IL-4 oder TGF- β . Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich zu der Produktion von IL-2 und IFN- γ auf Proteinebene (Abb.18) noch die Genexpression von IL-10 mittels quantitativer Realtime RT-PCR untersucht, nachdem T-Zellen in den Zellkulturüberständen primärer AML-Blasten kultiviert worden waren. Es konnte beobachtet werden, dass IL-10 durch alle der analysierten Zellkulturüberstände hochreguliert wurde (Abb.21). Zusätzlich wurde die Produktion von IL-10 auf Proteinebene von T-Zellen mit bzw. ohne AML-Blastenkontakt mittels ELISPOT untersucht. Auch hier konnten im Vergleich eine stärkere IL-10-Produktion nach Kontakt mit AML-Blasten beobachtet werden. IL-10 ist in der Lage, die Expression der T_H1 Zytokine IL-2 und IFN- γ zu unterdrücken [75]. Es wird vornehmlich von T_R1 -Zellen und T_H3 -Zellen produziert, die zur Gruppe der induzierten regulatorischen T-Zellen zählen [10, 11]. Diese iT_{regs} sind in der Lage, anti-Tumor Immunantworten zu unterdrücken, ein weiterer Mechanismus peripherer Toleranzinduktion. Man kann also vermuten, dass die löslichen immunsuppressiven Faktoren, die von den AML-Blasten produziert werden, regulatorische T-Zellen induzieren können, die wiederum durch die Ausschüttung von IL-10 eine effektive anti-Tumor Immunantwort unterdrücken können.

Eine effektive T-Zell-vermittelte Immunantwort benötigt den Eintritt in den Zellzyklus ($G_0 \rightarrow G_1$) für die klonale Proliferation, da naive T-Zellen in der G_0 Phase

des Zellzyklus arretiert sind, bis sie aktiviert werden [76]. Die Aktivierung von T-Zellen induziert deren klonale Proliferation, Sezernierung von Zytokinen und zytotoxischen Eigenschaften [76]. Nahezu alle Formen der Anergie-Induktion haben gemeinsam, dass sie eine frühe T-Zell Aktivierung verursachen, aber zu unzureichender Proliferation führen [77]. Eine Arretierung im Zellzyklus kann also für die ineffektive T-Zellantwort verantwortlich sein. Um zu untersuchen, ob der Grund für die verminderte Proliferation und Produktion von Zytokinen ein Zellzyklus-Arrest sein könnte, wurden T-Zellen im Zellkulturüberstand der AML-Zelllinie HL-60 unter mitogener Stimulation kultiviert. Als Kontrolle wurden dieselben T-Zellen im Überstand von gesunden PBMCs kultiviert. Anschließend wurden Zellzyklusanalysen mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass der Zellkulturüberstand von AML-Zellen den Eintritt von T-Zellen in den Zellzyklus verhindert oder verlangsamt, indem sie in der G0/G1-Phase arretiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine ähnliche Inhibierung von T-Zellen durch die Überstände von Tumorzellen wie z.B. von Wang *et al.* [73] beschrieben, die eine Inhibierung von T-Zellen in Überständen von Eierstock-Tumorzellen zeigen konnte. Der beobachtete Zellzyklus-Arrest durch den Überstand der AML-Zelllinie HL-60 kann somit eine Ursache für das verminderte Proliferationsverhalten und die verminderte Sezernierung der Zytokine IL-2 und IFN- γ sein.

4.3 Differentielle Genexpressionsanalyse an CD4⁺ T-Zellen von AML-Patienten

Neue Studien konnten zeigen, dass die Umgebung des Tumors („*tumor microenvironment*“) die Signaltransduktionskaskaden in T-Zellen verändern kann [78-80]. Daher sollte in einem nächsten Schritt das Genexpressionsprofil von CD4⁺ T-Zellen aus AML Patienten mit denen gesunder Spender mittels *Microarray*-Technologie untersucht werden, um molekulare Hinweise für die ineffiziente Immunantwort zu identifizieren. Um Gene zu finden, die sich signifikant zwischen beiden Gruppen unterscheiden, selbst hergestellte (von Susanne Pfortner an der GBF designte), Oligonukleotid-*Microarrays* verwendet, die mit jeweils 350 T-Zell-spezifischen Genen gespottet sind [43]. Diese *Microarray*analyse ermöglicht die individuelle Untersuchung von Proben verschiedener Spender auf je einem Chip, sodass ein *poolen* von Proben vermieden werden konnte. Auf diese Weise konnten die Gene ermittelt werden, die statistisch signifikant in T-Zellen von AML-Patienten differentiell exprimiert werden. Es wurden 38 regulierte Gene mit einer statistisch signifikanten Expression in T-Zellen

von AML Patienten gefunden (17 hoch- und 21 herunterreguliert). Um an Hand des gewonnenen Expressionsprofils neue Erklärungsansätze für molekularbiologische Ursachen der Tumorimmunität bei AML-Patienten zu finden, wurden die Gene zunächst in funktionelle Gruppen unterteilt (Abb.27). Interessanterweise zeigten die Gene von unbehandelten AML Patienten kein Expressionsprofil natürlich vorkommender regulatorischer T-Zellen (z.B. FoxP3, PD-1, GITR). Es könnte sein, dass der prozentuale Anteil an CD25⁺ T_{reg}-Zellen innerhalb der CD4⁺ Gesamtpopulation zu klein ist, um eine signifikante Änderung im Genexpressionsprofils ausmachen zu können. Von natürlich vorkommenden T_{regs} ist jedoch bekannt, dass auch eine geringe Zellzahl durchaus die Immunregulation beeinflussen kann. Die hier durchgeführten Genexpressionsanalysen entschlüsselten eine starke Dysregulierung von Molekülen, die eine Rolle im Zellzyklus (z.B. cdk4, Id2, prothymosin a) oder bei der Apoptose (z.B. Bcl-2, Bax, GZMB) spielen. Ebenso konnten Chemokine und Chemokinrezeptoren identifiziert werden, die für die Entwicklung, die Homeostase und die Funktion des Immunsystems von Bedeutung sind.

Wie die *in vitro* Experimente gezeigt haben, besitzen T-Zellen, die in direktem oder indirektem Kontakt mit AML-Blasten gestanden haben, eine deutlich verminderte Proliferationskapazität, produzieren weniger der T_H1-Zytokine IL-2 und IFN- γ , dagegen mehr immunsuppressives Zytokin IL-10 und scheinen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretiert zu sein (vgl. 3.2). Die *Microarray*-Analysen konnten einige Gene identifizieren, die diese funktionellen Eigenschaften auf molekularer Ebene belegen. Neben den hauptsächlich stimulatorischen Signaltransduktionswegen durch CD3 ζ und CD28 besitzen T-Zellen auch einen inhibitorischen *Pathway*, der durch die Interaktion von CTLA-4 mit seinen Liganden CD80 und CD86 kontrolliert wird [81, 82]. CTLA-4 ist ein entscheidender Negativregulator von T-Zellantworten in der Peripherie und in CD4⁺ T-Zellen von AML-Patienten hochreguliert. Es ist bekannt, dass dieser Mechanismus der Herunterregulierung von Immunantworten sich vom „*activation-induced cell death*“ (AICD) oder Apoptose unterscheidet [83]. Die Bindung von CTLA-4 unterdrückt unter anderem die Akkumulation von IL-2 nach der Aktivierung naiver T-Zellen, ein Effekt, der auch in den *in vitro* Experimenten dieser Arbeit gefunden wurde (Abb.18). Eine Hochregulierung von CTLA-4 unterdrückt die Proliferation von T-Zellen, indem ihr Fortschreiten durch den Zellzyklus inhibiert wird. Es verhindert die Produktion von Cyclin D3, der cyclin-dependent Kinase-4 (cdk4) und cdk6 [84]. Diese Befunde lassen sich in den Ergebnissen dieser Arbeit ebenso finden:

CTLA-4 ist auf CD4⁺ T-Zellen von AML-Patienten hochreguliert, während cdk4 herunterreguliert ist (Abb.26). Der Eintritt in den Zellzyklus benötigt die Aktivität des cdk4/cdk6-Cyclin D-Komplexes, der sehr früh im Laufe des Zellzyklus die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (pRb) initiiert [76]. Lea *et al.* identifizierten cdk4/6-Cyclin D als einen notwendigen Komplex für den Eintritt von der G0 in die G1 Phase des Zellzyklus [76]. Eine Blockierung dieses Komplexes durch den spezifischen Inhibitor TAT-p16^{INK4A} [85] innerhalb der ersten 3-5 Stunden nach mitogener Stimulation kann die Zellen an einem Eintritt in den Zellzyklus hindern [85]. Buggins *et al.* zeigten ebenfalls, dass die Proliferation von T-Zellen durch den Zellkulturüberstand primärer AML-Zellen blockiert wird, indem die Phosphorylierung von pRb und p130 verhindert wird [26].

Als weiteres interessantes Molekül wurde prothymosin alpha (PTMA) als negativ reguliert gefunden. PTMA ist ein Onkoprotein, das spezifisch die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen gegen autologe Tumoren verstärkt [86]. Voutsas *et al.* betonen eine Rolle von PTMA bei der Verstärkung von IL-2-induzierten Antworten zytotoxischer T-Zellen gegen autologe Tumorzellen [86]. Eine Herunterregulierung könnte eine fehlende Immunantwort gegen AML-Zellen erklären. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von PTMA während der G1-Phase des Zellzyklus auftritt und dass es einen erhöhten Bedarf dieses Moleküls für den Übergang der G1- in die S-Phase oder in der S-Phase des Zellzyklus gibt [87]. Der Befund, dass PTMA in CD4⁺ T-Zellen von AML Patienten negativ reguliert ist, weist erneut auf eine Blockierung der Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus hin.

Ein weiteres Molekül, das dieses Modell unterstützt, ist ID2, ein dominant-negativer Antagonist von *basic helix-loop-helix* Transkriptionsfaktoren und Proteinen der Retinoblastoma (Rb) Familie [88]. Eine Überexpression blockiert die T-Zell-Entwicklung in verschiedenen Stadien in Mäusen [89] und inhibiert die Proliferation von NB4 Tumorzellen durch die Induktion einer G0/G1 Akkumulation [90]. Es ist bekannt, dass nach Induktion durch Myc Onkoproteine, die Inaktivierung von Rb durch ID2 erfordert [88].

In der Gruppe der Gene, die in Apoptose-Prozesse involviert sind (Tab.5), befinden sich unter anderem die reziprok regulierten Gene Bcl-2 und BAX (Bcl-2 hochreguliert; BAX herunterreguliert). Mitglieder der Bcl-2 Familie sind Schlüssel-moleküle der Apoptose, indem sie Ereignisse wie z.B. die Freisetzung von Cytochrom c regulieren, wobei Bcl-2 ein anti-apoptotisches und BAX ein pro-apoptotisches Protein sind [91]. Es

wird vermutet, dass Mitglieder der Bcl-2 Familie BAX inhibieren [92], was zu einem Schutz vor Apoptose führt. Milojkovic *et al.* vermuten ein anti-apoptotisches „*microenvironment*“ der AML-Blasten, dass das Überleben der AML-Blasten verbessert, damit aber auch die T-Zellen vor Apoptose schützt [93]. Außerdem konnte diese Gruppe finden, dass das anti-apoptotische Molekül Bcl-2 in T-Zellen während einer Kurzzeit-Kultur herunterreguliert wird, die Expression von Bcl-2 bei einer Kurzzeit-Kultur im AML-Zellkulturüberstand hingegen konstant bleibt [93]. Man kann also vermuten, dass T-Zellen aus AML-Patienten einen Apoptose-Schutz durch die Regulierung von Bcl-2 besitzen. Weiterhin könnte man spekulieren, dass in der Tumorumgebung die Unterdrückung der T-Zell Apoptose die Akkumulation aneurer T-Zellen unter Ausschluss anderer T-Zellen erlaubt.

Einer der wichtigsten zytotoxischen *Pathways* ist der granuläre Exozytose-*Pathway* [94]. Bei den *Microarray*-Analysen konnten sowohl Granzyme-B als auch Granzyme-A als hochreguliert in CD4⁺ T-Zellen von AML-Patienten identifiziert werden. Granzymes sind Serinproteasen, die in den zytoplasmatischen Granula von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen enthalten sind und unter anderem die Tumorzell-Apoptose initiieren [24]. Man kann die Hypothese aufstellen, dass die T-Zellen in AML-Patienten zwar viele Eigenschaften aktivierter Effektor-T-Zellen haben, dass sie aber funktionell inaktiv (anerg) sind. Dies zeigt, dass sich systemische Immunantworten gegen Tumorantigen oder TAAs *de novo* in Krebspatienten zwar entwickeln können, aber dass der anerge Zustand der T-Zellen die Unfähigkeit des Immunsystems erklärt, den die Tumorzellen unter Kontrolle zu bringen [95].

Chemokine sind proinflammatorische Zytokine, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Homeostase und Funktion des Immunsystems spielen. Es konnten einige Mitglieder dieser Gruppe und ihrer Rezeptoren in T-Zellen von AML-Patienten als differenziell exprimiert gefunden werden, so z.B. RANTES (hochreguliert), ein Chemokinligand, der während einer Entzündung hochreguliert wird und das Einwandern von T-Zellen in das entzündliche Gewebe vermittelt [96]. RANTES erhöht die T-Zell Chemotaxis und könnte die Anziehung von zirkulierenden AML-reaktiven T-Zellen in das AML „*microenvironment*“ vermitteln [97]. Weiterhin wurde CCR2 in T-Zellen von AML-Patienten herunterreguliert. Peters *et al.* beobachteten, dass CCR2^{-/-} Mäuse nach Immunisierung mit T_H1-induzierenden Agenzien deutlich weniger IFN- γ nach Antigen-spezifischer Stimulierung produzieren als Wildtyp-Mäuse [98]. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den *in vitro* Ergebnissen aus Abbildung 18, in

denen gezeigt wird, dass IFN- γ in T-Zellen, die im Zellkulturüberstand von AML-Blasten kultiviert wurden, auch herunterreguliert wird. Ein weiteres Chemokin mit einem veränderten Expressionsprofil ist CXCL10 (herunterreguliert in AML-Patienten). Es inhibiert die Kolonienformation des Knochenmarks, hat anti-Tumor Aktivität *in vivo* und ist ein Chemoattraktant für Monozyten und T-Zellen [99]. Dufour *et al.* haben CXCL10-defiziente Mäuse generiert, deren Splenozyten kaum auf eine Stimulation mit allogenen Zellen oder exogenen Antigenen reagieren [100]. Die Gruppe schloss daraus, dass CXCL10 eine Rolle in der Bildung und Förderung von Effektor-T-Zell-Antworten spielen [100]. Man kann vermuten, dass es eine komplexes Chemokin/Chemokinrezeptor-Netzwerk in AML-Patienten gibt.

Zuletzt soll noch ein Mitglied aus der funktionellen Gruppe der Signaltransduktionsmoleküle diskutiert werden. Txk (herunterreguliert in AML-Pateinten), eine Tyrosinkinase der Tec Familie, reguliert die Produktion von IFN- γ in TH1/Th0 Zellen [101] und moduliert die TH1/TH2 Zytokin-Balance [102]. Kashiwakura *et al.* unterdrückten Txk mit *antisense* Molekülen und erreichten dadurch eine Inhibition der IFN- γ Produktion in normalen peripheren T-Zellen. Die Gruppe folgerte daraus, das Txk die IFN- γ Transkription spezifisch hochreguliert.

4.4 Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss primärer AML-Blasten auf die Funktion gesunder T-Zellen untersucht. Weiterhin wurde ein Genexpressionsprofil von CD4⁺ T-Zellen aus AML-Patienten erstellt und mit dem gesunder Spender verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass AML-Zellen direkt über Zell-Zellkontakt, aber auch indirekt über lösliche Faktoren die Homeostase von T-Zellen beeinflussen. Primäre AML-Blasten sind in der Lage, die Proliferation und Produktion der T_H1-Zytokine IL-2 und IFN- γ zu inhibieren und die T-Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus zu arretieren. Dieser Effekt lässt sich durch die Zugabe von exogenem IL-2 nicht wieder aufheben. Weiterhin werden die T-Zellen durch den Kontakt mit AML-Blasten zur Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 angeregt. Anhand des Genexpressionsprofils von *ex vivo* CD4⁺ T-Zellen aus AML-Patienten konnten einige Schlüsselgene identifiziert werden, die die funktionellen Daten, wie Zellzyklusarrest, unterstützen (z.B. CTLA-4, cdk4).

Nimmt man alle diese Erkenntnisse zusammen, so kann die Hypothese aufgestellt werden, dass einer der Mechanismen, der zu einer ineffektiven anti-Tumor

Immunantwort in AML-Patienten führt, die Induktion einer adaptiven Toleranz (*in vivo* Anergie) der T-Zellen ist. Die adaptive Toleranz ist charakterisiert durch einen Block der Proliferation, der IL-2 und IFN- γ Produktion, sowie aller anderen Zytokine außer IL-10, das von anergen T-Zellen produziert wird [77]. Weiterhin wird für die adaptive Toleranz die chronische Antigenstimulation benötigt, und sie lässt sich durch exogenes IL-2 nicht wieder aufheben [77]. Diese Blockierung des IL-2 Rezeptor-*Signalings* scheint weiterhin mit dem CTLA-4 *Signaling* assoziiert zu sein [103]. Perez *et al.* waren die ersten, die zeigen konnten, dass eine Blockierung von CTLA-4 *in vivo* die adaptive Toleranz verhindert [104]. Desweiteren liefert die hier vorliegende Arbeit Hinweise für eine *bystander suppression*. Roncarolo *et al.* konnten zeigen, dass naive CD4⁺ T-Zellen in einen anergen Zustand versetzt werden konnten, wenn sie in ihrem Umfeld IL-10 ausgesetzt waren [105]. Diese T-Zellen waren charakterisiert durch eine verminderte Proliferationskapazität, sowie IL-2, IFN- γ und IL-4 Produktion, sie produzierten aber große Mengen an IL-10 und ein wenig TGF- β . Die Zellen exprimierten kein CD25 nach Reaktivierung, und IL-2 konnte das anerge Stadium nicht aufheben. Durch die Produktion von IL-10 können diese anergen (oder T_R1) T-Zellen andere T-Zellen über einen Zytokin-vermittelten Prozess unterdrücken [105].

Wie in der Einleitung beschrieben wird die adaptive Toleranz durch eine unvollständige Aktivierung mit fehlender Kostimulation hervorgerufen. Die Ergebnisse im ersten Teil dieser Arbeit, in denen gezeigt werden konnte, dass primäre AML-Blasten nahezu keine kostimulatorischen Moleküle produzieren, sowie die Tatsache, dass in AML-Patienten eine chronische Antigenstimulation vorliegt, unterstützen ebenso die Hypothese. Die Induktion der adaptiven Toleranz durch die AML-Blasten könnte also zu einem anergen Zustand der T-Zellen (T_R1-Zellen) führen, die wiederum über den Mechanismus der *bystander suppression* zusätzlich noch vorhandene Tumorspezifische T-Zellen in ihrer Funktion unterdrücken könnten.

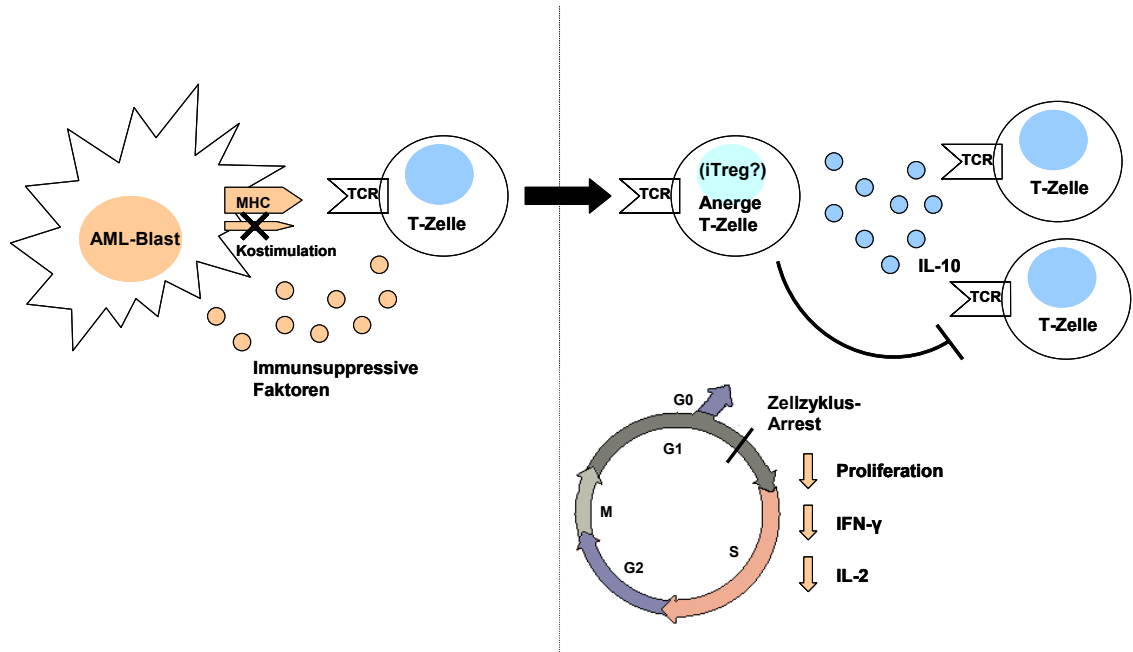


Abbildung 30: Hypothese für die Immundysregulation bei Patienten mit AML. MHC = Haupthistokompatibilitäts-Komplex; TCR = T-Zell-Rezeptor; iTreg = induzierte regulatorische T-Zelle; S = Synthesephase im Zellzyklus; G2 = Gap2-Phase im Zellzyklus; M = Mitosephase im Zellzyklus; G1 = Gap1-Phase im Zellzyklus; G0 = Phase in der sich Zellen nicht mehr teilen.

4.5 Ausblick und klinische Relevanz

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Komplexität der Immundysregulation in AML-Patienten. Die Charakterisierung der Tumor-induzierten Immunsuppression in AML-Patienten könnte für ein besseres Verständnis des Krankheitsbildes beitragen und helfen, neue immuntherapeutische Behandlungskonzepte zu finden, da unser Immunsystem ein großes Potential darstellt, Krebserkrankungen zu bekämpfen.

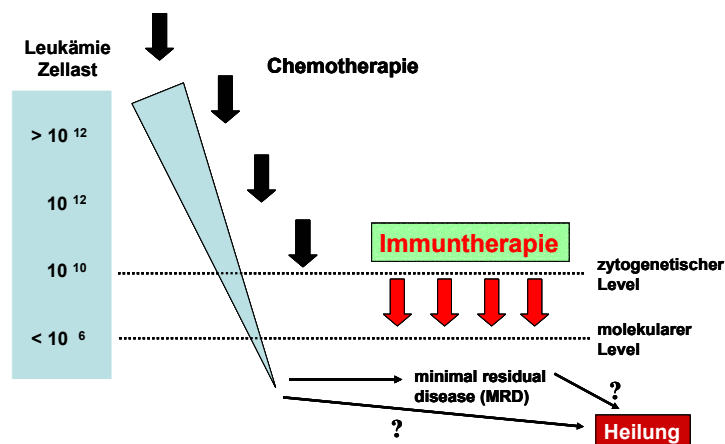


Abbildung 31: Immuntherapie bei AML.

So könnte eine Spätkonsolidierung mit Zytokinen, z.B. IL-2, in Betracht kommen, um eine Proliferation der T-Zellen zu bewirken. Diese Therapieoption wurde bereits durchgeführt, jedoch ohne Erfolg. Die *in vitro* Experimente in dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass es sich bei den anergen T-Zellen aus AML-Patienten um eine Anergieform handelt, die IL-2 irreversibel ist (Abb. 20). Vielversprechender für eine Therapie wäre eher die Gabe von AML-DC-geprägten T-Zellen im Rahmen der allogenen Knochenmarkstransplantation (*donor lymphocyte infusion* (DLI)) oder die Gabe von bestrahlten autologen AML-DCs direkt, um bei einer *minimal residual disease* (MRD) das Immunsystem in die Lage zu bringen, ein Rezidiv zu verhindern (Abb.31). Ziel könnte sein, über eine gezielte Manipulation der AML-Blasten oder der T-Zellen die systemische Immunantwort therapeutisch nutzbar zu machen.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag 2002; 5. Auflage
- [2] Rocha B, von Boehmer H: Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 1991; 251: 1225–1228.
- [3] Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM and Shevach EM: CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998; 160: 1212–1218.
- [4] Steinbrink K, Knop J: Bedeutung der immunologischen Toleranz in der Dermatologie. *Hautarzt* 2003; 54:45-52.
- [5] Lechner O, Lauber J, Franzke A, Sarukhan A, von Boehmer H, Buer J: Fingerprints of anergic T cells. *Curr Biol* 2001; 11(8):587-595.
- [6] Lechler R, Chai JG, Marelli-Berg F, Lombardi G: T-cell anergy and peripheral T-cell tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356(1409):625-637.
- [7] Taams LS, Wauben MH: Anergic T cells as active regulators of the immune response. *Hum Immunol* 2000; 61(7):633-639.
- [8] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3):1151-1164.
- [9] Shevach EM: CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2002 Jun;2(6):389-400.
- [10] Weiner HL: Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:207-214.
- [11] Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG: IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001; 166(9):5530-5539.
- [12] Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G: Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T-cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193:1303-1310.
- [13] Burnet M: Immunological factors in the process of carcinogenesis. *Br Med Bull* 1964; 20:154-158.

- [14] Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD: IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410(6832):1107-1111.
- [15] Houghton AN, Gold JS, Blachere NE: Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol.* 2001 Apr;13(2):134-140.
- [16] Fernandez Madrid F, Tang N, Alansari H, Karvonen RL, Tomkiel JE: Improved approach to identify cancer-associated autoantigens. *Autoimmun Rev* 2005; 4(4):230-235.
- [17] Strausberg RL: Tumor microenvironments, the immune system and cancer survival. *Genome Biol.* 2005; 6(3):211.
- [18] Stutman O: Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst* 1979; 62(2):353-358.
- [19] Harrison BD, Adams JA, Briggs M, Brereton ML, Yin JA: Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97(9):2764-2771.
- [20] Pittet MJ, Valmori D, Dunbar PR, Speiser DE, Lienard D, Lejeune F, Fleischhauer K, Cerundolo V, Cerottini JC, Romero P: High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J Exp Med* 1999; 190(5):705-715.
- [21] Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, Mortarini R, Arancia G, Anichini A, Fais S, Parmiani G: Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 2002; 188:97-113.
- [22] Zheng Z, Takahashi M, Aoki S, Toba K, Liu A, Osman Y, Takahashi H, Tsukada N, Suzuki N, Nikkuni K, Furukawa T, Koike T, Aizawa Y: Expression patterns of costimulatory molecules on cells derived from human hematological malignancies. *J Exp Clin Cancer Res* 1998; 17(3):251-258.
- [23] Jager E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, Arand M, Karbach J, Jager D, Oesch F, Knuth A: Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer.* 1997 Apr 10;71(2):142-147.

- [24] Marinov I, Koubek K, Stary J: Lack of expression of adhesion molecules on leukemic cells: possible pathogenetic factor in blood malignancies. *Neoplasma* 1994; 41(3):141-143.
- [25] Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A: Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer*. 1996 May 16;66(4):470-476.
- [26] Buggins AG, Milojkovic D, Arno MJ, Lea NC, Mufti GJ, Thomas NS, Hirst WJ: Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF-kappaB, c-Myc, and pRb pathways. *J Immunol* 2001; 167(10):6021-6030.
- [27] Orleans-Lindsay JK, Barber LD, Prentice HG, Lowdell MW: Acute myeloid leukaemia cells secrete a soluble factor that inhibits T and NK cell proliferation but not cytolytic function--implications for the adoptive immunotherapy of leukaemia. *Clin Exp Immunol* 2001; 126(3):403-411.
- [28] Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen PM: Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 1993; 363(6425):156-159.
- [29] Narita M, Takahashi M, Liu A, Nikkuni K, Furukawa T, Toba K, Koyama S, Takai K, Sanada M, Aizawa Y: Leukemia blast-induced T-cell anergy demonstrated by leukemia-derived dendritic cells in acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 2001; 29(6):709-719.
- [30] Willimsky G, Blankenstein T: Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature*. 2005 Sep 1;437(7055):141-146.
- [31] Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, Palmer DC, Chan CC, Klebanoff CA, Overwijk WW, Rosenberg SA, Restifo NP: CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 2005; 174(5):2591-2601.
- [32] Mapara MY, Sykes M: Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol* 2004; 22(6):1136-1151.
- [33] Ryan AE, Shanahan F, O'Connell J, Houston AM: Addressing the "Fas counterattack" controversy: blocking fas ligand expression suppresses tumor immune evasion of colon cancer in vivo. *Cancer Res* 2005; 65(21):9817-9823.

- [34] Igney FH, Behrens CK, Krammer PH: CD95L mediates tumor counterattack in vitro but induces neutrophil-independent tumor rejection in vivo. *Int J Cancer* 2005; 113(1):78-87.
- [35] Manual: Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München.
- [36] Mitrou PS, Länger F: Atlas der Hämatologie und Hämatologischen Onkologie. Mitrou & Länger GbR, Frankfurt a. M.
- [37] Kompetenznetz Leukämie: www.kompetenznetz-leukaemie.de
- [38] Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE: Acute myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2001; 62-86.
- [39] Garcia-Lora A, Algarra I, Collado A, Garrido F: Tumour immunology, vaccination and escape strategies. *Eur J Immunogenet* 2003; 30(3):177-183.
- [40] M Mohty, D Olive, B Gaugler: Leukemic dendritic cells: potential for therapy and insights towards immune escape by leukemic blasts. *Leukemia* 2002; 16:2197-2204.
- [41] Buer J, Lanoue A, Franzke A, Garcia C, von Boehmer H, Sarukhan A: Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *J Exp Med* 1998; 187(2):177-183.
- [42] Tanchot C, Guillaume S, Delon J, Bourgeois C, Franzke A, Sarukhan A, Trautmann A, Rocha B: Modifications of CD8+ T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity* 1998; 8(5):581-590.
- [43] Pfoertner S, Jeron A, Probst-Kepper M, Guzman CA, Hansen W, Toepfer T, Schrader A, Franzke A, Buer J, Geffers R: Signatures of human regulatory T cells: An encounter with old friends and new players. Eingereicht im Februar 2006 bei "Genome Biology".
- [44] Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(9):5116-21.
- [45] Quackenbush J: Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* 2001; 2(6):418-427.
- [46] Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G: Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180(1):83-93.

- [47] Falkenburg JH, Smit WM, Willemze R: Cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses against acute or chronic myeloid leukemia. *Immunol Rev* 1997; 157:223-230.
- [48] Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-252.
- [49] Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM: Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992; 176(6):1693-1702.
- [50] Zhou LJ, Tedder TF: CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(6):2588-2592.
- [51] Choudhury BA, Liang JC, Thomas EK, Flores-Romo L, Xie QS, Agusala K, Sutaria S, Sinha I, Champlin RE, Claxton DF: Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood* 1999; 93(3):780-786.
- [52] Robinson SP, English N, Jaju R, Kearney L, Knight SC, Reid CD: The in-vitro generation of dendritic cells from blast cells in acute leukaemia. *Br J Haematol* 1998; 103(3):763-771.
- [53] Banchereau J, Palucka AK: Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(4):296-306.
- [54] Jansen JH, Wientjens GJ, Fibbe WE, Willemze R, Kluin-Nelemans HC: Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. *J Exp Med* 1989; 170(2):577-582.
- [55] Sallusto F, Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179(4):1109-1118.
- [56] Lechner O, Lauber J, Franzke A, Sarukhan A, von Boehmer H, Buer J: Fingerprints of anergic T cells. *Curr Biol* 2001; 11(8):587-595.
- [57] Allison JP, Hurwitz AA, Leach DR: Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses. *Curr Opin Immunol* 1995; 7(5):682-686.
- [58] Choudhury A, Toubert A, Sutaria S, Charron D, Champlin RE, Claxton DF: Human leukemia-derived dendritic cells: ex-vivo development of specific antileukemic cytotoxicity. *Crit Rev Immunol* 1998; 18(1-2):121-131.

- [59] Maurer U, Weidmann E, Karakas T, Hoelzer D, Bergmann L: Wilms tumor gene (wt1) mRNA is equally expressed in blast cells from acute myeloid leukemia and normal CD34⁺ progenitors. *Blood* 1997; 90(10):4230-4232.
- [60] Scheibenbogen C, Letsch A, Thiel E, Schmitt A, Mailaender V, Baerwolf S, Nagorsen D, Keilholz U: CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 100(6):2132-2137.
- [61] Lowenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341(14):1051-1062.
- [62] Matsushita M, Yamazaki R, Ikeda H, Kawakami Y: Preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) in the development of diagnostic and therapeutic methods for hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(3):439-444.
- [63] Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Schmitt A, Kirchner D, Krahn G, Heilmann V, Gschwend J, Bergmann L, Dohner H, Schmitt M: Receptor for hyaluronan acid-mediated motility (RHAMM) is a new immunogenic leukemia-associated antigen in acute and chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2002; 30(9):1029-1035.
- [64] Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Cross NC, Kaeda J, Chase A, Olavarria E, van Rhee F, Kanfer E, Apperley JF, Goldman JM: Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95(1):67-71.
- [65] Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T, Coulie PG: Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 1997; 6(2):199-208.
- [66] Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Hauser T, Schmitt A, Dohner H, Schmitt M: Characterization of several leukemia-associated antigens inducing humoral immune responses in acute and chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 2003; 106(2):224-231.
- [67] Li L, Reinhardt P, Schmitt A, Barth TF, Greiner J, Ringhoffer M, Dohner H, Wiesneth M, Schmitt M: Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54(7):685-693.

- [68] Dengler R, Munstermann U, al-Batran S, Hausner I, Faderl S, Nerl C, Emmerich B: Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells. *Br J Haematol* 1995; 89(2):250-257.
- [69] Mohty M, Olive D, Gaugler B: Leukemic dendritic cells: potential for therapy and insights towards immune escape by leukemic blasts. *Leukemia* 2002; 16(11):2197-2204.
- [70] Yoshino I, Yano T, Murata M, Ishida T, Sugimachi K, Kimura G, Nomoto K: Tumor-reactive T-cells accumulate in lung cancer tissues but fail to respond due to tumor cell-derived factor. *Cancer Res* 1992; 52(4):775-781.
- [71] Alexander JP, Kudoh S, Melsop KA, Hamilton TA, Edinger MG, Tubbs RR, Sica D, Tuason L, Klein E, Bukowski RM, et al: T-cells infiltrating renal cell carcinoma display a poor proliferative response even though they can produce interleukin 2 and express interleukin 2 receptors. *Cancer Res* 1993; 53(6):1380-1387.
- [72] Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM: Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(14):6586-6590.
- [73] Wang H, Xie X, Lu WG, Ye DF, Chen HZ, Li X, Chen Q: Ovarian carcinoma cells inhibit T cell proliferation: suppression of IL-2 receptor β and γ expression and their JAK-STAT signaling pathway. *Life Sci.* 2004; 74 (14): 1739-1749.
- [74] Kemp RA, Ronchese F: Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol* 2001; 167(11):6497-6502.
- [75] Moore KW, O'Garra A, Malefyt RW, Vieira P, Mosmann TR: Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:165.
- [76] Lea NC, Orr SJ, Stoeber K, Williams GH, Lam EW, Ibrahim MA, Mufti GJ, Thomas NS: Commitment point during G0→G1 that controls entry into the cell cycle. *Mol Cell Biol* 2003; 23(7):2351-2361.
- [77] Schwartz RH: T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:305-334.
- [78] Kolenko V, Wang Q, Riedy MC, O'Shea J, Ritz J, Cathcart MK, Rayman P, Tubbs R, Edinger M, Novick A, Bukowski R, Finke J: Tumor-induced suppression of T lymphocyte proliferation coincides with inhibition of Jak3 expression and IL-2 receptor signaling: role of soluble products from human renal cell carcinomas. *J Immunol* 1997; 159(6):3057-3067.

- [79] Lockhart DC, Chan AK, Mak S, Joo HG, Daust HA, Carritte A, Douville CC, Goedegebuure PS, Eberlein TJ: Loss of T-cell receptor-CD3zeta and T-cell function in tumor-infiltrating lymphocytes but not in tumor-associated lymphocytes in ovarian carcinoma. *Surgery* 2001; 129(6):749-756.
- [80] Mizoguchi H, O'Shea JJ, Longo DL, Loeffler CM, McVicar DW, Ochoa AC: Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 1992; 258(5089):1795-1798.
- [81] Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW: Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl-4. *Science* 1995;v270(5238):985-988.
- [82] Krummel MF, Allison JP: CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 1996; 183(6):2533-2540.
- [83] Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP: CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:565-594.
- [84] Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP: CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol* 1999; 162(10):5813-5820.
- [85] Gius DR, Ezhevsky SA, Becker-Hapak M, Nagahara H, Wei MC, Dowdy SF: Transduced p16INK4a peptides inhibit hypophosphorylation of the retinoblastoma protein and cell cycle progression prior to activation of Cdk2 complexes in late G1. *Cancer Res* 1999; 59(11):2577-2580.
- [86] Voutsas IF, Baxevas CN, Gritzapis AD, Missitzis I, Stathopoulos GP, Archodakis G, Banis C, Voelter W, Papamichail M: Synergy between interleukin-2 and prothymosin alpha for the increased generation of cytotoxic T lymphocytes against autologous human carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49(8):449-458.
- [87] Szabo P, Ehleiter D, Whittington E, Weksler ME: Prothymosin alpha expression occurs during G1 in proliferating B or T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185(3):953-959.
- [88] Lasorella A, Nosedà M, Beyna M, Yokota Y, Iavarone A: Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* 2000; 407(6804):592-598.

- [89] Morrow MA, Mayer EW, Perez CA, Adlam M, Siu G: Overexpression of the Helix-Loop-Helix protein Id2 blocks T cell development at multiple stages. *Mol Immunol* 1999; 36(8):491-503.
- [90] Nigten J, Breems-de Ridder MC, Erpelinck-Verschueren CA, Nikoloski G, van der Reijden BA, van Wageningen S, van Hennik PB, de Witte T, Lowenberg B, Jansen JH: ID1 and ID2 are retinoic acid responsive genes and induce a G0/G1 accumulation in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia* 2005; 19(5):799-805.
- [91] Thomenius MJ, Wang NS, Reineks EZ, Wang Z, Distelhorst CW: Bcl-2 on the endoplasmic reticulum regulates Bax activity by binding to BH3-only proteins. *J Biol Chem* 2003; 278(8):6243-6250.
- [92] Cheng EH, Levine B, Boise LH, Thompson CB, Hardwick JM: Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 1996; 379(6565):554-556.
- [93] Milojkovic D, Devereux S, Westwood NB, Mufti GJ, Thomas NS, Buggins AG: Antiapoptotic microenvironment of acute myeloid leukemia. *J Immunol* 2004; 173(11):6745-6752.
- [94] Russell JH, Ley TJ: Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:323-370.
- [95] Appleman LJ, Tzachanis D, Grader-Beck T, van Puijenbroek AA, Boussiotis VA: Helper T cell anergy: from biochemistry to cancer pathophysiology and therapeutics. *J Mol Med* 2001; 78(12):673-683.
- [96] Hildebrandt GC, Olkiewicz KM, Choi S, Corrion LA, Clouthier SG, Liu C, Serody JS, Cooke KR: Donor T-cell production of RANTES significantly contributes to the development of idiopathic pneumonia syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2005; 105(6):2249-2257.
- [97] Olsnes AM, Motorin D, Rynningen A, Zaritskey AY, Bruserud O: T lymphocyte chemotactic chemokines in acute myelogenous leukemia (AML): local release by native human AML blasts and systemic levels of CXCL10 (IP-10), CCL5 (RANTES) and CCL17 (TARC). *Cancer Immunol Immunother* 2005;1-11.
- [98] Peters W, Dupuis M, Charo IF: A mechanism for the impaired IFN-gamma production in C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout mice: role of CCR2 in linking the innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 2000; 165(12):7072-7077.

- [99] Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G: Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 1995; 182(1):155-162.
- [100] Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD: IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 2002; 168(7):3195-3204.
- [101] Kashiwakura J, Suzuki N, Nagafuchi H, Takeno M, Takeba Y, Shimoyama Y, Sakane T: Txk, a nonreceptor tyrosine kinase of the Tec family, is expressed in T helper type 1 cells and regulates interferon gamma production in human T lymphocytes. *J Exp Med* 1999; 190(8):1147-1154.
- [102] Takeno M, Yoshikawa H, Kurokawa M, Takeba Y, Kashiwakura JI, Sakaguchi M, Yasueda H, Suzuki N: Th1-dominant shift of T cell cytokine production, and subsequent reduction of serum immunoglobulin E response by administration in vivo of plasmid expressing Txk/Rlk, a member of Tec family tyrosine kinases, in a mouse model. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(6):965-970.
- [103] Wells AD, Walsh MC, Bluestone JA, Turka LA: Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy. *J Clin Invest* 2001; 108(6):895-903.
- [104] Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK: Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 1997; 6(4):411-417.
- [105] Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK: Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:68-79.

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	<u>A</u> cet <u>a</u> t
AML	<u>a</u> kute <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie
AML-DC	ausdifferenzierte AML-Zelle mit „dendriten-ähnlichem“ Phänotyp
APC	<u>A</u> ntigen <u>P</u> resenting <u>C</u> ell (Antigen-präsentierende Zelle)
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
cDNA	<u>c</u> omplementary DNA (komplementäre DNA)
cRNA	<u>c</u> omplementary RNA (komplementäre RNA)
Ci	Curie
CTL	<u>C</u> ytotoxic <u>T</u> - <u>L</u> ymphocytes (zytotoxische T-Lymphozyten)
cpm	<u>c</u> ounts per <u>m</u> inute
DC	<u>D</u> endritic <u>C</u> ell (dendritische Zelle)
EDTA	<u>E</u> thylene <u>D</u> iamine <u>T</u> etraacetic <u>A</u> cid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EtOH	Ethanol
FACS	<u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting
FCS	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum (Fötale Kälber-Serum)
FITC	<u>F</u> luorescein- <u>I</u> s <u>o</u> thiocyanat
IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> er <u>o</u> n
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
iT _{reg}	induzierte regulatorische T-Zellen
kg	<u>K</u> ilogramm
LPA	<u>l</u> ineares <u>P</u> olyac <u>yl</u> amid
M	mol/l (molar)
MACS	<u>M</u> agnetic <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting
MHC	<u>M</u> ajor <u>H</u> isto- <u>C</u> ompartibility Comlex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	<u>M</u> inuten
mM	10 ⁻³ mol/l (millimolar)
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
m	milli-
μ	mikro-
n	nano-
PBMCs	<u>P</u> eripheral <u>B</u> lood <u>M</u> ononuclear <u>C</u> ells (periphere mononucleäre Zellen)
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer <u>S</u> olution
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
p	piko-
rpm	<u>r</u> ounds per <u>m</u> inute (Umdrehungen pro Minute)

SSC	<u>S</u> aline <u>S</u> odium <u>C</u> itrate Buffer
TCR	<u>T</u> - <u>C</u> ell <u>R</u> eceptor (T-Zellrezeptor)
TE	<u>T</u> ris / <u>E</u> DTA
T _{H1}	inflammatorische T-Zellen
T _{H2}	T-Helferzellen
T _{reg}	<u>r</u> egulatorische <u>T</u> -Zellen
U	<u>U</u> nit
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 : Interaktion von DCs mit T-Zellen	4
Abb. 2 : Periphere Toleranzmechanismen	5
Abb. 3 : Einteilung der AML nach der FAB-Klassifikation.....	10
Abb. 4 : Mögliche „ <i>immune escape</i> “ Mechanismen der AML-Blasten	11
Abb. 5 : Spotting-Muster des <i>Human T_{Reg} Chip</i>	25
Abb. 6 : Überprüfung der generierten AML-DCs	32
Abb. 7 : Morphologische Überprüfung der Differenzierung zu AML-DCs.....	40
Abb. 8 : FACS-Analyse zur Überprüfung der Differenzierung zu AML-DCs	41
Abb. 9 : FACS-Analyse der Dendritenmarker und Kostimulatoren.....	42
Abb. 10: „ <i>Mixed lymphocyte reaction</i> “ (MLR)	42
Abb. 11: Überprüfung des leukämischen Ursprungs der AML-DCs	43
Abb. 12: RT-PCR auf die LAAs RHAMM, Proteinase-3 und PRAME	44
Abb. 13: Allogene MLR mit T-Zellsubpopulationen	45
Abb. 14: Autologe MLR mit CD3 ⁺ T-Zellen.....	45
Abb. 15: Zytotoxische Aktivität nach „ <i>priming</i> “ mit AML-DCs.....	46
Abb. 16: MLR nach <i>in vitro</i> „ <i>priming</i> “ mit AML-Blasten	48
Abb. 17: Proliferationstest von T-Zellen in verschiedenen Zellkulturüberständen.....	49
Abb. 18: Intrazelluläre FACS-Analyse der T _H 1-Zytokine IL-2 und IFN- γ	50
Abb. 19: Dosisabhängige Untersuchung der Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen in HL-60 Zellkulturüberständen.....	51
Abb. 20: Untersuchung zur IL-2 Reversibilität	51
Abb. 21: Zellzyklusanalysen.....	52
Abb. 22: Realtime RT-PCR auf IL-10	53
Abb. 23: ELISPOT zur Überprüfung der IL-10 Produktion.....	53
Abb. 24: Darstellung der zu sortierenden CD4 ⁺ T-Zellen	55
Abb. 25: Agilent-Analyse fragmentierter, biotinylierter cRNA-Sonden.....	55
Abb. 26: Bilder des <i>Human T_{Reg} Microarrays</i>	56
Abb. 27: Hierarchische Clusteranalyse.....	57
Abb. 28: Einteilung der differenziell exprimierten Gene in funktionelle Gruppen.....	58
Abb. 29: Quantitative realtime RT-PCR.....	60
Abb. 30: Hypothese für die Immundysregulation bei Patienten mit AML	74
Abb. 31: Immuntherapie bei AML	76

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab.1 : Patientencharakteristika.....	14
Tab.2 : Primer für die Realtime RT-PCR	19
Tab.3 : Verwendete Oberflächen-Antikörper	37
Tab.4 : Zusammenstellung der analysierten Probanden	54
Tab.5 : Beschreibung der differentiell exprimierten Gene	58

6.4 Publikationen

Originalpublikationen

Westendorf AM, Gunzer F, Deppenmeier S, Tapadar D, **Hunger JK**, Schmidt MA, Buer J, Bruder D: *Intestinal immunity of Escherichia coli NISSLE 1917: a safe carrier for therapeutic molecules*. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 43(3):373-84.

Franzke A, **Hunger JK**, Dittmar K, Ganser A, Buer J: *Regulatory T-cells in the control of immunological diseases. Comprehensive Review*. Angenommen bei "Annals of Hematology" im März 2006

Franzke A, Koenecke C, Piao W, Geffers R, **Hunger JK**, Ganser A, Buer J: *Classical Hodgkin's Lymphoma: Molecular evidence for specific alterations of circulating T lymphocytes*. Angenommen bei "Tumor Biology" im März 2006

Hunger JK, Pfoertner S, Piao W, Geffers R, Grosse J, Ganser A, Buer J, Franzke A: *Identification of novel regulators in T-cell differentiation of aplastic anemia patients*. Eingereicht im März 2006

Abstraktpublikationen

Hunger JK, Pfoertner S, Piao W, Geffers R, Ganser A, Buer J, Franzke A: *Molecular evidence for an autoimmune process in acquired aplastic anemia*. Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO). Hannover, 2005

Pfoertner S, **Hunger JK**, Piao W, Grosse J, Klempnauer J, Ganser A, Buer J, Franzke A: *Molecular profiling of mucosal T lymphocytes in graft-versus-host disease of the gut*. Vortrag bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO). Hannover, 2005

Hunger JK, Pfoertner S, Ivanyi P, Krauter J, Ganser A, Buer J, Franzke A: *Regulation of T cell homeostasis and cell cycling in patients with acute myeloid leukemia*. Posterpräsentation bei der Jahrestagung der "American Society of Hematology" (ASH). Atlanta, USA, 2005

Koenecke C, Geffers R, Piao W, **Hunger JK**, Ganser A, Buer J, Franzke A: *Immudysregulatory events in Hodgkin's disease*. Posterpräsentation bei der Jahrestagung der "American Society of Hematology" (ASH). Atlanta, USA, 2005

6.5 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Jane Katrin Hunger
Anschrift: Teichmüllerstr. 17
38114 Braunschweig
Geburtsdaten: 24.09.1978 in Wolfenbüttel
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1985 - 1989 Grundschule Cranachstrasse in Wolfenbüttel
1989 - 1991 Orientierungsstufe Cranachstrasse in Wolfenbüttel
1991 - 1998 Gymnasium Grosse Schule in Wolfenbüttel
23.06.1998 Allgemeine Hochschulreife (gut)

Studium

1998 - 2003 **Technische Universität Carolo Wilhelmina zu Braunschweig;**
Studium der Biologie
20.09.2000 Vordiplom (sehr gut)
15.05.2003 Diplom (sehr gut)

09/2002 - 04/2003 **Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF)** in
Braunschweig; Abteilung Zell- und Immunbiologie (Prof.
Wehland); Arbeitsgruppe Mukosale Immunität (Prof. Buer)
Diplomarbeit zum Thema:
„Funktionelle Genomanalyse regulatorischer T-Zellen“

Promotion

seit 09/2003 **Medizinische Hochschule Hannover**, Abteilung Hämatologie,
Hämostaseologie und Onkologie (Prof. Ganser), Arbeitsgruppe von
PD Dr. Franzke
Dissertation zum Thema:
*„Analyse der Immundysregulation bei Patienten mit akuter
myeloischer Leukämie“*

6.6 Danksagung

Bei Herrn Prof. Walter Müller möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung des Promotionsverfahrens an der Universität Hannover und die Übernahme des Hauptreferats, sowie für die Durchsicht des Manuskripts bedanken. Es war sehr hilfreich, ihn als kompetenten Berater an der Seite zu haben.

Prof. Helmut Holtmann danke für die Übernahme des Korreferates.

Ich danke Frau PD Dr. Anke Franzke für die interessante Aufgabenstellung und die engagierte theoretische und praktische Betreuung, sowie ihre ständige Gesprächsbereitschaft, die wichtig für das Gelingen dieser Arbeit waren.

Prof. Arnold Ganser danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können, sowie für die Durchsicht des Manuskripts.

Besonders möchte ich mich bei Susanne Pfortner für die hervorragende Zusammenarbeit und Hilfe bei dieser Arbeit, sowie für ihre Freundschaft bedanken.

Jens Grosse, Philipp Ivanyi und Wenji Piao danke ich für die gute Stimmung im Labor, so manche Kaffeepause, für gute Ratschläge und für viele nützliche Tipps, ihre Unterstützung in schwierigen Situationen, sowie für die Tatsache, jeden Tag gern ins Labor gekommen zu sein.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern der Abteilung Hämatologie der Medizinischen Hochschule Hannover für ihre Zusammenarbeit und Hilfe bei alltäglichen Laborproblemen, sowie für die Kontakte in die Klinik. Besonderer Dank gilt hierbei der gesamten Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Eva Mischak-Weissinger.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der GBF Braunschweig für die Unterstützung und Ermöglichung der Raumnutzung im Array-Labor. Besonders möchte ich mich hierbei bei Prof. Jan Buer bedanken, der durch seine Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat und immer ein guter Ansprechpartner für mich war.

Dank gilt auch Marc Sommerfeld, meiner Familie und meinen Freunden, die stets hinter mir stehen und mich unterstützen, wo sie nur können.

Allen Spendern die mit der Überlassung einer kleinen Menge ihres Blutes diese Dissertation erst ermöglichten sei ein besonderer Dank ausgesprochen.

6.7 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation „*Analyse der Immundysregulation bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie*“ selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie zu Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe.

Diese Dissertation wurde nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Braunschweig, den 31. Juli 2006

Dipl.-Biol. Jane Katrin Hunger