

**Etablierung eines *in vitro* Testsystems zur
Vorhersage von
Graft-versus-Leukämie (GvL) – Effekten
in Patienten
mit akuter myeloischer Leukämie**

Sabine Elisabeth Kaiser
2005

Aus der Klinischen Kooperationsgruppe Hämatopoetische Zelltransplantation
der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
und
der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

unter der Leitung von
Professor Dr. med. Hans-Jochem Kolb

Vorgelegt über die
Medizinische Kleintierklinik
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Katrin Hartmann)

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Johannes Hirschberger

**Etablierung eines *in vitro* Testsystems zur
Vorhersage von
Graft-versus-Leukämie (GvL) – Effekten
in Patienten
mit akuter myeloischer Leukämie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Sabine Elisabeth Kaiser
aus
München

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. H. Kaltner

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Diese Arbeit widme ich
allen Patienten, ihren Angehörigen
und
meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Das blutbildende System	3
2.2 Die akute myeloische Leukämie	5
2.2.1 Definition und Epidemiologie	5
2.2.2 Das Krankheitsbild	6
2.2.3 Ätiologie	7
2.2.4 Pathogenese	8
2.2.5 Diagnostik und Klassifikation	9
2.2.6 Prognosefaktoren	11
2.2.7 Therapiemöglichkeiten	12
2.3 Der Graft-versus-Leukämie- (GvL) Effekt	15
3. Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Geräte	18
3.1.2 Verbrauchsmaterial	19
3.1.3 Chemikalien	19
3.1.4 Zellkulturmedien und Reagenzien	20
3.1.5 Zytokine	20
3.1.6 Antikörper (Maus anti Human) für FACS-Analysen	21
3.1.7 Microbeads für die MACS-Separation	22
3.1.8 Zellmaterial	22
3.2 Methoden	23
3.2.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen	23
3.2.2 Zellzahlbestimmung	23
3.2.3 Kryokonservierung von Zellen	24
3.2.4 Auftauen von Zellen	24

3.2.5 Magnetische Zellseparation(MACS)	25
3.2.6 Zellanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS)	27
3.2.7 Blasten-Proliferationsassay	28
3.2.8 Blasten-Inhibitionassay (Delta-Assay)	29
3.2.9 Generierung von Dendritischen Zellen (DC) aus AML Blasten	29
3.2.10 Stimulation von CD3+Spenderzellen mittels DC aus AML-Blasten	30
4. Ergebnisse	31
4.1 Wachstumsbedingungen für AML Blasten	31
4.1.1 Eignungsprüfung von humanem AB Serum anstelle von Fötalem Kälberserum (FCS)	33
4.1.2 Ermittlung der optimalen Zelldichte	34
4.1.3 Austestungen der Zytokine	35
4.1.4 Blasten und ihre Proliferationskinetik	40
4.1.5 Anreicherungsverfahren bei Patienten mit niedrigen Blastenzahlen	45
4.1.6 Unterschiede zwischen frischem und aufgetautem Blastenmaterial	48
4.2 Bedingungen für die Zugabe der Spenderzellen	50
4.3 Delta-Assays	52
4.3.1 Delta-Assays mit AML Zelllinien	52
4.3.2 Delta-Assays mit Patientenzellen	55
5. Diskussion	59
6. Zusammenfassung	73
7. Summary	75

8. Literaturverzeichnis	77
9. Anhang	84
9.1 Danksagung	84
9.2 Lebenslauf	86

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AML-M1	AML-FAB-Typ M1
AML-M2	AML-FAB-Typ M2
AML-M3	AML-FAB-Typ M3
AML-M3v	AML-FAB-Typ M3-Variante
AML-M4	AML-FAB-Typ M4
AML-M4 _{Eo}	AML-FAB-Typ M4 mit Eosinophilie
AML-M5	AML-FAB-Typ M5
AML-M6	AML-FAB-Typ M6
AML-M7	AML-FAB-Typ M7
AML-MO	AML-FAB-Typ MO
APC	Antigen präsentierende Zellen (Antigen Presenting Cells)
BCR	Bruchpunktregion („breakpoint-cluster-region“)
CD	Differenzierungsantigen (Cluster of Differentiation)
CML	Chronische myeloische Leukämie
CSF	Koloniestimulierender Faktor
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten (Cytotoxic T-Lymphocyte)
DC	Dendritische Zellen (Dendritic Cells)
DLI	Spender-Lymphozyten-Infusion (Donor Lymphocyte Infusion)
EPO	Erythropoetin
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (Fluorescence Activated Cell Sorter)
FAB	Französisch-Amerikanisch-Britisch
FCS	Fötale Kälber-Serum (Foetal Calf Serum)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärts-Lichtstreuung (Forward Scatter)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor

GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor)
GvHD	Transplantat-gegen-Empfänger-Krankheit (Graft-versus-Host-Disease)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (Graft-versus-Leukämie -Effekt)
Gy	Gray
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IG	Immunglobulin
IL	Interleukin
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MACS	Magnetische Zellseparation (Magnetic Cell Sorting)
mHAG	Minor Histokompatibilitätsantigene (Minor Histocompatibility Antigen)
MRD	Minimale Resterkrankung (Minimal Residual Disease)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMNC	Periphere Blut Mononukleäre Zellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate buffered Saline)
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PE	Phycoerythrin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
SCF	Stammzellfaktor (Stem Cell Factor)
SSC	Seitliche Lichtstreuung (Side Scatter)
SZT	Stammzelltransplantation
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α

1. Einleitung

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) ist nach Auftreten eines Rezidivs die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen oder Knochenmark oft die Therapie der Wahl und meist auch die einzige Möglichkeit zur dauerhaften Heilung. Im Rahmen der allogenen Transplantation werden dem Spender stammzellhaltige Präparate wie Knochenmark oder mobilisierte Stammzellen aus dem peripheren Blut entnommen und dem Empfänger intravenös verabreicht. Der Erfolg der allogenen Transplantation ist in erster Linie auf den durch Spender-Lymphozyten vermittelten, sogenannten „Graft-versus-Leukämie“ (GvL) -Effekt zurückzuführen. Die allogene Knochenmarktransplantation (KMT) ist jedoch mit dem Risiko einer Graft-versus-Host Krankheit (engl. graft-versus-host disease, GvHD) behaftet, bei der T-Zellen des Spenders Zellen des Empfängers als fremd erkennen und schädigen.

Zur Verhinderung bzw. Abschwächung der Graft-versus-Host Reaktion werden häufig immunkompetente Zellen, insbesondere T- Lymphozyten, aus dem Transplantat entfernt. Diese T-Zelldepletion des Transplantats ist aber mit einem signifikant erhöhten Rezidiv-Risiko assoziiert. Im Falle der HLA-identischen Transplantation spielen Minor-Histokompatibilitätsantigene, sogenannte mHags eine entscheidende Rolle. Je nachdem auf welchen Geweben des Patienten sie vorkommen und in welchem Maße sie von den T-Zellen des Spenders erkannt werden sind sie für das Auftreten des GvL-Effektes mit oder ohne GvHD verantwortlich. Ließe sich dieser GvL-Effekt in ein *in vitro* System übertragen, könnte man das Transplantationsergebnis in gewissem Maß vorhersagen, bzw. neue Therapieansätze, z. B. mit auf hämatopoetische Zellen beschränkten zytotoxischen T-Zellen (CTLs) auf ihre Wirksamkeit hin überprüfen.

Für die chronische myeloische Leukämie (CML) existiert ein solches System bereits, daher war das Ziel dieser Arbeit zu überprüfen, ob sich dieser Test auf die, im Vergleich zur CML, sehr heterogene AML übertragen läßt.

Es sollte somit ein *in vitro* Testsystem, als sogenannter modifizierter Delta-Assay etabliert werden, das als prädikativer Marker für das Auftreten einer GvL-Reaktion in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie dienen soll. Beim Delta-Assay handelt es sich um eine Suspensionskultur mit hämatopoetischen oder leukämischen Vorläuferzellen. Diese werden durch die Inkubation mit Wachstumsfaktoren zur

Proliferation gebracht. Das Wachstum dieser Zielzellen wird dann durch den Einbau eines radioaktiven Nukleotids in die DNA erfaßt. Durch die Zugabe von Effektorzellen (Zellen des Spenders) können die wachstumshemmenden bzw. zytotoxischen Einflüsse dieser Zellen auf die Zielzellen untersucht werden. In der Situation der allogenen, HLA-identischen Stammzelltransplantation werden leukämische Blasten des Patienten mit peripheren Blut Mononukleären Zellen (PBMCs) bzw. zytotoxischen T-Zellen (CTLs) des Spenders kokultiviert.

Die Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation mit acht europäischen Partnern durchgeführt.

EU-Projektnummer: QLK3-CT-2002-01936

2. Literaturübersicht

2.1 Das blutbildende System

Das Blut des Menschen, bestehend aus flüssigen und festen Bestandteilen übernimmt sehr vielfältige Aufgaben im Organismus. Es transportiert Nährstoffe, Vitamine und Sauerstoff zu allen Zellen des Körpers und übernimmt den Abtransport von Stoffwechselprodukten. Während der Nährstofftransport durch den flüssigen Teil des Blutes, dem Plasma gewährleistet wird, gibt es eine ganze Reihe von Aufgaben, die von den zellulären Bestandteilen übernommen werden. Die Erythrozyten transportieren den Sauerstoff. Die Leukozyten sind für die Entfernung von Krankheitserregern zuständig, für die Entsorgung von abgestorbenen Zellen und für die Eliminierung von Tumorzellen. Die Thrombozyten lösen in verletzten Geweben die Blutgerinnung aus. Sind die Blutzellen in ihrer Funktion gestört, handelt es sich dabei meist um eine Erkrankung der Blutbildung.

Der Ort der Blutbildung oder Hämatopoese ist das Knochenmark, dort befinden sich neben verschiedenen anderen Zellen die Ursprungszellen aller Blutzellen, die hämatopoetischen Stammzellen. Da sich aus ihnen alle Blutzellen entwickeln können, bezeichnet man sie oft auch als pluripotent. Abbildung 2.1 stellt die unterschiedlichen Blutzelltypen und ihre Differenzierungsreihen dar. Dieses Schema wurde das erste Mal 1909 von dem russischen Arzt Maximow während einer Vorlesung an der Berliner Charité vorgestellt und dann in der *folia haematologica* veröffentlicht (Maximov A, 1909). Es dauerte weitere 60 Jahre bis man mittels in vitro Methoden sicher zeigen konnte, daß sich alle Blutzellen von einer Stammzelle ableiten (Messner et al., 1973, 1980).

Etwa 1-3% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark sind Stammzellen. Man nimmt an, daß aufgrund der hohen Teilungskapazität etwa 100-1000 Stammzellen genügen, um die Blutbildung eines Erwachsenen ein Leben lang zu gewährleisten. Als Stammzellen werden auch noch jene Zellen bezeichnet, die bereits einen höheren Differenzierungsgrad besitzen und aus denen bestimmte Differenzierungsreihen, aber nicht mehr das komplette hämatopoetische System gebildet werden kann. Dies sind zum einen, die lymphatischen Vorläuferzellen, aus denen sich B- und T-Lymphozyten und NK-Zellen ableiten, und zum anderen die

myeloischen Vorläuferzellen, aus denen Erythrozyten, Leukozyten und Megakaryozyten hervorgehen. Die letzt genannten erzeugen die für die Blutgerinnung wichtigen Thrombozyten.

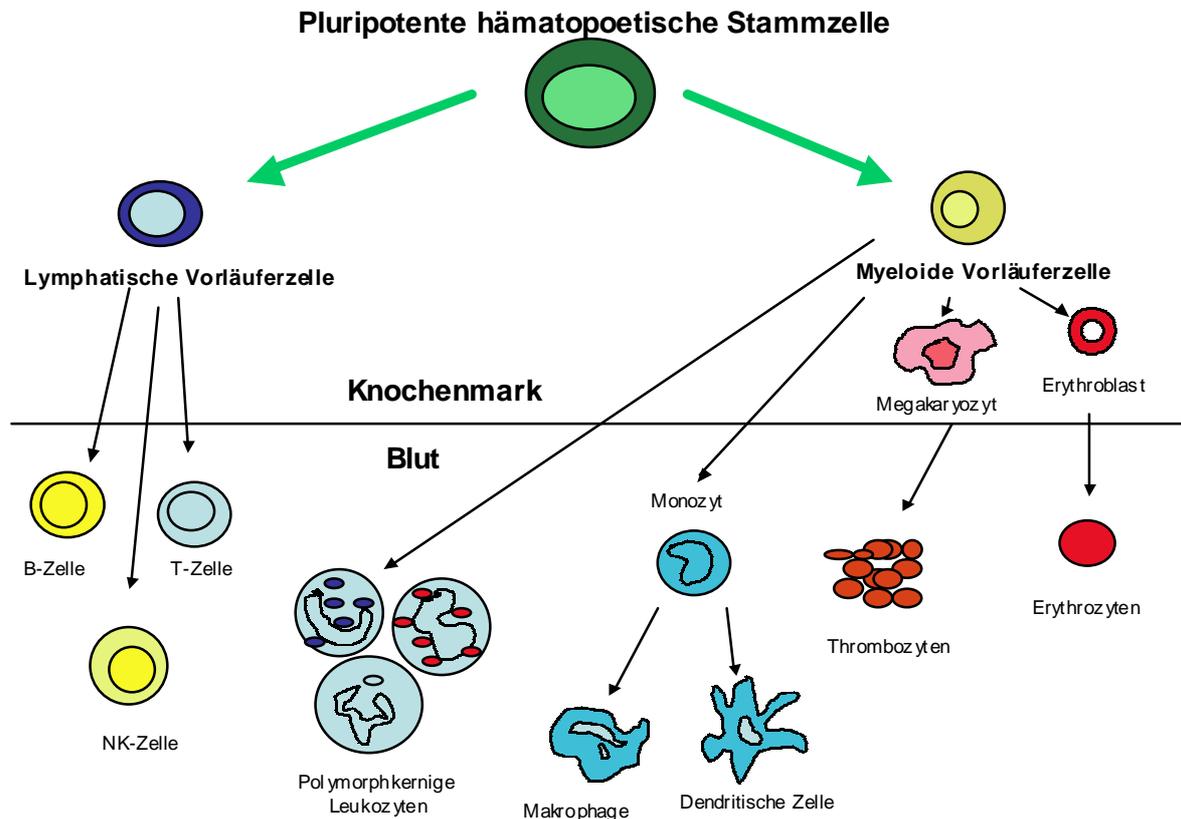


Abb. 2.1: Die Entwicklung der unterschiedlichen Blutzelltypen vereinfachtes Schema nach Janeway 1997

Verantwortlich für die Reifungsschritte der Blutzellen sind sogenannte Zytokine, körpereigene Botenstoffe, die Zellteilung und Differenzierung der Zellen regulieren. Die hämatopoetischen, also die blutbildenden, Wachstumsfaktoren regulieren im Knochenmark die Reifung von Erythro-, Leuko- und Thrombozyten. Das heißt, sie haben hormonähnliche Wirkung, werden aber nicht wie diese in speziellen Hormondrüsen, sondern in unterschiedlichen Zellen überall im Körper gebildet. Die Bildung dieser Zucker-Eiweiß-Verbindungen unterliegt komplizierten Regulationsmechanismen. Mitte der achtziger Jahre hat man einen Großteil der Zytokine

entdeckt. Heute werden sie gentechnisch hergestellt und manche von ihnen sind als Medikamente im klinischen Einsatz. Beispiele hierfür sind das Erythropoetin (EPO), der Granulozyten-koloniestimulierende Faktor (G-CSF) und der Granulozyten-/Makrophagen-koloniestimulierende Faktor (GM-CSF).

2.2 Die akute myeloische Leukämie (AML)

2.2.1 Definition und Epidemiologie

Der Begriff Leukämie (lat. „weißes Blut“) wurde erstmals 1845 von Virchow verwendet und bezieht sich auf die bei Leukämiepatienten mit sehr hohen Leukozytenwerten verbreiterte Schicht an weißen Blutkörperchen nach dem Zentrifugieren des Blutes (Herold et al., 1998).

Bei Leukämien handelt es sich um maligne Neoplasien hämatopoetischer Zellen von meist klonalem Ursprung. Die Expansion des malignen Zellklons geschieht zunächst im Knochenmark, um dann auf extramedulläre Organe überzugreifen und schließlich das periphere Blut mit leukämischen Zellen zu überschwemmen (Wilms et al., 1984). Die Ansammlung dieser Zellen, auch Blasten genannt, im Knochenmark und im peripheren Blut führt dazu, daß gesunde, funktionsfähige Blutzellen verdrängt werden. Dies kann zu einer Knochenmarkinsuffizienz führen, die sich klinisch als Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie manifestiert.

Für die Einteilung der Leukämien werden vier Kriterien herangezogen. Je nach Krankheitsverlauf unterscheidet man zwischen akuter und chronischer Leukämie. Der Zelltyp, von dem sich die Leukämiezellen ableiten, entscheidet darüber, ob es sich um eine lymphatische oder myeloische Leukämie handelt. Ein weiteres Kriterium ist der Differenzierungsgrad der pathologischen Zellen, hierbei unterscheidet man zwischen reifzelliger und unreifzelliger Form. Bei dem vierten und letzten Kriterium, der Ätiologie differenziert man schließlich zwischen einer primären und einer sekundären Form.

Die Entstehung der akuten myeloischen Leukämie (AML) ist das Resultat eines Stufenprozesses, der aus einer Vielzahl von genetischen Veränderungen in hämatopoetischen Vorläuferzellen resultiert. Der Prozeß der normalen Blutbildung ist dynamisch aber hoch stringent reguliert. Die Regulation geschieht durch das

Zusammenwirken von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, die bestimmte genetische Programme bezogen auf die Linienspezifität und Differenzierung der Zellen aktivieren. Einige dieser Gene sind bei der AML häufig von chromosomalen Translokationen betroffen, was zu einer Dysregulation dieser genetischen Programme führen kann, so daß eine genügende Kontrolle von Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen nicht mehr gegeben ist. Durch genetische Studien wurde zwar gezeigt, daß es sich um eine klonale Erkrankung handelt, daß sie also aus einer einzigen transformierten Zelle hervorgeht, die genaue Ursprungszelle der leukämischen Transformation hat man aber noch nicht identifiziert.

15-20% der AML Fälle werden bei Kindern und etwa 80% bei Erwachsenen diagnostiziert, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen. Sie ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters, denn die meisten Fälle treten deutlich nach dem 45. Lebensjahr auf. Die Inzidenz liegt insgesamt bei ca. 5 pro 100.000 Einwohner pro Jahr, 10 pro 100.000 bei den über 70-jährigen Patienten (Schön et al., 1996) und im Vergleich dazu nur bei 0,6 pro 100000 bei den unter 15-jährigen (Graf et al., 1995).

2.2.2 Das Krankheitsbild

Das klinische Erscheinungsbild der AML wird geprägt von der hämatopoetischen Insuffizienz infolge der blastären Knochenmarkinfiltration. Die Patienten leiden an allgemeiner Schwäche, Müdigkeit, Belastungsdyspnoe, Schwindel und Kopfschmerzen. Diese oft sehr plötzlich auftretenden Symptome sind meist die Folge einer schweren Anämie, wobei die Ausprägung der Beschwerden stark vom Alter des Patienten abhängt. Als Folge der Granulozytopenie besteht eine stark erhöhte Infektionsgefahr, was zu chronischen Infektionen der Atemwege verbunden mit anhaltendem Fieber und vermehrtem Schwitzen führt. Aufgrund der Thrombozytopenie haben die Patienten eine stark erhöhte Blutungsneigung, die sich häufig in petechialen Blutungen, Zahnfleischbluten oder Nasenbluten äußert. In wenigen Fällen treten durch eine Reizung des Periostes, verursacht durch die proliferierenden Blasten, Knochenschmerzen auf. Dies läßt sich klinisch durch eine

erhöhte Druckempfindlichkeit von Sternum und auch anderen Knochen nachweisen. Bei der AML treten im Vergleich zur akuten lymphatischen Leukämie (ALL) nur sehr selten eine Vergrößerung der Leber und der Milz auf, auch eine Lymphadenopathie ist eher selten (Gollard et al., 1996). Hat der Patient sehr hohe Blastenzahlen ($> 100\text{G/l}$) im peripheren Blut ist sehr oft eine Hypoxämie vorhanden, die mit zentralnervösen Störungen einhergeht. Diese Symptome werden unter dem Begriff Hyperleukozytose-Syndrom zusammengefaßt. Dieses Syndrom tritt gehäuft bei monoblastärer und myelomonozytärer Differenzierung auf (Creutzig et al., 1987). Klinisch stehen Dyspnoe und Bewußtseinseintrübung bis hin zum Koma im Vordergrund. Die Ursache liegt sehr wahrscheinlich in der gesteigerten Blutviskosität, die durch die leukämischen Blasten bedingt ist und in deren Folge es zu einer Mikrozirkulationsstörung kommt. Die Letalität infolge zerebraler Blutungen ist in diesen Fällen sehr hoch (Ventura et al., 1988). Bei diesen Patienten ist es häufig sinnvoll vor der Chemotherapie eine Leukapherese durchzuführen, um die überhöhten Leukozytenzahlen zu senken.

2.2.3 Ätiologie

Eine ganze Reihe neuer Erkenntnisse haben zur Aufklärung der multifaktoriellen Ätiologie der AML beigetragen, dennoch sind die genauen Mechanismen noch nicht bis ins letzte Detail geklärt. Schon 1928 stellte man einen Zusammenhang zwischen vermehrtem Benzolkontakt und erhöhtem Erkrankungsrisiko für AML her (Austin et al., 1988). Auch für eine Reihe anderer Chemikalien gilt bei dauerhafter Exposition ein erhöhtes Leukämierisiko. Dazu gehören Ethylenoxide, Pestizide und auch einige organische Lösungsmittel.

Infektionen mit Retroviren, deren genetische Information in das Genom integriert wird und zu onkogenen Fehlregulationen führen kann, wurden vor allem bei zahlreichen Tieren als Auslöser für AML nachgewiesen (Largaespada et al., 2000). Auch zwischen radioaktiver Strahlung und erhöhtem Leukämierisiko besteht ein Zusammenhang. Nach den Atombombenabwürfen auf Hiroshima und Nagasaki (Ichimaru et al., 1978) wurde ein 30-facher Anstieg der AML-Häufigkeit festgestellt. Sog. sekundäre Leukämien treten mit einer 10 bis 15 % Häufigkeit in Folge einer Chemo- oder Radiotherapie einer anderen Neoplasie auf. Verantwortliche

Chemotherapeutika kommen vor allem aus der Gruppe der alkylierenden Substanzen, wie z.B. Cyclophosphamid, Busulfan u.a.). Auch genetische Dispositionen spielen eine Rolle. Man weiß z.B. von Kindern mit Down-Syndrom, daß sie gegenüber der Kontrollgruppe ein 10-20-fach höheres Risiko haben innerhalb der ersten zehn Lebensjahre an einer AML zu erkranken (Rosner et al., 1972).

2.2.4 Pathogenese

Wie die meisten Krebserkrankungen hat auch die AML eine genetische Ursache. Durch Mutationen werden die Eigenschaften einer ursprünglich gesunden Zelle verändert. Viele dieser von Mutationen betroffenen Gene sind in die Regulation von Zellwachstum, Ausreifung oder Apoptose involviert. Man nennt diese Gene auch Proto-Onkogene. Oftmals handelt es sich dabei um Transkriptionsfaktoren, die die hämatopoetische Differenzierung der Zellen steuern. So wurden beispielsweise in AML häufig chromosomale Translokationen beobachtet, die zur Fusion der Gene AML1 und ETO führen. Bei etwa $\frac{1}{4}$ der AML Patienten werden Mutationen der ras-Protoonkogene gefunden. Mutiertes ras hat eine Daueraktivierung von Signalkaskaden zur Folge, die zu einer akzentuierten Proliferation des leukämischen Klons führen. Durch zytogenetische Untersuchungen konnten spezifische, nicht zufällige klonale Chromosomenaberrationen bei der AML nachgewiesen werden. In Tabelle 2.1 sind die wichtigsten der AML zu Grunde liegenden genetischen Veränderungen zusammengestellt. Bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) ist die Ursprungszelle eine sehr primitive Vorläuferzelle, die der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle sehr nahe steht. Das einzige zuverlässige Unterscheidungsmerkmal zur gesunden Stammzelle ist die BCR-ABL Translokation (Maguer-Satta et al., 1996). Die AML hingegen kann sich aus verschiedenen Reifungsstadien der myeloischen Differenzierungsreihe entwickeln. Zwei Drittel aller AML Formen stammen von reiferen, hämatopoetischen Vorläuferzellen ab. Das verbleibende Drittel, das vor allem ältere Patienten und Patienten mit sekundärer Leukämie betrifft, hat die pluripotente Stammzelle als Ausgangspunkt. Dies erklärt die klinische, morphologische, immunphänotypische und molekulare Heterogenität der AML.

Je höher der Grad an Selbsterneuerung der AML Zellen in vitro, desto ungünstiger ist die Prognose (Mc Culloch et al., 1982). Die meisten AML Zellen benötigen Zytokine wie GM-CSF, G-CSF oder IL-3 um zu proliferieren. Einige besitzen jedoch eine autokrine Produktion an hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, so daß sie in vitro auch unabhängig von extern zugeführten Zytokinen proliferieren können (Young et al., 1986).

Tab.2.1: Genetische Veränderungen bei der AML

Chromosomen-Aberration	Molekulargenetische Veränderung	Typenspezifische Leukämieform
t(8;21)	Fusionsprotein AML1/ETO	AML-M2
inv 16	Fusionsprodukt CBF β /MYH11	AML-M4 Eo
t(15;17)	Fusionsprotein PML/RARa	AML-M3 und M3 Variante
11q23 Translokationen	Rearrangements des MLL-Gens	

2.2.5 Diagnostik und Klassifikation

Grundlage jeder Leukämiediagnostik ist ein gefärbter Austrich von peripherem Blut und Knochenmark. Bei einem Blastenanteil von >20% gemäß World Health Organisation (WHO), bzw. von >30% nach French-American-British (FAB) gilt die Diagnose als gesichert. Ein Blast ist definiert als eine undifferenzierte Zelle von unterschiedlicher Größe. Er besitzt einen runden, zentral gelegenen Zellkern, dessen Chromatin nicht kondensiert ist, sondern fein und retikulär erscheint. Das Kern/Zytoplasma Verhältnis ist deutlich zu Gunsten des Kerns verschoben. Die weitere Diagnostik erfolgt anhand eines Stufenplanes, wie er in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt ist.

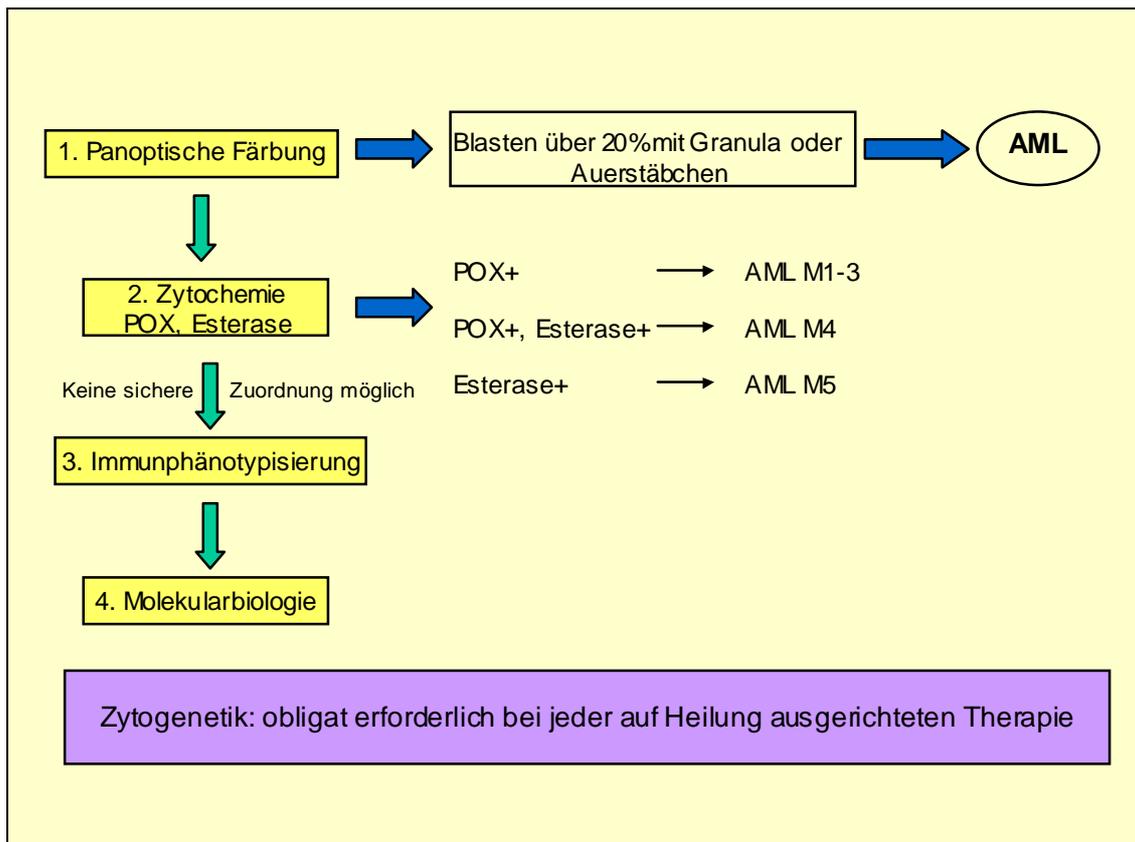


Abb.2.2: Stufenplan zur Diagnostik der AML vereinfacht nach: Fuchs, R: Akute myeloische Leukämie. Therapie-Forschung-Perspektiven. 1. Auflage Bremen: UNI-MED, 2002

Da es sich bei der AML um eine sehr heterogene Erkrankung handelt, haben eine Gruppe von französischen, amerikanischen und englischen Hämatologen eine Klassifikation, die sog. FAB-Klassifikation eingeführt. Diese teilt die myeloischen Leukämien anhand ihrer morphologischen und zytologischen Merkmale ein. Mit bestimmten FAB-Typen können auch bestimmte Chromosomenaberrationen verbunden sein. Eine Übersicht gibt Tabelle 2.2.

Tab.2.2: FAB-Klassifikation der AML und assoziierte chromosomale Veränderungen

AML-Subtyp	Häufigkeit in %	Chromosomale Veränderungen
M0 undifferenzierte AML	3	
M1 AML ohne Ausreifung	15-20	
M2 AML mit Ausreifung	25-30	t(8;21)
M3 Promyelozytenleukämie	5-10	t(15;17)
M4 myelomonozytäre AML	20-30	inv(16)
M5 monozytäre AML	2-10	11q23
M6 Erythroleukämie	3-5	
M7 megakaryozytäre AML	3-12	

2.2.6 Prognosefaktoren

Faktoren, die für die AML von prognostischer Bedeutung sind, lassen sich in mehrere Gruppen einteilen. Zur Gruppe der klinischen Prognosefaktoren zählen das Alter des Patienten, sein Allgemeinzustand, Begleiterkrankungen oder auch die Leukozytenzahl bei Diagnosestellung. In der nächsten Gruppe werden FAB-Subtyp und zytologische Merkmale als Kriterien herangezogen. Während die M3 als günstig eingestuft wird, gelten die Subtypen M6 und M7 als prognostisch ungünstig (Ribeiro et al., 1993). Bei den restlichen AML Subtypen gibt es noch keine verlässlichen prognostischen Kriterien. Bezüglich der zytologischen Merkmale gilt das Vorhandensein von Auer-Stäbchen als prognostisch günstiger (Billstrom et al., 1988) ebenso wie ein hoher Anteil an Myeloperoxidase- bzw. Sudanschwarz-positiver Zellen (Advani et al., 1993; Hoyle et al., 1991). Eine weitere Gruppe beinhaltet zytogenetische Risikofaktoren. Hier unterteilt man in Hochrisikogruppe, prognostisch günstige Formen und in eine Gruppe mit intermediärer Prognose. Zur Hochrisikogruppe gehören Patienten mit komplexen Aberrationen oder Veränderungen am langen Arm von Chromosom 3, 5, 7 oder 11. Bei den

Translokationen t(15;17), t(8;21) und bei der Inversion am Chromosom 16 ist die Prognose günstig, intermediär ist sie bei Patienten mit normalem Karyotyp.

2.2.7 Therapiemöglichkeiten

Wie schon weiter oben beschrieben handelt es sich bei der AML um eine sehr heterogene Entität prognostisch unterschiedlicher Sub-Formen. FAB-Klassifikation, Karyotyp und Alter sind entscheidende Kriterien. Demzufolge kann auch die Therapie nicht für alle Patienten die gleiche sein. Es gibt daher verschiedene Protokolle, die zwar alle auf einem grundsätzlich gleichen Schema aufgebaut sind, aber in den Details feine Unterschiede aufweisen. Hier soll nur auf das Grundschema eingegangen werden.

Während man vor 20 Jahren Leukämiepatienten nur palliativ behandeln konnte, hat man heute die Heilung des Patienten zum Ziel. Die Voraussetzung dafür ist, daß man den leukämischen Klon komplett eliminiert, so daß sich dann wieder eine normale Blutbildung einstellen kann. Um dies zu erreichen beginnt man jede Leukämietherapie mit der so genannten Induktionstherapie. Dabei wird eine komplette Remission (weniger als 5% Blasten im peripheren Blut bzw. im Knochenmark) angestrebt. Dies heißt, daß mit Routineverfahren die restlichen Leukämiezellen nicht mehr nachzuweisen sind. Die normale Blutbildung sollte wieder eingesetzt haben (Löwenberg B, 1999). Das versucht man durch eine intensive zytostatische Kombinationsbehandlung, wobei eine Kombination aus Cytosin-Arabinosid und einem Anthrazyklin verwendet wird. Dadurch kommt es bei Patienten im Alter bis 60 Jahre in 80% der Fälle zu einer kompletten Remission, bei den über 60-Jährigen immerhin noch in 50% der Fälle (Büchner et al., 1993).

Bei etwa 50 % der Patienten, die sich in kompletter Remission befinden, lassen sich trotzdem noch leukämische Zellen nachweisen, wenn auch in sehr geringer Konzentration. Dieser Umstand wird als „minimale Resterkrankung“ (Minimal Residual Disease, MRD) bezeichnet und kann zu einem Rezidiv führen (Bishop et al., 1997).

An die Induktionstherapie schließt sich die Postremissionstherapie an. Dabei wird versucht durch weitere Chemotherapiezyklen den leukämischen Klon weiter zu reduzieren. Eine Hochdosis-Chemotherapie führt nicht nur zur Elimination des

malignen Klons, sondern auch zur Zerstörung des gesunden Knochenmarks. Um dennoch eine Hochdosistherapie durchführen zu können, muß die Hämatopoese des Patienten nach Therapie durch autologes oder allogenes Knochenmark rekonstituiert werden.

Prinzip der allogenen Stammzelltransplantation (SZT) ist es, die erkrankte Blutbildung des Patienten durch Stammzellen eines gesunden gewebeverträglichen Spenders vollständig zu ersetzen. Um die Stammzellen zu gewinnen gibt es zwei Möglichkeiten, entweder entnimmt man Knochenmark oder man bedient sich der Apherese, um die mittels Zytokingabe aus dem Knochenmark ins Blut mobilisierten Stammzellen zu sammeln. Als Spender kommen Familienmitglieder mit übereinstimmendem HLA-Typ (engl. „human leucocyte antigen“= humanes Leukozytenantigen) in Betracht. Da bei Geschwistern in nur etwa 25% der Fälle diese Übereinstimmung gegeben ist, ist es oft nötig im erweiterten Familienkreis zu suchen oder falls auch diese Suche nicht zum Erfolg führt auf einen unverwandten freiwilligen HLA-identischen Fremdspender zurückzugreifen. Dank weltweiter Spenderkarteien kann so für etwa 80% der Patienten ein geeigneter Spender gefunden werden. Der therapeutische Effekt bei der Transplantation liegt nicht nur in der Rekonstitution der durch die vorangehende myeloablative Chemotherapie zerstörten Hämatopoese, sondern auch im Auftreten des sogenannten Graft-versus-Leukämie-Effektes (GvL-Effekt) (Antin et al., 1993; Horowitz et al., 1990). Hierunter versteht man die durch immunologische Mechanismen der alloreaktiven T-Lymphozyten des Spenders vermittelte zytotoxische Wirkung gegen noch verbliebene Leukämiezellen. Die T-Lymphozyten sind Bestandteil des Transplantates und werden somit dem Patienten mit der Transplantation infundiert. Der für den Patienten günstige GvL-Effekt wird allerdings meist von der für den Patienten ungünstigen Transplantat-gegen-Empfänger-Krankheit (engl. Graft-versus-Host-Disease, GvHD) begleitet. Diese GvH Erkrankung manifestiert sich vor allem an Haut, Leber und Darm und ist die schwerwiegendste Komplikation nach SZT.

Bei der autologen Transplantation werden dem Patienten seine eigenen, idealerweise zum Zeitpunkt der kompletten Remission, entnommenen Stammzellen zurückgegeben. Um sicherzustellen, daß im Transplantat keine leukämischen Zellen mehr vorhanden sind, wird das Transplantat einer Aufreinigung, dem sogenannten „Purging“ unterzogen. Die Stammzellgewinnung findet nach dem gleichen Prinzip

statt wie bei der allogenen Transplantation. Da bei dieser Form der Transplantation weder ein GvL-, noch ein GvH-Effekt auftreten kann sie auch bei älteren Patienten angewendet werden. Der fehlende GvL-Effekt ist jedoch dafür verantwortlich, daß bei autolog transplantierten Patienten etwa 25% einen Krankheitsrückfall erleiden (Gorin et al., 1995).

Entfernt man mittels T-Zelldepletionsverfahren die für die GvHD ursächlichen T-Lymphozyten aus dem Transplantat, so läßt sich dadurch die GvHD-Rate deutlich senken. Allerdings kommt es dadurch häufiger zu Abstoßungsreaktionen, das heißt, daß die übertragenen Blutzellen im Knochenmark des Patienten nicht anwachsen, sich somit wieder seine eigenen Blutzellen bilden und sich dadurch die Rezidivraten erhöhen. Durch die immer besser werdenden Selektionsverfahren können inzwischen jedoch schwere GvHD Verläufe verhindert werden, ohne daß die Abstoßungsrate sich erhöht. Den höheren Rezidivraten versucht man entgegenzuwirken, indem man nach Angehen des Transplantates dem Patienten die zuvor depletierten Spender-Lymphozyten fraktioniert verabreicht.

Dies wird als Spender-Lymphozyten-Infusion (engl. „donor-lymocyte-infusion“= DLI) bezeichnet und geht auf Beobachtungen zurück, daß bei einer rezidierten CML durch die DLI eine erneute Remission erreicht werden konnte. Bei der AML schafft man dies durch diese sogenannte adoptive Immuntherapie jedoch in nur etwa 10-15% der Fälle. Im Vergleich dazu sind es bei der CML etwa 80%, allerdings mit signifikanter GvHD Inzidenz (Kolb et al., 1995).

Für das deutlich schlechtere Ansprechen der AML auf die Spenderlymphozyteninfusionen im Vergleich zur CML werden verschiedene Ursachen diskutiert. Die AML Blasten sind sehr schlechte Antigen-präsentierende Zellen, da ihnen die kostimulatorischen Moleküle, die für eine T-Zell Antwort entscheidend sind, entweder ganz fehlen oder nur in sehr geringem Maße exprimiert werden (Brouwer et. al, 2000; Vollmer et al., 2003). Ein anderer Mechanismus der Blasten, sich der Kontrolle durch das Immunsystem zu entziehen, ist die Produktion von Zytokinen, die eine Immunantwort unterdrücken. Solche sind bei der AML z.B. Interleukin-10 (IL-10) (Opal et al., 2000) oder TGF- β (Kao et al., 2003).

2.3 Der Graft-versus-Leukämie (GvL)-Effekt

Barnes et al. veröffentlichte 1956 erstmals die These, daß nicht die Konditionierung, die der Transplantation vorausgeht und aus Bestrahlung und Chemotherapie besteht, allein für die Auslöschung des leukämischen Klons verantwortlich ist, sondern daß dies auch durch einen vom übertragenen Spendermark vermittelten Effekt hervorgerufen werden muß (Barnes et al., 1956). Dieser Studie folgten weitere auch von anderen Forschergruppen, die an Mausmodellen zeigen konnten, daß ein sog. Graft-versus-Leukämie (GvL)-Effekt tatsächlich existiert, allerdings fehlten noch Beweise, daß dies auch beim Menschen so ist. Mathé et al. waren die ersten, die auch beim Menschen den GvL-Effekt für Transplantationserfolge verantwortlich machten und die dafür den Begriff „adoptive Immuntherapie“ prägten (Mathé et al., 1965). Erste Beweise für die Richtigkeit dieser Vermutung lieferten allerdings erst Weiden und das Transplantationsteam aus Seattle. Sie konnten zeigen, daß Patienten mit akuter oder chronischer GvHD geringere Rezidivraten hatten, als Patienten bei denen diese transplantationsassoziierte Erkrankung nicht auftrat (Weiden et al., 1981). Eine andere Gruppe kam zu der Erkenntnis, daß bei der syngenen Transplantation verglichen mit der allogenen Transplantation deutlich höhere Rezidivraten auftreten (Horowitz et al., 1990). Eine Reihe von Arbeiten zeigte, daß durch ex-vivo T-Zell Depletion bei CML Patienten das Risiko, einen Rückfall zu erleiden, steigt. Den ersten direkten Beweis für das Vorhandensein eines GvL-Effektes im Menschen konnte schließlich von Kolb et al. 1990 gezeigt werden. Drei CML Patienten mit Rezidiv nach KMT wurden mit Interferon- α und Lymphozyten von ihrem jeweiligen Spender behandelt. Alle drei Patienten waren anschließend sowohl zytogenetisch als auch hämatologisch in kompletter Remission (Kolb et al., 1990). Diese Beobachtung wurde bald von anderen unabhängigen Forschergruppen bestätigt. Mononukleäre Blutzellen eines allogenen Spenders sind in der Lage in vivo CML Zellen zu erkennen und zu zerstören. Dies führt bei der CML in etwa 80% der Patienten zu einer kompletten Remission, bei der AML leider nur in 10-15% der Fälle. Der Vorteil dieser Behandlung gegenüber einer erneuten Transplantation liegt in der geringeren Rückfallrate und in der geringeren therapieassoziierten Sterblichkeit (Radich et al., 1993).

Man weiß inzwischen auch, daß die GvL-Reaktion und die GvHD nach allogener KMT davon abhängen, welche antigenen Zielstrukturen sie haben und daß beide Prozesse nicht zwangsläufig miteinander gekoppelt sein müssen. Wird ein Patient von einem HLA-differenten Spender transplantiert, so sind es die HLA-Moleküle der Klasse I und der Klasse II gegen die die Reaktion gerichtet ist. Da diese Moleküle überall auf Körperzellen exprimiert werden ist die Folge eine stark ausgeprägte GvHD, die für den Patienten lebensbedrohend sein kann. Im HLA-identischen System sind es die sog. Minor-Histokompatibilitätsantigene (mHags) die die immunologische Reaktion im Patienten hervorrufen. Je nachdem in welchen Geweben sie vorhanden sind kann es entweder zu einer GvHD kommen und/oder zu einer GvL-Reaktion (Falkenburg et al., 2003). Abbildung 2.3 zeigt schematisch wie sich die GvHD vom GvL-Effekt separieren läßt bzw. wo eine Überschneidung stattfindet.

Minor-Histokompatibilitätsantigene sind definiert als Alloantigene, die in der Lage sind eine allogene T-Zell Antwort zwischen HLA-identischen Individuen hervorzurufen. Es sind Peptide, die sowohl von HLA-Molekülen der Klasse I, als auch der Klasse II auf der Zelloberfläche präsentiert und von T-Zellen eines HLA-identischen Individuums als „fremd“ erkannt werden können (Simpson et al., 2002). Viele mHags konnten inzwischen an Hand von Klonen zytotoxischer T-Zellen, sogenannter CTL-Klone charakterisiert werden, aber nur von einigen kennt man auch die Gensequenz. Die CTL-Klone hat man aus Blut von Patienten nach KMT isoliert. Die meisten mHags werden in mehreren Geweben exprimiert. Beispielsweise werden HA-3, HA-4, HA-B7, HA-6 oder HA-7 in der Haut, der Niere und in Blutzellen exprimiert. Andere mHags, wie z.B. HA-1, HA-2 und HA-5 werden gewebespezifisch exprimiert, und zwar ausschließlich im hämatopoetischen System (de Buerger et al., 1992; Dolstra et al., 1997; Mutis et al., 1999; van Els et al., 1992). Die mHags werden nach Gesetzen (Goulmy et al., 1995) vererbt und ihre Genloci sind nicht mit dem HLA-Genlocus verbunden (Goulmy et al., 1996). Bei einer HLA-identischen Situation können deshalb durchaus Unterschiede in mHags bestehen. Die Wahrscheinlichkeit, daß HLA-identische Familienmitglieder mHag-identisch sind, ist jedoch höher als bei HLA-identischen Fremdspendern.

Könnte man im Patienten mit Hilfe einer DLI eine Immunantwort induzieren, die gegen mHags gerichtet ist, die ausschließlich auf hämatopoetischen Zellen präsentiert werden, hätte man die Möglichkeit spezifisch leukämische Blasten zu zerstören, ohne daß anderes Gewebe geschädigt wird.

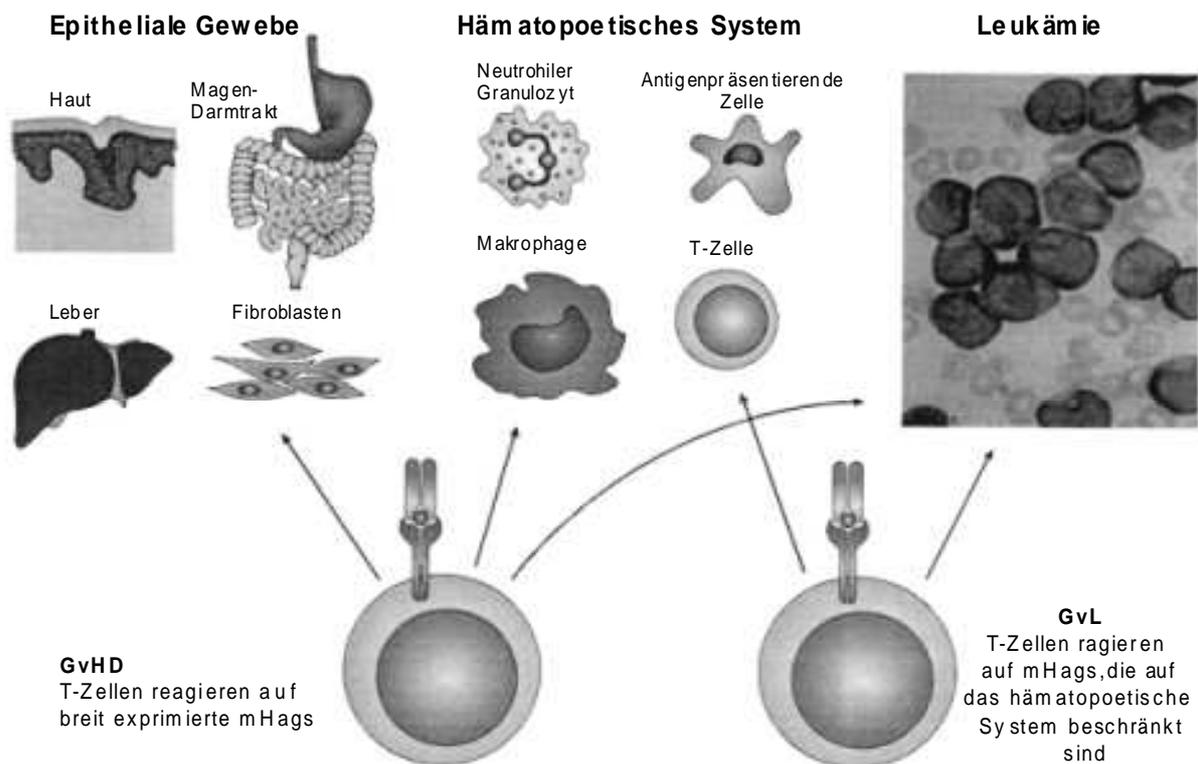


Abb. 2.3: Schema zur Trennung von GvL-Effekt und GvHD
nach: Bleakley M, Riddell S R: Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect.

Nature Reviews, cancer 2004, 4: 371-380

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Inkubationsschrank	Heraeus Instruments
Sterilbank (Hera safe)	Heraeus Instruments
Wasserbad	Köttermann
Mikroskop	Zeiss
Bestrahlungsanlage (Gammacell 40)	Atomic Energy of Canada Limited, Kanada
Zentrifuge	Heraeus Instruments
Kühlschränke	Liebherr
Gefrierschrank (-20° C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80° C)	Labotect
Stickstofftank für die Langzeitlagerung (-196° C)	Messer-Griessheim
Vortexer	Bender und Hobein
Eismaschine	Ziegra
Variopette (Stepper)	Eppendorf
Pipettierhilfe (Accu-jet)	Brand
Mikroskop invers mit aufsetzbarer Kamera	Zeiss
β-Counter, TopCount, 6 detector	Perkin Elmer LAS GmbH
FACS Calibur und CellQuest Software	Becton Dickinson
Separator Vario MACS	Miltenyi Biotec
Cell Harvester	Packard

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einweg-Pipetten: 2ml, 5ml, 10ml und 25ml	Peske OHG
Zellkulturflaschen: 25ml und 75ml	Peske OHG
Zellkulturplatten: 24 und 6 Loch	Peske OHG
96 Loch-Rundbodenplatten	Peske OHG
Pipettenspitzen: 2-10 μ l, 10-200 μ l und 100-1000 μ l	Peske OHG
96 Loch-Unifilterplatten	Packard
Kryoröhrchen	Nunc
Falconröhrchen: 15ml und 50ml	Becton Dickinson
MACS-Säulen (MS/LS)	Miltenyi
FACS-Röhrchen	Peske OHG
Reaktionsgefäße: 0,5ml, 1,5ml und 2ml	Eppendorf

3.1.3 Chemikalien

Ficoll-Hypaque spezifische Dichte = 1,078 g/ml (Biocoll)	Biochrom
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma
³ H-Thymidin	Amersham (Life Science, Buckinghamshire, England)
Szintillationscocktail M40	Perkin Elmer/Packard
DMSO	WAK-Chemie
Heparin	Essex Pharma
Natrium Azid	Merck

3.1.4 Zellkulturmedien und Reagenzien

RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Cell Concepts
IMDM	Invitrogen
X-vivo-15	Invitrogen
PBS (Phosphate-buffered saline)	Cell Concepts
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma
Penicillin-Streptomycin (1000IU/ml)	Invitrogen
L-Glutamin	Invitrogen
Transferrin (human apo-Form)	PAN Systems
PHA (Phytohämagglutinin)	Abbot Murex
2-ME (2-Mercaptoethanol)	Invitrogen
FCS (Fötales Kälberserum)	Invitrogen
Humanserum vom Typ AB	PAN Systems

3.1.5 Zytokine

EPO	Janssen-Cilag GmbH
FLT-3	Promocell
G-CSF	Aventis Pharma
GM-CSF	Essex Pharma
IL1- β	Cell Concepts
IL-2	Chiron Therapeutics
IL-3	Pepto Tech EC
IL-4	Cell Concepts
IL-6	Cell Concepts
IL-7	Cell Concepts
PGE ₂	Pharmacia
SCF	Pepto Tech EC
TNF- α	R&D Systems

3.1.6 Antikörper (Maus anti Human) für FACS-Analysen

Spezifität	Markierung	Hersteller
IgG1- Isotypkontrolle	PE	Becton Dickinson
IgG1- Isotypkontrolle	FITC	Becton Dickinson
IgG1- Isotypkontrolle	APC	Becton Dickinson
HLA-DR	PE	Becton Dickinson
HLA-ABC	FITC	Becton Dickinson
CD3	PE	Dako Cytomation
CD4	FITC	Immunotech, Coulter Company
CD13	PE	Becton Dickinson
CD14	PE	Dako Cytomation
CD14	FITC	Becton Dickinson
CD19	PE	Becton Dickinson
CD19	FITC	Immunotools
CD20	FITC	Dako Cytomation
CD33	PE	Becton Dickinson
CD34	PE	Immunotools
CD34	FITC	Becton Dickinson
CD56	PE	Immunotech, Coulter Company
CD56	APC	Becton Dickinson

Propidiumjodid: (95-98%), Stock: 2 µl/ml, zugegebenes Volumen: 10 µl/250µl

Zellsuspension

3.1.7 Microbeads für die MACS-Separation

CD2 Beads human	Miltenyi Biotec
CD3 Beads human	Miltenyi Biotec
CD33 Beads human	Miltenyi Biotec
CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec

3.1.8 Zellmaterial

Für die Durchführung der Experimente wurde 10-50 ml Heparin-Blut bzw. Heparin-Knochenmark (pro 10 ml Blut bzw. Knochenmark 0,1 ml (500 IE) Heparin) von AML Patienten bzw. deren HLA-identischen Spendern entnommen (KMT-Einheit im Klinikum Großhadern bzw. aus dem Städtischen Klinikum Harlaching), sowie von gesunden unverwandten Probanden (Buffy-Coats, Rotes Kreuz). Die Blutentnahme bzw. die Knochenmarkpunktion erfolgte entweder zum Zeitpunkt der Erstdiagnose oder beim Auftreten eines Rezidivs. Sowohl die Patienten, als auch die Spender wurden umfassend aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis, daß ihr Blut für die Forschung verwendet werden darf. Die mononukleären Zellen wurden mittels Dichtezentrifugation isoliert und entweder sofort verwendet oder eingefroren.

Desweiteren wurden drei Leukämiezelllinien (HL 60, THP-1 und Mono Mac 6) verwendet, die hier am Institut zur Verfügung standen.

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

Die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) wurden mittels Dichtezentrifugation isoliert. In ein 50 ml Falconröhrchen wurden 15 ml Ficoll (Dichte 1,077 g/ml) vorgelegt. Das heparinisierte Vollblut wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 gemischt, das Knochenmark im Verhältnis 1:4. Davon wurden 35 ml mit einer Pipette langsam auf die Ficollphase aufgeschichtet. Zur Ausbildung eines Dichtegradienten wurde das Röhrchen bei 20° C, 400g und einem Auslauf ohne Bremse 20 Minuten lang zentrifugiert. An der Grenzschicht zwischen Ficoll und verdünntem Blut wurde nach der Zentrifugation ein weißer Ring sichtbar. Diese Schicht besteht aus B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und Makrophagen. Dieser Ring wurde großzügig abpipettiert und in ein neues steriles 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen, das Zellpellet in RPMI-1640 mit 10% FCS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Um die Anzahl der Zellen und deren Vitalität zu bestimmen, wurden 10µl Zellsuspension 1:20 mit Trypanblau verdünnt. Dabei nehmen lediglich die toten Zellen, deren Zellwand nicht mehr intakt ist, den Farbstoff auf und färben sich dunkelblau, so sind sie eindeutig von den lebenden Zellen abgrenzbar. Durch mehrmaliges auf und ab pipettieren wurden Zellen und Farbstoff gut gemischt und davon 10µl in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Unter Verwendung eines inversen Mikroskops wurden die lebenden Zellen gezählt. Die Zellzahl berechnete sich dann wie folgt:

Gezählte Zellen x Verdünnungsfaktor x 1×10^4 = Zellzahl pro ml

Anzahl der ausgezählten Quadrate

3.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 bis 2×10^7 pro ml Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) eingefroren, abhängig von der Ausgangszellzahl. Das Einfriermedium und die Kryoröhrchen wurden auf Eis vorgekühlt. Die Zellen wurden in 15 ml oder 50 ml Zentrifugenröhrchen durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde leicht aufgerüttelt und auf Eis gestellt. Schließlich wurde das Einfriermedium zugegeben und die Zellsuspension auf die zuvor beschrifteten Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden in die vorgekühlte spezielle Einfrierbox gestellt und für mindestens 24 Stunden bei -80°C gefroren ehe sie für die Langzeitlagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff transferiert wurden.

3.2.4 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad gegeben. War die Zellsuspension soweit aufgetaut, daß nur noch ein kleines Eisklumpchen vorhanden war, wurde das Kryoröhrchen aus dem Wasserbad entnommen und unter der Sterilbank weiterbearbeitet. Es wurde 1 ml Medium (IMDM mit $2,0 \text{ g/L NaHCO}_3$, 15% Humanserum vom Typ AB, 100 IU/ml Penicillin, $100 \mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 2 mM L-Glutamin) in das Kryoröhrchen gegeben, so daß das Eisklumpchen schmolz. Die Zellsuspension wurde dann mit der Pipette komplett aufgenommen, in ein ebenfalls mit Medium gefülltes 15 ml Falconröhrchen überführt und zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und gezählt.

3.2.5 Magnetische Zellseparation (MACS)

Grundprinzip

Bei dieser Trennmethode werden die Zellen über monoklonale Antikörper direkt oder indirekt mit superparamagnetischen Mikropartikeln (Durchmesser ca. 100 nm) markiert. Die Zellsuspension mit den spezifisch markierten und den unmarkierten Zellen wird auf eine Trennsäule aufgetragen, die sich in einem Permanentmagnetfeld befindet und eine Matrix aus Stahlwolle oder eisenmagnetischen Kugeln besitzt. Während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen, bleiben die markierten in der Säule hängen, aus der sie dann außerhalb des Magnetfeldes herausgewaschen werden können (Abb. 3.1). Das MACS System kann entweder zur Positivselektion oder zur Depletion einer Zellpopulation verwendet werden. Die Zellseparationen wurden gemäß den Herstellerprotokollen von Miltenyi Biotec durchgeführt. Die Art der verwendeten Säulen richtete sich nach der eingesetzten Zellzahl. Es wurden Säulen vom Typ LS (bis 10^8 positive Zellen) oder MS (bis 10^7 positive Zellen) verwendet.

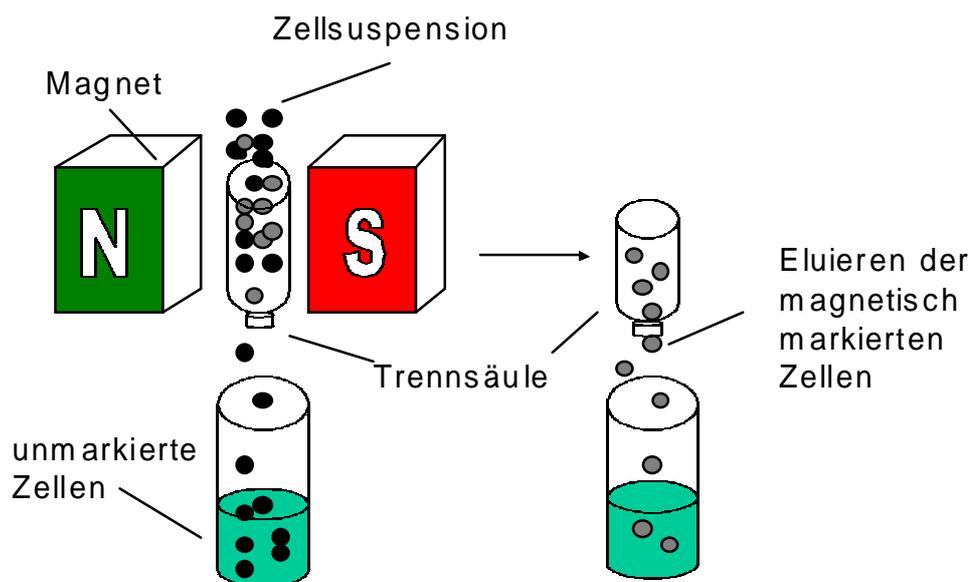


Abb. 3.1 Prinzip der magnetischen Zellseparation (MACS)

Durchführung

Positivselektion von CD34+ Zellen

Die aufgetauten PBMCs der Patienten wurden in dem von Miltenyi vorgegebenen Volumen an MACS Puffer (PBS mit 0,5% BSA) aufgenommen. Nach Zugabe von FcR Blocking Reagent und Hapten Antibody wurde gut gemischt und für fünfzehn Minuten bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde mit MACS Puffer gewaschen und bei 300g für zehn Minuten zentrifugiert. Zu dem aufgerüttelten Pellet wurden die Anti Hapten Micro Beads zugegeben. Nach einer erneuten 15-minütigen Inkubationsphase bei 4° C, der sich wiederum ein Waschschriff anschloß wurde das Zellpellet in MACS Puffer resuspendiert und mittels MACS Säule separiert. Beide Fraktionen, sowohl Positiv- als auch Negativfraktion wurden in IMDM mit AB-Serum aufgenommen.

Positivselektion von CD33+ Zellen

Die aufgetauten PBMCs der Patienten wurden in dem angegebenen Volumen an MACS Puffer aufgenommen, mit den anti-CD33 Beads für fünfzehn Minuten bei 4° C inkubiert. Nach einem Waschschriff wurde das Pellet gut aufgerüttelt, in MACS Puffer resuspendiert und mittels MACS Säule separiert. Die CD33+ Zellen wurden aus der Säule eluiert und wie die Negativfraktion in IMDM mit AB-Serum aufgenommen.

Depletion der CD2+ und CD3+ Zellpopulation

Die aufgetauten PBMCs der Patienten wurden auch hier in dem angegebenen Volumen an MACS Puffer aufgenommen und in einem Schriff mit den anti-CD2 und anti-CD3 Beads für fünfzehn Minuten bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden sie mit MACS Puffer gewaschen und bei 300g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet gut aufgerüttelt, in MACS Puffer resuspendiert und mittels MACS Säule separiert. Die CD2+/CD3+ Zellen wurden aus der Säule eluiert

und wie die Negativfraktion nach Zentrifugation in IMDM mit AB-Serum aufgenommen.

3.2.6 Zellanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS)

Prinzip der Durchflußzytometrie

Das FACS-Gerät (Fluorescence Activated Cell Sorter) kann Zellen nicht nur nach Größe und Granularität einordnen, sondern sie aufgrund ihrer Oberflächenmarkierung auch auftrennen und quantifizieren. Da die monoklonalen Antikörper, die gegen verschiedene Oberflächenproteine gerichtet sind sich mit Fluoreszenzfarbstoffen wie beispielsweise FITC oder PE koppeln lassen, können Zellen innerhalb einer gemischten Population detektiert werden. Das Gemisch der markierten Zellen wird von einer Kapillare angesaugt und durch diese hindurchgedrückt. So entsteht ein feiner Flüssigkeitsstrahl mit vereinzelt Zellen, die sich in bestimmten Abständen befinden. Dieser Flüssigkeitsstrahl passiert einen Laserstrahl, dabei kommt es an den Zellen zu einer Lichtstreuung und die Farbstoffmoleküle, die über die monoklonalen Antikörper an die Zelle gebunden sind werden zur Fluoreszenz angeregt. Empfindliche Photodetektoren messen sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht, wobei ersteres Informationen über Größe und Granularität der Zelle liefert, die Fluoreszenz ermöglicht dagegen Aussagen über die Bindung der monoklonalen Antikörper und damit über die Expression der Oberflächenproteine auf jeder untersuchten Zelle.

Tab. 3.2: Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzkanal	Farbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Fluoreszenz 1 (FL-1)	Fluoreszein-isothiocyanat (FITC)	495 nm	519 nm
Fluoreszenz 2 (FL-2)	Phycoerythrin (PE)	480 nm/565 nm	578 nm
Fluoreszenz 3 (FL-3)	Propidiumjodid (PI)	536 nm	617 nm
Fluoreszenz 4 (FL-4)	Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm

Probenvorbereitung

Die zu untersuchenden Zellen wurden in FACS-Puffer (PBS mit 2% FCS und 0,1% Natrium Azid) gewaschen und auf eine Konzentration von mindestens 200.000 Zellen pro 50 μ l FACS-Puffer eingestellt. Entsprechend der zu untersuchenden Oberflächenantigene wurde die entsprechende Menge an FACS-Röhrchen beschriftet und jeweils ein Aliquot der vorbereiteten Zellsuspension vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Antikörper, wobei sich die Menge nach den Angaben der jeweiligen Hersteller richtete. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis und im Dunkeln wurden die Röhrchen mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und 5 Minuten bei 200g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann bis zu einem Restvolumen von 50 μ l mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Um die abzentrifugierten Zellen wieder in Lösung zu bringen wurden die Zellen auf einem Vortexer aufgeschüttelt. Nach Zugabe von 250 μ l FACS-Puffer waren die Proben bereit zur FACS-Analyse.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm Cell Quest.

3.2.7 Blasten-Proliferations-Assay

Die Blasten wurden in Medium (IMDM mit 2,0 g/L NaHCO₃, 15% Humanserum vom Typ AB, 100 IU/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin) aufgenommen, dem 0,47g/L humanes Transferrin und 5x10⁵ mmol/L 2 β -Mercaptoethanol zugesetzt worden war. Die für die Proliferation benötigten Zytokinkombinationen bzw. -konzentrationen wurden variiert (siehe Ergebnisteil). Um die Proliferationskinetik der Leukämiezellen zu bestimmen, wurden 3-6-fach Wiederholungen pro Konzentration einer 2-fach Verdünnung der Blasten in 96-er Rundbodenplatten ausgebracht. Die eingesetzten Zellzahlen variierten dabei (siehe Ergebnisteil). Die Platten wurden dann bei 37° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (siehe Ergebnisteil) wurden die Platten entnommen und mit 1 μ Ci [³H] Thymidin pro Loch gepulst. Nach weiteren 18 Stunden Inkubation wurde die [³H] Thymidin - Inkorporation gemessen. Dazu wurden die Zellen mittels Zell-Harvester durch eine 96-Loch-Filterplatte gespült. Die

Filterplatten wurden einen Tag lang getrocknet und dann nach Zugabe von 30µl Scintillationscocktail in einem TopCount gemessen. Das Ergebnis wurde in counts pro Minute angegeben.

3.2.8 Blasten-Inhibitions-Assay (Delta-Assay)

Der Proliferations-Assay diente dazu, die optimale Blastenzahl, Zytokinkombination bzw. -konzentration und den günstigsten Tag für den [³H] Thymidin Einbau zu ermitteln. Die Bedingungen für die Blasten, um sie im Delta-Assay einzusetzen, wurden so gewählt, daß mindestens 10.000 counts pro Minute gezählt wurden und die Zellzahl im linearen Bereich der Wachstumskurve lag. Die Blasten wurden in einer 96-er Platte in der im Proliferations-Assay ermittelten optimalen konstanten Zellzahl pro Vertiefung ausgebracht. Die Effektorzellen (PBMCs oder CTLs) wurden in Medium (siehe 2.2.7) aufgenommen und mit 15 Gy bestrahlt um eine eventuelle Proliferation zu verhindern, ohne aber ihre Funktion einzuschränken.

Anschließend wurden sie in drei bis 6-fach Wiederholungen zu den Blasten gegeben. Die Effektor Target ratio variierte dabei (siehe Ergebnisteil). Als Kontrolle dienten Blasten ohne Effektorzellen und bestrahlte PBMCs bzw. CTLs. Nach der, im Proliferations-Assay als optimal ermittelten Kulturdauer wurde 1µCi [³H] Thymidin zu jeder Vertiefung gegeben und nach weiteren 18 Stunden Inkubation wurde dann die [³H] Thymidin - Inkorporation gemessen.

3.2.9 Generierung von DC aus AML Blasten

Die aufgetauten PBMCs des Patienten wurden mit 4×10^6 Zellen in 2ml Medium (X-vivo-15 mit 2mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) in eine 24 Lochplatte ausgebracht. Zur Stimulation der Zellen wurden dem Medium folgende Zytokine zugesetzt: FLT-3 (40 ng/ml), IL-4 (500 U/ml) und GM-CSF (800 U/ml).

Nach vier Tagen wurden diese Zytokine nochmals in der gleichen Konzentration zugegeben. Nach weiteren vier Tagen wurde 1ml des Mediums durch frisches ersetzt. Der bisher verwendete Zytokincocktail wurde um folgende Zytokine erweitert und zugegeben: IL-6 (1000 U/ml), IL1-β (10 ng/ml), PGE₂ (1µg/ml) und TNF-α (200

U/ml). Nach weiteren drei Tagen, also an Tag 11 wurden die Zellen dann geerntet und für die Stimulation der Spenderzellen verwendet.

3.2.10 Stimulation von CD3+Spenderzellen mittels DC aus AML Blasten

Aus den PBMCs des Spenders wurden mittels MACS Separation die CD3+ Zellen isoliert und davon 2×10^6 Zellen mit 5×10^4 DCs, generiert aus den AML Blasten des Patienten, in 2ml Medium (RPMI-1640 mit 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 20% Humanserum vom Typ AB) in einer 24 Lochplatte kokultiviert. Zu dem Medium wurde IL-7 (10 ng/ml) zugegeben. Diese Zugabe wurde nach drei Tagen wiederholt. Nach weiteren drei Tagen wurde 1ml des Mediums ausgetauscht und gleichzeitig wurden IL-2 (25 U/ml) und 5×10^4 DCs zugegeben. An Tag 8 wurde nochmals IL-2 (25 U/ml) zugefügt. Zwei Tage später wurde erneut mit IL-2 (25 U/ml) und 5×10^4 DCs stimuliert, nachdem zuvor die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt wurde. An Tag 14 konnten die stimulierten CD3+ Spenderzellen dann geerntet und mit den AML Blasten des Patienten im Delta-Assay getestet werden.

Die DCs und die CTLs wurden von Frau Dr. Schmetzer zur Verfügung gestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Wachstumsbedingungen für AML Blasten

Voraussetzung für die Durchführbarkeit des Delta-Assay (vgl. Abb. 4.1) war, daß die leukämischen Blasten *in vitro* proliferierten und als relativ reine Population vorliegen mußten. Um dies zu erreichen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welcher Serumzusatz fördert das Wachstum der Blasten, ohne dabei die Effektorzellen zu beeinflussen?
2. Welche Zelldichte ist für ein gutes Wachstum optimal?
3. Welche Zytokine bewirken eine gute Proliferation und in welcher Konzentration müssen sie eingesetzt werden?
4. Was für eine Proliferationskinetik weisen die Blasten auf?
5. Welches Anreicherungsverfahren eignet sich bei Patienten mit niedrigen Blastenzahlen?
6. Gibt es Unterschiede im Wachstum bei frisch entnommenem Material im Vergleich zu asserviertem?

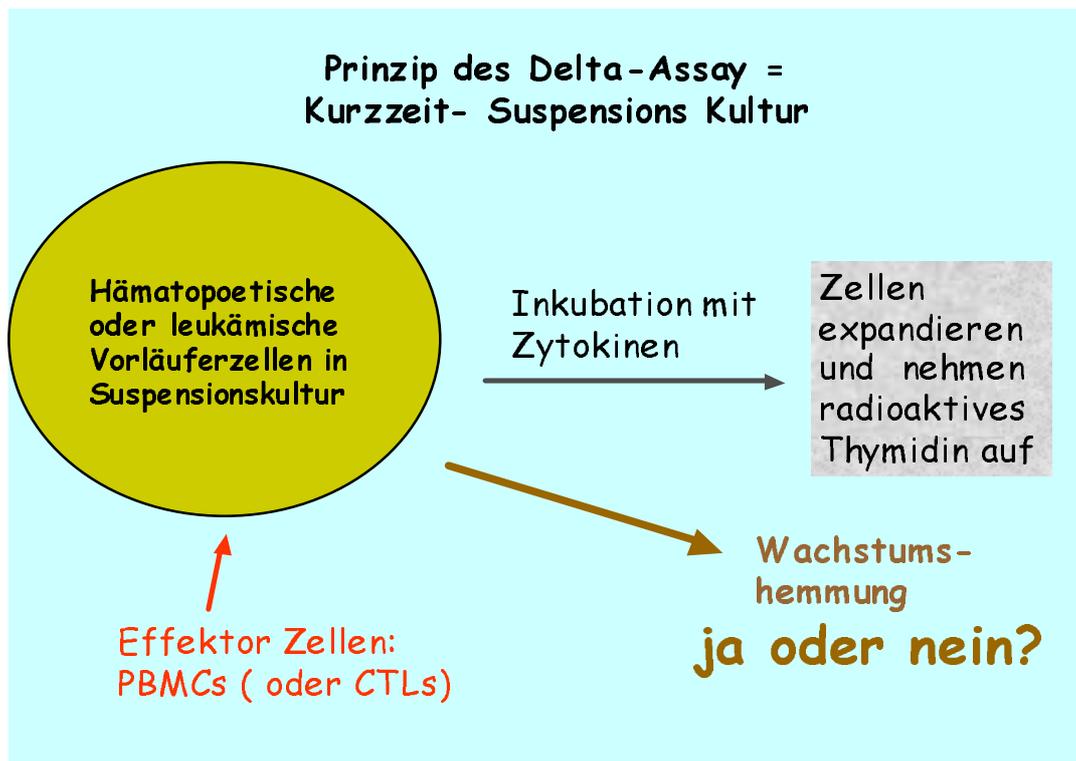


Abb.4.1: Prinzip des Delta-Assay

Wie schon in der Einleitung erwähnt ist die AML eine sehr heterogene Erkrankung. Deutlich wird dies an der in Tabelle 4.1 zusammengestellten Liste an Patienten (im folgenden wird der Begriff Patient auch verwendet, wenn es sich um eine Patientin handelt), deren Blasten für die Untersuchungen verwendet wurden.

Die Patienten unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihres Alters und Geschlechtes, auch Anzahl der Blasten im peripheren Blut, klinischer Status und FAB-Typ variieren stark.

Tab. 4.1: Eingesetztes Patientenmaterial

Patient	Alter	m/w	% Blasten	Klinischer Status	FAB-Typ
1	54	w	79	Rezidiv nach KMT	M4 M5b
2	65	m	82	Rezidiv nach KMT	M6
3	69	m	> 95	frisch diagn. AML	M2
4	53	m	87	frisch diagn. AML	nicht bekannt
5	32	m	79	Rezidiv nach KMT	M2
6	37	m	85	frisch diagn. AML	nicht bekannt
7	60	w	77	frisch diagn. AML	nicht bekannt
8	91	w	> 80	Rezidiv nach Chemo	nicht bekannt
9	51	w	> 80	Rezidiv nach KMT	M1
10	66	m	50	frisch diagn. AML	nicht bekannt
11	60	w	30	sek. AML	nicht bekannt
12	53	m	98	Rezidiv nach Chemo	M2
13	57	m	59	frisch diagn. AML	M1
14	62	m	36	Rezidiv nach Chemo	M2
15	22	m	66	sek. AML	M4
16	51	w	58	frisch diagn. AML	M3

4.1.1 Eignungsprüfung von humanem AB Serum anstelle von fötalem Kälberserum (FCS)

Die Anwendung von FCS kann die Reaktion der Effektorzellen im Delta-Assay beeinflussen (siehe Diskussion). Daher wurde die Einsetzbarkeit von Humanserum an Blasten eines Patienten (Patient 1, Tab. 4.1) getestet. Dazu wurde ein Blasten-Proliferations-Assay durchgeführt. Die Blasten wurden in zytokinhaltigem (SCF, GM-CSF, IL-3) Medium welches entweder FCS oder AB Serum enthielt auf einer 96er Rundbodenplatte in unterschiedlicher Zellzahl, kultiviert. Nach 5 Tagen wurde ^3H -Thymidin zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 18 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und der ^3H -Thymidineinbau gemessen. Da nur sich teilende Zellen dieses radioaktive Nukleotid einbauen, ist dies ein Maß für die Proliferation der Zellen, gemessen in counts / min. Wie in Abbildung 4.2 ersichtlich, war die Proliferation bei den Zellen, die mit AB Serum kultiviert wurden fast doppelt so hoch wie bei den Blasten mit FCS-haltigem Medium. Für die weiteren Versuche wurde daher ausschließlich Humanserum vom Typ AB verwendet.

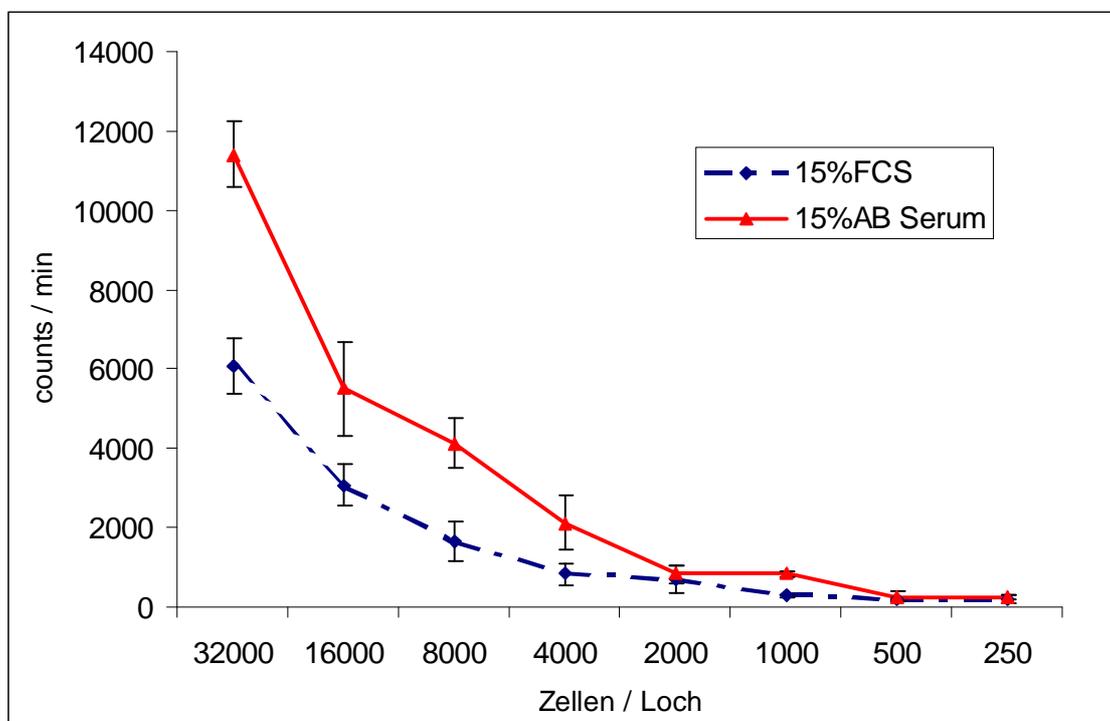


Abb. 4.2: Wachstumsvergleich von Blasten eines Patienten mit FCS bzw. humanem AB Serum, bei unterschiedlicher Zellzahl. Fehlerbalken als Standardabweichung, n = 3.

4.1.2 Ermittlung der optimalen Zelldichte

Das Prinzip des Delta-Assay beruht darauf, daß Spenderzellen das Wachstum von leukämischen Blasten inhibieren können. Eine wichtige Voraussetzung für das Blastenwachstum ist die richtige Wahl der Zellzahl / Loch. Setzt man die Blasten zu dicht ein, inhibieren sie sich wegen zu raschem Nährstoffverbrauch und zu starker Ansammlung von schädlichen Stoffwechselprodukten selbst und der Wachstumsrückgang würde dann fälschlicherweise den Effektorzellen zugeschrieben werden. Es mußte also der lineare Bereich der Wachstumskurve ermittelt werden. Dazu wurden die Blasten von Patient 2 (Tab. 4.1) in einer seriellen 2-fachen Verdünnung von 256000 bis 250 Zellen / Loch einer 96-er Platte ausgebracht. Um die Proliferation zu induzieren wurden, wie schon zuvor beim Serumtest, Zytokine eingesetzt. Wie aus Abbildung 4.3 ersichtlich, tritt ab einer Zellzahl von 32000 Zellen/Loch ein Wachstumsrückgang auf. Der lineare Teil der Wachstumskurve liegt bei diesem Patienten im Bereich zwischen 2000 und 8000 Zellen / Loch. Die Blasten dieses Patienten wiesen ein insgesamt sehr starkes Wachstum auf. Für die folgenden Experimente wurde der Bereich so gewählt, daß die oberste Zellkonzentration 40000 Zellen / Loch nicht überschritt.



Abb. 4.3: Wachstumskurve der Blasten von Patient 2 in Abhängigkeit von der Zellzahl; Fehlerbalken als Standardabweichung, n=4

4.1.3 Austestungen der Zytokine

Wie bereits in Abschnitt 2.2.4 erwähnt, verfügen einige AML Blasten über eine autokrine Produktion an Wachstumsfaktoren, die meisten benötigen jedoch die Zugabe von Zytokinen, um in vitro zu proliferieren.

Es wurden folgende Zytokine, in unterschiedlicher Kombination und Konzentration verwendet: SCF, IL-3, GM-CSF, G-CSF und EPO.

Angelehnt an einen Artikel von Bruserud (Bruserud et al., 2001) wurden zunächst SCF (50 ng/ml), GM-CSF (100 ng/ml) und IL-3 (25 ng/ml) kombiniert. Abbildung 4.4 zeigt die Auswirkung der Zugabe dieser Zytokine auf das Wachstum von AML Blasten dreier Patienten (Patienten 2, 3, 4, Tab. 4.1).

Alle drei Patienten zeigten bei der Zugabe von SCF, GM-CSF und IL-3 eine Zunahme des Wachstums, allerdings in unterschiedlichem Maße. Da die Patienten 3 und 4 ein eher geringes Wachstum aufwiesen, wurde versucht durch Erweiterung der Zytokinpalette eine Steigerung der Proliferation zu erreichen.

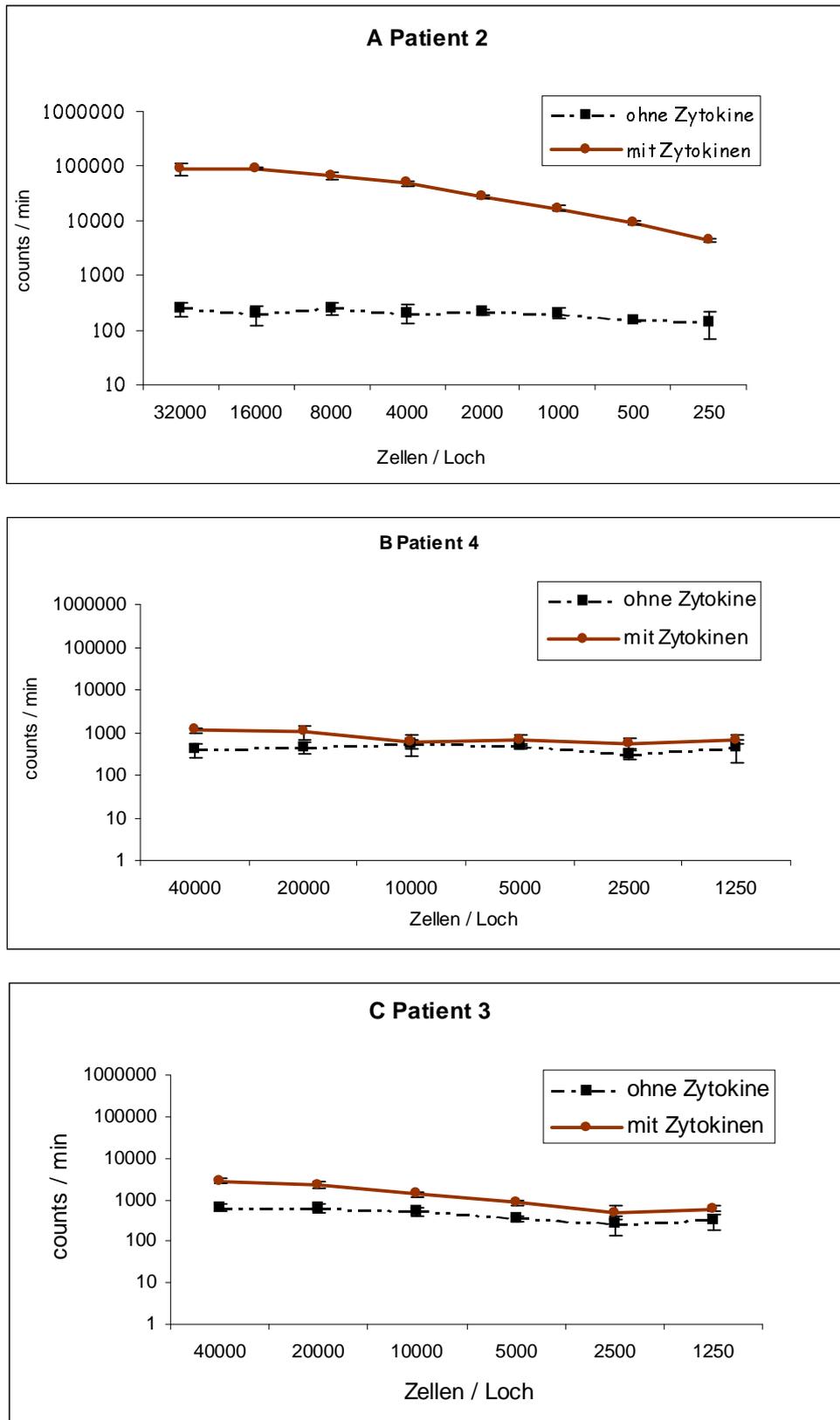
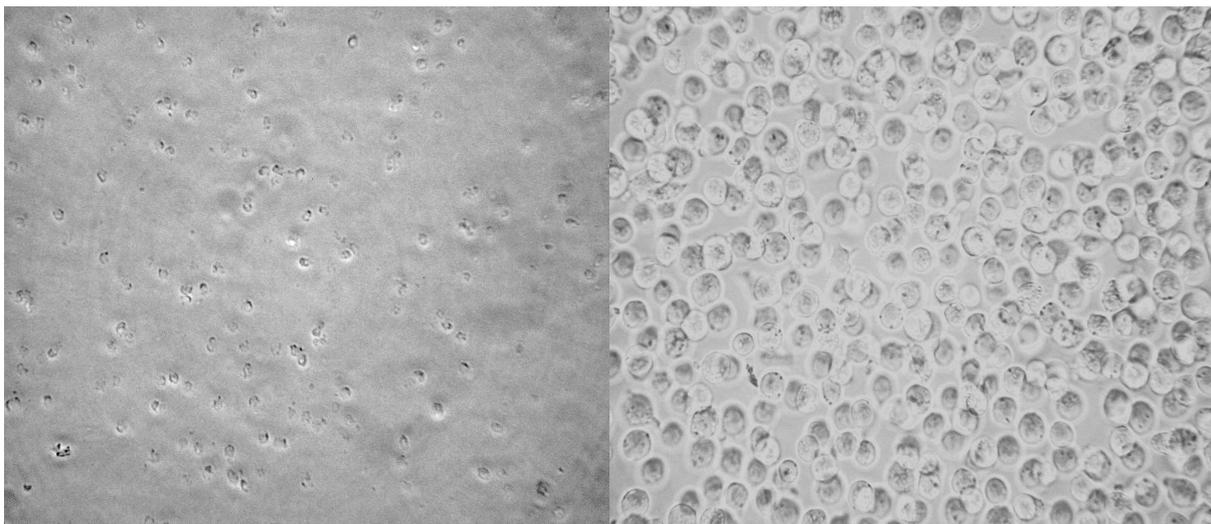


Abb. 4.4 A, B und C: Wachstumskurve der AML Blasten von Patient 2, 4, 3 mit und ohne Zugabe von Zytokinen (50 ng/ml SCF, 100 ng/ml GM-CSF und 25 ng/ml IL-3) bei unterschiedlicher Zellzahl. Logarithmische Skalierung für die counts / min. Fehlerbalken als Standardabweichung, n = 4.

In Anlehnung an die Arbeit von Smit (Smit et al., 1998) wurden folgende Zytokine verwendet:

50 ng/ml SCF, 100 ng/ml GM-CSF, 50 ng/ml IL-3, 100 ng/ml G-CSF und 2 U/ml EPO

Für eine erste Austestung wurden Stammzellen (CD34+) eines gesunden Spenders eingesetzt. Wie in Abbildung 4.5 bzw. 4.6 gezeigt, setzte durch die Zytokine ein starkes Wachstum ein. Abbildung 4.4 zeigt die CD34+ Zellen in Kultur, aufgenommen an Tag 5. Die Zellen in Bild (a) wurden ohne Zytokine kultiviert. Bei einer Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau ließen sich keine lebenden Zellen mehr nachweisen. Bild (b) zeigt die gleichen Zellen mit Zusatz von Zytokinen. Im Vergleich zur eingesetzten Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml hat sich bis Tag 5 die Zellzahl um den Faktor 12 erhöht. Bei der Färbung mit Trypanblau waren hier zu 95% lebende Zellen vorhanden.



a

b

Abb. 4.5: Lichtmikroskopische Aufnahmen der CD34+ Zellen eines gesunden Spenders bei 320-facher Vergrößerung. Beide Aufnahmen sind an Tag 5 gemacht worden. Bild (a) zeigt die Zellen ohne, Bild (b) mit Zytokinen.

Die Messung der Proliferation der Stammzellen mittels Einbau von ^3H -Thymidin ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Ohne Zytokinzusatz (gestrichelte Linie) findet kein Einbau des radioaktiven Nukleotids statt, das heißt sie proliferieren nicht. Mit Zytokinen steigt die Proliferation in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl stark an, was sich in der Höhe der gemessenen counts / min ausdrückt (durchgehende Linie).

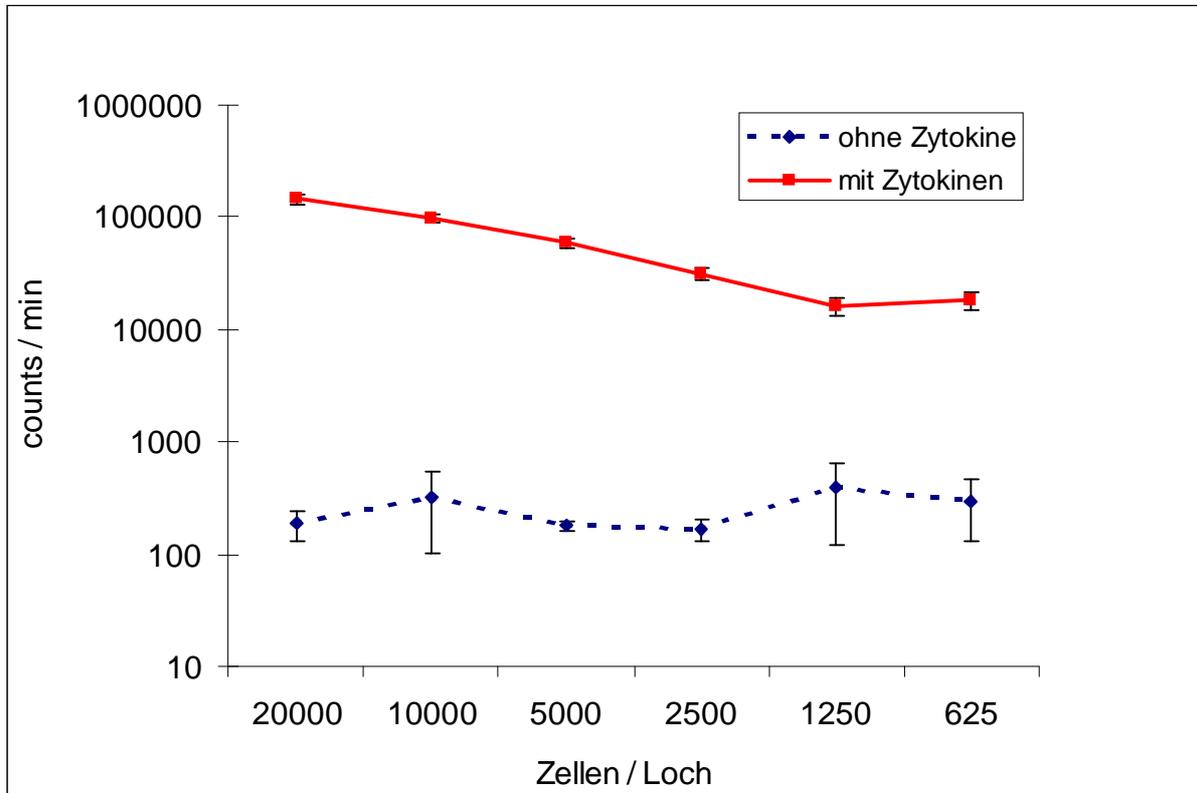


Abb. 4.6: Wachstumskurve der CD34+ Zellen eines gesunden Spenders mit und ohne Zugabe von Zytokinen (50 ng/ml SCF, 100 ng/ml GM-CSF, 50 ng/ml IL-3, 100 ng/ml G-CSF und 2 U/ml EPO) bei unterschiedlicher Zellzahl. Die counts / min sind logarithmisch dargestellt. Fehlerbalken als Standardabweichung, n = 6.

Diese Zytokinkombination wurde anschließend bei Patient 3 und 4 eingesetzt. Die Blasten beider Patienten zeigten, wie in Abbildung 4.7 ersichtlich immer noch ein eher geringes Wachstum, aber besser als beim ersten Versuch mit einer Kombination aus nur SCF, GM-CSF und IL-3.

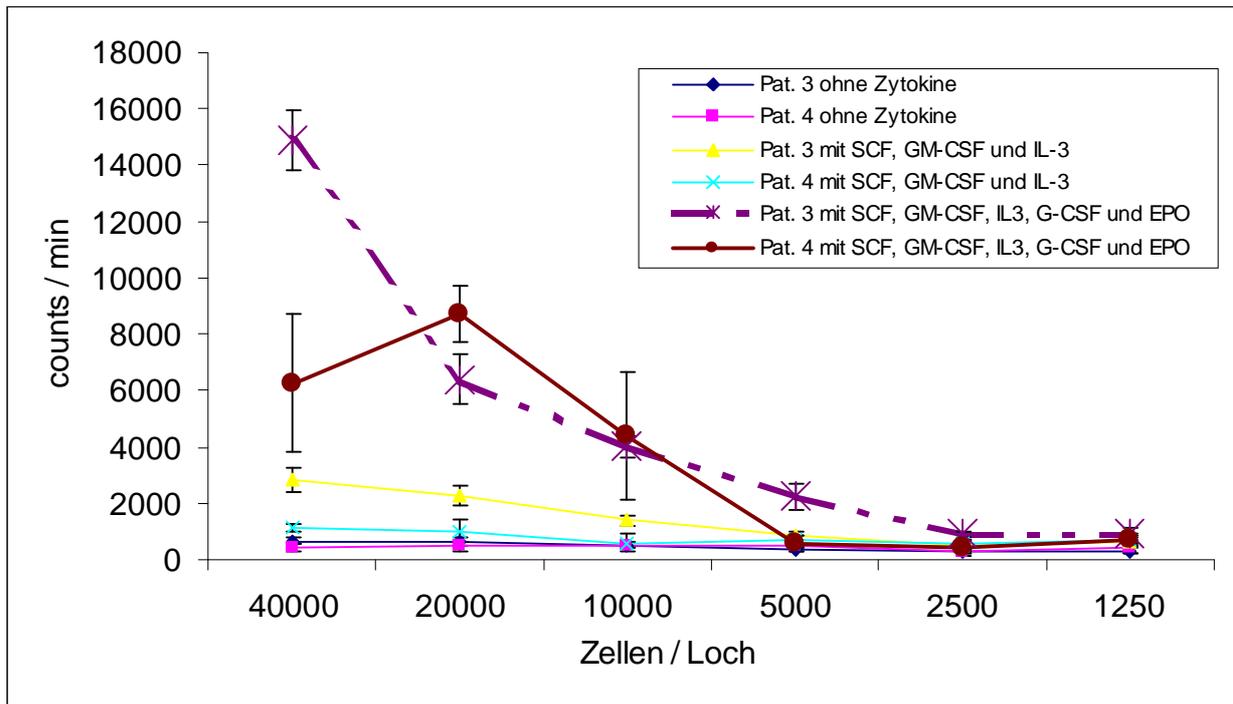


Abb. 4.7: Wachstumskurve der AML Blasten von Patient 3 und 4 mit und ohne Zugabe von Zytokinen in zwei verschiedenen Kombinationen bei unterschiedlicher Zellzahl. Fehlerbalken als Standardabweichung, n = 4.

Aus diesem Grund wurde für alle folgenden Ansätze die 5-er Zytokinkombination gewählt, um den Delta-Assay auch mit schlecht wachsenden Blasten durchführen zu können.

Um sicher zu stellen, daß die Sättigungsgrenze hinsichtlich der Wachstumsfaktoren erreicht war, wurden bei fünf Patienten steigende Mengen an Zytokinen eingesetzt bis zum maximal 8-fachen der Ausgangskonzentration. Die Zellzahl wurde für alle fünf Patienten konstant mit 1×10^4 Zellen/Loch gewählt. Keine der Konzentrationserhöhungen hatte aber eine Steigerung der Proliferation zur Folge. Das heißt, mit den ursprünglich gewählten Konzentrationen befanden sich die Blasten bezüglich der Zytokine im Sättigungsbereich (Abb. 4.8).

Als Nebeneffekte sind deutlich patientenspezifische Unterschiede in der Stärke der durch die Zytokine ausgelösten Proliferation festzustellen.

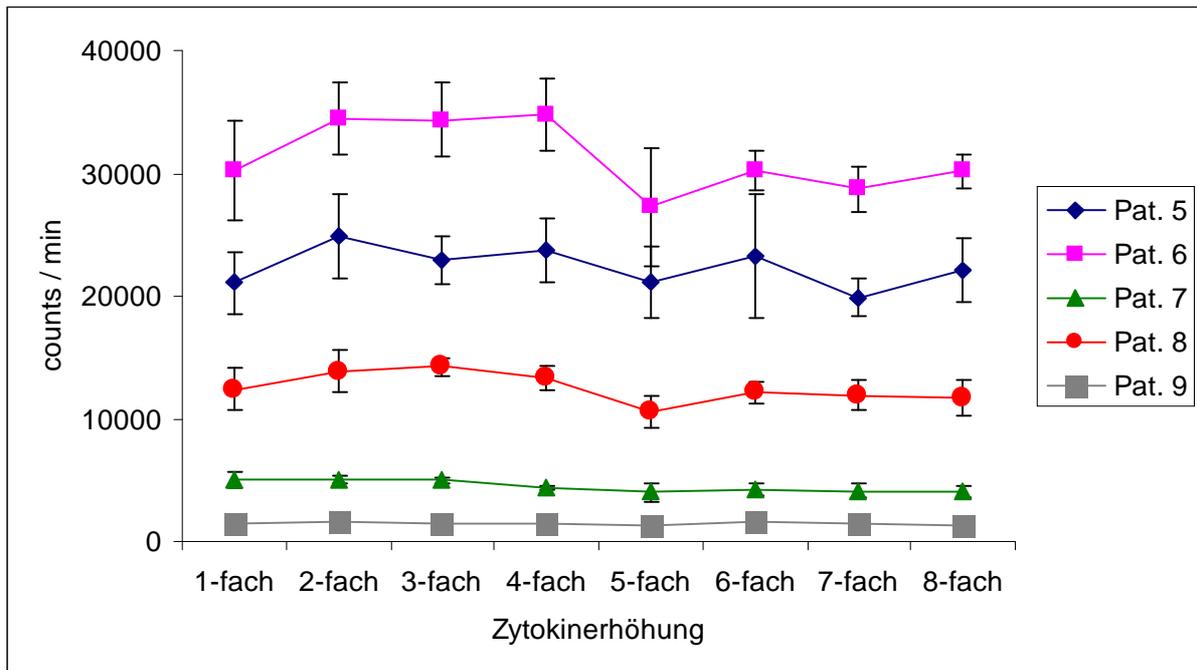


Abb. 4.8: Bestimmung der Sättigungskonzentration der eingesetzten Zytokine bei AML Blasten von fünf verschiedenen Patienten (Pat. 5-9 aus Tab. 3.1). Die Ausgangszellzahl wurde konstant mit 1×10^4 Zellen / Loch gewählt. Fehlerbalken als Standardabweichung, $n = 9$.

4.1.4 Blasten und ihre Proliferationskinetik

Ein wichtiges Kriterium für die Überprüfung eines wachstumshemmenden Einflusses der Spenderzellen im Delta-Assay ist, daß sich die Blasten im linearen Bereich ihrer Wachstumskurve befinden. Würde der Test erst durchgeführt, wenn die Blasten sich bereits in der Absterbephase befinden, würde dies einen hemmenden Einfluß der Spenderzellen vortäuschen. Aufgrund der Heterogenität der AML lag die Vermutung nahe, daß die Blasten hinsichtlich der Proliferationskinetik sich nicht einheitlich verhalten würden. Um eine erste Vorstellung über die Kinetik zu bekommen, wurde zunächst überprüft, wann die Hauptwirkung der Zytokine einsetzt. Dazu wurden die Blasten von Patient 6, 10 und 11 (Tab. 4.1) verwendet. Ein Teil der Blasten wurde nur über nacht mit den Zytokinen inkubiert, die am nächsten Tag in einem Waschschrift entfernt wurden, der andere Teil bekam Zytokine für die gesamte Kulturzeit (5 Tage). Als Kontrolle dienten Blasten des Patienten, die ohne Zytokine inkubiert wurden. Das Ergebnis (vgl. Abb. 4.10) aus diesem Versuch war, daß die

Hauptwirkung der Zytokine gleich zu Beginn eintritt. Die Blasten, die nur über Nacht mit den Zytokinen inkubiert wurden erreichten schon 50% der counts, die am Ende des Versuchs gemessen wurden.

In Abbildung 4.9 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Blasten von Patient 6 dargestellt, die an Tag 5 gemacht wurden. Bei den in 4.9 a dargestellten, ohne Zytokine kultivierten Zellen sieht man, daß die Zellen bereits beginnen in Apoptose zu gehen. Ihre Form wird unregelmäßig und im Medium reichert sich Zelldetritus der abgestorbenen Zellen an. In 4.9 b sieht man im Vergleich dazu die mit Zytokinen stimulierten Blasten. Sie haben eine gleichmäßige runde Form, es sind nur sehr vereinzelt tote Zellen vorhanden und die Zellen liegen aufgrund der Proliferation dichter.

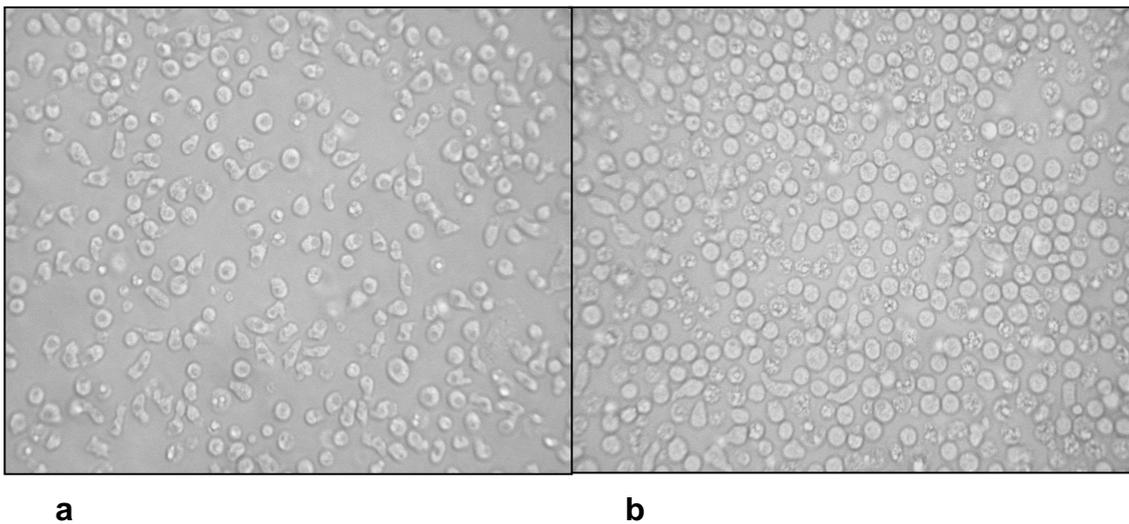


Abb. 4.9: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Blasten von Patient 6 bei 320-facher Vergrößerung mit (a) und ohne (b) Zusatz von Zytokinen an Tag 5.

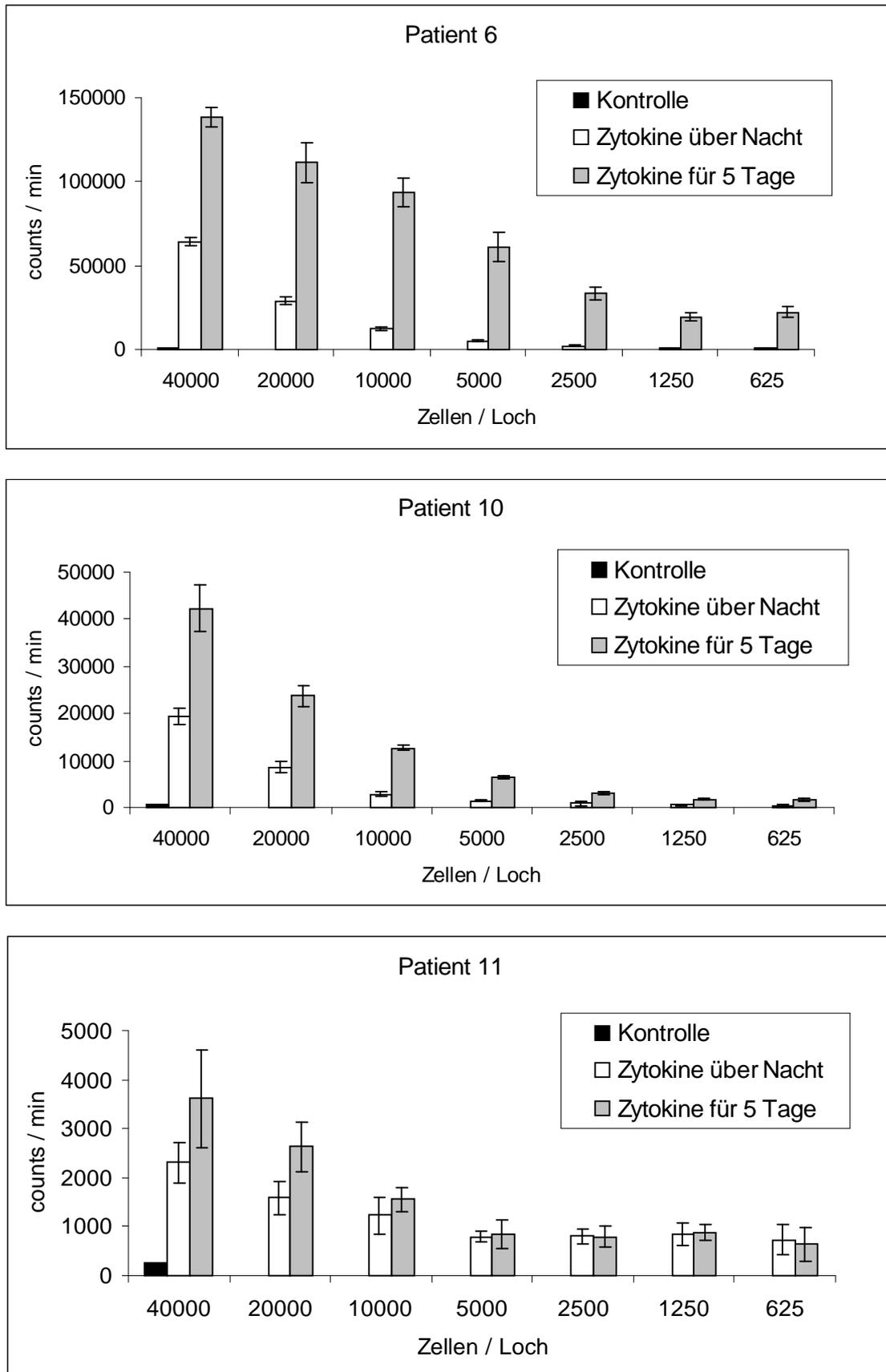


Abb. 4.10: Wirkungseintritt der Zytokine bei drei verschiedenen Patienten (6, 10 und 11). Der Übersichtlichkeit wegen unterschiedliche Skalierung der y-Achsen. Fehlerbalken als Standardabweichung, n = 9.

Der in Abbildung 4.10 dargestellte Versuch zeigte deutlich, daß die Hauptwirkung der Zytokine gleich zu Beginn der Inkubation stattfindet, er lieferte aber noch keine Information über den Proliferationsverlauf der Blasten während der 5-tägigen Kulturzeit. Um den optimalen Zeitpunkt für den Einbau von ^3H -Thymidin zu ermitteln wurden von den Blasten von Patient 5 sechs parallele Ansätze gemacht, so daß jeden Tag eine 96-er Platte für den Einbau von ^3H -Thymidin zur Verfügung stand. Abbildung 4.11 zeigt den Wachstumsverlauf der Blasten in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl. Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, müssen sich die Blasten für den Einsatz im Delta-Assay im linearen Bereich ihrer Wachstumskurve befinden. Bei diesem Patienten ist somit der optimale Zeitpunkt für den Einbau von ^3H -Thymidin an Tag 2, da ab Tag 3 das Wachstum bereits rückläufig ist.

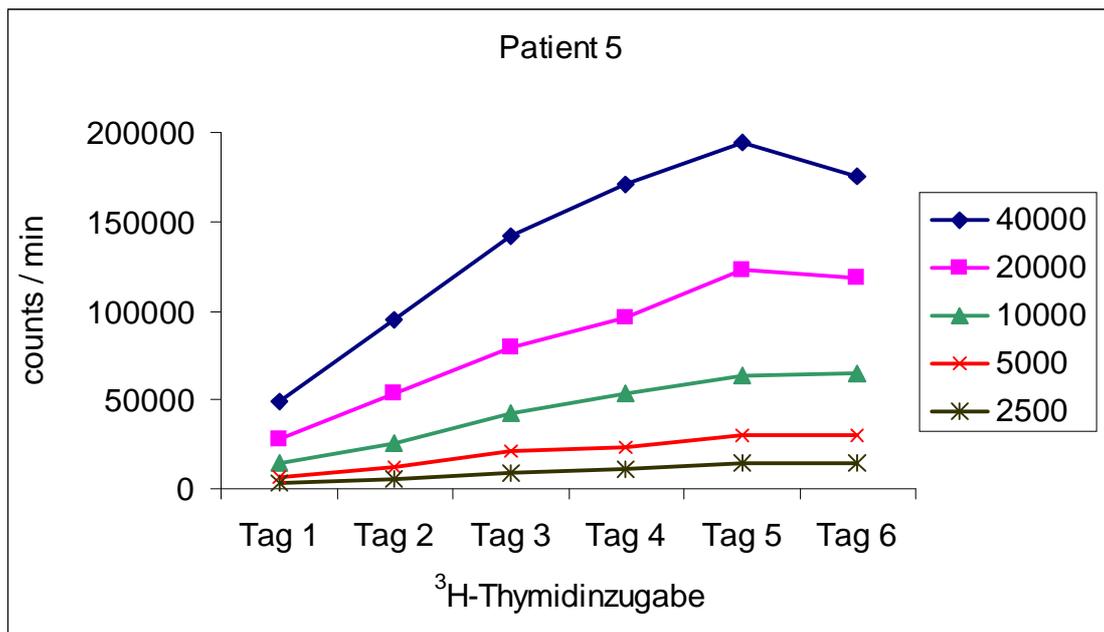


Abb. 4.11: Proliferationskinetik von Blasten aus Patient 5 über sechs Tage in Abhängigkeit von der Zellzahl. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert aus sechs Messungen dar. Auf Fehlerbalken wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet.

Es wurde von allen Patienten, soweit genügend Material zur Verfügung stand, eine Proliferationskinetik durchgeführt. Dabei traten starke patientenspezifische Unterschiede auf, die hier nur am Beispiel zweier Patienten gezeigt werden sollen. Abbildung 4.12 zeigt den bei Patient 7 ab Tag 3 starken Wachstumsrückgang, bei Patient 12 dagegen ein noch bis Tag 5 zunehmendes Wachstum. Für den Einsatz im Delta-Assay heißt das im Fall von Patient 7, daß der Einbau von ^3H -Thymidin an Tag 2 erfolgen sollte, bei Patient 12 hingegen an Tag 4.

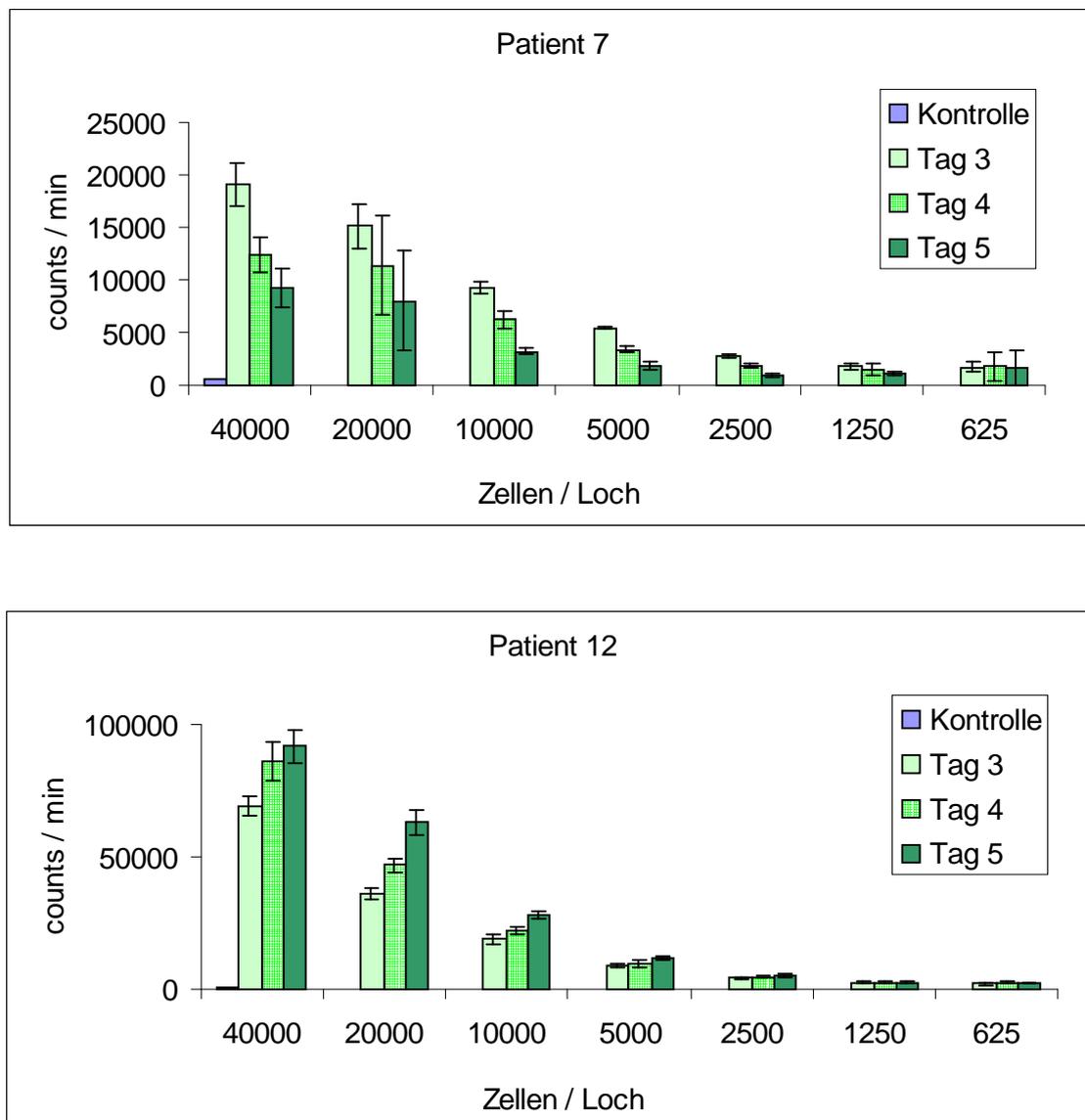


Abb. 4.12: Unterschiede in der Proliferationskinetik von Patient 7 und 12. Als Kontrolle dienten Blasten ohne Zytokine. Fehlerbalken als Standardabweichung, n = 6.

4.1.5 Anreicherungsverfahren bei Patienten mit niedrigen Blastenzahlen

Wie aus Tabelle 4.1 ersichtlich war der prozentuale Anteil der Blasten im Blut der Patienten sehr unterschiedlich. Für den Einsatz im Delta-Assay müssen die Blasten als möglichst reine Population vorliegen. Das bedeutet, daß bei Patienten mit einem Blastenanteil unter 80 % in jedem Fall eine Aufreinigung der Zellen stattfinden muß. Es kommen dafür grundsätzlich zwei Möglichkeiten in Betracht, die beide auf dem Prinzip der magnetischen Zellseparation beruhen. Die eine Möglichkeit ist die Positivselektion der Blasten. Die andere Möglichkeit ist die Entfernung der störenden Zellen mittels Depletionsverfahren.

Die Blasten von AML Patienten variieren bezüglich ihres Immunphänotyps, das heißt nicht bei allen Patienten können die gleichen Oberflächenmoleküle zur Selektion verwendet werden. Die Positivselektion setzt also eine genaue Analyse des Immunphänotyps voraus, will man den überwiegenden Teil der Blasten isolieren. Da bei den meisten Patienten CD33 und / oder CD 34 positive Blasten vorkommen, wurden diese Antigene für die Positivselektion ausgewählt. In Abbildung 4.13 ist am Beispiel von Patient 15 die Proliferation der mit CD34 angereicherten Blasten gezeigt. Dieser Patient hatte einen Blastenanteil von 66 % im peripheren Blut, davon waren 83 % CD34 positiv. Die Reinheit der positiv selektionierten Blasten wurde am FACS überprüft (Abb. 4.14).

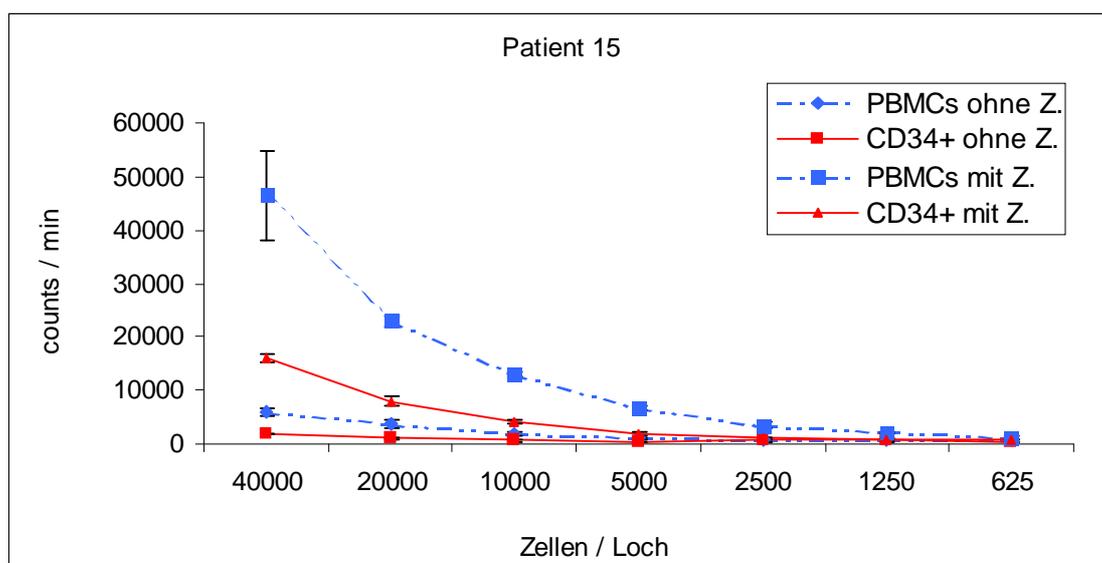


Abb. 4.13: Wachstumsraten der CD34+ Zellen von Patient 15 im Vergleich zu den unbehandelten PBMCs. Beide Zellfraktionen wurden jeweils mit und ohne Zytokine inkubiert. Fehlerbalken als Standardabweichung, n = 4. Fehlerbalken teilweise überdeckt.

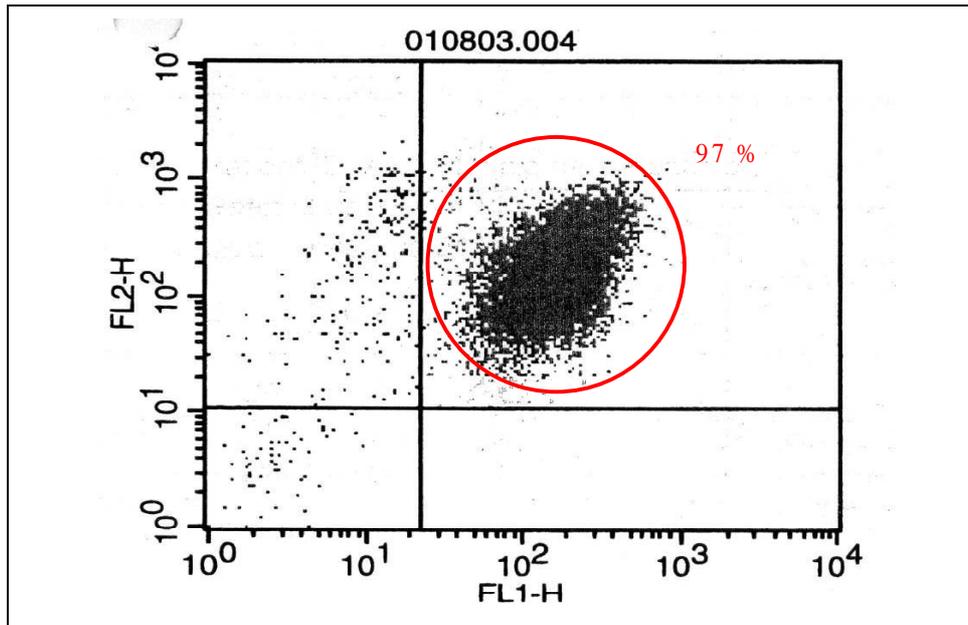


Abb. 4.14: FACS – Analyse der CD34 positiven Zellen. FL1: CD34-FITC, FL2: CD33-PE.

Die Depletion der T-Zellen durch die Kombination von CD2 und CD3 Beads ist am Beispiel von Patient 14 gezeigt. Dieser Patient hatte 36 % Blasten im peripheren Blut. Die erfolgreiche Depletion der T-Zellen und die dadurch gleichzeitige Anreicherung der Blasten sind in Abbildung 4.16 dargestellt. Das Wachstumsverhalten der Blasten nach der Depletion der T-Zellen zeigt Abbildung 4.15.

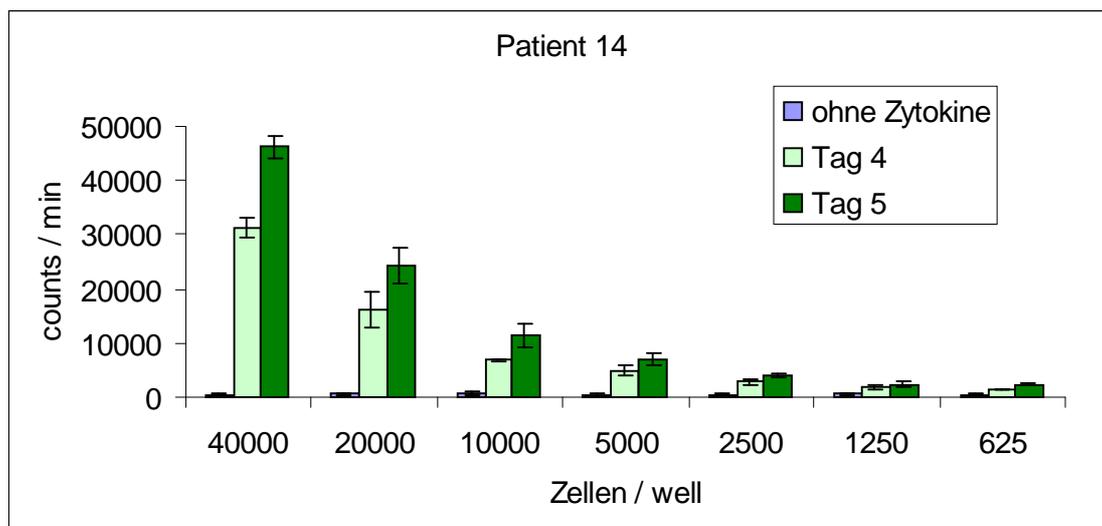
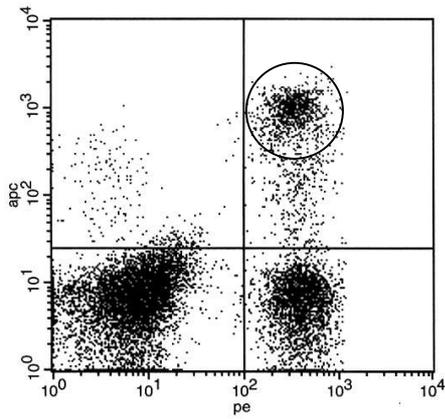
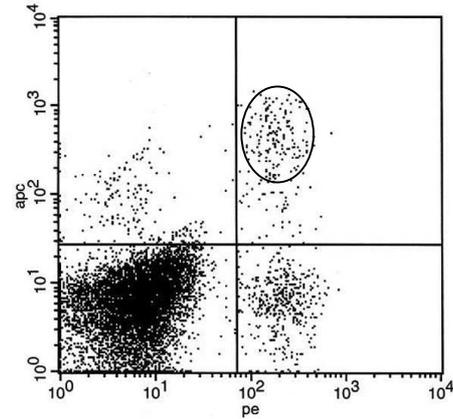


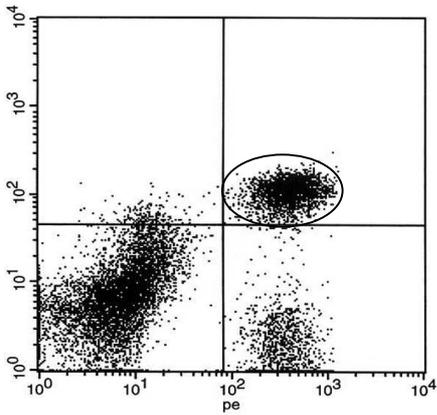
Abb. 4.15 Das Wachstumsverhalten der Blasten von Patient 14 nach der T-Zelldepletion. ³H-Thymidineinbau an Tag 4 bzw. an Tag 5. Fehlerbalken als Standardabweichung, n = 3.



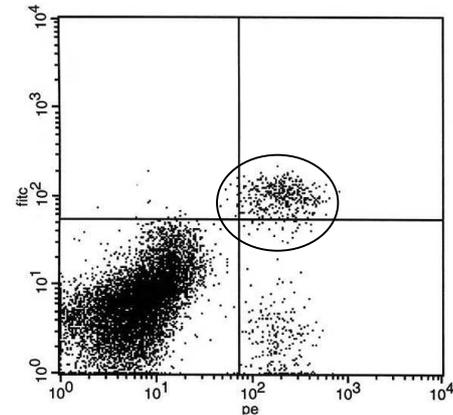
CD8 Zellen vor Depletion: **13,26%**



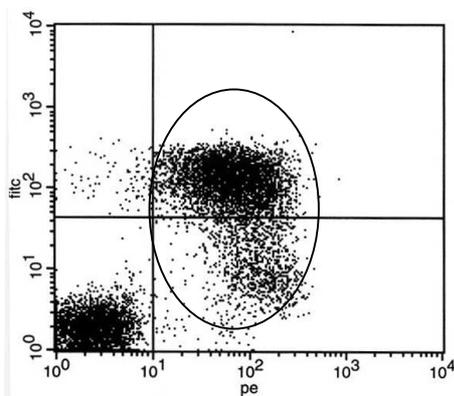
CD8 Zellen nach Depletion: **2,51%**



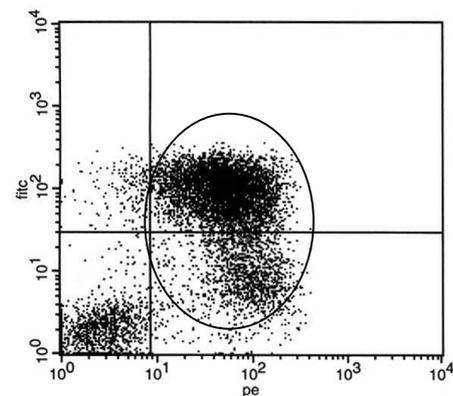
CD4 Zellen vor Depletion: **25,95%**



CD4 Zellen nach Depletion: **4,12%**



CD33/CD34 Zellen vor Depl.: **57,03%**



CD33/CD34 Zellen nach Depl.: **85%**

Abb. 4.16: FACS-Analysen der T-Zelldepletion von Patient 14
 Prozentangaben (eingekreister Bereich) bezogen auf die Gesamtzahl der analysierten Zellen; linke Spalte jeweils vor, rechte Spalte jeweils nach der Depletion der T-Zellen.

4.1.6 Unterschiede zwischen frischem und aufgetautem Blastenmaterial

Für den Delta-Assay werden sowohl Blasten des Patienten, als auch Zellen des Spenders benötigt. Das Problem dabei liegt darin, daß man beides selten zum gleichen Zeitpunkt zur Verfügung hat. Meistens hat man zunächst die Blasten und erst später Material vom Spender. Das bedeutet, daß man die Zellen des Patienten einfrieren muß, um sie dann einzusetzen, wenn das Spendermaterial zur Verfügung steht. Die Frage die es hierbei zu beantworten galt war, ob der Einfrierprozeß einen Einfluß auf das spätere Wachstum der Blasten hat. Dazu wurden Patientenzellen von drei Patienten (Pat. 7, 9, 12, Tab. 4.1) sowohl frisch, als auch aufgetaut im Versuch eingesetzt.

Bei allen drei Patienten blieb die Proliferationskinetik unverändert. Bei den Proliferationsraten gab es patientenspezifische Unterschiede. Die Blasten von Patient 7 erreichten in beiden Fällen die gleichen counts / min. Bei Patient 9 und 12 bewirkte das Einfrieren eine Abnahme in der Proliferationsrate (vgl. Abb. 4.17).

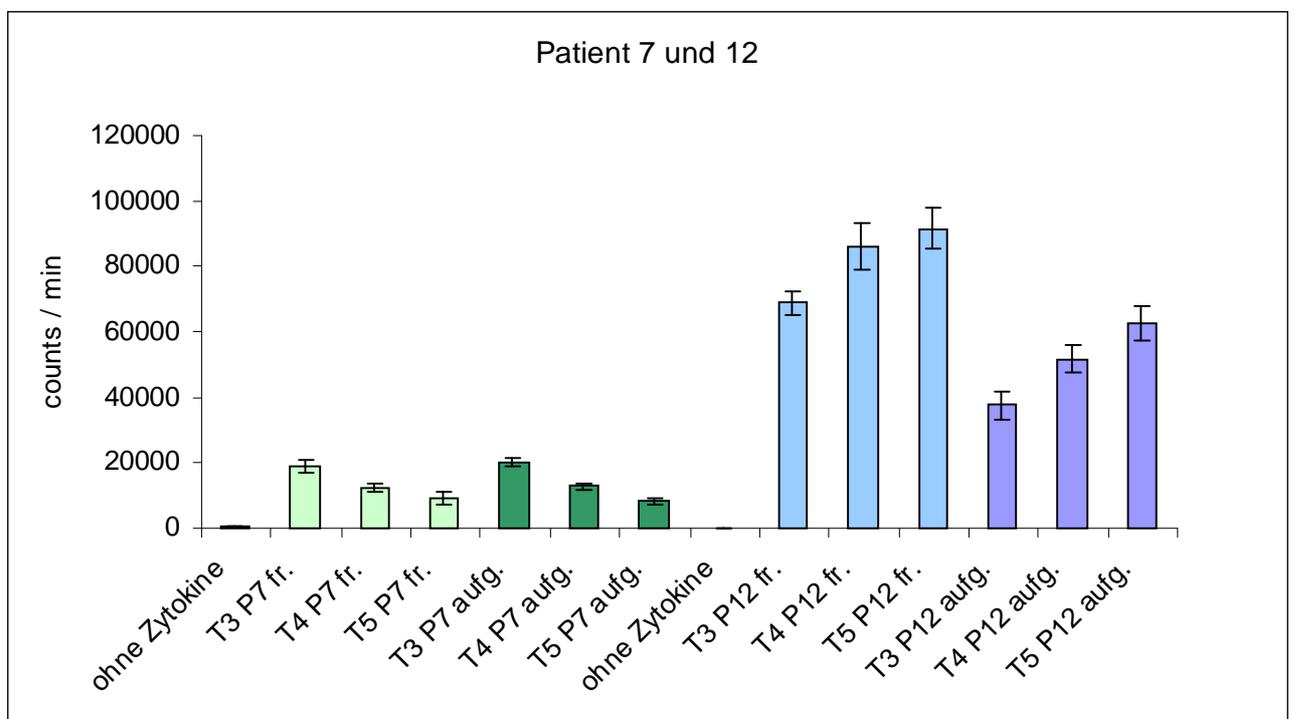


Abb. 4.17: Vergleich von Proliferationsrate und Proliferationskinetik bei 40000 Blasten von Patient 7 und 12; jeweils der Vergleich von frischem (fr.) und aufgetautem (aufg.) Material. ^3H -Thymidin-Einbau an Tag 3, 4 und 5. Fehlerbalken als Standardabweichung, n = 4. T steht für Tag, P für Patient.

Bisher wurden die für die Blastenproliferation entscheidenden Kriterien aufgezeigt und erläutert. In Tabelle 4.2 sind die Proliferationsdaten der getesteten Patienten im Überblick dargestellt. Die Heterogenität der AML spiegelt sich in den Ergebnissen wider.

Tab. 4.2: Zusammenstellung der Ergebnisse der Proliferationsassays

Patient	Bemerkungen	Proliferation nach Zytokinzusatz ja / nein	Zellzahl/well für Einsatz im Delta-Assay	Absolutwert (counts/min) (Bei Zellzahl für Delta- Assay)	Optimaler Tag für Einbau von ³H- Thymidin
1	Nur für Serumtest verwendet	ja			
2		ja	4000	48762 ± 6310	Tag 4
3	Nur für Test- etablierung ver- wendet	ja			
4	„	ja			
5	Im Delta-Assay eingesetzt	ja	10000	26027 ± 1522	Tag 2
6	Im Delta-Assay eingesetzt	ja	5000	83297 ± 2316	Tag 5
7		ja	20000	15106 ± 2147	Tag 2
8		ja	5000	14218 ± 892	Tag 3
9	autokrine Proliferation	ja	40000	8803 ± 604	Tag 3
10	Im Delta-Assay eingesetzt	ja	5000	7434 ± 923	Tag 5
11		zu gering	(40000)	(3621 ± 1001)	
12		ja	10000	22116 ± 1727	Tag 4
13		ja	40000	10644 ± 400	Tag 3
14		ja	20000	16140 ± 3356	Tag 4
15	Nur für Test- etablierung ver- wendet	ja			
16		ja	40000	8711 ± 807	Tag 5

4.2 Bedingungen für die Zugabe der Spenderzellen

Nachdem die Grundvoraussetzung für die Durchführung des Delta-Assay, die Proliferation der Blasten gewährleistet war, konnten die Bedingungen für die Zugabe der Spenderzellen ausgetestet werden.

Im Gegensatz zu den Blasten sollte eine Proliferation und damit ein ^3H -Thymidineinbau der Spenderzellen nicht stattfinden. Um dies zu erreichen sollten die Spenderzellen, ähnlich wie bei einer mixed lymphocyte culture (MLC) bestrahlt werden. Da es beim Delta-Assay aber darauf ankommt, daß die Spenderzellen (=Effektorzellen) ihre sonstigen Funktionen behalten, mußte die Strahlendosis ermittelt werden, die einerseits groß genug ist, die Proliferation der Effektorzellen zu verhindern, andererseits aber deren zytotoxische Funktionen möglichst nicht beeinträchtigt.

Dazu wurden PBMCs von drei gesunden Spendern (buffy coats vom Roten Kreuz) verwendet. Sie wurden jeweils mit 10, 15, 20, 25 und 30 Gray (Gy) bzw. als Kontrolle unbestrahlt in 96er Platten ausgebracht. Die Zellzahl wurde auf 1×10^5 Zellen / Loch eingestellt. Anschließend wurden die Zellen, von denen jeweils ein Drittel mit PHA (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ein Drittel mit PHA (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und IL-2 (50 U/ml) und das verbliebene Drittel als unstimulierte Kontrolle für fünf Tage unter Blastenbedingungen inkubiert. Am Tag fünf wurde der Proliferationsassay mit ^3H -Thymidin durchgeführt.

Dabei zeigte sich (Abb. 4.18), daß unstimulierte PBMCs nicht proliferieren, daß aber bei stimulierten PBMCs, also z.B. bei CTLs sehr wohl eine Proliferation auftritt, die jedoch durch eine Bestrahlung ausgeschaltet bzw. deutlich reduziert werden kann. Bereits bei einer Dosis von 10 Gray (Gy) tritt eine deutliche Reduzierung der Proliferation ein. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden bei den folgenden Experimenten alle Spenderzellen mit einer Dosis von 15 Gy bestrahlt, um eine Proliferation ganz sicher auszuschalten. Die bestrahlten Spenderzellen wurden bei jedem für diese Arbeit durchgeführten Experiment zur Kontrolle mitgemessen. Es wurden nie mehr als 1000 counts / min, meist deutlich weniger gemessen. In den nachfolgend gezeigten Grafiken sind die bestrahlten Spenderzellen nicht dargestellt, da sie sich aufgrund der niedrigen counts kaum von der Grundlinie abheben.

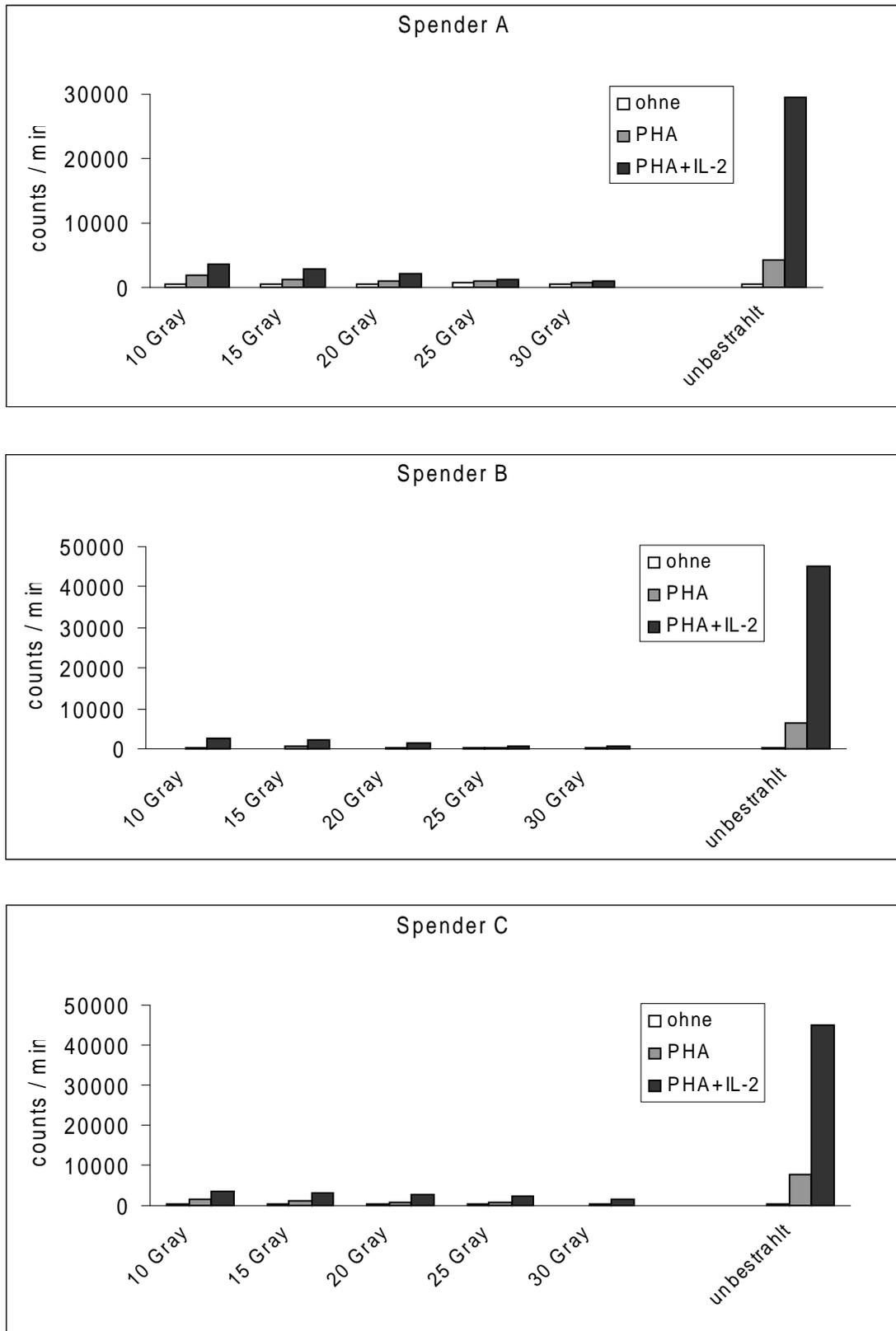


Abb. 4.18: 1×10^5 PBMCs (drei verschiedene Spender) ohne Stimulation bzw. mit Stimulation (PHA / PHA u. IL-2) bei unterschiedlichen Bestrahlungsstärken. Als Kontrolle dienten unbestrahlte PBMCs. n=5

4.3 Delta-Assays

Nachdem die Proliferation der Spenderzellen sicher ausgeschlossen werden konnte sollten nun die Bedingungen für den eigentlichen Delta-Assay definiert werden. Aufgrund des sehr unterschiedlichen Verhaltens der Blasten im Proliferationsassay wurde zunächst ein Vorversuch mit CD34+ Zellen eines gesunden Spenders, an Stelle der Blasten, durchgeführt. Diese wurden mit Zellen eines HLA-differenten Spenders kokultiviert (vgl. 3.2.8). Abbildung 4.19 zeigt den proliferationshemmenden Einfluß der Effektorzellen auf die gesunden Stammzellen.

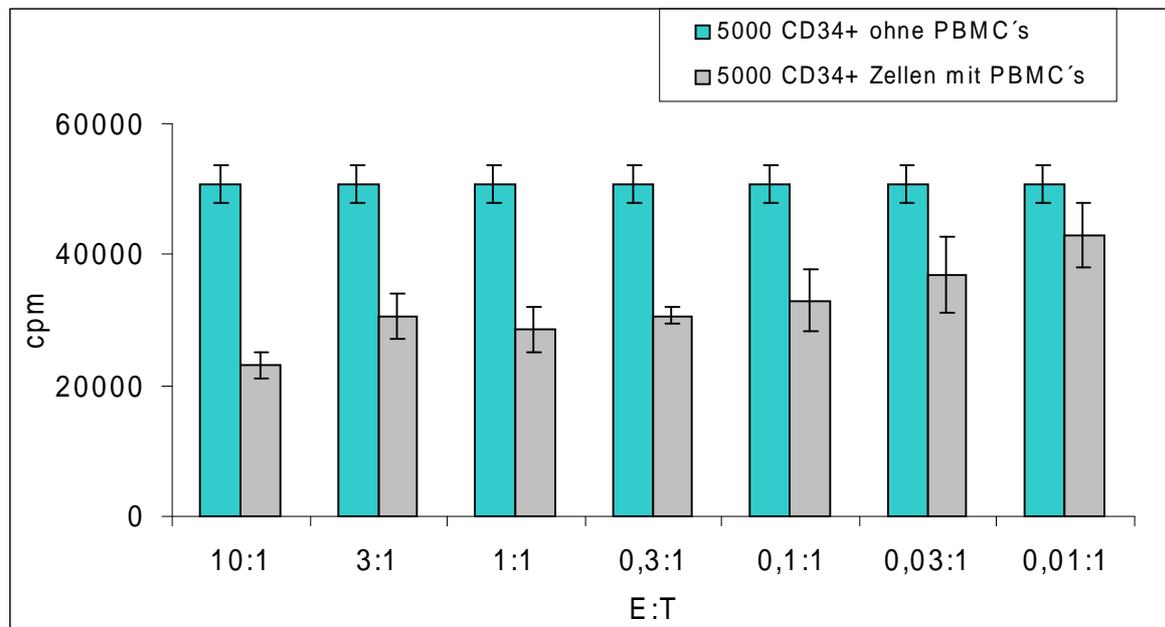


Abb. 4.19: Delta-Assay mit CD34+ Zellen eines gesunden Spenders und PBMCs eines HLA-differenten Spenders. Die Effektor zu Target Ratio (E:T) variiert von 10:1 bis 0,01:1. Fehlerbalken als Standardabweichung, n=4.

4.3.1 Delta-Assays mit AML Zelllinien

An die Stelle der CD34+ Zellen sollten nun AML Blasten treten, um zu sehen ob auch hier ein proliferationshemmender Effekt auftritt. Da Patientenmaterial nicht unbegrenzt zur Verfügung stand, in manchen Fällen sogar schon nach den

Proliferationsassays verbraucht war wurde in den ersten Versuchen mit drei verschiedenen AML Zelllinien gearbeitet. Zum Einsatz kamen HL60, THP-1 und Mono-Mac-6. Die Ermittlung der Proliferationsbedingungen erfolgte wie bei den Patientenblasten und soll hier nicht näher beschrieben werden. Es soll nur kurz erwähnt werden, daß alle drei Zelllinien über ein starkes autonomes Wachstum verfügen, das durch die Zugabe der im Proliferationsassay verwendeten Zytokine nicht gesteigert werden konnte.

Die Zellen aller drei Linien wurden wie zuvor die CD34+ Zellen mit HLA-differenten Spenderzellen kokultiviert. Eine Proliferationshemmung konnte nur bei der Mono-Mac-6 festgestellt werden. Bei den beiden anderen fand durch die Zugabe der Spenderzellen ein stimulatorischer Effekt statt. Dieser war bei der THP-1 etwas stärker ausgeprägt, als bei der HL60. In Abbildung 4.20 ist das Ergebnis für alle drei Zelllinien grafisch dargestellt.

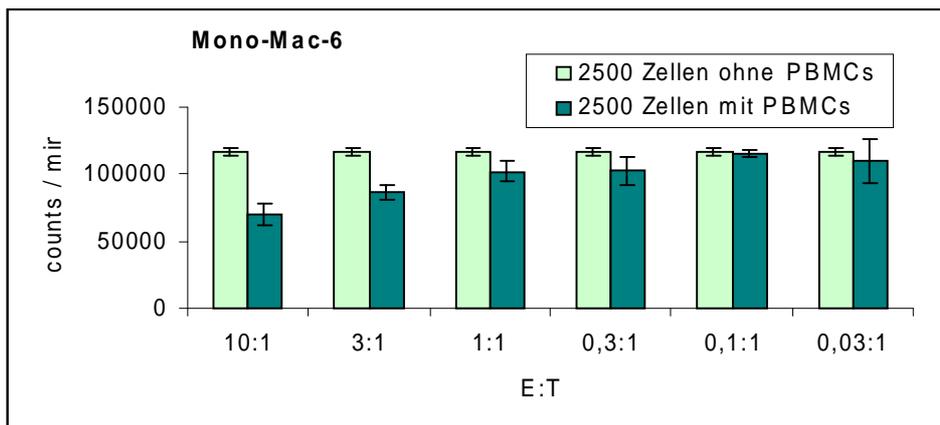
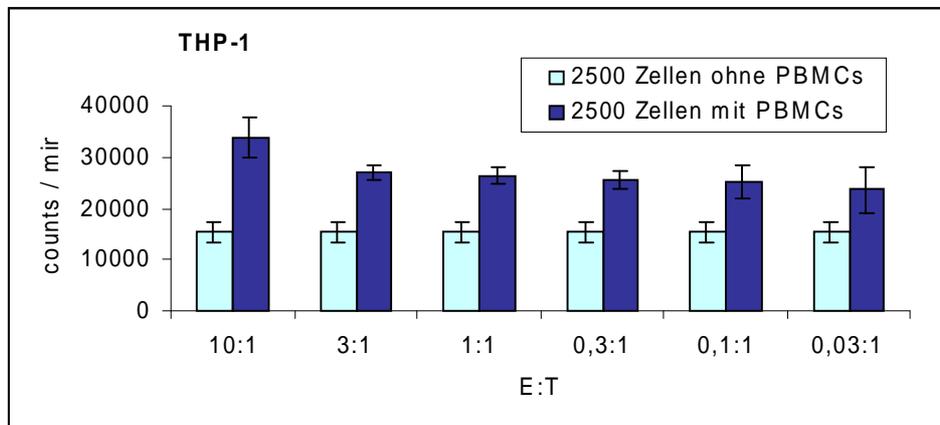
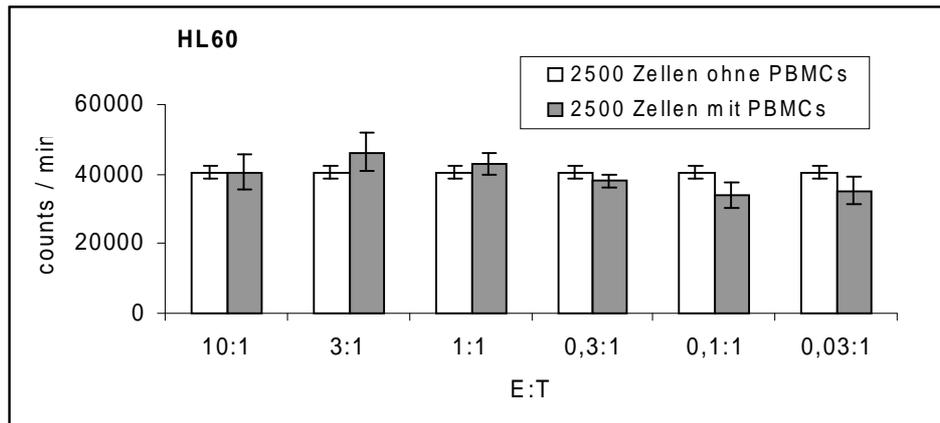


Abb. 4.20: Delta-Assay mit drei verschiedenen Zelllinien (HL60, THP-1 und Mono-Mac-6). Als Effektorzellen dienten PBMCs von drei versch. HLA-differenten Spendern. Die Ergebnisse aus allen drei Versuchen wurden jeweils gemittelt. Fehlerbalken als Standardabweichung, n= 4.

4.3.2 Delta-Assays mit Patientenzellen

Die mit den AML Zelllinien durchgeführten Experimente mit HLA-differentem Spendermaterial zeigten, daß unter den gewählten Bedingungen der Delta-Assay grundsätzlich durchführbar ist. Sie wurden deshalb bei der Testung von Patientenmaterial so beibehalten. Bei den mit Patient 5, 6 und 10 durchgeführten Versuchen wurden die im Proliferationsassay ermittelten optimalen Bedingungen für die Blasten berücksichtigt. So ergaben sich für Patient 5 eine einzusetzende Blastenzahl von 10000 Zellen / Loch und ein Einbau von ^3H -Thymidin an Tag 2. Für Patient 6 und 10 ein ^3H -Thymidineinbau an Tag 5 mit je 5000 Zellen / Loch. Bei allen drei Patienten wurden die Versuche mit drei verschiedenen Spenderzellen durchgeführt. Die Effektor/Target Ratio mußte bei Patient 5 aufgrund der geringeren Spenderzellzahlen etwas variiert werden (vgl. Abb. 4.21).

Die Auswertung der Versuche zeigte, mit minimalen Schwankungen zwischen den verschiedenen Spendern bei Patient 6 und 10 eine Hemmung der Proliferation der Blasten durch die Zugabe der HLA-differenten Spenderzellen. Bei Patient 5 kam es durch die Kokultur der Blasten mit den PBMCs zu einer Steigerung der Proliferation der Blasten.

In Abbildung 4.21 sind die Ergebnisse der Delta-Assays von allen drei Patienten jeweils am Beispiel eines Spenders dargestellt, da die Unterschiede zwischen den Spendern nur sehr gering waren.

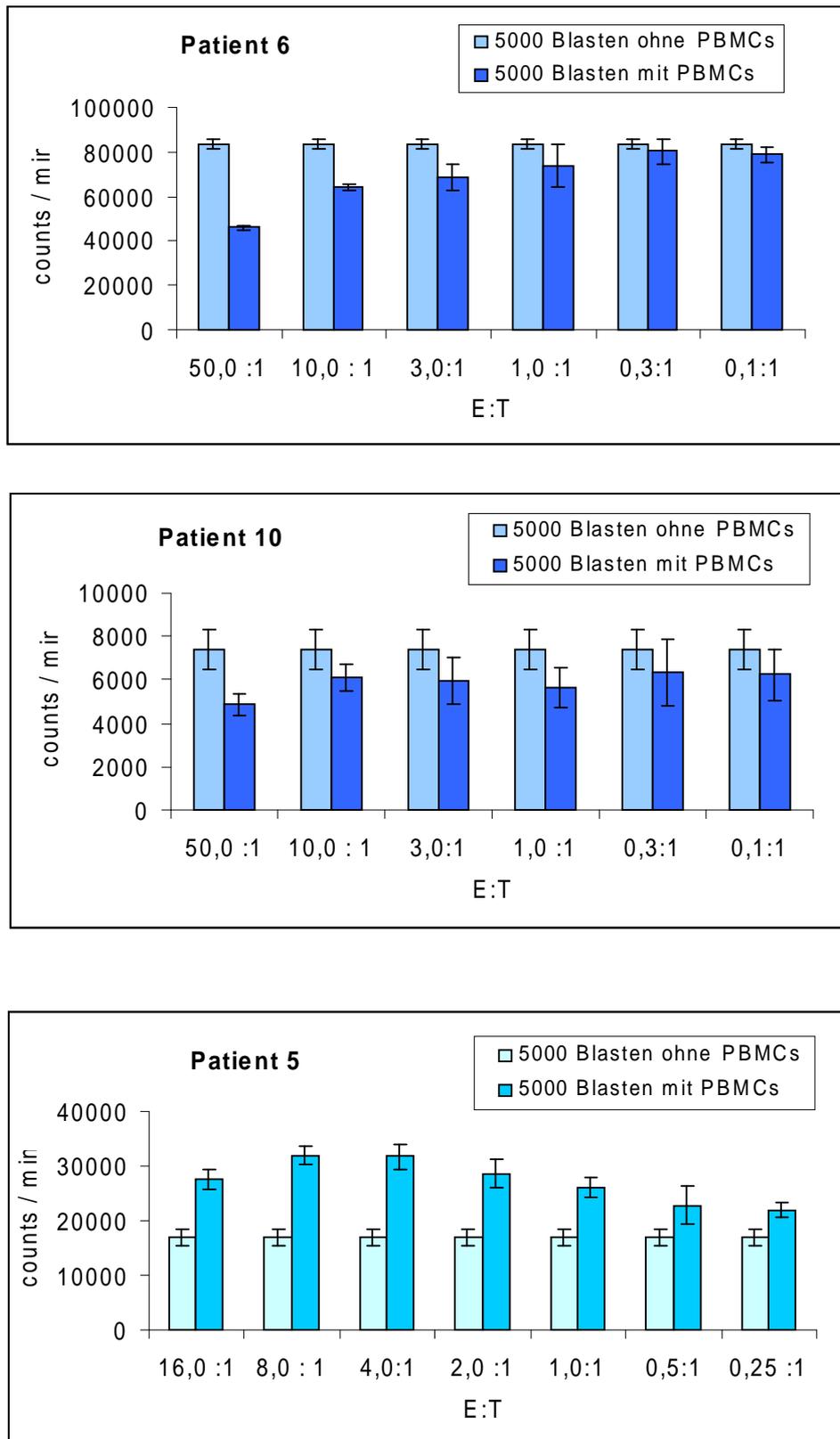


Abb. 4.21: Ergebnisse der Delta-Assays von allen drei Patienten jeweils am Beispiel eines Spenders dargestellt. Unterschiedliche Skalierung der y-Achse wegen Übersichtlichkeit, da starke Unterschiede in der Anzahl der Counts. Fehlerbalken als Standardabweichung, n=6.

Alle bisherigen Delta-Assays waren mit Zellen von HLA-differenten Spendern durchgeführt worden. Um seine Einsetzbarkeit im HLA-identischen System zu prüfen wurden zwei Delta-Assays mit Material von Patient 5 und seinem HLA-identischen Spender durchgeführt. Zusätzlich wurden zum Vergleich CD3+ Zellen von einem HLA-differenten Spender eingesetzt. Die Versuchsbedingungen waren identisch mit denen aus den vorherigen Versuchen (vgl. Abb. 4.21). Im zweiten Assay kamen die Zellen vom HLA-identischen Spender in zwei Varianten zum Einsatz. Zum einen als CD3 + Zellen ohne vorherige Stimulation, zum anderen als CD3+ Zellen mit vorheriger Stimulation durch DCs aus Patientenblasten (vgl. Material und Methoden).

Abbildung 4.22 zeigt den Versuch mit den HLA-differenten CD3+ Zellen als Vergleichskontrolle. Man sieht, daß die HLA-identischen Spenderzellen weder einen inhibierenden noch einen stimulatorischen Effekt auf die Blasten haben, hingegen die HLA-differenten Zellen auf die Proliferation der Blasten verstärkend wirken.

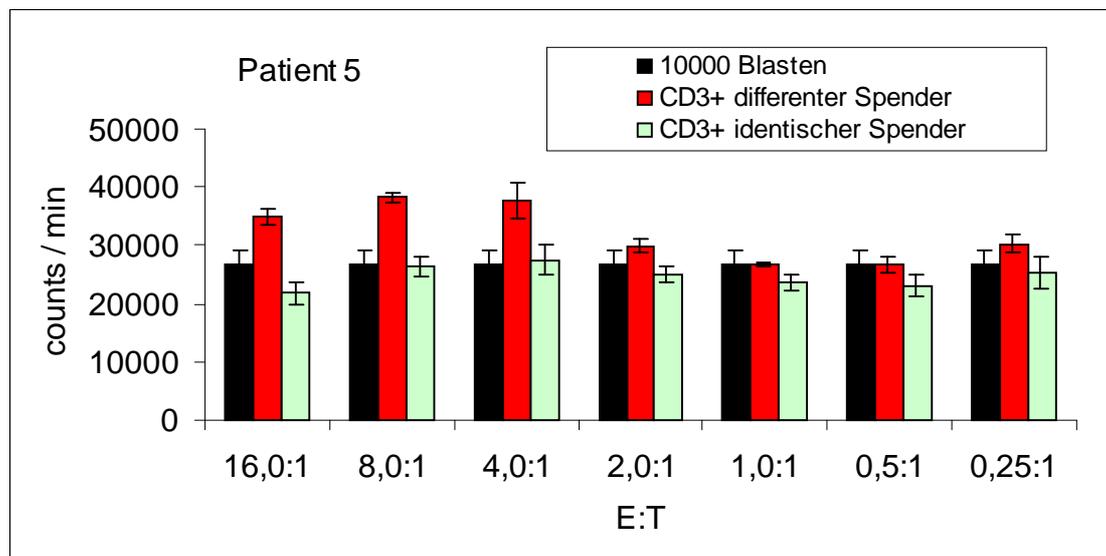


Abb. 4.22: Delta-Assay mit Patient 5 und Material von einem HLA-differenten und seinem realen HLA-identischen Spender. Fehlerbalken als Standardabweichung, n=4

In Abbildung 4.23 wird deutlich, daß eine Vorstimulation der HLA-identischen Spenderzellen mit DCs aus den Blasten von Patient 5 einen in höheren E:T Verhältnissen inhibierenden, bei niedrigeren E:T Ratios hingegen stimulierenden

Effekt aufweist. Diese zwei unterschiedlichen Effekte lassen sich bei den unstimulierten Spenderzellen nicht nachweisen.

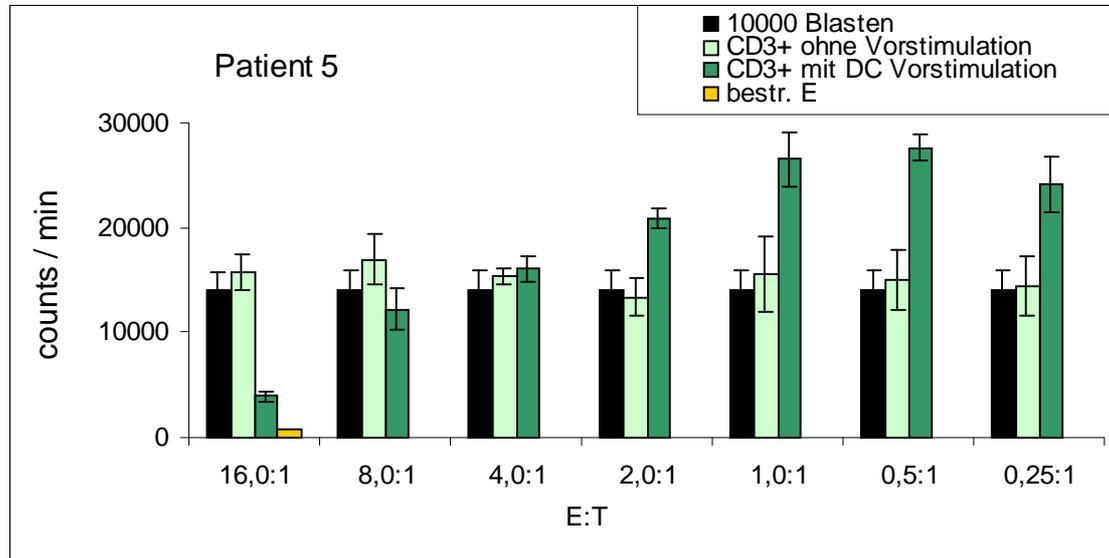


Abb. 4.23: Delta-Assay mit Patient 5 und Material von seinem realen HLA-identischen Spender, einmal unstimuliert und einmal mit DCs vorstimuliert. Fehlerbalken als Standardabweichung, n=4

5. Diskussion

Die adoptive Immuntherapie mittels Spenderlymphozyteninfusion (DLI) wird erfolgreich eingesetzt zur Behandlung des Leukämie Rezidivs bei Patienten mit CML- und in gewissem Maß für AML Patienten nach SZT. Verantwortlich dafür ist ein durch die übertragenen Spender T-Zellen vermittelter immunologischer Effekt, der als GvL-Effekt bezeichnet wird (Antin 1993; Horowitz et al., 1990). Dieser für den Patienten positive Effekt ist oft mit der sog. GvHD assoziiert, die für den Patienten lebensbedrohlich sein kann. Die Vorhersage eines möglichen GvL-Effektes nach DLI wäre hilfreich um die Vor- und Nachteile dieser Behandlungsmethode insbesondere bei Risikopatienten (über 60 Jahre, Begleiterkrankungen, schlechter Allgemeinzustand etc.) besser abzuwägen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte geprüft werden, ob der Delta-Assay als in vitro Testsystem grundsätzlich geeignet ist, dabei zu helfen die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines GvL-Effektes bei AML Patienten abzuschätzen.

Bereits zu Beginn der neunziger Jahre wurde der Einfluß von Spenderzellen auf leukämische Vorläuferzellen getestet. In diesen Versuchen wurde im ^{51}Cr Release Assay nicht immer ausreichende Sensitivität und Spezifität erzielt um z.B. den wachstumshemmenden Einfluß von minor-Histokompatibilitätsantigen spezifischen zytotoxischen T-Zellen auf leukämische Zellen nachzuweisen (Falkenburg et al., 1991). Beim ^{51}Cr Release Assay werden die Zielzellen und die Effektorzellen für etwa 4 Stunden inkubiert, das heißt die Effektorzellen haben nur so lange Zeit ihren zytotoxischen Effekt auszuüben. Spielt für die Apoptose der Zielzellen aber auch das Fas/Fas-Ligand System eine Rolle, so kann dies mit diesem Assay nicht erfaßt werden, da dafür die 4-stündige Inkubationszeit zu kurz ist. Deshalb entwickelte die Gruppe um Fred Falkenburg ein neues Testsystem, das auf einer Kultur mit halb-flüssigem Medium basierte (Voogt et al., 1987; Falkenburg et al., 1991; Faber et al., 1995). Die leukämischen Zellen wurden mit den CTLs vorinkubiert und dann allein in das halb-flüssige zytokinhaltige Medium gegeben. Nach 10 bis 14 Tagen wurden die aus den Blasten entstandenen Kolonien ausgezählt. Blasten, die nicht mit den CTLs vorinkubiert wurden dienten als Kontrolle und die Zahl der Kolonien wurde verglichen. Diese Methode stellte sich als sehr sensitiv heraus, hatte aber den

Nachteil, daß sie zum einen sehr aufwendig und zum anderen von subjektiver Interpretation, bezüglich der Koloniebewertung beeinflusst war. Der Test sollte also in der Durchführung vereinfacht und in der Auswertung objektiver werden. Das Ergebnis dieser Bemühungen war dann der Delta-Assay (Smit et al., 1998), der in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich dazu verwendet wurde, Minor-Histokompatibilitätsantigene auf hämatopoetischen Progenitorzellen des Hundes nachzuweisen (Weber et al., 2003).

Das Grundprinzip des Delta-Assay besteht darin, leukämische Blasten durch Zugabe von Zytokinen zur Proliferation zu bringen und diese durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin zu quantifizieren. Durch Zugabe bestrahlter Spenderzellen, die selbst nicht mehr proliferieren, aber noch funktionsfähig sind, wird der Einfluß dieser Effektorzellen auf die Targetzellen (Blasten) untersucht.

Im Rahmen der CML ist der Test für verschiedenste Fragestellungen schon erfolgreich eingesetzt worden (Faber et al., 1995; Smit et al., 1998). Es stellte sich daher die Frage, ob dieser Test für die viel heterogenere AML ebenfalls einsetzbar ist.

Zunächst wurden dazu die Kultur- bzw. Proliferationsbedingungen für AML Blasten definiert, wobei sechs Fragestellungen im Vordergrund standen, dessen Ergebnisse im folgenden diskutiert werden sollen.

1. Welcher Serumzusatz fördert das Wachstum der Blasten, ohne dabei die Effektorzellen zu beeinflussen?

Serum stellt immer eine mögliche Quelle an undefinierten löslichen Stoffen, wie z.B. Zytokine, Zytokinantagonisten, lösliche Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle dar, die so auch das Verhalten der Blasten in Kultur beeinflussen können (Bruserud et al., 1996). Hierzu war grundsätzlich die Überlegung anzustellen, ob man eventuell ganz auf Serum im Medium verzichten will oder nicht. In unserem Fall war entscheidend, daß die Blasten gut proliferierten und die Antwort der T-Zellen durch das Serum möglichst wenig beeinflusst wird. AML Blasten können auch mit serumfreiem Medium kultiviert werden, Serum hat aber oftmals einen die Proliferation

steigernden Einfluß (Bruserud et al., 1999). In den Arbeiten von Falkenburg et al. kam Humanserum zum Einsatz, die Alternative dazu, da kostengünstiger, wäre fötales Kälberserum gewesen. Da aber hierbei mit mehr störenden Einflüssen auf die T-Zellen zu rechnen war und im Vergleich das Humanserum die besseren Ergebnisse bezüglich der Blastenproliferation ergaben (vgl. Abb. 4.2), wurden die weiteren Versuche mit Humanserum durchgeführt.

2. Welche Zelldichte ist für ein gutes Wachstum optimal?

Grundlage des Delta-Assays ist die Proliferation der leukämischen Blasten. Die Bedingungen sollten deshalb so gewählt werden, daß ein optimales Wachstum in 96-Lochplatten ermöglicht wird. Ein zu dichtes Ausbringen der Zellen würde dazu führen, daß sich das Medium zu rasch verbraucht und die anfallenden Stoffwechselprodukte auf die Zellen toxisch wirken (vgl. Abb. 4.3). Dies ist zum einen abhängig von der Zellzahl zu Beginn der Kultur, zum anderen davon, wie sehr die Blasten auf die Zytokine ansprechen, das heißt wie schnell sie sich teilen. Es zeigte sich, daß es vollkommen ausreichend ist, wenn die höchste Zellzahl, die eingesetzt wird bei 40000 Zellen/Loch liegt. Damit wurden für alle getesteten AML Blasten ausreichende Counts pro Minute erzielt (vgl. Tab. 4.2) und gleichzeitig konnten die negativen Einflüsse einer zu dichten Belegung vermieden werden.

3. Welche Zytokine bewirken eine gute Proliferation und in welcher Konzentration müssen sie eingesetzt werden?

Es gibt Patienten, deren Blasten in vitro ein autokrines Wachstum aufweisen, die meisten Blasten benötigen jedoch die Zugabe von Zytokinen um in vitro zu proliferieren. Diese Beobachtungen regten zu verschiedensten Theorien an. So gibt es z.B. eine Reihe von Arbeiten, die versuchten einen Zusammenhang herzustellen zwischen autokrinem Wachstum der Blasten und der sich daraus ergebenden Prognose für den Patienten (Löwenberg et al., 1993; Hunter et al., 1993; Nara et al., 1994).

Es gibt aber auch zahlreiche Veröffentlichungen über die Auswirkung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren auf das Proliferationsverhalten von leukämischen Blasten mit ganz unterschiedlichen Fragestellungen. In diesen

Arbeiten wurden verschiedenste Zytokine allein und in Kombination eingesetzt und ihre Wirkungen auf die Proliferation der Blasten untersucht (Löwenberg und Touw, 1993).

Im Delta-Assay ist die Proliferation der leukämischen Blasten die Grundvoraussetzung für dessen Durchführbarkeit. Im Gegensatz zu vielen Arbeiten, in denen es darum ging für jeden Patienten die optimalste Zytokinkombination zu ermitteln, galt es hier einen Cocktail zu finden, der für alle oder zumindest den größten Teil der Patienten zu einem guten Wachstum führt. In einer Übersichtsarbeit von Bruserud (Bruserud et al., 2001) wird SCF, GM-CSF und IL-3 als eine Kombination angegeben, die in der Mehrheit der AML Patienten zu einer starken Proliferation der Blasten führt. Die ersten Proliferationsassays mit AML Blasten wurden aus diesem Grund mit dieser Dreierkombination durchgeführt (vgl. Abb. 4.4 A-C). Bei einem Patienten trat mit diesen drei Zytokinen eine starke Proliferation ein (4.4 A), bei den beiden anderen war sie deutlich schwächer (4.4 B und C). Dieses Ergebnis führte dazu, daß der Zytokinmix in Anlehnung an eine Arbeit von Smit (Smit et al., 1998) um G-CSF und EPO erweitert wurde.

Die Wirkung dieser Zytokinkombination wurde zunächst an CD34+ Zellen überprüft. Die Überlegungen hierzu waren, daß ein großer Teil der AML Blasten CD34+ ist. Es sollten die Bedingungen an einer einheitlichen Zellpopulation etabliert werden, um sie dann auf die heterogene Population zu übertragen. Die gesunden Stammzellen zeigten eine Zunahme der Zellzahl um das 12-fache durch die Zugabe dieser fünf Zytokine (vgl. Abb. 4.5) und auch die ^3H -Thymidinaufnahme war mit etwa 100.000 Counts pro Minute bei 2×10^4 eingesetzten Zellen / Loch sehr gut.

Die Zellen der beiden Patienten, die mit der Dreierkombination aus SCF, GM-CSF und IL-3 nur eine sehr geringe Proliferation zeigten, konnten mit dem erweiterten Cocktail eine deutliche Proliferationssteigerung erfahren, so daß die Blasten dadurch für den Delta-Assay einsetzbar wurden (vgl. Abb. 4.7).

Die Zytokinkombination wurde deshalb so beibehalten und zeigte bis auf Patient 11 in allen anderen getesteten Fällen eine genügende Proliferation der Blasten. Bei Patient 11 waren nach dem Auftauen nur noch 20% der Blasten am Leben. Die

restlichen 80% waren durch das Einfrieren und Auftauen vermutlich so geschädigt, daß sie trotz Zugabe von Zytokinen nicht mehr zur Proliferation gebracht werden konnten.

Die in Tabelle 4.2 gezeigten patientenspezifischen Unterschiede bezüglich der Stärke der Proliferation sind ein, in der Literatur häufig beschriebenes Phänomen. In einigen Arbeiten von Bruserud et al. wird sogar ein Zusammenhang zwischen Proliferation und FAB-Klassifikation hergestellt.

In einer Arbeit von 2001 ergab die Auswertung von 50 AML Patienten, daß AML-M2 Blasten eine generell höhere Proliferationsrate aufweisen als AML-M0/M1 und AML-M4/M5. Diese Beobachtung bestätigte sich bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Blasten nicht.

Auf Grund der starken Unterschiede in der Proliferationsstärke zwischen den Patienten stellte sich die Frage, ob die Blasten mit der eingesetzten Zytokinkonzentration jeweils schon im Sättigungsbereich waren. Es wurden deshalb ausgehend von den Grundkonzentrationen (50 ng/ml SCF, 100 ng/ml GM-CSF, 50 ng/ml IL-3, 100 ng/ml G-CSF und 2 U/ml EPO) alle Zytokine bis zum 8-fachen der Grundkonzentration gesteigert. Dabei zeigte sich, daß eine Erhöhung der Konzentrationen keinen Einfluß auf die Stärke der Proliferation hatte und die patientenspezifischen Unterschiede weiterhin bestehen blieben (vgl. Abb. 4.8).

4. Was für eine Proliferationskinetik weisen die Blasten auf?

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die spätere Durchführung des Delta-Assay war der optimale Tag für die ^3H -Thymidin-Zugabe. Ob die Effektorzellen einen hemmenden Einfluß auf die Proliferation der Blasten haben, läßt sich nur im linearen Bereich der Wachstumskinetik ermitteln, aber nicht mehr wenn bereits die stationäre Phase erreicht wurde.

Idealerweise sollte die Zugabe des ^3H -Thymidin deshalb an einem Tag erfolgen, an dem sich die Blasten im linearen Teil ihrer Wachstumskurve befinden. Da bei den ersten Versuchen noch keine eigenen Erfahrungen zum Wachstumsverhalten der Blasten vorlagen und es zunächst nur von Interesse war zu sehen, ob die Blasten

überhaupt auf die Zytokine ansprechen wurde bei diesen Versuchen, angelehnt an andere Arbeiten (Smit et al., 1998) die Zugabe des ^3H -Thymidin an Tag 5 vorgenommen.

Die Unterschiede in der Proliferation der Blasten (Tab.4.2) aus verschiedenen Patienten waren aber so groß, daß der Verdacht nahe lag, daß dies nicht nur daran liegen kann, daß die Blasten unterschiedlich auf die Zytokine ansprechen, sondern daß auch die Wachstumskinetik eine Rolle spielen muß.

Um herauszufinden wann die Hauptwirkung der Zytokine einsetzt wurde ein Versuch mit den Blasten von drei Patienten durchgeführt. Die Blasten wurden jeweils in zwei Portionen aufgeteilt. Die einen bekamen Zytokine über Nacht, diese wurden dann am nächsten Tag in einem Waschschrift entfernt. Die andere Hälfte der Zellen wurde über die gesamte 5-tägige Kulturzeit mit den Zytokinen inkubiert. Dabei zeigte sich (vgl. Abb. 4.10), daß die Hauptwirkung der Zytokine gleich zu Beginn der Kulturzeit einsetzt. Blasten, die nur eine Nacht mit Zytokinen inkubiert waren hatten nach den fünf Tagen in Kultur die Hälfte der Counts pro Minute erreicht, die im Vergleich dazu die Blasten erzielten, die über fünf Tage Zytokine erhielten.

Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, daß der ^3H -Thymidineinbau an Tag 5 deutlich zu spät ist. Der mit zunächst nur einem Patienten durchgeführte Versuch der in Abbildung 4.11 dargestellt ist, bestätigte diese Vermutung. Die Kinetik über sechs Tage machte deutlich, daß ein Thymidineinbau an Tag 5 oder gar an Tag 6, wie er in anderen Arbeiten (Smit et al., 1998; Bruserud et al. 2001) verwendet wurde, bei diesem Patienten deutlich zu spät ist, da hier die Proliferation bereits deutlich rückläufig ist.

Bei der Überprüfung der Kinetiken aller im Rahmen dieser Arbeit getesteten Patienten bestätigte sich dieses Ergebnis. Die hier getesteten Blasten zeigten unterschiedliche Kinetiken, wobei der für die Thymidinzugabe optimale Tag von Tag 2 bis Tag 5 variierte.

Diese Ergebnisse bestätigen die Arbeit von van der Hoorn (van der Hoorn et al., 2003), in der gezeigt wurde, daß Testsysteme, in denen die Blastenproliferation die entscheidende Rolle spielt nicht ohne eine Überprüfung der Kinetik auskommen. Dies steht im Gegensatz zu der Arbeit von Bruserud (Bruserud et al., 2001), der bei seinen Proliferationsstudien an Blasten den Thymidineinbau, unabhängig von der Kinetik, grundsätzlich an Tag 6 durchführte.

5. Welches Anreicherungsverfahren eignet sich für Patienten mit niedrigen Blastenzahlen?

Für die Durchführbarkeit des Delta-Assay ist nicht nur wie im vorigen Abschnitt beschrieben die Kinetik der Blasten wichtig, sondern auch daß die Zellen als reine Population vorliegen. Ein hoher Anteil an T-Zellen in der Targetzellpopulation kann dazu führen, daß die T-Zellen des Spenders mit den T-Zellen des Patienten im Sinne einer MLC (engl. mixed lymphocyte culture = gemischte Lymphozytenkultur) reagieren. Ein möglicher inhibitorischer Effekt der Spender T-Zellen ließe sich so nicht detektieren. Um das Auftreten einer MLC zu verhindern ist die einfachste Möglichkeit die T-Zellen aus der Blastenfraktion zu entfernen, indem man sie mit Antikörpern, die gegen CD2 und CD3 gerichtet sind markiert. Die mit paramagnetischen Partikeln gekoppelten Antikörper sorgen so dafür, daß die T-Zellen in einer Magnetsäule hängen bleiben, während die Blasten die Säule ungehindert wieder verlassen können. Wie am Beispiel von Patient 14 gezeigt (Abb. 4.16) konnte der T-Zellanteil auf unter 5% gedrückt werden. Der Blastenanteil von 57% wurde so auf 85% angehoben. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß die Blasten nicht mit magnetischen Beads gekoppelt sind und somit die Proliferation der Blasten nicht negativ beeinflusst wird (Abb. 4.15). Nicht dargestellt in Abbildung 4.15 ist die Proliferation der Blasten vor der T-Zelldepletion. Nach der Depletion wurden mehr Counts pro Minute gemessen. Dies erklärt sich dadurch, daß die eingesetzte Zellzahl nicht bezogen auf die Blastenzahl, sondern bezogen auf die Gesamtzellzahl berechnet wurde. Entfernt man die T-Zellen erhöht sich somit automatisch der Anteil an Blasten und somit an Zellen, die auf die Zytokine ansprechen. Somit erreicht man bei gleicher Zellzahl eine höhere Rate an Counts pro Minute.

Manche AML Blasten exprimieren T-Zellmarker auf ihrer Oberfläche, so daß diese Methode nicht angewendet werden kann. In diesen Fällen kann man eine Positivselektion der Blasten durchführen. Da die meisten AML Blasten für CD33 und/oder CD34 positiv sind wurden diese Antigene für die Selektion verwendet. Der Nachteil der Positivselektion besteht darin, daß die Blasten mit den Beads gekoppelt sind, was möglicherweise einen negativen Einfluß auf die Proliferation der Zellen haben kann. Wie in Abbildung 4.13 gezeigt war die Proliferation der kompletten Blastenfraktion doppelt so stark wie die CD34+ Fraktion. Dennoch war die Proliferation stark genug, um die Blasten im Delta-Assay einsetzen zu können. Es gab aber auch Patienten, deren Blasten nach der Positivselektion keine ausreichende Proliferation mehr aufwiesen (Daten nicht gezeigt), so daß sie für einen Einsatz im Delta-Assay nicht in Frage kamen.

Für beide Methoden sind die Kenntnis des prozentualen Anteils der Blasten im peripheren Blut und ihr Immunphänotyp Voraussetzung. Da dies aber bei jedem Leukämiepatienten routinemäßig untersucht wird stellt dies kein Hindernis dar.

6. Unterschiede zwischen frischem und aufgetautem Blastenmaterial

Für den Delta-Assay werden Patientenzellen ebenso wie Spenderzellen benötigt. Selten hat man jedoch beides zum gleichen Zeitpunkt zur Verfügung. Deshalb war es wichtig zu wissen, ob Blasten auch in wieder aufgetautem Zustand einsetzbar sind. Dies wurde an Hand dreier Patienten untersucht, indem von ihnen sowohl frische, als auch aufgetaute Blasten im Proliferationsassay eingesetzt wurden. Abbildung 4.17 zeigt, daß der Einfrier- bzw. Auftauprozess keine Auswirkung auf die Kinetik der Blasten hat, die Proliferationsrate, das heißt die absoluten Counts pro Minute aber abnehmen können.

Folglich ist das Einfrieren der Blasten kein limitierender Faktor für die Durchführbarkeit des Delta-Assay, solange die Proliferation nicht zu stark absinkt. Im Falle der getesteten drei Patienten war dies nicht der Fall.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß dem eigentlichen Delta-Assay immer ein Blastenproliferationsassay vorausgehen muß, indem die für den einzelnen Patienten

optimalen Testbedingungen ermittelt werden. Bei Patienten mit niedrigem Blastenanteil im peripheren Blut muß vor dem Proliferationsassay eine Aufreinigung der Blastenpopulation stattfinden, indem vorzugsweise die T-Zellen depletiert werden oder falls die Blasten selbst T-Zellmarker exprimieren durch eine Positivselektion der Blasten selbst. Für den Test können die Blasten grundsätzlich auch eingesetzt werden, wenn sie zuvor in flüssigem Stickstoff gelagert waren.

Die Bedingungen der *in vitro* Kultur der Blasten waren somit festgelegt. Bevor sie im Delta-Assay eingesetzt werden konnten, mußte noch überprüft werden bei welcher Bestrahlungsdosis eine Proliferation der Spenderzellen sicher ausgeschlossen werden konnte. Das Prinzip des Delta-Assay beruht auf der Messung der Proliferation der Zielzellen unter dem Einfluß der Spenderzellen. Für dieses System wäre es daher fatal, wenn auch die Spenderzellen radioaktives Thymidin einbauen würden. Die zytotoxischen Fähigkeiten der Zellen dürfen durch die Bestrahlung nicht ausgeschaltet werden. Um die Dosis zu ermitteln, die gerade stark genug ist die Proliferation zu stoppen bzw. auf ein Minimum zu beschränken wurden PBMCs von drei verschiedenen Spendern mit PHA bzw. einer Kombination aus PHA und IL-2 stimuliert und ihre Proliferation nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen gemessen. Wie in Abbildung 4.18 gezeigt wird schon bei einer Dosis von 10 Gy die Proliferation der stimulierten Spenderzellen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle stark vermindert. Um jedoch ganz sicher zu gehen wurden für alle Experimente die Spenderzellen mit 15 Gy bestrahlt. Diese Dosierung wurde auch von van der Hoorn (van der Hoorn et al., 2003) für die Bestrahlung der Spenderzellen angegeben.

Delta-Assay mit CD34+ Zellen und HLA-differenten Spenderzellen

Für die Etablierung des Delta-Assay wurden ursprünglich CD34+ Zellen verwendet. Wie in Abbildung 4.19 gezeigt wurde die Proliferation der CD34+ Zellen durch die Zugabe von HLA-differenten Spenderzellen inhibiert, in Abhängigkeit von der Effektor-Target Ratio unterschiedlich stark. Im Anschluß an diese Experimente wurden drei verschiedene AML Zelllinien und HLA-differente Spenderzellen getestet. Die verwendeten Zelllinien waren THP-1 (FAB M5), Mono Mac 6 (FAB M5) und HL-60 (FAB M2).

Dabei traten unterschiedliche Effekte auf. Während die THP-1 und die HL-60 Zellen durch die Zugabe der Effektorzellen stimuliert wurden, erfuhren die Mono-Mac-6 Zellen eine Proliferationsreduktion (vgl. Abb. 4.20).

Diese gegenläufigen Effekte, Stimulation und Inhibition, wurden im Anschluß auch bei Patientenblasten gefunden, die mit HLA-differenten Spenderzellen kokultiviert wurden (Abb. 4.21).

Verantwortlich für die Effekte auf das Wachstumsverhalten der Blasten sind vermutlich zelluläre Immunantworten, die auf einem Unterschied in Antigenen der HLA-Klasse II beruhen. Je größer die HLA-Differenz zwischen Patient und Spender desto stärker die Immunreaktion. Eine Aktivierung von T-Zellen führt zu einer Ausschüttung von Zytokinen sowie zur Expression von membranständigen Oberflächenmolekülen. Diese können das Wachstum der Blasten unterdrücken oder steigern. Da eine Erhöhung der zugesetzten fünf Zytokine (SCF, GM-CSF, IL-3, G-CSF und EPO) keine weitere Steigerung der Proliferation der Blasten bewirkten (vgl. Abb. 4.8) müssen andere Zytokine für diese proliferationssteigernden Effekte verantwortlich sein.

In der Literatur sind eine Reihe von Zytokinen beschrieben, die einen proliferationssteigernden Einfluß auf Blasten haben. In Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen können Zytokine auch hemmend auf das Wachstum der Blasten wirken.

So weiß man z.B. von IL-9, daß es eine proliferationssteigernde Wirkung auf Blasten haben kann (Lemoli et al., 1996), die stärker ist als die von SCF, GM-CSF und IL-3. In Kombination mit anderen Zytokinen, wie sie auch in unserem Cocktail enthalten sind, tritt in der Hälfte der getesteten AML Blasten ein proliferationssteigernder Effekt auf. Dieser Effekt von IL-9 ist auf maligne Zellen beschränkt, normale Knochenmarkzellen reagieren auf IL-9 nicht mit vermehrter Proliferation. In einer Arbeit von Renauld (Renauld et al., 1990) wurde gezeigt, daß IL-9 von aktivierten CD4+ T-Zellen ausgeschüttet wird.

Auch IL-11 kann in Kombination mit IL-3 und GM-CSF die Proliferation von AML Blasten steigern (Hu et al., 1993).

IL-6 kann proliferationssteigernd, aber auch inhibierend wirken. Es wird in einer Publikation von Suzuki (Suzuki et al., 1990) postuliert, daß die Wirkung vom Phänotyp der Blasten abhängt. Die Heterogenität der AML sei der Grund, weswegen in einem Fall eine Steigerung des Wachstums stattfindet und im anderen Fall eine Inhibition.

TNF α wirkt in Kombination mit GM-CSF proliferationssteigernd, allerdings mit großen patientenspezifischen Unterschieden (Hoang et al., 1989). Darüber hinaus kann TNF α die Blastenproliferation auch inhibieren. Aktivierende und inhibierende Funktionen von TNF α werden zudem durch weitere Zytokine moduliert.

Ein ähnliches Verhalten wurde auch für Interferon γ beschrieben (Murohashi et al., 1991).

Allen Arbeiten ist gemeinsam, daß patientenspezifische Unterschiede beschrieben werden, die teilweise mit der FAB-Klassifikation in Zusammenhang stehen.

Für die Ergebnisse aus den Delta-Assays mit HLA-differenten Spendern läßt sich zusammenfassend sagen, daß je nachdem welche Zytokine von den Spenderzellen ausgeschüttet werden, das Wachstum der Blasten unterstützt oder inhibiert wird.

Bei den Delta-Assays mit HLA-identischen Spenderzellen zeigte sich, daß ohne Vorstimulation der T-Zellen weder ein stimulatorischer, noch ein inhibitorischer Effekt auftritt. Durch die Übereinstimmung im HLA-Typ kommt es zu keiner genügend starken Aktivierung der T-Zellen und folglich nicht zur Ausschüttung von Zytokinen (vgl. Abb. 4.22).

Nach Vorstimulation der T-Zellen durch aus Blasten generierte DCs wurden stimulatorische und inhibitorische Effekte gleichzeitig beobachtet. Befanden sich die Effektorzellen im Überschuß, so hemmten sie das Wachstum der Blasten, befanden sie sich in der Unterzahl, stimulierten sie deren Proliferation. Ohne Vorstimulation war keiner dieser Effekte zu sehen, dies bedeutet, daß eine Vorstimulation der T-Zellen durch DCs zu einer Erkennung der Blasten führen kann. Verantwortlich dafür sind vermutlich mHags, die auf den hämatopoetischen Zellen exprimiert werden.

Dies steht in Einklang mit einer Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe (Weber et al., 2003), in der gezeigt wurde, daß es möglich ist mHags auf caninen hämatopoetischen Vorläuferzellen zu detektieren, wenn man die Zellen des HLA-identischen Spenders mit DCs vorstimuliert.

Sind genügend durch die mHags aktivierte T-Zellen vorhanden, werden offensichtlich genügend Zytokine ausgeschüttet, die das Wachstum der Blasten unterdrücken können. Bei abnehmendem E:T Verhältnis geht dieser inhibierende Effekt der T-Zellen verloren, und ein stimulierender Effekt kommt zum Vorschein. Möglicherweise treten beide Effekte gleichzeitig und unabhängig voneinander auf. Eine Inhibition der Blastenproliferation wird dabei nur bei hohen Zytokinspiegeln beobachtet, wie sie nur nach Aktivierung einer entsprechenden Anzahl an T-Zellen auftreten.

Was bedeuten diese Ergebnisse im Hinblick auf die Einsetzbarkeit des Delta-Assay bei der AML zur Abschätzung des Auftretens eines möglichen GvL-Effektes.

Der CML liegt immer die gleiche chromosomale Veränderung zu Grunde, eine Translokation zwischen Chromosom 9 und 22. Damit ist die CML eine sehr homogene Erkrankung, so daß der Delta-Assay bei dieser Leukämieform in einer einheitlichen Form angewendet werden kann. Im Gegensatz dazu muß man bei der AML ihre Heterogenität berücksichtigen. Dies bedeutet konkret eine individuelle Ermittlung der Proliferationsbedingungen für jeden einzelnen Patienten. Setzt man einen einheitlichen Zytokinmix für alle Blasten von AML Patienten ein, wie es im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurde, führt dies in einem Teil der Patienten zu einer Proliferationssteigerung der Blasten durch die Spenderzellen. Dies liegt an den von den Spenderzellen ausgeschütteten Zytokinen und ihrer unterschiedlichen Nutzung durch die Blasten. Jeder Patient bräuchte seinen individuellen Zytokinmix, damit seine Blasten maximal stimuliert werden. Nur so könnte man den proliferationssteigernden Effekt durch die Spenderzellen ausschließen. Dies würde für die Durchführung des Delta-Assay bedeuten, daß neben der Kinetik und der optimalen Zellzahl auch diverse Zytokinkombinationen getestet werden müßten. Dies wäre mit einem Mehraufwand an Zeit, Patientenmaterial und Kosten verbunden.

Auf der Seite der Spenderzellen gilt es noch zu überprüfen, welche Zellen für welche Effekte verantwortlich sind. Dazu müßten CD4+ und CD8+ Zellen isoliert eingesetzt werden. So ließe sich überprüfen, welche Fraktion der T-Zellen für die Stimulation

welche für die Inhibition des Blastenwachstums verantwortlich ist. Dazu könnte man die Spenderzellen entweder mittels Magnetseparation in einzelne Populationen aufteilen und dann im Delta-Assay einsetzen, oder man würde blockierende Antikörper einsetzen. Diese wären einmal gegen CD4+, das andere Mal gegen CD8+ T-Zellen gerichtet.

Wenn man die Zellen definiert hat, die für die Inhibition verantwortlich sind, muß man noch prüfen, ob diese T-Zellen vorstimuliert im Delta-Assay eingesetzt werden sollten. Bei der DLI bekommt der Patient Spenderlymphozyten, die keine besondere Vorbehandlung erfahren. Dennoch sind sie in der Lage den GvL-Effekt auszuüben, denn die Aktivierung dieser Zellen findet im Körper des Patienten statt.

Für in vitro Bedingungen hieße das, daß die Spenderzellen vorstimuliert werden müßten, ehe man sie im Delta-Assay einsetzt. Auch in dieser Arbeit wurden Spenderzellen einmal unstimuliert, das andere Mal mittels Patienten DCs vorstimuliert eingesetzt. Dabei zeigte sich erst bei den vorstimulierten Zellen ein inhibitorischer Effekt (vgl. Abb. 4.23).

In den Arbeiten von der Gruppe um Fred Falkenburg, in denen der Delta-Assay als Testsystem eingesetzt wurde, waren es immer CTLs, die auf ihre zytotoxische Fähigkeit hin getestet wurden. Die Spenderzellen waren also immer gezielt vorstimuliert.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte kann man auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit sagen, daß der Delta-Assay grundsätzlich auch bei der AML angewendet werden kann. Es ist aber entscheidend dabei die Heterogenität der AML immer zu berücksichtigen. Der Test wird nur dann sinnvolle Ergebnisse bringen können, wenn man ihn für jeden Patienten immer wieder eigens definiert. Um eine zuverlässige Aussage über seine klinische Einsetzbarkeit machen zu können, müssen noch in weiteren Versuchen die Testbedingungen optimiert werden und dann möglichst viele Patienten/Spenderpaare getestet werden, deren Testergebnisse dann mit den klinischen Daten verglichen werden.

Ein anderer Aspekt bezüglich der Einsetzbarkeit dieses Testsystems soll hier noch kurz erwähnt werden. Eine Reihe von neueren Therapieansätzen basieren auf der Grundlage, in vitro generierte zytotoxische T-Zellen den Patienten zu infundieren, die

dann die noch verbliebenen oder wieder neu entstandenen leukämischen Zellen zerstören sollen. Gerade bei der AML besteht noch viel Handlungsbedarf, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln. Der Delta-Assay ist ein sehr schönes Testsystem, um solche in vitro generierten spezifischen Spenderzellen auf ihre Wirksamkeit hin zu überprüfen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ein in vitro Testsystem zur Vorhersage eines möglichen GvL-Effektes bei Patienten mit AML etabliert werden. Der Delta-Assay ist eine Kurzeit-Suspensionskultur, die es erlaubt die Reaktivität von T-Zellen gegen hämatopoetische Progenitorzellen und leukämische Blasten zu testen. Immunkompetente T-Zellen inhibieren dabei das durch Zytokinzugabe stimulierte Wachstum der Blasten. Das Blastenwachstum oder seine eventuelle Inhibition können durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin quantifiziert werden. Der Delta-Assay wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich eingesetzt, um Minor-Histokompatibilitätsantigene hämatopoetischer Vorläuferzellen des Hundes zu detektieren.

Um das System für den Einsatz an AML Patienten zu etablieren, mußten die Wachstumsbedingungen für die leukämischen Blasten definiert werden. Ein Zytokincocktail, bestehend aus SCF, IL-3, GM-CSF, G-CSF und EPO, der eine gute Proliferation bei gesunden Stammzellen zeigte, funktionierte auch für die getesteten AML Blasten. Allerdings traten hierbei starke patientenspezifische Unterschiede auf. Sowohl die Thymidin Einbauraten, als auch die Wachstumskinetiken variierten zum Teil stark. Der optimale Tag für die Zugabe des ^3H -Thymidins lag zwischen Tag 2 und Tag 5. Die Proliferationsbedingungen der Blasten müssen somit im Hinblick auf ihren Einsatz im Delta-Assay individuell für jeden Patienten definiert werden. Ein anderer wichtiger Punkt, den es zu testen gab, war die Blastenanreicherung bei Patienten mit geringen Blastenzahlen im peripheren Blut. Für die Positivselektion, eine der verwendeten Methoden, wurden anti-CD33-oder anti-CD34-Antikörper eingesetzt, für die andere Methode, die T-Zelldepletion kamen anti-CD2 und anti-CD3 Antikörper zum Einsatz. Beide Varianten sind möglich, ausschlaggebend ist der Immunphänotyp der Blasten.

In den nächsten Experimenten wurde der hemmende Einfluß von Spenderzellen auf leukämische Blasten untersucht. Um die Versuchsbedingungen festzulegen, wurden zunächst drei AML Zelllinien verwendet.

Dabei traten zwei gegensätzliche Effekte auf, zum einen eine Inhibition des Zellwachstums, zum anderen eine Stimulation der Proliferation. Überraschenderweise wurden auch bei Patientenblasten inhibierende und stimulierende Effekte beobachtet. In den meisten Fällen waren HLA-differente T-Zellen als Effektorzellen verwendet worden. Unterschiede in den MHC-Klasse II Molekülen haben möglicherweise zur Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen und zur Ausschüttung von Blastenwachstum-fördernden Zytokinen geführt. Bei einer HLA-identischen Kombination von Blasten und T-Zellen, vorstimuliert mit aus Blasten generierten DCs, konnte in hohen Effektor-Target Ratios eine Inhibition beobachtet werden, wohingegen niedrige Ratios in einer Stimulation der Blasten resultierten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß der Delta-Assay in der Lage ist zelluläre Immunität gegen AML Blasten zu detektieren, also auch bei einer so heterogenen Erkrankung, wie es die AML ist, eingesetzt werden kann. Allerdings nur unter der Voraussetzung, daß die Wachstumsbedingungen für jeden Patienten individuell definiert werden. Um eine definitive Aussage darüber treffen zu können, ob dieser Assay in der Klinik als prognostischer Marker eingesetzt werden kann, müssen noch mehrere Patienten-Spender Paare getestet und mit den klinischen Daten verglichen werden.

7. Summary

Development of an *in vitro* testsystem to predict graft-versus-leukemia (GvL) responses in patients with acute myeloid leukemia

The Delta-Assay is a short time suspension culture that can be used to test the reactivity of donor T-cells against haematopoietic progenitor cells and leukemic blasts. The growth of leukemic blasts stimulated by cytokines and its inhibition by donor T cells can be measured by ^3H -thymidine incorporation. The Delta-Assay is presumed to detect immune responses against minor histocompatibility antigens expressed in haematopoietic progenitor cells.

In order to establish the experimental conditions for the Delta-Assay in human patients, we initially used stem cells from a healthy donor. After establishing the growth conditions for CD34+ progenitor cells we tested the inhibitory effect of irradiated allogeneic PBMC on the expansion of these cells. The effector cells were irradiated with 15 Gray, which prevents proliferation but does not impair effector functions of the cells. Initial experiments showed that these cells are able to inhibit proliferation of CD34+ peripheral blood stem cells (PBSCs).

Subsequently the culture conditions were adapted for the proliferation of AML blasts. The same cytokine cocktail that had stimulated growth of PBSC, also stimulated growth of the leukemic cells from 16 patients. However, differences between patients were observed. The absolute number of counts per minute varied from patient to patient, as did the growth kinetics of the blasts. The day of maximal ^3H -thymidine uptake varied in the tested patients between day 2 and day 5. In patients with low blast counts, strongly enriched leukemic cell populations were obtained either by positive selection using anti-CD33- or anti-CD34-microbeads, or negative selection using anti-CD2- and anti-CD3-microbeads. Depending on the immune phenotype, one or the other method was used.

In summary the blast culture conditions have to be determined for each patient with regard to blast proliferation, input cell numbers, and optimal day of the ^3H -thymidine uptake.

In the second set of experiments, growth inhibition was studied by co-culture of AML blasts and irradiated allogeneic effector T-cells. For establishing test conditions, we used three different AML cell lines. Two opposite effects were observed: inhibition and stimulation of proliferation of the blasts. Surprisingly these results were also obtained with leukemic blasts from patients. Most of these blast-effector cell combinations were HLA-mismatched, which may result in strong immune responses favoring rather than inhibitory blast growth. In a HLA-identical combination of blasts and T cells primed by dendritic cells derived from leukemic cells inhibition was seen in high effector target ratios, whereas low ratios resulted in stimulation.

In summary the Delta-Assay is a valuable test to detect cellular immune responses against AML blasts.

To see whether there is a correlation between the test results and the clinical data, more donor-recipient pairs have to be tested. This will answer the question, whether this assay can be used as a prognostic marker for the detection of a GvL-effect in patients with AML.

8. Literaturverzeichnis

Advani SH, Hegde UP, Iyer RS, Gopal R, Saikia TK, Pai SK, Nair CN, Kurkure PA, Pai VR, Nadkarni KS: Prognostic significance of myeloperoxidase containing blast cells in acute myelogenous leukaemia.

Indian J Med Res 1993, 98: 8-14

Antin JH: Graft- versus leukemia: no longer an epiphenomenon.

Blood 1993, 82: 2273-2277

Austin H, Delzell E, Cole P: Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment.

Amer J Epidem 1988, 127: 419-439

Barnes DWH, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE: Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow. Preliminary communication.

Br Med J 1956, 32: 626-627

Billstrom R, Nilsson PG, Mitelman F: Chromosomes, Auer rods and prognosis in acute myeloid leukaemia.

Eur J Haematol 1988, 40: 273-278

Bishop JF: The treatment of adult acute myeloid leukemia.

Semin. Oncol. 1997, 24: 57-69

Brouwer RE, Zwinderman KH, Kluin-Nelemans, HC, Luxemburg-Heijs, SA, Willemze R, Falkenburg JHF: Expression and induction of costimulatory and adhesion molecules on acute myeloid leukemic cells: implications for adoptive immunotherapy.

Exp Hematol. 2000, 28: 161-168

Bruserud O, Halstensen A, Peen E, Solberg CO: Serum levels of adhesion molecules and cytokines in patients with acute leukaemia.

Leuk. Lymphoma 1996, 23:423-430

Bruserud O, Frostad S, Foss B: In vitro culture of acute myelogenous leukemia blasts: a comparison of four different culture media.

Journal of Hematotherapy 1999, 8: 63-73

Bruserud O, Gjertsen BT, Foss B, Huang T: New strategies in the treatment of acute myelogenous leukemia (AML): In vitro culture of AML cells – The Present use in experimental studies and the possible importance for future therapeutic approaches.

Stem Cells 2001, 19: 1-11

Büchner T: Acute leukemia.

Current Opinion in Hematology 1993, 1:172-182

Creutzig U, Ritter J, Budde M et al.: Early deaths due to hemorrhage and leukostasis in childhood acute myelogenous leukemia. Associations with hyperleukocytosis and acute monocytic leukemia.
Cancer 1987, 60: 3071-3079

De Buerger M, Bakker A, van Rood JJ, van der Woude F, Goulmy E: Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens.
J Immunol. 1992, 149: 1788-1794

Dolstra H, Fredrix H, Preijers F, Goulmy E, Figdor CG, de Witte TM, van de Wiele van Kemenade E: Recognition of a B cell leukemia-associated minor histocompatibility antigen by CTL.
J Immunol 1997, 158: 560

Faber LM, van der Hoeven J, Goulmy E, Hooftman-den Otter AL, van Luxemburg-Heijs SAP, Willemze R, Falkenburg JHF: Recognition of clonogenic leukemic cells, remission bone marrow and HLA-identical donor bone marrow by CD8+ or CD4+ minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes.
J Clin. Invest. 1995, 96: 877-883

Faber LM, van Luxemburg-Heijs SAP, Veenhof WFJ, Willemze R, Falkenburg JHF: Generation of CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones from a patient with severe graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: implications for graft-versus-leukemia reactivity.
Blood 1995, 86: 2821-2828

Falkenburg JHF, Goselink HM, van der Harst D, van Luxemburg-Heijs SAP, Kooy-Winkelaar YMC, Faber LM, de Kroon J, Brand A, Fibbe WE, Willemze R, Goulmy E: Growth inhibition of clonogenic leukemic precursor cells by minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.
J Exp. Med. 1991, 174: 27-33

Falkenburg JH, van de Corput L, Marijt EW, Willemze R: Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation.
Exp. Hematol. 2003, 31: 743-751

Fuchs R: Akute myeloische Leukämie. Therapie-Forschung-Perspektiven.
1. Auflage Bremen: UNI-MED, 2002

Gollard RP, Robbins BA, Piro L, Saven A: Acute myelogenous leukemia presenting with bulky lymphadenopathy. Case report and literature review.
Acta Haematol 1996, 95: 129-134

Gorin NC: Stem cell transplantation in acute leukemia.
Annals of the New York Academy of Sciences 1995, 770: 262-287

Goulmy E, Pool J, van den Elsen PJ: Interindividual conservation of T cell receptor β chain variable regions by minor histocompatibility antigen-specific HLA-A*0201-restricted cytotoxic T cell clones.
Blood 1995, 85: 2478-2481

Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JHF, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ: Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation.
N Engl J Med 1996, 334: 281-285

Graf N: Maligne Erkrankung im Kindesalter In: Pädiatrie-Duale Reihe, Hrsg.: Carl Friedrich Sitzmann, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1995:540

Herold G. (Hrsg.): Innere Medizin 1998: 70

Hoang T, Levy B, Onetto N, Haman A, Rodriguez-Cimadevilla JC: Tumor necrosis factor α stimulates the growth of the clonogenic cells of acute myeloblastic leukemia in synergy with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.
J.Exp.Med. 1989, 170: 15-26

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RC, Zwaan FE, Bortin MM. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.
Blood 1990, 75: 555-562

Hoyle CF, Gray RG, Wheatley K, Swirsky D, de Bastos M, Sherrington P, Rees JK, Hayhoe FG: Prognostic importance of Sudan Black positivity: a study of bone marrow slides from 1, 386 patients with de novo acute myeloid leukaemia.
Br J Haematol 1991, 79: 398-407

Hu JP, Cesano A, Santoli D, Clark SC, Hoang T: Effects of Interleukin-11 on the proliferation and cell cycle status of myeloid leukemic cells.
Blood 1993, 6: 1586-1592

Hunter AE, Rogers SY, Roberts IAG et al.: Autonomous growth of blast cells is associated with reduced survival in acute myeloblastic leukemia.
Blood 1993, 82: 899-903

Ichimaru M, Ishimaru T, Bellsky JL: Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki.
J Radiat Res 1978, 1: 262-282

Kao JY, Gong Y, Chen CM, Zheng QD, Chen JJ: Tumor-derived TGF-beta reduces the efficacy of dendritic cell/tumor fusion vaccine.
J Immunol. 2003, 170: 3806-3811

Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W: Donor leucocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients.
Blood 1990, 76: 2462-2465

Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermüller J, de Witte T, Holler E, Ansari H: Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia.
Blood 1995, 86: 2041-2050

Largaespada DA: Genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia: maximizing information flow from MuLV mutagenesis studies.
Leukemia 2000, 14: 1174-1184

Lemoli RM, Fortuna A, Tafuri A, Fogli M et al.: Interleukin-9 stimulates the proliferation of human myeloid leukemic cells.
Blood 1996, 9: 3852-3859

Löwenberg B, van Putten WLJ, Touw IP et al.: Autonomous proliferation of leukemic cells in vitro as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia.
N Engl J Med 1993, 328: 614-619

Löwenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia.
N Engl J Med 1999, 341: 1051-1062

Maguer-Satta V, Petzer AL, Eaves AC, Eaves CJ: BCR-ABL expression in different subpopulations of functionally characterized Ph⁺ CD34⁺ cells from patients with chronic myeloid leukemia.
Blood 1996, 88: 1796-1804

Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M: Adoptive immunotherapy of acute leukemia: Experimental and clinical results.
Cancer Res 1965, 25: 1525-1531

Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M, De Vries JM, Tubiana M, Lalanne C, Binet JL, Papiernik M, Seman G, Matsukuba M, Mery AM, Schwarzmann V, Flaisler A: Successful allogeneic bone marrow transplantation in man: Chimerism, induced specific tolerance and possible anti-leukemic effects.
Blood 1965, 25: 179-196

Maximov A: Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere.
Folia Haematol 1909, 8: 125-134

Mc Culloch EA, Curtis IJ, Messner HA, Senn JS, Germanson TD: The contribution of blast cell properties to outcome variation in acute myeloblastic leukemia.
Blood 1982, 59: 601-608

Messner HA, Till JE, Mc Culloch EA: Interacting cell populations affecting granulopoietic colony formation by normal and leukemic human marrow cells. Blood 1973, 42: 701-710

Messner HA, Fauser AA, Lepine J, Martin M: Properties of human pluripotent hemopoietic progenitors. Blood cells 1980, 6: 595-607

Murohashi I, Hoang T: Interferon- γ enhances growth factor-dependent proliferation of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. Blood 1991, 4: 1085-1095

Mutis T, Verdijk R, Schrama E, Esendam E, Brand A, Goulmy E: Neoplasia: Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens. Blood 1999, 93: 2336-2341

Nara N, Kurokawa H, Tanikawa S et al.: Prognostic significance of the blast self-renewal capacity in patients with acute myeloid leukemia. Cancer 1994, 73: 92-97

Opal SM, Huber CE: The role of interleukin-10 in critical illness. Curr Opin Infect Dis. 2000, 13: 221-226

Radich JP, Sanders JE, Buckner CD, Martin PJ, Petersen FB, Bensinger W, McDonald GB, Mori M, Schoch G, Hansen JA: Second allogeneic marrow transplantation for patients with recurrent leukemia after initial transplant with total-body irradiation-containing regimens. J Clin Oncol 1993, 11: 304-313

Renauld JC, Goethals A, Houssiau F, Merz H, van Roost E, van Snick J: Human P40/IL-9 expression in activated CD4+ cells, genomic organization and comparison with the mouse gene. J Immunol. 1990, 144: 4235-4241

Ribeiro RC, Oliveira MS, Fairclough D, Hurwitz C, Mirro J, Behm FG, Head D, Silva ML, Raimondi SC, Crist WM et al.: Acute megakaryoblastic leukemia in children and adolescents: a retrospective analysis of 24 cases. Leuk Lymphoma. 1993, 10: 299-306

Rosner F, Lee SL: Down's syndrome and acute leukemia: myeloblastic or lymphoblastic? Am J Med 1972, 53: 203-218

Schön D, Hoffmeister H: Bevölkerungsbezogene Krebsregister in der Bundesrepublik Deutschland, Band 3, MMV Medizin Verlag, München 1995; Zahlen und Fakten: zwölf häufige Krebserkrankungen – Spektrum der Wissenschaft Verlag mbh Heidelberg (1996):72.

Simpson E, Scott D, James E, Lombardi G, Cwynarski K, Dazzi F, Millrain M, Dyson PJ: Minor H antigens: genes and peptides.
Transpl Immunol. 2002, 10: 115-123

Smit WM, Rijnbeek M, van Bergen CAM, Fibbe WE, Willemze R, Falkenburg JHF: T cells recognizing leukemic CD34+ progenitor cells mediate the antileukemic effect of donor lymphocyte infusions for relapsed chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95: 10152-10157

Smit WM, Rijnbeek M, van Bergen CAM, Willemze R, Falkenburg JHF: Generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes from HLA-identical donors of patients with chronic myeloid leukemia using modifications of a limiting dilution assay.
Bone Marrow Transplant. 1998, 21: 553-560

Suzuki T, Morio T, Tohda S, Nagata K, Yamashita Y, Imai Y, Aoki N, Hirashima K, Nara N: Effects of interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor on the proliferation of leukemic blast progenitors from acute myeloblastic leukemia patients.
Jpn J Cancer Res. 1990, 81: 979-986

van Els CA, D`Amaro J, Pool J, Blokland E, Bakker A, van Elsen PJ, van Rood JJ, Goulmy E: Immunogenetics of human minor histocompatibility antigens: their polymorphism and immunodominance.
Immunogenetics 1992, 35: 161-165

van der Hoorn MAWG, van Luxemburg-Heijs SAP, van Bergen CAM, Bongaerts R., Willemze R., Falkenburg JHF: The progenitor cell inhibition assay to measure the anti-leukemic reactivity of T cell clones against acute and chronic myeloid leukemia.
Methods 2003, 31: 113-119

Ventura GJ, Hester JP, Smith TL et al.: Acute myeloblastic leukemia with hyperleukocytosis: risk factors for early mortality in induction.
Am J Hematol 1988, 27: 34-37

Voogt PJ, Fibbe WE, Veenhof WF, Brand A, Goulmy E, van Rood JJ, Falkenburg JHF: Cell-mediated lysis of human hematopoietic progenitor cells.
Leukemia 1987, 5: 427-431

Vollmer M, Li L, Schmitt A, Greiner J, Reinhardt P, Ringhoffer M, Wiesneth M, Dohner H, Schmitt M: Expression of human leucocyte antigens and co-stimulatory molecules on blasts of patients with acute myeloid leukaemia.
Br J Haematol. 2003, 120: 1000-1008

Weber M, Lange C, Günther W, Franz M, Kremmer E, Kolb HJ: Minor histocompatibility antigens on canine hemopoietic progenitor cells.
The Journal of Immunology 2003, 170: 5861-5868

Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED: Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation.

N Engl J Med. 1981, 304 (25): 1529-1533

Young DC, Griffin JD: Autocrine secretion of GM-CSF in acute myelogenous leukemia.

Blood 1986, 68: 1178-1181

9. Anhang

9.1 Danksagung

Herrn Professor Kolb danke ich für die Überlassung des Themas, für die stets anregenden Diskussionen und dafür, daß ich an Treffen der EU-Kooperationspartner teilnehmen und dort unsere Ergebnisse präsentieren durfte.

Sein Engagement für die Patienten und der stete Kampf neue Behandlungsmethoden zu entwickeln haben mich immer wieder tief beeindruckt. Es war für mich stets ein Ansporn vielleicht einen ganz kleinen Beitrag dabei zu leisten.

Daß ich dieses humanmedizinische Thema bearbeiten konnte verdanke ich Herrn Professor Hirschberger, der sich bereit erklärt hat als Betreuer für die tierärztliche Fakultät zu fungieren. Seine aufmunternden Worte und sein stets ehrliches Interesse an der Arbeit habe ich sehr angenehm, im Gegensatz zu ihm aber nie als selbstverständlich empfunden.

Einen großen, wenn nicht den größten Anteil am Gelingen der Arbeit hatten meine Betreuer Dr. Josef Mautner und Dr. Christoph Schmid. Während Josef bei labortechnischen Problemen stets eine Lösung parat hatte und auf alle auch noch so merkwürdigen Fragen eine Antwort wußte, hat Christoph in der Klinik die Probensammlung koordiniert. In diesem Zusammenhang auch ein besonderes Dankeschön an die Ärzte und Schwestern auf den Stationen, vor allem auf der M21, daß sie trotz des großen Pensums, das sie täglich abuarbeiten haben, auch an unser Blut gedacht haben.

Auch Herrn Dr. Hentrich vom Klinikum Harlaching gebührt ein großes Dankeschön für die Bereitstellung von Patientenmaterial.

Großen Respekt den Patienten und ihren Angehörigen, die trotz ihrer großen psychischen und physischen Belastung bereit waren Blut für diese Untersuchungen zu spenden.

Ein dickes Dankeschön an die Mitarbeiterinnen aus dem Stammzelllabor, vor allem an Iris Bigalke. Ihr verdanke ich nicht nur die CD34 positiven Zellen von gesunden Spendern, sondern auch eine „unvergeßliche Nacht“ im Reinraum.

Dr. Antonia Gaeta gebührt ein großes Dankeschön für Hilfe bei den FACS Analysen, Diskussionen, großes Fachwissen, Spaß, Freundschaft, aufmunternde Worte und ein paar Brocken italienisch...

Dr. Raymund Buhmann danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine fachlichen Ratschläge.

Dr. Helga Schmetzer und ihrer Mitarbeiterin Tanja Kröll danke ich für die gute Zusammenarbeit und den gegenseitigen Austausch von Zellmaterial.

Guido Höbbel, Michaela Svihla und Gisela Werner danke ich für spontane Hilfe bei allem was so angefallen ist. Zellen einfrieren, Blut in der Klinik abholen, Zellen in den Stickstoff bringen, etc. etc. Auch an den Rest der KKG HZT ein Dankeschön. Es hat Spaß gemacht hier zu arbeiten.

Sylvia Donhauser, als guter Geist des GSF-Institutes für Molekulare Immunologie hat nicht nur bei Übersetzungen ins Englische geholfen, auch Finanzabteilungen etc. erwischte sie immer auf dem richtigen Fuß.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. Udo Kummer der mir in meiner HIWI Zeit am Institut für Molekulare Immunologie der GSF in vielen, langen Gesprächen die Immunologie näher gebracht und schließlich den Kontakt zu Herrn Professor Kolb hergestellt hat.

Einen Dank an all diejenigen, die ich jetzt nicht namentlich erwähnt habe, die aber ihren Anteil am Gelingen der Arbeit hatten.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, vor allem meinem Mann für die Unterstützung und die aufmunternden Worte in schwierigen Momenten danken. Ein Satz wie „ Du schaffst das schon, da bin ich ganz sicher!“ kann manchmal doch Wunder wirken.

9.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sabine Kaiser, geb. Ascherl
Geburtsdatum/-ort: 04. Oktober 1970 in München
Eltern: Heinrich Ascherl, Margot Ascherl, geborene Haymann

Schulbildung:

1976 - 1980 Grundschule in München
1980 - 1989 Oskar-von-Miller Gymnasium in München
1989 Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung:

1993 - 1996 Ausbildung zur Biologielaborantin bei der GSF-
Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
in München-Neuherberg mit Abschluß vor der IHK

Studium:

1990 - 1993 Studium der Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel
an der Technischen Universität München (Außenstelle
Weihenstephan)

1996 - 2002 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München

25.10.1999 Erster Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
13.02.2001 Zweiter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
24.09.2002 Dritter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung

2002 Approbation als Tierärztin

2003 - 2005 Dissertation in der KKG HZT (Klinische Kooperationsgruppe
Hämatopoetische Zelltransplantation der GSF-
Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit und dem
Klinikum Großhadern der LMU-München) unter Leitung von
Professor Dr. Hans-Jochem Kolb