

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Großhadern der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

SEKRETION UND OBERFLÄCHENEXPRESSION VON  
CD137L (4-1BBL) UND CD178 (FAS-LIGAND) UND  
DEREN PROGNOSTISCHE RELEVANZ BEI PATIENTEN MIT  
MDS, AML UND NHL

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

vorgelegt von  
Nina Elisabeth Scholl

aus  
Dachau

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Helga Schmetzner

Mitberichterstatter:  
Priv. Doz. Dr. Dr. Fuat Oduncu  
Priv. Doz. Dr. Andreas Jung  
Prof. Dr. Georg W. Bornkamm

Mitbetreuung durch den promovierten  
Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2009

Meinem Großvater  
Konrad Bernauer (1919 – 2008)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1 Die akute myeloische Leukämie . . . . .	11
1.2 Das myelodysplastische Syndrom . . . . .	16
1.3 Das Non-Hodgkin-Lymphom . . . . .	19
1.4 Das Immunsystem . . . . .	22
1.4.1 Allgemein . . . . .	22
1.4.2 Erkennung von Krebszellen durch das Immunsystem . . . . .	23
1.4.3 Mechanismen verminderter Immunantwort – Immune Escape	24
1.5 Die Rolle des CD137L und CD178 . . . . .	26
1.5.1 CD137/CD137L (4-1BB/4-1BBL) . . . . .	26
1.5.2 CD178/CD95 (Fas-Ligand/Fas) . . . . .	29
1.6 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	31
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>33</b>
2.1 Patientencharakterisierung . . . . .	33
2.2 Reagenzien . . . . .	36
2.3 Bestimmung des sCD137L und sCD178 im menschlichen Serum . . . . .	36
2.4 Analyse der Oberflächenexpression des cCD137L bei MNC oder DC	38
2.5 DC-Generierung . . . . .	39
2.6 Statistische Analyse . . . . .	39
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1 Serummenge der löslichen Faktoren sCD137L und sCD178 bei NHL	41
3.2 Serummenge der löslichen Faktoren sCD137L und sCD178 bei AML	44
3.3 Oberflächenexpression von cCD137L auf Tumorzellen bei AML, MDS oder NHL . . . . .	50
3.3.1 Oberflächenexpression von cCD137L bei AML, MDS oder NHL	50
3.3.2 cCD137L - ein DC-Marker . . . . .	54
3.3.3 CD137L-FITC und CD137L-PE Antikörper im Vergleich . .	56
3.3.4 sCD137L - ein Marker für Mechanismen des „Immune-Escape“ im Zusammenhang mit seiner zellulären Expression . . . . .	56
<b>4 Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1 Die Rolle des sCD178 bei Patienten mit AML, MDS und NHL . . . . .	59
4.2 Die Rolle des sCD137L bei Patienten mit AML, MDS und NHL . . . . .	59
4.3 Die Rolle des zellständigen CD137L bei der Vermittlung und Modu- lation der Immunreaktion . . . . .	61
<b>5 Ausblick</b>	<b>65</b>
<b>6 Danksagung</b>	<b>67</b>
<b>7 Eigene Publikationen und Kongressbeiträge</b>	<b>69</b>
<b>8 Lebenslauf</b>	<b>86</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Aberr.	.....	Aberration
abs	.....	absolut
ALL	.....	akute leukämische Leukämie
AML	.....	akute myeloische Leukämie
APC	.....	Antigen präsentierende Zellen
AraC	.....	Cytosin-Arabinosid
ATG	.....	Anti-Thrombozyten-Globulin
BM	.....	Knochenmark
BSA	.....	bovine serum albumine
cCD137L	.....	zellulär/cellular CD137L
cDNA	.....	complementäre DNA
CLL	.....	chronisch lymphatische Leukämie
CML	.....	chronisch myeloische Leukämie
CMMI	.....	Chronisch myelomonozytäre Leukämie
CR	.....	komplette Remission
CTL	.....	cytotoxische T-Lymphozyten
CyA	.....	Ciclosporin A
DC	.....	dendritische Zellen
del	.....	Deletion
Dgn	.....	Diagnose
DNS	.....	Desoxyribonucleinsäure
e.M.	.....	extranodale Manifestation
EBV	.....	Epstein-Barr-Virus
EPO	.....	Erythropoietin
FAB-Klassifikation	.....	French-American-British-Klassifikation
FITC	.....	Fluorescin Isothiocyanat
g	.....	günstig
G-CSF	.....	Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor
GTP	.....	Guanosintriphosphat
GTP-Stoffwechsel	.....	Guanosintriphosphat
Hb-Wert	.....	Hämoglobin-Wert
HGF	.....	human growth factor
HLA	.....	humanes Lymphocytantigen
HTLV	.....	humanes T-lymphozytäres Virus
i	.....	intermediär
IFN	.....	Interferon
Ig	.....	Immunglobuline
IL	.....	Interleukin
inv	.....	Inversion
IPSS-Score	.....	internationales Prognose-Scoringsystem
KM	.....	Knochenmark
KM-Blasten	.....	Knochenmarks-Blasten
KMT	.....	Knochenmarktransplantation
L	.....	Ligand
LDH	.....	Lactatdehydrogenase
LPS	.....	Lipopolysaccharid
m	.....	männlich
mAB	.....	monoklonale Antikörper
MDS	.....	myelodysplastisches Syndrom
MHC	.....	major histocompatibility complex
MMP	.....	Matrix-Metalloproteinase
MNC	.....	mononukleäre Zellen

moABS .....	monoklonale Maus-Antikörper
MPO .....	Myeloperoxidase
mRNA .....	messenger Ribonukleinsäure
MW .....	Mittelwert
n .....	Anzahl Proben
NEZ .....	nichterythrozytäre Zellen
NHL .....	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen .....	natürliche Killerzellen
NO .....	Stickstoffmonoxid
NSE .....	unspezifische Esterase
pAML .....	primäre AML
PB .....	heparinisiertes Blut
PB .....	peripheres Blut
PC5 .....	Cy5-PE-Konjugation
PE .....	Phycoerythrin
Pers .....	Persistenz
PML-Gen .....	Gen auf Chromosom 17, bedeutend für die Ausreifung weißer Blutkörperchen
POX .....	Peroxidase
PR .....	partielle Remission
Prog .....	Progression
RA .....	refraktäre Anämie
RAEB .....	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess
RAEB-t .....	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation
RARS .....	refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
rel .....	relativ, bezogen auf 4000 Leukozyten
Rez .....	Rezidiv
s .....	schlecht
sAML .....	sekundäre AML
sCD137L .....	löslich/soluble CD137L
t .....	Translokation
TCR .....	T-Zell-Rezeptor
TIL .....	Tumor Infiltrating Lymphocytes
TIL .....	tumor-infiltrierende-Lymphozyten
TNF .....	Tumornekrose Faktor
TNFR .....	Tumornekrose Faktor Rezeptor
VEGF .....	vascular endothelial growth factor
VP .....	vesicle preparation
w .....	weiblich
WHO .....	world health organisation
ZNS .....	zentrales Nervensystem

## Zusammenfassung

CD137 (4-1BB), ein Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor (TNFR), der Fas-Rezeptor CD95 und ihre Liganden spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose bzw. der Immunantwort und der Pathogenese verschiedener Erkrankungen.

CD137 wird unter anderem auf aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert und vermittelt die Kostimulation zu seinem auf dendritischen Zellen exprimierten Liganden (CD137L). Darüber hinaus ist bekannt, dass CD137L auch auf soliden Tumorzellen, auf Tumoren lymphatischer Herkunft sowie auf aktivierte T-Zellen exprimiert sein kann. Es konnte gezeigt werden, dass eine Übertragung von CD137L auf die Zelloberfläche von Tumorzellen zu einer Immunantwort gegen jene maligne Zellen führt. Der Fas-Ligand (CD178), ebenfalls ein Mitglied der TNFR-Familie, wird unter anderem auf der Zelloberfläche von zytotoxischen T-Zellen exprimiert und vermittelt im Zusammenspiel mit seinem Rezeptor CD95 Apoptose in CD95-sensitiven Zellen. Dabei sind Metalloproteasen für die Abspaltung von löslichen Formen des CD137L sowie des CD178 verantwortlich. Ein vermehrter Nachweis des löslichen CD178 (sCD178) konnte bei Patienten mit einer erhöhten Apoptoserate, sowie bei diversen malignen Erkrankungen nachgewiesen werden, wie z.B. bei Leberzirrhose oder Melanomen; über die Rolle des löslichen CD137L (sCD137L) ist wenig bekannt. Vor kurzem konnte unsere Arbeitsgruppe für Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) zeigen, dass niedrige Werte des sCD137L und hohe Werte des sCD178 signifikant mit der Dauer eines progressfreien Überlebens korrelieren.

Somit steht fest, dass CD137 und CD95 und ihre Liganden zentrale regulatorische Funktionen des zellulären Überlebens sowie der Immunantwort beeinflussen. Mit dieser Arbeit soll daher das Expressionsverhalten von CD137L, sowie das Sekretionsverhalten von löslichen CD137L und CD178 bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, Myelodysplasien und Non-Hodgkin-Lymphomen und die prognostische Relevanz der Ergebnisse näher untersucht werden, um die biologischen Zusammenhänge im klinischen Kontext besser zu verstehen und mögliche therapeutische Aspekte ableiten zu können.

Zunächst wurden Serumwerte des sCD137L und des sCD178 von 42 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und von 46 Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) in verschiedenen Krankheitsstadien und Subtypen bestimmt, und die prognostische Relevanz der Ergebnisse, vor allem im Hinblick auf den Krankheitsverlauf und progressfreie Lebenszeiten, korriert.

Im Vergleich zu gesunden Probanden waren Serumwerte des sCD137L bei NHL-Patienten im Durchschnitt signifikant erhöht. Bei Patienten mit T-Zell-Lymphom erreichten die Werte im Mittel 13 pg/ml, bei Patienten mit B-Zell-Lymphom 7 pg/ml. Diese im Vergleich zu AML- und MDS-Proben geringeren Mengen (sCD137L erreichte bei AML-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Mittel einen Wert von 107 pg/ml) könnte dadurch erklärt werden, dass maligne Zellen bei NHL, im Gegensatz zu AML und MDS, in der Regel nicht im Blut nachweisbar sind. Eine Korrelation von Serumwerten des sCD137L mit Subtypen des NHL oder dem klinischen Verlauf der Patienten zeigte sich nicht.

Im Gegensatz dazu konnten wir bei AML-Patienten (wie bereits von unserer Gruppe bei MDS gezeigt) eine direkte Korrelation von erhöhten Serumwerten des sCD137L mit ungünstigen Subtypen und einem kürzeren progressiven Überleben zeigen: Patienten mit einem intermediären zytogenetischen Risiko wiesen z.B. einen Mittelwert von 59 pg/ml auf, Patienten mit einer, aufgrund der Zytogenetik, schlechten Prognose einen Mittelwert von 288 pg/ml. Patienten mit weniger als 40% Blasten im Knochenmark wiesen 14 pg/ml sCD137L im Vergleich zu 186 pg/ml bei Fällen mit mehr als 40% Blasten auf. Ferner konnten wir für AML-Fälle zeigen, dass niedrige Werte (<10,5 pg/ml) des sCD137L mit einer höheren Wahrscheinlichkeit des progressiven Überlebens korrelierten ( $P=0,07$ ). Dies könnte bedeuten, dass im

Serum vermehrt nachweisbarer sCD137L an den Rezeptor auf T-Zellen bindet, dadurch kompetitiv die Bindung der T-Zellen an dendritische Zellen oder Tumorzellen behindert, und somit Immune-Escape vermittelt. Die Quantifizierung von sCD137L erlaubt in Folge dessen eine Prognoseabschätzung für AML und MDS, aber nicht für NHL-Patienten. Eine Korrelation von Serumwerten des sCD178 mit Subtypen oder prognostischen Faktoren bei Patienten mit AML oder NHL konnte nicht gezeigt werden.

Im nächsten Schritt wurde die Expression von CD137L auf peripheren Blutzellen von 34 AML-, fünf MDS- und neun NHL-Patienten untersucht. Es zeigte sich eine zelluläre Koexpression von CD137L auf malignen Zellen bei NHL, sowie auch auf Blasten von AML- oder MDS-Patienten. 29 bzw. 28% der malignen Zellen bei Patienten mit einem B- oder T-Zell-Lymphom, 22% der Blasten von AML-Patienten und 16% der Blasten von MDS-Patienten koexprimierten zellulären CD137L (cCD137L). Zusätzlich wurde untersucht, ob cCD137L auf dendritischen Zellen (DC), die aus blastenhaltigen Blutproben bei 34 AML-Patienten und fünf MDS-Patienten generiert wurden, exprimiert wird. Eine Expression des CD137L konnte sowohl auf DC von Patienten mit AML (35%), als auch mit MDS (44%) nachgewiesen werden. Aufgrund der Expression von cCD137L sowohl auf Tumorzellen als auch auf DC kann geschlossen werden, dass der Marker an sich weder ein spezifischer Tumor- noch DC-Marker ist, jedoch höchstwahrscheinlich das Reaktionsverhalten zwischen diesen Zellen und T-Zellen beeinflusst.

Im letzten Teil der Arbeit sollte bei vier Proben von Patienten mit AML und elf von Patienten mit NHL festgestellt werden, ob eine direkte Korrelation einer zellulären Expression von CD137L mit im Serum nachweisbaren sCD137L-Werten besteht. Unsere Daten zeigten jedoch keine regelmäßige Korrelation zwischen zellulärer Expression des CD137L und der Menge des im Serum nachweisbaren sCD137L bei den von uns untersuchten Proben von AML- und NHL-Patienten. Dies könnte bedeuten, dass bei erhöhter zellulärer Expression von CD137L nicht zwingend eine Metalloprotease-vermittelte Abspaltung der löslichen Form einhergehen muss.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass CD137L auf malignen lymphatischen sowie auch myeloischen Zellen exprimiert wird, was bislang noch nicht gezeigt wurde. Zudem wird cCD137L auf DC nachgewiesen. Seine lösliche Form findet sich in vermehrter Form bei AML- und MDS-Patienten. Sie korreliert bei oben genannten Patienten mit einem kürzeren progressfreien Überleben. Somit konnten wir mit dieser Arbeit neue Erkenntnisse über das Expressionsverhalten des CD137L, sowie auch die prognostische Bedeutung von ins Serum freigesetztem CD137L erarbeiten. Dadurch könnte in Zukunft ein Krankheitsprogress bei AML oder MDS früher erkannt und therapeutisch interveniert werden. Sollte es gelingen, freigesetzten CD137L mit einer innovativen immunologischen, z.B. antikörperbasierten Strategie zu entfernen, könnte möglicherweise der Immune-Escape umgangen und die Kostimulation zwischen T-Zellen, DC und Tumorzellen wieder hergestellt werden.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die akute myeloische Leukämie

**Definition und Epidemiologie** Der Begriff Leukämie wurde von R. Virchow geprägt, der bei einem Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie beim Spiegeln des Augenhintergrundes das „weiße Blut“ des Patienten bemerkte [167].

Leukämien sind definiert als maligne Neoplasien des hämatopoetischen Systems. Sie sind charakterisiert durch eine unregulierte Proliferation und eine fehlende Ausdifferenzierung unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen [127].

Die akute myeloische Leukämie repräsentiert eine Gruppe von Störungen der klonalen hämatopoetischen Stammzellreihe. Bei diesen liegt entweder eine mangelnde Differenzierung oder eine von physiologischen Regulierungsmechanismen unabhängige Proliferation von myeloischen Vorläuferzellen (Blasten) zugrunde, was zu einer Akkumulation und anschließenden Ausschwemmung nicht funktionsfähiger Blasten führt. Häufig werden auch extramedulläre Organe befallen [182]. Durch diese Akkumulation unreifer Vorläuferzellen im Knochenmark (KM) und im peripheren Blut (PB) werden gesunde, funktionstüchtige Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten zurückgedrängt, wodurch die Patienten unter Anämie, verstärkter Blutungsneigung und schweren Infektionen leiden [200, 92].

Die AML ist mit 80% der AML-Fälle zwischen dem 60. und dem 65. Lebensjahr eine Erkrankung des höheren Erwachsenenalters [176].

In der BRD liegt die Inzidenz insgesamt bei ca 3/100.000 Einwohnern pro Jahr, 15/100.000 bei den über 65-Jährigen [22] und 0,6/100.000 bei den unter 15-Jährigen [59]. Die AML findet sich 1,5 mal häufiger beim männlichen als beim weiblichen Geschlecht. Frauen mit der Blutgruppe 0 haben eine geringere Erkrankungswahrscheinlichkeit [82].

**Ätiologie** Obwohl es immer wieder neue Erkenntnisse über die multifaktorielle Ätiologie der AML gibt, sind die speziellen Ursachen noch nicht in vollem Ausmaß bekannt.

Man weiß jedoch, dass folgende Faktoren bei der Entstehung einer AML eine Rolle spielen: zum einen sind **genetische Faktoren** bekannt. Das Risiko im ersten Lebensjahrzehnt an einer AML zu erkranken steigt bei Patienten mit Trisomie 21 um das 10-20 fache. Ebenfalls erhöht ist es bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 1. Außerdem lassen sich bei verschiedenen Leukämien typische Chromosomenaberrationen nachweisen [153, 167]. Am häufigsten findet eine postzygotische, genetische Transformation statt, wodurch Gene verändert werden, die in der Regulation von Zellwachstum, Ausreifung oder Apoptose involviert sind (Protoonkogene). Meist blockieren diese Protoonkogene die Funktion sog. Transkriptionsfaktoren, über die die hämatopoetische Differenzierung gesteuert wird, wie z.B AML1/ETO (FAB-Klassifikation M2). Die Translokation t(8;21)(q22;q22) ist die bei AML-Patienten am häufigsten vorkommende genetische Aberration [26]. Bei ca. 30% der AML-Patienten werden Mutationen der ras-Protoonkogene gefunden [45, 130], die in die Vermittlung wachstumsfaktorabhängiger Signale (GTP-Stoffwechsel) involviert sind [166]. Ebenso findet man bei 20-30% der AML-Zellen Mutationen des Wachstumsfaktorrezeptors FL-R, was zur ligandenunabhängigen Stimulation des Rezeptors und zur Apoptoseresistenz der Zellen führt [93].

Durch die Beobachtung von Opfern von Strahlenunfällen oder Nuklearwaffen wurde festgestellt, dass **ionisierende Strahlen** Leukämien mit einer Latenz von bis zu fünf Jahren begünstigen [167].

Außerdem ist bekannt, dass ein vermehrter Kontakt zu Benzol [11] und die Aufnahme von alkylierenden Substanzen in der Nahrung, sowie im Zigarettenrauch ein erhöhtes Risiko mit sich bringt [153].

Ein weiteres Problem stellen in der modernen Onkologie **sekundäre AML-Erkrankungen** dar. Infolge einer Chemotherapie, mit oder ohne Radiotherapie, einer anderen Neoplasie treten mit einer Häufigkeit von 10-15% sekundäre AML-Erkrankungen auf. Eine Bedeutung hierfür haben alkylierenden Substanzen wie, Metchlorethamin, Cyclophosphamid, Busulfan, Chlorambucil, BCNU und CCNU, sowie Substanzen mit Wirkung auf die DNS-Topoisomerase II, wie Etoposid, Teniposid und Anthracycline. V.a. nach Therapie mit Cyclophosphamid des Morbus Hodgkins [141], mit Teniposid oder Etoposid der ALL im Kindesalter [147], mit Chlorambucil bei Polycythämien [97] und mit Melphalan bei Myelomen [35] wurde eine erhöhte AML-Inzidenz beobachtet. In diesen Fällen geht üblicherweise bis zum Ausbruch der AML eine myelodepressive Phase voraus.

**Pathogenese** Der Ursprungsort der AML ist das Knochenmark, das diffus von leukämischen Blasten infiltriert wird. Durch diesen Vorgang wird, wie bereits erwähnt, die Ausreifung der gesunden hämatopoetischen Zellreihe durch eine mechanische Verdrängung gehemmt, was zu einer progressiven Knochenmarkinsuffizienz führt. Im weiteren Krankheitsverlauf können die entarteten Zellen aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden und andere Gewebe, wie z.B. Leber, Milz und Lymphknoten, infiltrieren [127]. Zu den allgemeinen Malignitätsfaktoren zählen die Proliferationskinetik, die Hämatopoeseverdrängung und der Differenzierungsblock.

Charakteristisch für die **Proliferationskinetik** ist eine hohe Zellteilungsrate, also eine kurze Zellverdopplungszeit, was zu einem raschen Wachstum der entarteten Zellen führt. Es ist bekannt, dass die meisten Zellen Zytokine wie z.B. G-CSF, IL-3 und IL-1 benötigen um zu proliferieren. Um unabhängig von diesem externen Stimulationsweg proliferieren zu können, besitzen einige AML-Zellen eine autokrine HGF-Produktion [91, 202].

Dadurch, dass die Stromazellen des Knochenmarks, in denen die normale **Hämatopoesie** stattfindet von leukämischen Blasten im Rahmen einer AML besetzt sind, und die gesunden und entarteten Zellen gleichermaßen Zytokine zur Proliferation benötigen, endet die AML in einer Anämie, Granulo- und Thrombozytopenie. Dies führt bei den betroffenen Personen zu einer Agranulozytose mit Verlust der Infektabwehr und einer Thrombozytopenie mit hämorrhagischer Diathese [167].

Außerdem ist bei der AML der **Differenzierungsblock** betroffen. Die Blasten, die bei der AML gebildet werden, können, je nachdem welche Zellreihe betroffen ist, nicht phagozytieren und die Erythrozyten und Thrombozyten sind nicht funktionsfähig. Zu Beginn der Erkrankung kann man im Blut noch gesunde Granulozyten nachweisen. Dieser Zustand, in dem nur leukämische Blasten und segmentkernige Granulozyten im Blut zu finden sind, nennt man „Hiatus leucaemicus“ (hiatus, lat. = Spalt) [167].

Die Zellen der AML stammen alle von einer einzigen, genetisch veränderten Vorläuferzelle ab, weshalb sie zu den klonalen Erkrankungen zählt, und können sich aus verschiedenen Reifungsstufen der myeloischen Stammzellreihe entwickeln [47]. In Einzelfällen wurden jedoch auch oligoklonale Fälle beobachtet [169]. Es ist bekannt, dass 2/3 aller AML-Zellen von reiferen, hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammen. Diejenigen AML Fälle, die ihren Ursprung in pluripotenten Stammzellen haben, scheinen v.a. bei älteren Patienten und bei Patienten mit sekundärer Leukämie und/oder vorausgegangenem MDS aufzutreten [48, 47]. Dies erklärt die klinische, morphologische, immunphänotypische und molekulare Heterogenität der AML.

**Diagnostik und Klassifikation** Um eine AML diagnostizieren zu können, sind die zytomorphologische Beurteilung von Blut- und Knochenmarkausstrichen in der Pappenheim-Färbung und zytochemische Analysen nach der FAB-Klassifikation von

Bedeutung: durch die FAB-Klassifikation (French-American-British-Klassifikation) wird die AML nach morphologischen, zytochemischen und zytogenetischen Markern in die Subtypen M1 bis M7 unterteilt. Außerdem wird der Immunphänotyp zur Klassifikation bestimmt. Um die Zellmorphologie und eventuelle Zelleinschlüsse wie Granula oder Auer-Stäbchen beurteilen zu können, wird die klassische Färbung mit der panoptischen May-Grünwald-Giemsa-Färbung nach Pappenheim verwendet. Zur weiteren Differenzierung der Zellen verwendet man die mit zytochemischen Verfahren nachweisbaren Enzymaktivitäten (Myeloperoxidase MPO, unspezifische Esterase NSE) oder Glykogen (PAS-Färbung).

Grundlegend für die Diagnose einer AML ist das Vorhandensein eines Blastenanteils im Knochenmark unter allen kernhaltigen Zellen von mindestens 30%, wobei mindestens 3% der Blasten Peroxidase-positiv sein müssen [92]. Bei gut 93% der Patienten sind mehr als 50% leukämische Blasten neben reifen Granulozyten, ein stark hyperzelluläres Knochenmark und ein Überwiegen des entsprechenden Zellklons im Blutausstrich nachweisbar. Die Anzahl der Leukozyten ist nicht spezifisch und kann im Blutbild normal, erhöht oder erniedrigt sein, wobei 40% aller Fälle subleukämisch (= normale oder erniedrigte Leukozytenzahl) verlaufen [2]. Meist besteht eine Anämie mit einem Hb-Wert von weniger als 10g/dl und eine Thrombozytopenie mit unter 50.000 Thrombozyten/ml [181]. Neben der Zytomorphologie und der Zytchemie sind folgende Untersuchungen notwendig, um den Patienten bestmöglichst supportiv therapieren zu können: ein Differentialblutbild mit Infektionsserologie, die Blutgruppenbestimmung, die Anlage von Überwachungskulturen, Röntgenbilder des Thorax und der Nasennebenhöhlen, eine sonographische Untersuchung des Abdomens und eine Lungenfunktion [92]. Je nachdem, ob sich die AML de novo, nach vorangegangener Radio- und/oder Chemotherapie eines anderen Malignoms, aus einem mehr als sechs Monate bestehenden myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder einer anderen myeloproliferativen Erkrankung entwickelt, unterscheidet man zwischen einer primären (pAML) und einer sekundären AML (sAML) [90]. Die WHO-Klassifikation beinhaltet eine Kombination aus Methoden der FAB-Klassifikation (Zytomorphologie, Zytchemie und Immunphänotypisierung), der Zyt- und Molekulargenetik und weiteren klinischen Faktoren. In dieser Arbeit wurde jedoch die FAB-Klassifikation verwendet [92].

**Klinik** Der rasche Krankheitsverlauf ist geprägt von den Folgen der Verdrängung der normalen Hämatopoese und der leukämischen Infiltration extramedullärer Gewebe, wobei die Patienten meist durch Abgeschlagenheit und Schwäche, Belastungsdyspnoe, Tachykardie, Blässe, Fieber, Infektionen und Knochenschmerzen beeinträchtigt sind. Neben eher unspezifischen Symptomen wie Appetitlosigkeit, Schwäche, Abgeschlagenheit, und der B-Symptomatik (Gewichtsverlust, Nachschweiß und Fieber) zeigen sich als Zeichen der Anämie Blässe, Tachykardie und ein, in vielen Fällen nachweisbares, Systolikum. Durch die Thrombopenie neigen die Patienten verstärkt zu Blutungen wie starke Epistaxis, Fundusblutungen, Petechien nach langem Stehen und oralen Schleimhautblutungen. Die Neutropenie, die durch eine Verdrängung der Granulopoese entsteht, bringt ein erhöhtes Risiko an Infektionen, z.B der Atemwege, des Zahnfleisches, der Nasennebenhöhlen, der Harnwege, der Perianalregion, der Haut- und Schleimhautübergänge und Pilzinfektionen, wie z.B Soor durch Candida albicans mit sich [13, 12, 2, 92]. Extramedulläre Manifestationen treten bei t(8;21) und inv(16), einer Positivität für CD56, CD2, CD4 und CD7, den Subtypen M2, M4, und M5, einer vorhandenen Differenzierung bzw. Ausreifung, einem bestimmten Alter und hohen Leukozytenzahlen auf. Als häufigste Manifestationen sind die Infiltration von oberflächlichen Lymphknoten, Leber und Milz, Zahnfleisch, ZNS und Haut zu nennen [92].

FAB-Subtyp	FAB-Kriterien					Assoziation mit		
	Granulozytopoese	Monozyto-poese	Erythro-poese	Immunologische Marker	zytogenetisch	molekular-genetisch	Häufigkeit	
M0	< 10%, POX < 3%	< 20%	< 50%	myeloisch positiv, lymphatisch negativ	t(8;21)	AML1/ETO	1,70%	
M1	< 10%, POX > 3%	< 20%	< 50%		t(8;21)	AML1/ETO	12,50%	
M2	> 10%	< 20%	< 50%		t(15;17)	PML/RAR $\alpha$	98%	
M3	hypergranulär Auer-Stäbchen	< 20%	< 50%	HLA-DR-negativ	t(15;17)	PML/RAR $\alpha$		
M3v	mikrogranulär-monozytoidie Kerne	< 20%	< 50%	HLA-DR-negativ				
M4	> 20%	> 20%	< 50%		inv(16)/t(16;16)	CBF $\beta$ /MYH11	100%	
M4Eo	> 20% abnorme Eosinophile	> 20%	< 50%					
M5a	< 20%	> 80% unreif	< 50%		11q23 Aberr.	MLL-Aberr.	31%	
M5b	< 20%	> 80% reif	< 50%		11q23 Aberr.	MLL-Aberr.	17%	
M6	> 30% der NEZ sind Blasten	variabel	> 50%					
M7	> 30% Megakaryoblasten	variabel	< 50%	CD41/CD61-positiv				

POX: Peroxidase, NEZ: nichterythrozytäre Zellen, HLA-DR: MHC II, lokalisiert auf Chromosom 6, AML1/CBF $\beta$ : Transkriptionsfaktorkomplex, steuert die Expression von Genen für Wachstumsfaktoren, AML1/ETO: pathologisches Fusionsprodukt zweier Gene, PML-Gen: Gen auf Chromosom 17, bedeutend für die Ausreitung weißer Blutkörperchen, RAR $\alpha$ : Gen auf Chromosom 15 für den Retinolsäurerzeptor alpha, PML/RAR $\alpha$ : pathologisches Fusionsprodukt zweier Gene, MYH11: myosin heavy chain, lokalisiert auf Chromosom 6, CBF $\beta$ /MYH11: pathologisches Fusionsprodukt zweier Gene, MLL: Myeloid-Lymphoid-Leukemia, lokalisiert auf Chromosom 11, beteiligt an Translokationen mit verschiedenen Genen auf anderen Chromosomen

Tabelle 1: FAB-Klassifikation [92]

**Prognose** Es ist bekannt, dass 70% der erwachsenen Patienten im Alter von 15 bis 60 Jahren durch moderne Chemotherapieregime eine komplette Remission (CR) mit 25 bis 35%-igem Langzeitüberleben erreichen. Die Prognose bei Patienten über 60 Jahren ist jedoch im Hinblick auf die Remissionsrate, die Remissionsdauer und die Überlebenszeit erheblich schlechter [92].

Bei Patienten mit AML gelten einige funktionelle Parameter als allgemeine Prognosekriterien: für einen prognostisch ungünstigen Verlauf gelten initial hohe Leukozytenzahlen, Serum-LDH Werte von mehr als 700 U/l, ein Lebensalter von > 60 Jahren, eine fehlende Blastenreduktion nach initialer Chemotherapie, ein autonomes Koloniewachstum in vitro und der Nachweis einer minimalen Residualerkrankung zum Zeitpunkt der Remission.

Die Prognose bei AML ist, wie durch viele Analysen bekannt, zusätzlich von zytogenetischen Anomalien abhängig: eine CR konnte bei der Gruppe mit der besten Prognose, zu der die Translokation t(8;21) (FAB-M2), t(15;17) oder die Inversion inv(16)/ t(16;16) (FAB-M4Eo) zählen, bei über 80% erreicht werden. Nach fünf Jahren waren 70% der Patienten in anhaltender Remission. Diese beiden sind die am häufigsten vorkommenden Anomalien der de-novo-AML bei Patienten jünger als 45 Jahre. 10 bis 15% aller Patienten zählen zu der Gruppe mit der schlechtesten Prognose. Sie weisen zytogenetische Anomalien wie -5/5q-, -7/7q- t(3;3) und 17p oder einen komplexen aberranten Karyotyp mit mehr als drei Anomalien auf. Hier erreichen 75% der Patienten eine CR, wobei nur 10% dieser Patienten nach fünf Jahren eine anhaltende Remission aufweisen. Zu der Gruppe der Patienten mit einem intermediären Risiko gehören all diejenigen mit normalem Karyotyp oder anderen chromosomal Anomalien. 75% dieser Patienten erreichen eine CR, das krankheitsfreie Überleben liegt bei nur 30% [92, 64].

**Therapie** Bei der AML muss die Behandlung der Krankheit sofort begonnen werden, sobald die Diagnose gestellt wurde. Floride Infekte, Gerinnungsstörungen oder Blutungen werden jedoch vor Therapiebeginn behandelt, um den Zustand des Patienten zu stabilisieren [92].

Die Therapie der AML ist aufgeteilt in eine Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie, wobei das Ziel der Behandlung das Erreichen und Erhalten einer CR ist. Bei der konventionellen **Induktionstherapie** wird weltweit am häufigsten das „3/7“-Programm verwendet. Hierfür werden die Patienten drei Tage lang mit einem Anthrazyklin, meist Daunorubicin, und sieben Tage lang mit Cytosin-Arabinosid (AraC) behandelt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine Intensivierung der Induktionstherapie zu einer Erhöhung der Remissionsrate führt, jedoch auch die Frühodesrate erhöht. Die Durchführung einer **Konsolidierungstherapie** nach Erreichen einer Remission bringt ein signifikant besseres Überleben der Patienten mit sich. Hierzu gehört sowohl die Chemokonsolidierung, als auch die Knochenmarktransplantation (KMT). Die konventionelle Konsolidierung beinhaltet die Gabe von gleichen Zytostatika im selben Dosisbereich, der bereits zur Induktionstherapie verwendet wurde [92]. Bei der KMT unterscheidet man zwischen der allogenen und der autologen KMT. Bei der allogenen KMT finden sich zwei Arten von KM-Spendern: HLA-identische, verwandte Spender oder nicht verwandte Spender bzw. HLA-differente Verwandte. Die Prognose des Patienten bei der Indikationsstellung spielt hier eine große Rolle. Durch die KMT wird zwar die Rezidivrate gesenkt, es besteht jedoch ein erhöhtes Risiko durch lebensbedrohliche Komplikationen. Die autologe Stammzelltransplantation nach myeloablativer Therapie und intensivierter Konsolidierungstherapie zeigte ebenfalls eine signifikant verminderte Rezidivrate (bei ebenfalls erhöhter Mortalität und nicht verbessertem Gesamtüberleben). Um die Mortalität, die bei vielen Patienten durch ein Rezidiv nach Erreichen einer Remission und einer Konsolidierungstherapie auftritt, zu senken, erhalten die Pati-

enten über zwei bis drei Jahre eine **Erhaltungstherapie**. Hierzu zählen die „low dose maintenance“ und die ablative, zytoreduktive Erhaltungstherapie.

## 1.2 Das myelodysplastische Syndrom

**Definition und Epidemiologie** Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind definiert als klonale Erkrankungen hämatopoetischer Stammzellen. Charakteristisch sind ein zellreiches, dysplastisches Knochenmark mit oft erhöhtem Blastenanteil und eine qualitativ und quantitativ veränderte Hämatopoese, wodurch eine Anämie, Neutropenie und/oder eine Thrombozytopenie mit unterschiedlichem Schweregrad entsteht. Daraus resultiert oft eine transfusionspflichtige Anämie und ein erhöhtes Risiko für Infektionen oder Blutungen. Noch dazu besteht die Gefahr, dass das MDS in eine sAML übergeht. Über 50% der Patienten sterben an den Folgen, die das Krankheitsbild mit sich bringt, nämlich Infektionen, Blutungen aber auch an der sich daraus entwickelnden sAML. 2/3 der Patienten haben eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 3-4 Jahren nach Auftreten der Krankheit, wobei einzelne Personen mit hohem Risikofaktor (siehe Tabelle 3) nur eine Überlebenswahrscheinlichkeit von einem Jahr haben [29, 4]. Die Inzidenz von MDS variiert von 2,1-12,6 Fällen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 60 und 70 Jahren, wobei die Inzidenz bei dieser Altersgruppe 20-50/100.000 Einwohnern pro Jahr beträgt [10, 9, 199]. Die wachsende Inzidenz dieser Krankheit lässt sich auf die immer besser werdende medizinische Behandlung älterer Menschen und auf unsere immer älter werdende Gesellschaft zurückführen [199].

**Ätiologie** Als Risikofaktoren für MDS gelten Alkoholgenuss, Zigarettenrauch, ionisierende Strahlung, immunsuppressive Therapien, virale Infektionen und Kontakt mit Benzol. Diese Faktoren treffen jedoch nur bei ca. 20-30% der Patienten zu. Ältere Menschen und Männer erkranken häufiger [154, 36, 126, 133, 49]. Bei nachweisbar vorhandenen Risikofaktoren wird die Krankheit oft als sekundäres MDS beschrieben [49], wobei Fälle von idiopathischem MDS, auch primäres MDS genannt werden (bis zu 90%). Am häufigsten tritt das sekundäre MDS nach Zytostatikatherapie (Alkylieren, Topoisomerase II-Inhibitoren, Cisplatin, Fludarabin und Azathioprin) und/oder Radiochemotherapie auf [116, 154, 4], welches als schwer therapierbar gilt und sich oft zu einer sAML weiterentwickelt [29]. Diese besondere Form von MDS wird t-MDS genannt (therapy-related MDS).

**Pathogenese** Der Pathogenese von MDS liegen klonale zytogenetische Veränderungen von Knochenmarkzellen und ein abnormes Knochenmark zugrunde [30, 106, 152, 27, 69, 46, 66].

Anfangs dominiert eine vermehrte Apoptose von Vorläuferzellen, was zu einer ineffektiven Hämatopoiese führt. Diese wird durch eine erhöhte Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen ausgeglichen [46]. Das Resultat ist eine Zytoptenie neben einer normalen oder erhöhten Zellzahl im Knochenmark [44]. Gründe für diese Veränderungen kann eine erhöhte Apoptoserate sein, bei der lösliche Faktoren wie Epojen oder Interaktionen von TNF mit TNFR und Fas mit Fas-L (siehe Kapitel 1.5.2) eine Rolle spielen. Eine Dysregulation des Immunsystems, bei der oft HLA-D15 (DR2) überexprimiert ist, und eine Dysregulation der Angiogenese mit Beteiligung von VEGF (vascular endothelial growth factor) und TNF $\alpha$  sind bei der Pathogenese dieser Erkrankung von Bedeutung.

Die zweite Phase des MDS ist gekennzeichnet von Ereignissen, die die Apoptoserate senken, anti-apoptotische Signale fördern und genetische Instabilitäten mit sich bringen [152]: Telomere sind stabilisierende Regionen am Ende des eukaryotischen Chromosoms, die durch das Telomerase-Enzym nach Zellteilungen immer wieder mit repetitiver DNA verlängert werden. Diese Telomere werden zu Beginn der

Subtyp	Knochenmark		Peripheres Blut	
	% Blasten	% Ringsideroblasten	% Blasten	Monozyten
Refraktäre Anämie (RA)	< 5	$\leq 15$	$\leq 1$	$< 1/nl$
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	< 5	$> 15$	$\leq 1$	$< 1/nl$
Refraktäre Anämie mit Blastenexzess (RAEB)	5-20	$\pm$	$< 5$	$< 1/nl$
Refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation (RAEB-t)	21-30	$\pm$	$< 5$	$> 1/nl$
Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML)	$\leq 20$	$\pm$	$< 5$	$> 1/nl$

**Tabelle 2: FAB-Klassifikation der MDS [189]**

Krankheit durch die gesteigerte Apoptoserate immer kürzer. Bei fortschreitender Krankheit, wie bei fast allen Krebsarten, inklusive AML, werden diese jedoch durch eine erhöhte Telomeraseaktivität immer länger [114, 135, 6, 152]. Noch dazu lassen sich bei Patienten mit MDS veränderte Methylierungen erkennen, die z.B zu einer erhöhten Zellteilung führen [103, 71]. Weitere genetische Instabilitäten sind zu 30% eine Überexpression des anti-apoptotischen Gens Bcl-2, p53 Abnormalitäten und Punktmutationen im RAS-Oncogen, welche meist einen schlechteren Krankheitsverlauf zur Folge haben [135, 6, 152, 46].

Zytogenetische Aberrationen finden sich bei primären MDS zu 40-70%, bei t-MDS jedoch zu 95% [154]. Die häufigsten Aberrationen bei MDS sind del(20q), Monosomie Y, Monosomie 5, das 5q-Syndrom, Monosomie 7/del(7q), das 17p-Syndrom, 11q23 Aberrationen, Trisomie 8 und weitere komplexe Karyotypen [137]; auch sie bedeuten eine schlechtere Prognose für die Patienten [29].

**Diagnostik und Klassifikation** Diagnostisch entscheidende morphologische Befundkonstellationen für ein MDS sind: eine variable, eher gesteigerte Zelldichte, wobei ein Alters berechtigt hyperzelluläres Mark in 63% der Fällen und ein hypozelluläres Mark in 8-28% der Fälle auftritt, Zeichen der Dysmyelopoese in mindestens zwei Zellreihen (Erythroblasten, Megakaryozyten oder neutrophile Segmente-kernige) mit mindestens 50% betroffenen Zellen in jeder Zellreihe und ein mehr als 5% erhöhter, jedoch für die Diagnose einer AML nicht ausreichender Prozentsatz von Blasten im Blut und/oder Knochenmarksausstrich [1]. Weitere Befunde, die für die Diagnose jedoch nicht entscheidend sind, sind z.B ausgeprägte erythrozytäre Dysmorphien, wie Makroovalozyten und Akantozyten, Hypochromasie oder Mikrozytose und Döhle Körper, eine Linksverschiebung der Granulozyten, Megakaryozytenkerne und zirkulierende Mikromegakaryozyten und eine Eosinophilie oder Vermehrung der Gewebsmastzellen im Knochenmark [189].

Die auch für diese Arbeit verwendete FAB-Klassifikation basiert auf der Morphologie des Blutes und des Knochenmarks (siehe Tabelle 2).

Um auch die Anzahl der betroffenen Zelllinien und den Karyotyp bei der Klassifikation der MDS berücksichtigen zu können, wurde das IPSS-Score (Internationales Prognose-Scoringsystem), das zusätzlich eine Einteilung in Risikogruppen ermöglicht, entwickelt (siehe Tabelle 3).

Bei der WHO-Klassifikation werden zusätzlich neben dem Blastenanteil, der Differenzierung und der Linienzugehörigkeit der Dysplasiegrad, der Karyotyp bzw. molekulare Aberrationen als genetischer Faktor und klinisch definierte Syndrome

	Score-Wert				
	0	0,5	1	1,5	2
Blasten im KM, %	< 5	5-10	∅	11-20	21-30
Karyotyp*	günstig	intermediär	ungünstig	∅	∅
Zytopenien (Anzahl betr. Linien)	0/1	2/3	∅	∅	∅

\*Karyotyp =zytogenetisches Risiko  
 günstig: normaler Karyotyp, -Y, del(5) allein, del(20)  
 intermediär: weder Hoch- noch Niedrig-Risiko, +8  
 ungünstig: komplexe Aberrationen ( $\leq 3$  Aberrationen), Veränderung an Chromosom 7

**Tabelle 3: IPSS-Risiko-Score [189]**

(5q-Syndrom) integriert.

**Klinik** 20% der Patienten sind asymptatisch und ihre Diagnose ist auf einen Zufallsbefund zurückzuführen. Von den 80% aller Betroffenen, die Symptome zeigen, haben 70% Anämiesymptome (Müdigkeit, und Blässe), 35% hohe Infektionsneigungen und 20% Blutungsneigungen in Folge einer Zytopenie. Außerdem weisen einige Patienten einen extramedullären Befall, wie Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie auf. Dieses Erscheinungsbild ist jedoch häufiger bei chronisch myelomonozytärer Leukämie zu finden [34, 16, 192]. Es wird geschätzt, dass bis zu 10% der MDS-Patienten an verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie z.B akute systemische Vaskulitis, Glomerulonephritis, Fieber, Arthritis und peripheren Neuropathien leiden [155, 193]. Noch dazu stellten Chandran et al fest, dass seronegative Arthritiden eine Assoziation mit MDS aufweisen und diesem oft vorausgehen [31]. Eine weitere Komplikation des MDS ist der Diabetes insipidus, was auf eine leukämische Infiltration des Hypothalamus-Hypophysen-Systems zurückzuführen ist. Diese Patienten leiden an Hypodipsie, Hypernatriämie und Dehydratation, wobei diese Komplikation des MDS nur selten auftritt [129].

**Prognose** Kriterien wie ein höheres Alter, Vorerkrankungen, ein reduzierter Allgemeinzustand, das Ausmaß der Zytopenie, eine Erhöhung der Thymidinkinase und der LDH, ein erhöhter Blastenanteil und komplexe Chromosomenaberrationen zählen zu den ungünstigen Prognosefaktoren. Außerdem sterben über 50% der Patienten an den Komplikationen des MDS wie Infekten, Blutungen und sAML [4]. Bei einer Punktzahl von 0 Punkten im IPSS-Risiko-Score (siehe Tabelle 3) gilt ein niedriges Risiko mit einem medianen Überleben von 5,7 Jahren, mit 0,5 bis 1 Punkt haben die Patienten ein intermediäres Risiko I mit einem medianen Überleben von 3,5 Jahren, mit 1,5 bis 2 Punkten gilt ein intermediäres Risiko II mit einem medianen Überleben von 1,2 Jahren und mit mehr als 2,5 Punkten haben die Patienten ein medianes Überleben von 0,4 Jahren [189].

**Therapie** Bei der Therapie des MDS wird zwischen einer **symptomatischen Therapie** und **speziellen Therapieoptionen** unterschieden.

Die **symptomatische Therapie** ist vor allem bei älteren Patienten eine wichtige Option. Zu ihr zählen die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten bei einem Hämoglobin von unter 8g/dl, die Gabe von Thrombozytenkonzentraten bei Thrombozytenwerten unter 10/nl oder manifesten Blutungen und eine frühzeitige Antibiotikatherapie bei Infekten.

Jede weitere über die symptomatische Therapie hinaus gehende Behandlung ist individuell abzuwägen und abhängig vom Behandlungsziel, wie das Anstreben einer

kompletten Remission, die alleinige Behandlung krankheitsspezifischer Komplikationen und das Ziel das Gesamtüberleben zu verlängern oder den Patienten rein palliativ zu versorgen [189].

Es gelten jedoch von dem U.S. amerikanischen National Comprehensive Cancer Network erstellte Leitlinien, die Indikationen für spezielle Therapieoptionen geben. Dazu gehören Allgemeinsymptome (Fieber, Nachtschweiß und Müdigkeit), ein schnelles Fortschreiten der Erkrankung oder der Wechsel in eine höhere MDS-Kategorie, ein IPSS von über 1,5 oder neutrophile Granulozyten von weniger als 0,5/nl, ein gehäuftes Auftreten von Infekten oder eine hämatopoetische Insuffizienz, die eine Transfusion von Erythrozyten oder Thrombozyten postuliert [131]. Bei Vorliegen einer der genannten Punkte kann die Indikation zu folgenden Therapiemöglichkeiten gegeben sein. Zur Milderung einer Anämie ist die Gabe von Wachstumsfaktoren, wie Erythropoietin (EPO) ggf. in Kombination mit dem Granulozytenkolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) zur Besserung einer Neutropenie üblich. Durch eine Immunsuppressive Therapie mit Ciclosporin (CyA) [88] oder Anti-Thrombozyten-Globulin (ATG) [122, 187, 19] kann Transfusionsunabhängigkeit oder in Einzelfällen sogar eine komplette Remission erreicht werden. Diese Behandlung ist, v.a. bei Patienten unter 65 Jahren, mit einem IPSS bis 1, ohne aktive Infektionen und mit bis zu diesem Zeitpunkt niedrigem Transfusionsbedarf sinnvoll.

### 1.3 Das Non-Hodgkin-Lymphom

**Definition und Epidemiologie** Non-Hodgkin-Lymphome sind bösartige Krankheiten des lymphatischen Systems. In 85% der Fälle handelt es sich um B-Zell-, in ungefähr 15% um T-Zell- oder NK-Zell-Lymphome [14, 168]. Eine leukämische Manifestation ist in 30% der Fälle zu beobachten. Zu den Sonderformen zählen das Plasmozytom, das sich primär im Knochenmark manifestiert und die chronisch lymphatische Leukämie (CLL), ein leukämisches B-Zell-Lymphom [5]. Die Inzidenz der NHL beträgt 10/100.000 Einwohner jährlich, wobei die Tendenz steigend ist. Männer erkranken häufiger als Frauen, außerdem ist ein Häufigkeitsgipfel im höheren Alter zu erkennen [5, 23].

**Ätiologie** Zu den bereits bekannten Risikofaktoren zählen **Viren**, wie das Epstein-Barr-Virus (EBV), das an der Entstehung des in Zentralafrika vorkommenden endemischen Burkitt Lymphom beteiligt ist, das humane T-lymphozytäre Virus 1 (HTLV1), ein Retrovirus, und HTLV2, **Chromosomenaberrationen** wie Translokationen, die Tumorsuppressorgene inaktivieren sowie **ionisierende Strahlung** und **angeborene und erworbene Immundefekte**. Maligne Erkrankungen sind bei Kindern mit angeborenen Immundefekten die zweit häufigste Todesursache, wobei über die Hälfte NHL darstellen. Auch Patienten, die mit Immunsuppressiva behandelt werden oder an AIDS erkrankt sind, entwickeln gehäuft ein NHL [5, 14, 23].

**Pathogenese** Bei der Pathogenese des NHL spielen Hybrid-Gene, wie REL-NRG, die durch Translokationen entstehen, eine entscheidende Rolle [5]. Die Ursache dafür, dass B-Zell-Lymphome ungefähr zehn mal so häufig wie T-Zell-Lymphome vorkommen, liegt vermutlich darin begründet, dass B-Zellen drei Entwicklungsstufen durchlaufen müssen und damit im Gegensatz zu den T-Zellen anfälliger für pathogene Translokationen sind, die zu Fehlregulationen von wachstums- und überlebenssteuernden Genen führen [42].

**Diagnostik und Klassifikation** Zu Beginn der Diagnosestellung steht eine ausführliche Anamnese, die die Frage nach B-Symptomatik, Pruritus und auffälligen

Lymphknoten enthalten muss. Bei der klinischen Untersuchung wird vor allem auf den Lymphknotenstatus und eine häufig vorkommende Milzvergrößerung geachtet. Außerdem sind ein auffälliges Blutbild mit leukämischem Verlauf, erhöhte LDH-Werte und eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit richtungweisend, wobei zusätzlich auf eine monoklonale Gammopathie geachtet werden sollte. Entscheidend zur Diagnosestellung eines NHL ist die Lymphknotenbiopsie mit anschließender histologischer Untersuchung. Dies ist prognostisch und therapeutisch von Bedeutung. Zusätzlich sollten das Knochenmark und befallene Organe biopsiert werden [5, 50].

In Deutschland wird neben der international gültigen WHO-Klassifikation, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, die Kiel-Klassifikation benutzt. Durch die WHO-Klassifikation werden, unter Berücksichtigung der Wachstumsdynamik und Zellreife, die Lymphome in zwei Gruppen unterteilt: die indolenten Lymphome mit niedrigem Malignitätsgrad und die aggressiven Lymphome mit hohem Malignitätsgrad. Noch dazu werden Faktoren, wie die Immunologie und die Genetik berücksichtigt. Einige Lymphome, wie das MALT-Lymphom des Gastrointestinaltraktes, AIDS-related lymphoma, lymphoproliferative Erkrankungen, ZNS-Lymphome und die CLL werden aufgrund ihrer besonderen Histologie, dem klinischen Verlauf und der Therapie gesondert betrachtet [3].

**Klinik** Zu den Leitsymptomen eines NHL zählen vor allem die Lymphadenopathie, die Splenomegalie und die Hepatomegalie. Neben Allgemeinsymptomen, wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Müdigkeit, Leistungsminde rung und Blässe, auf Grund einer Anämie, leiden die Patienten bei Granulozytopenie, Antikörpermangelsyndrom oder Immundefizienz häufig an Infekten und bei Thrombopenie an Blutungsneigungen und Petechien. Außerdem werden Hautveränderungen wie Erytheme und plaqueartige Infiltrationen, Pruritus und Zeichen der Organinfiltration beobachtet [50].

**Prognose** Die Prognose von Patienten mit NHL ist wesentlich von der Art des Tumors, dem Ausmaß der Erkrankung, der Verfassung des Patienten und der medizinischen Vorgesichte abhängig. Von folgenden Faktoren ist bereits bekannt, dass sie mit einem rasch progredienten Krankheitsverlauf einhergehen: ein Alter von über 60 Jahren, ein reduzierter Allgemeinzustand, Zeichen der B-Symptomatik, ein dissemi niertes Stadium, eine abdominelle Tumormasse von mehr als zehn Zentimetern im Durchmesser, mehr als drei extranodale Manifestationen, ein Befall des Knochenmarks, eine erhöhte LDH-Konzentration im Serum und eine Verschlechterung des histologischen Typs [43].

Die Stadieneinteilung der NHL erfolgt nach dem Prinzip der Ann-Arbor-Klassifikation (siehe Tabelle 4), die aus vier Stadien besteht und zwischen einem primär nodalen und einem primär extranodalen Befall unterscheidet.

Niedrigmaligne NHL zeichnen sich durch ihre langsame Progredienz aus. Die Patienten haben meist ein generalisiertes, nicht heilbares Stadium mit einer Überlebenszeit von zwei bis zehn Jahren, wobei die Patienten mit den seltener vorkommenden lokalisierten Stadien mit einer 50%igen Chance geheilt werden können. Hochmaligne oder aggressive NHL sind meist rasch progredient, bei zehn bis 15% lokalisiert (Stadium I-II) und bei 85-90% generalisiert (Stadium II-IV). Da sie rasch wachsen, sind sie mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% prinzipiell heilbar. Unbehandelt haben die Patienten jedoch eine kurze Überlebenszeit von Wochen bis Monaten [3, 5].

**Therapie** Bei der Therapie eines NHL muss immer das Alter und der Allgemeinzustand des Patienten, sowie die Histologie und das Stadium der Erkrankung

Stadium	Primär nodale Manifestation (70%)	Primär extranodale Manifestation (30%)
I	Befall einer Lymphknotenregion	Befall eines extralymphatischen Organs oder Gewebes
II1	Befall von benachbarten Lymphknotenregionen über- oder unterhalb des Zwerchfells (II1) oder einer Lymphknotenregion mit lokalisiertem Übergang auf ein benachbartes Organ oder Gewebe (II1E)	Befall eines extralymphatischen Organs einschl. der regionalen Lymphknoten (II1) oder eines weiteren benachbarten extralymphatischen Organs (II1E) ober- oder unterhalb des Zwerchfells
II2	Befall von zwei nicht benachbarten oder mehr als zwei benachbarten Lymphknotenregionen ober- oder unterhalb des Zwerchfells (II2) einschl. eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (II2E)	Befall eines extralymphatischen Organs und Lymphknotenbefall, der über die regionalen Lymphknoten hinausgeht und auch einen weiteren lokalisierten Organbefall einschließen kann (II2E)
III	Befall von Lymphknotenregionen ober- und unterhalb des Zwerchfells (III) einschl. eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (IIIIE) oder der Milz (IIIS) oder beide (IIISE)	Befall eines extralymphatischen Organs und Lymphknotenbefall ober- und unterhalb des Zwerchfells einschl. eines weiteren lokalisierten extralymphatischen Organs oder Gewebes (IIIIE) oder der Milz (IIIS) oder beide (IIISE)
IV	Lymphknotenbefall mit diffusem oder disseminiertem Befall extralymphatischer Organe und Gewebe	Diffuser oder disseminierter Organbefall mit oder ohne Lymphknotenbefall

Zusatz: A Ohne Allgemeinerscheinungen B: Mit B-Symptomatik (> 10% in den letzten 6 Monaten)

**Tabelle 4: Ann-Arbor-Klassifikation [5]**

berücksichtigt werden. Die Therapie variiert, je nachdem welche Untergruppe vorherrscht, stark. Hochmaligne NHL werden immer, niedrigmaligne nur zum Teil, mit einer kurativen Absicht bei Diagnosestellung aggressiv nach dem CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin = Oncovin und Prednison) therapiert. Patienten, die eine Sekundärtherapie erhalten, und Hochrisikopatienten werden mit einer Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation behandelt. Von einer Sekundärtherapie spricht man bei primär refraktären Patienten und solchen mit Rezidiven. Niedrigmaligne NHL werden überwiegend schonend mit einer palliativen Absicht therapiert: Patienten in einem lokalisierten Stadium (Stadium I und II) werden nach dem Prinzip „watch and wait“ therapiert oder mit einer milden Radiotherapie und/oder einer milden Chemotherapie nach dem CHOP-Schema behandelt. Bei Patienten im generalisierten Stadium (Stadium III und IV) gelten B-Symptome, eine hämatopoetische Insuffizienz, eine rasche Progression, eine Organdestruktion, große Lymphknoten und/oder eine Splenomegalie mit Beschwerden oder eine Paraproteinämie mit einer Erhöhung des Gesamteiweißes über 9g/dl als Therapieindikation [5, 50].

## 1.4 Das Immunsystem

### 1.4.1 Allgemein

Das Immunsystem hält als komplex funktionierendes System die individuelle Struktur des menschlichen Körpers aufrecht, indem es körperfremde Substanzen abwehrt und atypische Zellen des menschlichen Körpers, wie zum Beispiel Tumorzellen, kontinuierlich eliminiert [72].

Es besteht aus einem unspezifischen, angeborenen, und in der frühen Phase der Immunantwort, aktiven System und einem adaptiven, erworbenen Immunsystem, das erst nach einigen Tagen aktiv wird.

Zum **unspezifischen Immunsystem** gehören vor allem neutrophile Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und NK-Zellen (natürliche Killerzellen). Diese Zellen kommunizieren hauptsächlich über proinflammatorische Zytokine wie IL-1 (Interleukin-1), IL-6, TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor-alpha), IL-12 und Chemozine, wie IL-8 und Eikosanoide, wie Prostaglandine, Prostazykline und Thromboxane miteinander, durch die weitere Zellsysteme wie Endothelzellen und Lymphozyten aktiviert werden. Die in der Frühphase der Immunantwort freigesetzten Effektormoleküle Stickstoffmonoxid (NO), reaktive Sauerstoffspezies, Komplementfaktoren, Myeloperoxidase, proteolytische Enzyme, wie Granulozyten-Elastase und toxische Granulabestandteile wirken zytotoxisch auf die „bekämpften“ Mikroorganismen [142].

Zelluläre Faktoren der unspezifischen Abwehr, wie Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und NK-Zellen stellen eine Verbindung zwischen dem unspezifischen und dem **adaptiven Immunsystem** dar. Die adaptive Immunantwort unterscheidet sich von der unspezifischen in den Eigenschaften der Spezifität, der Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ über das MHC- bzw. HLA-System (siehe unten) und einem immunologischen Gedächtnis [142]. Das adaptive Immunsystem lässt sich wiederum in eine zelluläre und eine humorale Komponente unterteilen. Die zelluläre Antwort besteht aus Zellen der lymphatischen Reihe, den B-Zellen, die im Knochenmark heranreifen und den T-Zellen, die sich im Thymus zu reifen Zellen entwickeln. Bei den B- und T-Zellen wird jeweils nicht das ganze Antigen von den entsprechenden Lymphozyten erkannt, sondern nur ein Epitop, was dazu führt, dass ein Antigen von verschiedenen Lymphozytenklonen erkannt werden kann. Unterschiede zwischen B- und T-Zellen gibt es vor allem in deren spezifischen Antigenerkennung, der Struktur der jeweiligen Antigenerkennung und ihrer Effektorfunktion. Genauer gesagt werden Antigene von B-

Zellen in ihrer nativen Form erkannt, wogegen T-Zellen Antigene erst nach Prozessierung und Präsentation der Peptide durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) über Membran gebundene MHC- bzw. HLA-Moleküle wahrnehmen können. Durch MHC-Moleküle ist es dem Immunsystem möglich, zwischen körpereigenen und fremden bzw. entarteten Zellen unterscheiden zu können. Die MHC-Moleküle der Klasse I sind auf nahezu allen Körperzellen vorhanden. Durch sie wird die Zelle bzw. das jeweilige Gewebe charakterisiert. Antigenbruchstücke, z.B von Viren, die in die Zelle eingedrungen sind, bewirken durch die Präsentation über MHC-I eine T-Zell-Antwort. Die infizierte Zelle wird eliminiert. MHC-Moleküle der Klasse II sind vor allem auf Zellen des Immunsystems, den APCs nachweisbar. Sie präsentieren bevorzugt größere Peptidbruchstücke, z.B von Bakterien, die über Endozytose von der Zelle aufgenommen wurden. Auch B-Lymphozyten präsentieren die von ihnen aufgenommenen Antigene über MHC-II-Moleküle [120]. CD4<sup>+</sup> T-Zellen benötigen HLA-II-Moleküle und differenzieren, nachdem sie aktiviert wurden, zu T<sub>H1</sub>-Zellen, die überwiegend eine zelluläre Immunantwort induzieren und T<sub>H2</sub>-Zellen, die eher eine von Antikörpern abhängige humorale Immunantwort bewirken. CD8<sup>+</sup> T-Zellen benötigen HLA-I-Moleküle. Diese sind zytotoxische T-Zellen oder Suppressor-T-Zellen. Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt unter anderem über die soeben beschriebene, unspezifische Wechselwirkung von T-Zellen mit APCs über CD4 und CD8, die spezifische Wechselwirkung von T-Zell-Rezeptor mit über HLA-I oder HLA-II präsentierten Antigenpeptiden und über die Wechselwirkung mit dem auf T-Zellen vorkommenden CD28 und dem auf APCs vorhandenen B7 (CD80/CD86). Diese Aktivierung wirkt kostimulatorisch.

An der humoralen Abwehr sind Antigenrezeptoren beteiligt. Sie werden von B-Zellen, nachdem sie zu Plasmazellen aktiviert wurden, freigesetzt. Diese Immunglobuline (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE), auch Antikörper genannt, können, gelöst oder als Bestandteile der Plasmamembran von reifen B-Zellen, nachgewiesen werden. Durch die Aktivierung einer größeren Anzahl von B-Zellen bei der Immunisierung wird erreicht, dass eine Vielzahl von Antikörpern, die gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind, im Serum vorhanden sind. Die Aktivierung der B-Zellen geschieht über einen mehrstufigen Prozess, an dem unter anderem, wie auch bei der T-Zelle, kostimulatorische Signale über die Wechselwirkung zwischen B7 und CD28 beteiligt sind [75, 142].

#### 1.4.2 Erkennung von Krebszellen durch das Immunsystem

Trotz des heutigen umfassenden Wissens über die Mechanismen unseres Immunsystems ist immer noch nicht genau bekannt, wie Tumore der Immunantwort entgehen können, und in welcher Weise Tumorzellen mit dem Immunsystem interagieren. Paul Ehrlich glaubte bereits Ende des 19. Jahrhunderts, dass eine Immunreaktion gegen Tumorzellen besteht. Er vertrat die These, dass aberrante Zellen in großem Ausmaß in unserem Körper vorhanden sind, jedoch vom Immunsystem soweit in Schach gehalten werden, dass nur ein gewisser Teil an Tumorerkrankungen klinisch sichtbar werden. Burnett und Thomas entwickelten Ehrlichs Idee weiter und kamen zu dem Entschluss, dass die Zellen des Immunsystems kontinuierlich den menschlichen Körper nach abnormalen Zellen absuchen und diese anschließend eliminieren [159].

Es spricht viel dafür, dass das Immunsystem entscheidend dazu beiträgt, das Tumorwachstum zu verzögern und eine Regression von bereits existierenden Tumoren zu bewirken. Folgende Beobachtungen unterstützen diese Theorie: 1) Autopsien zeigten eine erhöhte Anzahl von Tumoren, die klinisch inapparent waren, 2) in vielen Tumoren wurde eine lymphatische Infiltration gefunden, die als Zeichen einer immunologischen Reaktion gewertet werden kann, 3) es wurden spontane Regressionen beobachtet, 4) die Inzidenz von Tumoren ist in der Neonatalperiode und

bei älteren Menschen, beides Lebensabschnitte in denen das Immunsystem nicht voll funktionsfähig ist, am größten, 5) es wurde eine erhöhte Anzahl an Tumoren bei immunsupprimierten Patienten gefunden [159]. Es wurde jedoch bekannt, dass die Tumore, die bei immunsupprimierten Patienten in größerem Ausmaß nachgewiesen wurden, mit Infektionskrankheiten assoziiert sind, was die These wiederum schwächt [77].

Letztendlich konnte man durch viele Experimente zeigen, dass das Immunsystem, vor allem die zelluläre Immunantwort mit den zytotoxischen T-Lymphozyten, eine große Rolle bei der Tumorabwehr im menschlichen Körpers spielt [83, 150]. Es wurde gezeigt, dass sich die zelluläre Immunantwort gegen intrazelluläre Proteine richtet, die über das MHC-System auf der Zelloberfläche präsentiert und von T-Zellen erkannt werden (siehe unten) [56]. Lange Zeit wurde vermutet, dass Tumorzellen über fremde Moleküle, die auf der Zellmembran exprimiert werden durch das Immunsystem als „fremd“ erkannt werden. Es wurde aber gezeigt, dass die meisten Immunreaktionen gegen Tumore nicht auf der Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ basieren, sondern eher gegen Antigene gerichtet sind, die die Zelle als körpereigen auszeichnen, jedoch im Kontext mit anderen immunologisch relevanten Faktoren stehen [21, 136].

#### 1.4.3 Mechanismen verminderter Immunantwort – Immune Escape

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse stellt sich die Frage, ob Tumorzellen aktive Strategien entwickeln, um der körpereigenen Immunantwort zu entgehen oder ob sie vom Immunsystem schlicht und ergreifend nicht erkannt oder gar ignoriert werden.

Tumorzellen exprimieren entweder Neoantigene oder Onkofetalantigene. Neoantigene lassen sich in tumorspezifische Antigene, die lediglich auf Tumorzellen, aber nicht auf adulten Normalzellen, nachweisbar sind und in tumorassoziierte Antigene, die im Gegensatz zu den tumorspezifischen Antigenen auch auf normalen untransformierten Zellen zu finden sind, aufteilen.

Folgende Immunreaktionen konnten bei den meisten Tumoren bereits nachgewiesen werden: Im Rahmen einer humoralen Immunreaktion wird das Tumorwachstum durch gegen tumorassoziierte Oberflächenantigene gerichtete Antikörper gehemmt. Dies geschieht entweder durch komplementbindende Antikörper, die zytotoxisch auf Tumorzellen wirken, oder durch Makrophagen bzw. natürliche Killerzellen. Durch diese humoralen Antikörper werden jedoch häufig tumorspezifische Membranantigene bedeckt, wodurch sie für zytotoxische Zellen nicht mehr erkennbar sind. Zytotoxische CD8-Zellen der zellvermittelten Immunantwort erkennen Tumorzellen über tumorspezifische Antigene, die über HLA-I-Moleküle präsentiert werden, und töten sie daraufhin ab. Diese sind in vielen Tumoren als tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) nachweisbar [151].

Eine **inadäquate Immunantwort** könnte auf der Tatsache beruhen, dass das zweite Signal, das T-Zellen zu ihrer Aktivierung aus ihrer Umwelt von Zytokinen oder kostimulatorischen Molekülen benötigen, im Tumorgewebe nicht existiert und damit eine Toleranz des Tumors bewirkt. Noch dazu führt die Tatsache, dass Antigene, um von T-Zellen erkannt zu werden, von APCs präsentiert werden müssen. Dafür wird eine relativ große Menge von Antigenen benötigt. Eine nicht ausreichende Menge an Antigenen führt nicht nur dazu, dass T-Zellen nicht aktiviert werden, sondern auch zu einer Toleranz der Tumorzellen gegenüber dem Immunsystem [96]. Ein Grund für die niedrige Anzahl an Antigenen ist vermutlicherweise, dass Tumorzellen ohne eine inflammatorische Komponente über Apoptose zugrunde gehen. Dies hat zur Folge, dass Phagozyten, die die Fähigkeit zur Antigenpräsentation nicht besitzen, die abgestorbenen Zellen phagozytieren, was wiederum zu einer zu geringen Menge an Antigenen führt, die von dendritischen Zellen präsentiert werden können [41].

Neben den soeben beschriebenen Vorgänge der inadäquaten Immunantwort gibt es viele Hinweise für aktive Mechanismen der Tumorzellen, um einer Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem entgegen zu wirken (**Immune Escape**).

Wie schon beschrieben, ist die Expression von Antigenen zusammen mit MHC-Molekülen entscheidend für die Erkennung eines Tumors durch T-Zellen. Deshalb ist eine T-Zell-Antwort bei abnormer Antigenpräsentation nicht gewährleistet. Eine defekte Expression von Proteasomen- oder Transporteruntereinheiten in Tumorzellen, die zu einer funktionslosen Präsentation und Expression von Antigenpeptiden zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) führt, konnte nachgewiesen werden [149, 112]. Außerdem entdeckten Marincola et al. eine reduzierte Anzahl von Transporteruntereinheiten in Gewebeproben von verschiedenen Tumoren und noch ausgeprägter bei Metastasen [113]. Weiterhin deutet die Tatsache, dass eine verminderte Expression von MHC oder HLA I auf der Oberfläche von Tumorzellen zu einer verminderten Immunantwort gegen Tumorzellen führt, auf einen „Immune Escape“ Mechanismus hin. Dies konnte zu Beginn an Tiermodellen gezeigt werden und weiterhin an verschiedenen menschlichen Tumoren [37, 52, 54, 77]. Die Tatsache, dass die Anzahl von exprimiertem HLA I zwischen unterschiedlichen Tumorgeweben variiert bestätigt diese These [33]. Ein kompletter Verlust von HLA I würde eine Aktivierung von NK-Zellen mit sich bringen, die die Eigenschaft besitzen, Zellen mit zu geringer Expression von HLA I zu eliminieren [108]. Dies lässt vermuten, dass besagte reduzierte Anzahl von HLA I auf der Oberfläche von Tumorzellen noch ausreichend ist, um keine NK-Zell-Aktivierung zu bewirken, jedoch zu gering ist, um T-Zellen zu aktivieren [81].

Ein weiterer Grund für die Toleranz von Tumorzellen durch das Immunsystem könnten lösliche HLA-Moleküle darstellen. Es sind viele Mechanismen beschrieben worden, auf welche Weise die Sekretion von HLA induziert wird. Noch dazu konnten lösliche HLA-Moleküle im Serum, im Urin und in anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, wobei die Leber eine sehr große Menge an löslichem HLA aufwies. Da die Leber ein Organ ist, das eine hohe Toleranz im Rahmen von Transplantatabstoßungen aufweist, ist dies ein Zeichen für die immunsuppressive Wirkung von löslichem HLA [203, 81]. Zavazava et al. stellten die These auf, dass lösliches HLA durch einen programmierten Zelltod von zytotoxischen T-Lymphozyten eine Immuntoleranz induziert [204].

Noch dazu ist bekannt, dass verschiedene Faktoren die „Schulung“ von T-Zellen von Geburt an beeinflussen. In diesem Zusammenhang haben T-Zellen auch wiederholten Kontakt mit entarteten endogenen und exogenen Epitopen. Dieses Phänomen wurde von Bevan als „molecular mimicry“ beschrieben [18]. Bestimmte T-Zell-Rezeptoren besitzen die Eigenschaft, mehrere, biochemisch verwandte Peptide binden zu können, wodurch viele verschiedene Reaktionen induziert werden können. Hierbei beeinflussen Interaktionen mit teilweise agonistischen oder antagonistischen Peptiden die Reaktionen von CTL mit ihren natürlichen Liganden [109]. Dies könnte eine Ursache für eine beeinträchtigte Reaktion von tumorantigenspezifischen CTL gegen Tumore sein.

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, spielt eine wichtige Rolle in der Tumorimmunologie. Hierbei induziert die Bindung des Fas-Rezeptors an seinen Liganden (siehe Kapitel 1.5.2) die Apoptose der Zielzelle [183]. In den letzten Jahren wurde man jedoch auf eine weitere Rolle des Fas/Fas-Ligand Systems aufmerksam, und zwar bei der Interaktion zwischen Tumoren und dem Immunsystem. Neben der schon bekannten Expression von FasL auf T- und NK-Zellen, fand man ihn zusätzlich auf Zellen, die nicht zum lymphatischen System gehören, nämlich auf Stromazellen des Auges und auf Sertolizellen des Hodens und von Neuronen. Diese Tatsache lässt vermuten, dass das Vorhandensein von FasL für einen besonderen Immunstatus wichtig ist [61]. Deshalb stellt man sich vor, dass Tumorzellen nicht nur die Expression von Fas runter regulieren [81, 107], sondern auch FasL expri-

mieren oder seine Expression nach einer chemotherapeutischen Behandlung hoch regulieren [51]. Dadurch, dass diese Expression von FasL zu einer Eliminierung von Tumor-infiltrierenden-Lymphozyten (TIL) führt, ermöglicht sie den Tumorzellen, sich vor dem Immunsystem zu schützen [55, 148, 177]. Die Tatsache, dass bei menschlichen Tumoren *in situ* die Apoptose von Lymphozyten charakterisierend ist [55, 148], unterstützt diese These, die jedoch immer noch nicht endgültig geklärt ist. Die Diskussion über die Rolle des FasL bei der Frage nach einem „Immune Escape“ Mechanismus verdeutlicht, dass die Interaktion zwischen Tumoren und dem Immunsystem über die Expression von Oberflächenmolekülen bei weitem komplexer ist, als zu Beginn erwartet.

Salih vermutet, dass die Interaktion von Tumoren und dem Immunsystem von einem Gleichgewicht zwischen der Expression von verschiedenen Oberflächenmolekülen abhängig ist, die für die Immunogenität von Tumorzellen und damit für das Zustandekommen einer adäquaten Immunantwort zuständig sind [159]. Die Tatsache, dass CD137L, der Ligand des an der Kostimulation von T-Zellen beteiligten CD137 (siehe Kapitel 1.5.1), in unterschiedlichem Ausmaß auf Tumorzellen entdeckt wurde [158], und dass die Behandlung mit sublethalen Dosen von verschiedenen Chemotherapeutika eine Hochregulierung oder Runterregulierung der Expression von CD137L oder anderen kostimulatorischen Molekülen auf Tumorzellen induziert, spricht weiterhin für eine Interaktion zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem [159].

## 1.5 Die Rolle des CD137L und CD178

In diesem Abschnitt werden der CD137L und der CD178 mit ihren jeweiligen Rezeptoren charakterisiert und deren Aufgabe und Funktion, ihr Zusammenhang mit Tumorzellen und die jeweils lösliche Form näher erläutert.

### 1.5.1 CD137/CD137L (4-1BB/4-1BBL)

**Charakterisierung** CD137 (4-1BB) gehört zur Familie der Tumornekrose Faktor Rezeptoren (TNFR), die primär auf aktivierten T-Zellen exprimiert werden [179, 138]. Zu der Familie der TNFR zählen letztendlich 13 Proteine, zu denen Fas (CD95), CD30, TNFR I/II, OX40, CD40, CD27, HVEM/TR2, RANK und OPG gehören. Die Familie der TNFR kann weiterhin in zwei Gruppen aufgeteilt werden: zu der einen gehören Moleküle wie CD137, OX40 und CD27, die hauptsächlich auf lymphatischen Zellen exprimiert werden, zu der anderen Moleküle wie NGF-R, Fas und TNFRI/II, die auf mehreren Gewebearten zu finden sind [179].

Seine Namen erhielten der TNF und dessen Rezeptor durch Versuche an Mäusen, deren Tumore nach einer Behandlung mit TNF nekrotisierten. Er wird jedoch in der Onkologie noch nicht zu diesen Zwecken eingesetzt. TNF führt als proinflammatorisches Zytokin zu Fieber und in hohen Konzentrationen zum septischen Schock, außerdem spielt er eine entscheidende Rolle bei entzündlichen Erkrankungen [67, 104, 68].

Die menschliche Form des CD137 wurde aus cDNA-Banken (complementäre DNA) von peripheren T-Zellen isoliert, die mit PMA und Ionomycin behandelt wurden. Das Protein besteht aus 225 Aminosäuren mit zwei N-Glykosilierungsstellen [205], vier extrazellulären Cystein-reichen Modulen, die bis zu 30% homolog zu anderen Mitgliedern der TNFR Familie sind, und intrazellulären Domänen, die außer CD27 wenig Ähnlichkeit mit anderen Mitgliedern aufweisen [179]. CD137 konnte auf der Oberfläche von CD8 und CD4 positiven T-Zellen, aktivierten Thymozyten, intraepithelialen Lymphozyten, aktivierten NK Zellen und eosinophilen Leukozyten nachgewiesen werden. Menschliche mRNA von CD137 wurde bei aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und einigen IL-1b stimulierenden, nicht-lymphoiden

Zellen gefunden [173, 111]. Man konnte bis jetzt jedoch noch keine Expression von CD137 auf Monozyten, nichtlymphatischen Zellen und B-Zellen nachweisen [53]. CD137 wird durch eine Aktivierung von T-Zellen oder T-Zell-Hybriden durch anti-CD3 monoklonale Antikörper (mAB) oder PMA/Ca-Ionophor hochreguliert [144, 38, 53].

Nach mehreren Versuchen wurde auch der Ligand für CD137 gefunden; CD137L ist ein Typ II Glycoprotein mit einem extrazellulären C Terminus. Er ist homolog zu anderen Mitgliedern der TNF-Familie, wie TNF, Lymphotoxin a und b, CD40L und CD27L [58, 7], wiegt 34 kDa und befindet sich auf der Oberfläche von aktivierte T-Zellen, Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen (DC), B-Zellen und B-Lymphom-Zellen [58]. Auf der Oberfläche von B-Lymphom-Zellen und gereinigten B-Zellen wird CD137L nach Kontakt mit cAMP (3',5'-cyclo-AMP) oder LPS (Lipopolysaccharid), oder durch Stimulation über CD40 hoch reguliert [78, 38, 145, 58, 7]. Die Expression von CD137L auf T-Zellen erreicht innerhalb von vier Stunden nach Stimulation mit anti-CD3 mAB den höchsten Wert. Dieser sinkt nach 16 Stunden wieder auf seinen Ausgangswert [7].

**Aufgabe und Funktion** Eine Aufgabe des CD137 ist die Kostimulation von T-Zellen. Diese benötigen einerseits, wie schon in Kapitel 1.4.1 beschrieben, die Interaktion des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit dem MHC Peptid Komplex und andererseits die bedeutendere Kostimulation durch die Interaktion von CD28 und B7. Versuche mit anti-CD3 mAB haben ergeben, dass die IL-2-Produktion der T-Zellen durch Gabe von anti-CD3 mAB steigt [178, 174, 144, 7]. Dieses Resultat bekommt man jedoch nicht bei alleiniger Gabe von CD137 ohne anti-CD3 mAB, was darauf hinweist, dass CD137 ein kostimulierendes Molekül ist [78]. Weitere Untersuchungen weisen darauf hin, dass CD137 und CD28 zwei voneinander unabhängig arbeitende Moleküle sind [179]. Wie schon von anderen Mitgliedern der TNFR Familie bekannt, ist auch CD137 für eine bestimmte Untergruppe von T-Zellen spezifisch; CD8<sup>+</sup> T-Zellen reagieren *in vitro* im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen um ein 25-faches schneller auf eine Kostimulation mit anti-CD3/anti-CD137 mAB als CD4<sup>+</sup> T-Zellen [178].

In vivo-Versuche an Mäusen mit Tumoren und an Mäusen, die eine akute „graft-versus-host disease“ durchmachten, zeigten, dass durch die Gabe von anti-CD137 die Proliferationskapazität und die zytolytische Aktivität stieg [118, 178]. Diese Ergebnisse, vor allem die Tatsache, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen bevorzugt durch anti-CD137 mAB aktiviert werden, weisen darauf hin, dass CD137 einen großen Einfluss auf das Immunsystem bei intrazellulären pathologischen Vorgängen, Tumoren und der Modulation einzelner Entzündungsstadien hat [179].

Eine Studie von Jakob Bukczinsky et al., die sich mit CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> T-Zellen beschäftigt, die bei asymptomatischen HIV- und HCMV-Patienten [196, 175, 188, 123], bei Tumorpatienten und Patienten mit Autoimmunerkrankungen, aber auch bei älteren Menschen zu finden sind, ergab, dass diese CD28<sup>-</sup> T-Zellen durch den Liganden CD137 unabhängig von CD28 kostimuliert werden können. Dies äußerte sich durch Zellteilung, Produktion inflammatorischer Zytokine, steigende Perforin Werte, erhöhte zytolytische Ereignisse an Effektorzellen und die Hochregulation des antiapoptotischen Proteins Bcl-XL [24].

Da der Verlauf der oben genannten Krankheiten und auch der bei rheumatoider Arthritis und Lupus erythematoses mit der Anzahl der vorhandenen CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> T-Zellen korreliert, kann der Aktivierung von T-Zellen über CD137L eine wichtige therapeutische Rolle zugeschrieben werden [24].

Neuere Daten haben ergeben, dass CD137L auch eine wichtige Rolle bei der Vermehrung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen spielt [60, 28]. Noch dazu hat CD137 die Eigenschaft, ein bidirektionales Signal in die Zelle, die den Liganden exprimiert, zu senden. Splenische B-Zellen, die mit anti IgM getriggert wurden, konnten durch dieses

rückwirkende Signal kostimuliert werden [145]. Auch in Monozyten, die den Liganden CD137L exprimieren, wird ein Signal geschickt, das zu einer Expression des Makrophagen stimulierenden Faktors und somit zum längeren Überleben dieser Zellen führt [100, 198, 190]. Außerdem zeigten Langstein et al., dass durch die Wechselwirkung von CD137L auf Monozyten mit einem CD137 Ig fusionierten Protein IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  freigesetzt, ICAM exprimiert und die Expression von FcgRIII reduziert wird, wobei keine Veränderungen in der Höhe der Expression von HLA-DR festgestellt wurde. Noch dazu konnte eine verstärkte Adhärenz und Proliferation der Monozyten nach besagtem Rückwärts-Signal über den Liganden CD137 gemessen werden [99].

Überraschenderweise beobachteten Langstein et al. eine erhöhte Apoptoserate bei den über CD137 aktivierte Monozyten und verglichen diese mit dem Mechanismus des Zelltods bei Lymphozyten, der durch deren Aktivierung herbeigeführt wird. Hier bewirkt die Interaktion eine Aktivierung und Proliferation parallel zu einem programmierten Zelltod [157, 99]. Michel et al. zeigten, dass die Expression von Fas (CD95; siehe Kapitel 1.5.2) durch die Interaktion von CD137L mit dem zellständigen CD137 in ruhenden primären B- und T-Lymphozyten induziert wird, was zur Fas abhängigen Apoptose dieser Zellen führt. Die Induktion der Apoptose über CD137 ist, laut Michel et al., jedoch unabhängig von Fas. Dies konnte zum einen dadurch gezeigt werden, dass antagonistisch wirkende anti-CD95 Antikörperfragmente die über CD137 induzierte Apoptose nicht hemmen und zum anderen dadurch, dass CD137, im Gegensatz zu anti-CD95, Apoptose in ruhenden Lymphozyten herbeiführen kann [119].

**Tumorzellen und ihr Zusammenhang mit CD137L/CD137** Eine interessante Tatsache ist, dass Mitglieder der TNF- Familie auf Tumorzellen exprimiert werden [140, 65]. Die Expression von CD137L auf Tumorzellen mit lymphatischem oder myeloischem Ursprung wurde festgestellt. Eine funktionelle Expression in unterschiedlichem Ausmaß konnte sowohl auf verschiedenen menschlichen Tumorzelllinien, als auch auf soliden Tumoren nachgewiesen werden. Auch Tumorzellen werden über CD137L aktiviert, was zu einer Produktion von IL-8 führt [158]. Man konnte jedoch keinen direkten Zusammenhang zwischen der Höhe der Expression von CD137L auf Tumorzellen und der durch diesen Faktor induzierten Produktion von IL-8 nachweisen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Tumorzellen die Fähigkeit besitzen, die Stärke des Signals, das über CD137 vermittelt wird, zu regulieren. Noch dazu werden durch die Interaktion von CD137L auf Tumorzellen und CD137 auf T-Zellen letztere Zellen kostimuliert, dadurch der T-Zell-Rezeptor (TCR) aktiviert und IFN- $\gamma$  und IL-2 abgesondert, was mit der Anzahl von CD137L auf Tumorzellen korreliert [158].

Guinn et al. [62] verglichen das Tumorgewicht von verschiedenen Formen des B-Zell-Lymphoms A20, die entweder CD137L exprimierten (A20/4-1BBL) oder nicht (A20/B7-1). Sie zeigten, dass diejenigen Mäuse, die A20/B7-1 injiziert bekamen innerhalb von 25 Tagen Tumore entwickelten, wohingegen diejenigen mit A20/4-1BBL in den folgenden 150 Tagen nach Injektion tumorfrei blieben. Melero et al. [117] konnten nachweisen, dass eine retrovirale Übertragung von CD137L auf Mastzelltumorzellen oder Zellen von Lymphomen zu einer schützenden Immunantwort gegen diese Tumore führt. Um festzustellen, ob der natürliche CD137L ebenfalls eine effektive Immunantwort herbeiführen kann, transduzierte Melero et al. CD137L in P815 (ein Mastozytom, das eine Immunantwort auslöst) und AG104A (ein Sarkom, das nur eine schwache Immunantwort bewirkt). Mäuse, die mit CD137L transduzierten Tumoren inkuliert wurden, blieben tumorfrei und erkrankten auch nicht an Wildtumoren, was zeigt, dass die Mäuse eine lang anhaltende Immunität gegen Tumore entwickelten.

Auch Zhengmao Y et al. kamen durch Mäuseversuche zu dem Ergebnis, dass Melanomzellen, die eine sehr geringe Expression des MHC I und somit eine sehr schwache Immunantwort auslösen, nachdem sie mit CD137L behandelt wurden, eine starke T-Helferzellantwort aufwiesen.

Diese Erkenntnisse lassen auf eine analoge Therapie bei menschlichen Mikrometastasen und Tumoren, die eine geringe Expression von MHC I aufweisen, hoffen [201] und zeigen, dass die Expression des CD137L auf Tumorzellen einen positiven Effekt bewirkt, indem eine Immunantwort gegen besagte Tumorzellen unterstützt wird.

**sCD137L (s4-1BBL)** Es ist bekannt, dass einige Liganden der TNF-Familie in löslicher Form in Patientenserien nachweisbar sind. Diese wurden von der Zelloberfläche abgesondert [163]. Salih et al. stellten außerdem fest, dass CD137L in löslicher Form durch die Aktivität der Matrix-Metalloproteinase (MMP) von der Oberfläche verschiedener Leukozyten abgelöst wurde [161]. Die Folgen, die durch die Ablösung des CD137L von der Zelloberfläche entstehen sind noch unklar und hängen womöglich vom Zelltyp ab. Bei T-Lymphozyten könnte es deren Sensitivität für apoptotische Signale mindern [119], bei APCs, wie B-Zellen und Monozyten, bei denen CD137 eine Rolle der Aktivierung, Kostimulation und Proliferation spielt, könnte die Absonderung von CD137L zu einer verminderten inflammatorischen oder kostimulierenden Immunantwort führen [163].

Im Rahmen unserer Arbeit stellte Helmut Salih bereits mittels Cut-off-Werten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen hohen Serumwerten des sCD137L und niedrigen Serumwerten des sCD178 (siehe Kapitel 1.5.2) und einer rapiden Progression der Krankheit von Patienten mit MDS fest [160].

### 1.5.2 CD178/CD95 (Fas-Ligand/Fas)

**Charakterisierung** Der Fas Rezeptor (Fas, CD95) und der Fas Ligand (FasL, CD178, CD95-L) sind komplementäre Faktoren eines Weges, der zur Apoptose der Zielzelle führt und spielen somit eine bedeutende Rolle in der Regulation des Immunsystems [80].

Das Typ-I-Membran-Protein **Fas** (CD95, Apo-1) findet man auf der Oberfläche von Immunzellen und auf Zellen der Leber, der Lunge und der Nieren. Auf anderen Zellen wie den B-Zellen des Pankreas oder den Zellen der Langerhans-Inseln wird er jedoch nur im Rahmen einer Entzündung oder Autoimmunerkrankung exprimiert [195, 143].

Zytotoxische T-Zellen exprimieren den **FasL** (CD178) auf ihrer Zelloberfläche. Er ist ein 40-kDa-Typ-II-Membran-Protein und gehört zur TNF $\alpha$ -Familie [143]. Die aktive Seite des Liganden befindet sich auf der extrazellulären Region des FasL und entfaltet ihre Wirkung durch die Bindung an den Fas-Rezeptor der Zielzelle. Die Regulation erfolgt durch den zytoplasmatischen Teil (FasL(Cyt)), wobei die Sequenz FasL(2-33) wesentlich für die zytolytische Funktion des FasL zuständig ist. Die Expression von FasL wird über dessen Transkription, Translation und Posttranslation reguliert, die Absonderung des FasL gilt als effektiver Weg um die Expression des FasL zu vermindern (siehe unten, [86]). Der FasL kann jedoch auch in Form eines Vesikels von der Zelloberfläche abgesondert werden. Diese Form wird „FasL vesicle preparation“ (FasL VP) genannt. FasL VP ist genauso groß wie der zellständige FasL und legt noch dazu eine starke zytolytische Aktivität an den Tag [87].

**Aufgabe und Funktion** Zytotoxische T-Zellen (CTL) haben unter anderem die Aufgabe, virusinfizierte Zellen, von Bakterien infizierte Makrophagen oder körpereigene, entartete Zellen durch direkte, antigenspezifische Zytolyse abzutöten. Dies geschieht über die Apoptose. CTL haben, um eine Zielzelle in die Apoptose

zu führen, zum einen die Möglichkeit Inhaltsstoffe ihrer zytotoxischen Granula frei zusetzen und somit eine Aktivierung von Caspases durch aktivierte Granzyme zu bewirken, oder über den nicht dauerhaft auf aktivierten Zellen des Organismus exprimierten Fas [143]. Somit werden diejenigen Zellen, die Fas exprimieren durch die Aktivierung über FasL abgetötet [80]. FasL spielt nicht nur in der Induktion der Apoptose eine Rolle, sondern hat auch bei der Eliminierung von aktivierten T-Zellen während der Herabregulierung der Immunantwort eine bedeutende Rolle [128].

**Tumorzellen und ihr Zusammenhang mit Fas/FasL** Es ist bekannt, dass Tumorzellen und TIL Fas und FasL in verschiedenem Ausmaß exprimieren und dass das Verhalten der Zellen durch das Zusammenspiel zwischen Rezeptor und Ligand beeinflusst wird.

Die Expression des FasL konnte bereits bei verschiedenen malignen Erkrankungen, wie dem Kolonkarzinom und dessen Lebermetastasen, dem Lungenkrebs, dem multiplen Myelom, dem Ösophaguskarzinom und den Ewing-Sarkomen nachgewiesen werden [134, 132, 177, 191, 17, 121]. Außerdem konnte zum Teil ein Zusammenhang zwischen der Expression des FasL und dem klinischen Stadium der Krankheit festgestellt werden [177, 121]. Weiterhin zeigten Joachim et al., dass Fas und sein Ligand auf Krebszellen von Patienten mit Mammakarzinom und auf TIL koexprimiert werden und dass die Expression von Fas auf normalen Epithelzellen und TIL in größerem Ausmaß vorhanden ist als auf Tumorzellen, wobei die Expression von FasL auf Tumorzellen stärker ausgeprägt war. Dieselben Ergebnisse wurden bereits bei vorausgegangenen Studien mit anderen Tumoren bestätigt.

Die dort erkennbare Hochregulation von FasL auf Tumorzellen und alle bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass Tumorzellen die Eigenschaft besitzen, Apoptose in TIL und dem gesunden Gewebe, das den Tumor umgibt, zu induzieren und damit die Immunantwort unterbinden können [80, 105].

Außerdem konnte eine hohe Expression von Fas und FasL in Knochenmarkzellen von Patienten mit MDS festgestellt werden, was die hohe Apoptoserate der Zellen unter diesem Krankheitsbild erklärt [73]. Lickliter et al. fanden eine hohe Expression von FasL bei Patienten mit AML und CML (chronisch myeloische Leukämie) mit hohen Blastenzahlen, wobei Patienten während chronischen Phasen der CML eine sehr schwache Expression des FasL zeigten. Es gibt jedoch auch Hinweise dafür, dass eine höhere Expression von Fas und FasL auf Blasen oder T-Zellen von AML-Patienten mit einer besseren Prognose für die Patienten assoziiert ist [146].

Diese Ergebnisse sind ein Hinweis für einen möglichen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression des FasL und akuten Formen von Leukämien. Eine Ursache der erhöhten Expression des FasL bei Patienten mit Leukämien könnte jedoch auch die Expression des FasL auf Blasen sein. Da diese Zellen bei Leukämien in großem Ausmaß vorhanden sind könnte die erhöhte Expression von FasL einfach an dem Phänotyp der dort vermehrt vorkommenden Zellen liegen [105].

**sCD178 (sFas-Ligand)** Der membrangebundene 40-kD FasL wird durch eine Metalloproteinase von der Oberfläche der Zelle abgesondert und somit zu einem löslichen 26-29 kD Fragment [186]. Im Zusammenhang dazu ist es möglich, die Absonderung des FasL durch einen Metalloproteinaseinhibitor zu unterbinden [171]. Der abgesonderte lösliche FasL (sFasL) besitzt jedoch eine nur geringe zytolytische Aktivität. SFasL hemmt sogar in großem Ausmaß die über den FasL vermittelte Zytolyse [185]. Eine erhöhte Anzahl von sFasL wurde bei Patienten mit Krankheiten festgestellt, die durch vermehrten pathologischen Zelltod charakterisiert sind, wie z.B. der alkoholinduzierten Leberzirrhose, dem malignen Melanom, verschiedenen Arten von Leukämien und rheumatoiden Erkrankungen [65, 171, 85].

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

CD178 und CD137L wurden immer wieder in Seren von Patienten mit den verschiedensten Tumorarten beschrieben. Außerdem spielen sie eine große Rolle bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten. Salih und Schmetzer konnten zeigen, dass hohe Serumwerte des sCD137L und geringe Serumwerte des sCD178 signifikant mit einer raschen Progression des MDS korrelieren. Aufgrund dieser Ergebnisse soll im Rahmen dieser Arbeit die Rolle des sCD137L und sCD178 im Zusammenhang mit Subtypen und zur Prognoseabschätzung bei Patienten mit MDS, AML und NHL untersucht werden. Da bekannt ist, dass CD137L auf Tumorzellen und im Rahmen der Kostimulation durch T-Zellen auf DC exprimiert wird, soll die zelluläre Expression von CD137L auf leukämischen Blasten bei AML und MDS, auf Tumorzellen von NHL, sowie auf DC, die aus leukämischen Blasten generiert wurden, untersucht werden. Wir hoffen dadurch neue Kenntnisse über die Expressionsprofile von CD137L und die Funktionen dieses Liganden zu erlangen, um somit neue Erkenntnisse für Therapieansätze bei Krankheiten wie AML und MDS liefern zu können.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientencharakterisierung

Das von uns untersuchte Material (Serum und Vollblut), das in dieser Studie verwendet wurde, stammt von Patienten, die zwischen 1990 und 2005 im Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität in München, behandelt wurden. Es wurde mit dem Einverständnis der Patienten entnommen.

Die Diagnosestellung von AML, MDS und NHL basiert auf der Morphologie des Knochenmarks und der histologischen Analyse. Patienten, die an einer AML erkrankten, wurden wie in Kapitel 1.1 beschrieben in die zytogenetischen Risikogruppen günstig (g), intermediär (i) und schlecht (s) eingeteilt. Die Behandlung der Patienten erfolgte innerhalb klinischer Studien, wobei die Patienten mit AML, MDS und NHL in allen Stadien der Krankheit untersucht wurden. Jegliche hier verwendeten Daten wurden aus den medizinischen Dokumenten der Patienten erhoben.

Bei der Untersuchung der Proben beobachteten wir zusätzlich den Verlauf verschiedener Serumwerte innerhalb von drei Monaten bis zu zwei Jahren. Nachdem das vom Patienten abgenommene Blut zentrifugiert war, wurde das Serum bei -40°C eingefroren, bis es für ELISA verwendet wurde.

Um die Rolle des **löslichen CD137L** und des **löslichen FasL** genauer untersuchen zu können wurden 46 Serumproben von 23 Patienten mit NHL und 42 Serumproben von 27 Patienten mit AML zum Zeitpunkt der Diagnose und während des weiteren Krankheitsverlaufs analysiert:

von Patienten mit **NHL** wurden acht Proben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, acht während persistierender Krankheit, sieben während der Progression, sechs in CR und zwei von Patienten, die einen Rückfall erlitten, untersucht. Das mittlere Alter der Patienten betrug 50 Jahre, wobei zehn Patienten älter und elf jünger als 50 waren. 16 Patienten waren an einem B-Zell-Lymphom erkrankt, vier an einem T-Zell-Lymphom, zwei an einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und einer an einer cALL. In Anlehnung an die Ann Arbor Klassifikation (siehe Tab. 4) zählten drei zum Stadium I, fünf zum Stadium II, zwei zum Stadium III und sieben zum Stadium IV. Tabelle 5 zeigt alle Patienten mit NHL mit der jeweiligen Diagnose und den einzelnen Werten des sCD137L und des sCD178.

Die bei **AML** untersuchten Patientenserien stammten von neun Patienten mit einer pAML und 18 mit einer sAML. 27 Proben stammten von Patienten mit AML zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, acht von Patienten mit persistierender Krankheit, zwei von Patienten während des Progresses, vier von Patienten in CR, drei in PR und drei von Patienten, die einen Rückfall erlitten. Im Hinblick auf die FAB-Klassifikation (siehe Tab. 1) waren 19 Patienten an einer AML-M1, neun an einer AML-M2, einer an einer AML-M3, sechs an einer AML-M4 und zwei an einer AML-M5 erkrankt. Bei drei Fällen war der FAB-Typ nicht bekannt. Wir konnten von 19 Patienten die zytogenetische Risikogruppe eruieren: dabei gehörten 14 der Gruppe mit einer intermediären und fünf der mit einer schlechten Prognose an. Tabelle 6 zeigt alle Patienten mit AML mit der jeweiligen Diagnose und den einzelnen Werten des sCD137L und sCD178.

Um die **immunologische Rolle** des zellständigen CD137L und seine Beziehung zum löslichen CD137L besser kennen zu lernen, untersuchten wir das Serum von neun gesunden Probanden und von 49 Patienten mit AML, MDS oder NHL zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und im weiteren Verlauf der jeweiligen Krankheit. Mononukleäre Zellen (MNC) aus heparinisiertem Blut (PB) oder Knochenmark (BM) (PB-MNC, BM-MNC) wurden vom Interface durch ihren Dichtegrad mit Hilfe der Zentrifugation isoliert (Ficoll-Hypaque, Biochrom, Berlin, Germany), gewaschen und in PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gegeben (Biochrom).

Die 36 Serumproben der **AML-Patienten** stammen von 35 Patienten während

Patientennummer	Alter (bei Untersuchung) / Geschlecht	Diagnose (WHO)	B-/T-Zell-Lymphom	Stadium der Krankheit	Leukozytenzahl	Knochenmarkbefall	Ann Arbor-Klassifikation	> 60 Jahre	> 1 exstranodale Manifestation	LDH über Normwert	sCD137L	sCD137L Mittelwert (bez. auf 4000 Leukozyten)	sCD178 Mittelwert (bez. auf 4000 Leukozyten)
1	70 / m	DLCBL: CB	B-Zell	Dgn	6,9	nein	IV	ja	ja	2.697	1.563	19.013	11.022
2	46 / w	DLCBL: CB	B-Zell	Dgn	14,6	nein	III A S	nein	nein	9.188	2.517	12.882	3.529
3	50 / w	DLCBL: CB	B-Zell	Dgn	7,9	ja	III A S	nein	nein	15.677	7.938	10.938	5.538
4	60 / m	follikuläres Lymphom	B-cell	Dgn	4	ja	I	ja	ja	1.78	1.78	4.739	4.739
5	71 / w	Immunocytom, lymphoplasmazytisch	B-Zell	Dgn	7,1			ja		0,756	0,426	9,58	5,402
6	71 / w	MALT, DLCBL: CB	B-Zell	Dgn	8,4	nein	I	ja	nein	12.651	6.024	14.292	6.806
7	60 / m	T-Zell neoplastisch anaplastisches Lymphom	T-Zell	Dgn	5,2	nein	IV A	ja	ja	8,59	6.608	19.751	15.193
8	18 / w	anaplastisches großzelliges T-Zell	T-Zell	Dgn	4,8	nein	IB	nein	nein	16.692	13.91	8,56	7.133
9	34 / m	CLL	B-Zell	Per	4,9		III	nein	nein	0,912	0,74	11.676	9.531
10	74 / m	CLL	B-Zell	Per	10,4		II	ja	nein	1.2509	0,097	17,185	0,661
11	62 / m	DLCBL: CB	B-Zell	Per	2,7	ja	IV B	ja	ja	9,177	13.396	6,182	9,159
12	31 / m	DLCBL: CB	B-Zell	Per	5,2	ja	IV B	ja	ja	8,348	0,268	3.995	3.073
13	46 / w	DLCBL: CB	B-Zell	Per	9	nein	III A S	nein	ja	8,784	3.904	8,471	3.765
14	71 / w	MALT, DLCBL: CB	B-Zell	Per	7,5	nein	I	ja	nein	7,821	4,171	3,286	1,753
15	49 / m	Mantelzellenlymphom	B-Zell	Per	6,9	ja	IV B	nein	nein	10,028	5,813	12,434	7,208
16	18 / w	anaplastisches großzelliges Lymphom	T-Zell	Per	1,5	nein	IB	nein	nein	7,476	19,936	6,453	17,208
17	30 / m	cAHL	B-Zell	Rez	3,7	65	IB	nein	nein	0,334	0,361	3,188	3,446
18	19 / w	DLCBL: IB	B-Zell	Rez	0,7	nein	II A	nein	nein	1,136	6,491	4,863	2,779
19	46 / m	DLCBL: CB	B-Zell	Prog	4,7	nein	III A S	nein	nein	8,09	6,851	7,189	6,118
20	46 / m	DLCBL: CB	B-Zell	Prog	0,2	nein	II A	nein	ja	7,555	15,11	10,629	212,58
21	38 / m	lymphoplasmazytisches Lymphom	B-Zell	Prog	1,1	nein	IB	nein	ja	5,411	19,676	14,674	53,36
22	49 / m	MALT-Lymphom	B-Zell	Prog	5,2	nein	IV	nein	ja	0,149	0,115	2,413	1,856
23	49 / m	Mantelzellenlymphom	B-Zell	Prog	3,2	nein	CC	IV B	nein	8,958	11,198	9,792	12,24
19	16 / m	Precursor-T-Zelleukämie	T-Zell	Prog	1	nein	IV	nein	ja	12,379	49,516	8,209	32,836
7	60 / m	T-Zell Neoplasie	T-Zell	Prog	6,9	nein	IV A	ja	nein	8,28	4,8	11,972	6,94
20	m	DLCBL: CB	B-Zell	CR	3,1	nein	nein	nein	nein	1,175	1,516	8,983	11,551
21	74 / m	DLCBL: CB	B-Zell	CR	7	nein	II B	ja	nein	2,337	1,355	4,389	2,565
22	w	DLCBL:CB; AML	B-Zell	CR	1,6	nein	del(7q)	1	ja	5,222	13,056	12,911	32,278
6	71 / w	MALT, DLCBL: CB	B-Zell	CR	8,8	nein	IB	nein	nein	5,968	2,713	9,781	4,446
8	18 / w	anaplastisches großzelliges Lymphom	T-Zell	CR	5,1	nein	I B	nein	nein	10,374	8,136	12,602	9,884
23	60 / m	lymphoepitheloidzelliges (Lennert) Lymphom	T-Zell	CR2	3	nein	II	ja	nein	4,254	5,672	10,054	13,405

**Tabelle 5: Patientencharakterisierung sCD137L und sCD178 bei NHL**

Patientennummer	Alter (bei Untersuchung) / Geschlecht	Diagnose		Stadium	Leukozytenzahl (G/l)	PB-Blasten [%]	BM-Blasten [%]	chromosomal Marker		zytogenetische Risikogruppe	sCD137L Mittelwert (bez. auf 4000 Leukozyten)	sCD137L Mittelwert (bez. auf 4000 Leukozyten)	sCD178 Mittelwert (bez. auf 4000 Leukozyten)	sCD178 Mittelwert (bez. auf 4000 Leukozyten)	
		AMLs-M2	AMLP-M4					-5 del(7q), del(11q)	s						
1	79 / m	AMLs-M2	Dgn	2,5	50	-5 del(7q), del(11q)	s	53,345	85,352	6,91	11,056	11,056	11,056	11,056	
2	28 / w	AMLP-M4	Dgn	2,3	26	46XX	i	11,288	19,631	10,038	17,544	17,544	17,544	17,544	
3	76 / w	AMLs-M2	Dgn	1,2	31	del(5q)	s	0,617	0,206	2,584	0,861	0,861	0,861	0,861	
4	66 / w	AMLs	Dgn	2,5	42			18,279	29,246	3,503	5,605	5,605	5,605	5,605	
5	58 / w	AMLs-M1	Dgn	2	15	44	del(3p), del(5q), del(7q)	s	1364,129	27,258	13,566	27,132	27,132	27,132	27,132
6	52 / m	AMLs	Dgn	13,2	36	5,5		6,017	1,823	2,57	0,779	0,779	0,779	0,779	
7	83 / m	AMLP-M5	Dgn	24	51	46XY	i	78,784	13,131	9,514	1,556	1,556	1,556	1,556	
8	78 / m	AMLs-M4	Dgn	4,3	42	-Y, del(3p), t(8;19) (q1;q1), +1,-3,+4,+5,+6,+8,-9,-18,-19,+21,-22	s	19,854	18,469	16,035	14,963	14,963	14,963	14,963	
9	49 / m	AMLs-M4	Dgn	2,7	1	31	r(1)	1	14,826	21,964	12,383	18,36	18,36	18,36	18,36
10	66 / m	AMLs	Dgn	1	2	35	21	i	0,035	0,272	3,075	12,228	12,228	12,228	12,228
11	63 / w	AMLP-M2	Dgn	0,5	58	46XX	i	1	439,377	35,15,016	7,546	60,368	60,368	60,368	60,368
12	54 / m	AMLs	Dgn	2,9	31	46XX	i	1,586	13,222	3,315	4,572	4,572	4,572	4,572	
13	75 / m	AMLs-M4	Dgn	31,4	68	46XY	i	1,589	0,202	9,33	1,189	1,189	1,189	1,189	
14	71 / m	AMLs	Dgn	1,7	0	34	46XY	i	18,38	43,247	5,075	11,941	11,941	11,941	11,941
15	67 / m	AMLs	Dgn	2,3	32	t(1;3)(p;q), del(11p)	i	0,639	1,094	4,085	7,104	7,104	7,104	7,104	
16	69 / w	AMLs	Dgn	1,5	0	31	46XX	i	73,956	197,216	10,509	28,024	28,024	28,024	28,024
17	82 / m	AMLs-M2	Dgn	1,3	1	41	46XY	i	39,655	122,95	31,876	98,98	98,98	98,98	98,98
18	50 / m	AMLs	Dgn	1,6	0	31	46XY	i	0,591	1,478	2,436	6,09	6,09	6,09	6,09
19	70 / w	AMLP-M2	Dgn	5,2	85	-7,+8,+8,+8	s	0,662	0,509	18,134	13,949	13,949	13,949	13,949	
20	45 / w	AMLP-M2	Dgn	1,03	68	del(7q)	i	1	204,013	7,924	7,518	0,252	0,252	0,252	0,252
21	46 / w	AMLs-M2	Dgn	9,5	0	30	t(6;9)+8	i	2,486	1,047	6,252	2,632	2,632	2,632	2,632
22	63 / w	AMLs-M4	Dgn	20	1	39	46XX	i	2,87	0,574	5,751	1,15	1,15	1,15	1,15
2	28 / w	AMLP-M4	Per	4,2	0	33		5,213	4,956	3,609	3,437	3,437	3,437	3,437	
11	63 / w	AMLP-M2	Per	4,7	7			53,541	45,567	0,988	0,841	0,841	0,841	0,841	
12	54 / m	AMLs	Per	3,5				6,585	7,526	3,287	3,757	3,757	3,757	3,757	
14	71 / m	AMLs	Per	2,1	0	10	46XY	26,27	50,038	5,153	9,815	9,815	9,815	9,815	
16	69 / f	AMLs	Per	3,6	0	12	46XX	172,528	191,698	9,509	10,566	10,566	10,566	10,566	
18	50 / m	AMLs	Per	1,1	0	12		3,073	11,175	2,87	10,436	10,436	10,436	10,436	
23	41 / w	AMLs-M2	Per	1,6	7	46XX		5,925	1,481	8,256	2,064	2,064	2,064	2,064	
22	63 / w	AMLs-M4	Per	4		66		5,915	1,834	13,637	4,229	4,229	4,229	4,229	
2	28 / w	AMLs-M4	PR	1,8	0	8		0,49	1,089	6,795	15,1	15,1	15,1	15,1	
18	50 / m	AMLs	PR	1,5	0	6	46XX	2,424	6,464	3,746	9,989	9,989	9,989	9,989	
23	41 / w	AMLs-M2	PR	3,2	0	6		8,99	11,238	10,915	13,719	13,719	13,719	13,719	
16	69 / w	AMLs	Prog	1,7	0	37		22,834	53,272	11,177	26,299	26,299	26,299	26,299	
23	41 / w	AMLs-M2	Prog	2,3	2	20	der(5q)	4,964	8,633	9,037	15,717	15,717	15,717	15,717	
24	29 / m	AMLP-M4	Rez	25	86	68		0,541	0,866	4,64	7,424	7,424	7,424	7,424	
25	52 / m	AMLP-M2	Rez	7,6	34	31	+13,+19,i(17q)	0,352	0,185	5,752	3,027	3,027	3,027	3,027	
26	54 / m	AMLP-M3	Rez	1,8	0	66		63,612	145,804	11,444	25,453	25,453	25,453	25,453	
6	52 / m	AMLs	CR	1,5	1	2		10,755	28,68	2,928	7,808	7,808	7,808	7,808	
11	63 / w	AMLP-M2	CR	6,2	0	3		76,975	38,488	0,832	0,416	0,416	0,416	0,416	
27	w	AMLP-M5	CR	6,2	0	4		0,236	0,152	4,221	2,723	2,723	2,723	2,723	
20	45 / w	AMLP-M2	CR	0,9	0	4		443,947	197,098	6,788	30,169	30,169	30,169	30,169	

**Tabelle 6: Patientencharakterisierung sCD137L und sCD178 bei AML**

aktiven Stadien der Krankheit, wobei 28 Proben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, vier während einer persistierenden Phase der Krankheit, und drei während eines Rückfalls untersucht wurden. Unter den von uns untersuchten Patienten wiesen 29 eine pAML und sieben eine sAML auf. Bei einem Patienten konnten das Stadium der Krankheit und weitere Angaben nicht ermittelt werden. Neun Patienten litten an einer undifferenzierten Leukämie (AML-M0: n=3, AML-M1: n=6), 15 an einer juvenilen granulozytischen Leukämie (AML-M2: n=13, AML-M3: n=2) und elf an einer monozytoiden Leukämie (AML-M4: n=5, AML-M5: n=6). Das mittlere Alter der Patienten betrug 59 Jahre, wobei Patienten im Alter zwischen 30 und 84 Jahren vertreten waren (siehe Tab. 7).

Die Proben der **MDS-Patienten** umfassten fünf Personen. Ein Patient hatte die Diagnose einer refraktären Anämie (RA), vier die einer refraktären Anämie mit Blastenexzess (RAEB). Das mittlere Alter der Patienten betrug 59 Jahre, wobei Patienten im Alter zwischen 52 und 64 Jahren vertreten waren (siehe Tab. 7).

Die elf Proben der **NHL-Patienten** stammen von neun Personen. Zu diesen zählt zusätzlich eine Probe eines Patienten mit der Diagnose einer cALL. Das mittlere Alter der Patienten betrug 44 Jahre, wobei Patienten im Alter zwischen 16 und 62 Jahren vertreten waren (siehe Tab. 7).

Meine Aufgabe beinhaltete zum einen die Auswertung der Daten über die in Patientenserien nachweisbaren löslichen Werte des CD137L und des CD178 bei Patienten mit AML und NHL, zum anderen die Auswertung der von mir und anderen Doktoranden experimentell eruierten, auf Blut- und KM-Proben nachweisbaren Daten des zellständigen CD137L bei Patienten mit MDS, AML und NHL im Zusammenhang mit den jeweiligen löslichen Werten dieses Liganden.

## 2.2 Reagentien

Die von uns verwendete Streptavidin-Horseradish Peroxidase stammte von den Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA), die Klone der anti-CD178 monoklonalen Antikörper 4H9 und 4A5 von MBL (Nagoya, Japan), die rekombinanten Fusionsproteine „mouse CD8-human CD178“, „mouse CD8-human CD137L“ und der anti-CD137L Antikörper „nos 18 und 28“ wurden, wie von Helmut Salih und Helga Schmetzer beschrieben, hergestellt [161]. Fluorochrommarkierte Antikörper bezogen wir von Biozol (CD137L-FITC, Clone5F4 und CD137L-Pe, CloneC65-485). Diese wurden zur Untersuchung der Expression auf Zelloberflächen verwendet [161]. Alle anderen Reagenzien erhielten wir von Sigma (St Louis, MO, USA).

## 2.3 Bestimmung des sCD137L und sCD178 im menschlichen Serum

Die Serumwerte beider Moleküle wurden, wie von Helmut Salih und Helga Schmetzer beschrieben, an Hand von ELISA ermittelt [161, 162]. SCD137L und sCD178 konnten durch Kryokonservierung fixiert werden [161, 162]. Um die Seren analysieren zu können, mussten sie im Verhältnis 1:3 in 5%-iger BSA (bovine serum albumine) in PBS verdünnt werden. Nachdem sie 15 min bei 12000 g zentrifugiert wurden, verteiltten wir sie auf 96 well Platten. Um die Werte von sCD137L messen zu können, wurden 96 well Platten über nacht bei 4°C mit 100 µl pro well mit 2,0 µg/ml des capture anti-CD137L Antikörper 18 in PBS bedeckt. Nach der Inkubation wurden die Platten mit BSA fixiert. Nachdem sie gewaschen wurden fügten wir die Standardlösung (rekombinantes CD8-CD137L) und die Proben zu den wells hinzu. Im Anschluss wurden sie über nacht bei 4°C bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Platten gewaschen, im Anschluss ergänzten wir 100 µl einer Lösung, bestehend aus biotinolisiertem anti-CD137L Antikörper 28 im Verhältnis 2 µg/ml in 10%-igem fetalen Kalbserum. Daraufhin wurden die Platten wiederum für 2 h bei

Patientennummer	Alter (bei Untersuchung)	Geschlecht	Diagnose	Stadium	zytogenetische Risikogruppe
1	64	m	AMLp-M0	Dgn	s
2	63	m	AMLp-M0	Pers	s
3	64	m	AMLs-M0	Dgn	i
4	38	w	AMLp-M1	Dgn	i
5	82	w	AMLp-M1	Dgn	s
6	67	w	AMLp-M1	Dgn	s
7	46	w	AMLp-M1	Dgn	i
8	64	w	AMLp-M1	Dgn	
9	62	w	AMLp-M1	Rez	
10	63	w	AMLp-M2	Dgn	i
10	63	w	AMLp-M2	Pers	i
11	54	w	AMLpM2	Dgn	
12	40	m	AMLp-M2	Dgn	
13	84	m	AMLp-M2	Dgn	i
14	64	m	AMLp-M2	Dgn	g
15	64	m	AMLp-M2	Dgn	
16	64	w	AMLp-M2	Dgn	i
17	56	m	AMLp-M2	Rez	i
18	64	w	AMLS-M2	Dgn	s
19	66	m	AMLS-M2	Dgn	i
20	34	w	AMLS-M2	Dgn	i
21	41	w	AMLS-M2	Pers	
22	62	w	AMLp-M3	Dgn	g
23	64	m	AMLp-M3	Rez	
24	64	m	AMLp-M4	Dgn	
25	64	w	AMLp-M4	Dgn	i
26	64	w	AMLp-M4	Dgn	
27	64	w	AMLp-M4	Dgn	
28	53	m	AMLS-M4	Dgn	
29	30	m	AMLp-M5	Dgn	
30		m	AMLp-M5		
31	61	m	AMLp-M5	Dgn	
32	63	m	AMLp-M5	Dgn	i
33	63	w	AMLp-M5	Dgn	
34	33	w	AMLp-M5	Dgn	
35	47	m	AMLS	Pers	
36	64	w	MDS-RA	Pers	
37	52	m	MDS-RAEBt	Dgn	g
38	52	m	MDS-RAEBt	Dgn	g
39	64	m	MDS-RAEBt	Pers	
40	64	w	MDS-RAEBt	Dgn	
41	31	m	cALL	Rez	
42	54	m	CCNHL	Pers	
42	53	m	CCNHL	Prog	
42	54	m	CCNHL	Pers	
43	59	w	CB-NHL and AML	CR	
44	49	m	MALT-NHL polymorph-zelliges CB-NHL	prog	
45	22	w	IB-NHL	Rez	
46	19	w	Ki1-NHL	Pers	
47	60	m	T-NHL	Dgn	
48	16	m	T-LB-NHL	Prog	
49	62	m	Lennert-NHL	CR2	

**Tabelle 7: Patientencharakteristika von AML, MDS und NHL in verschiedenen Krankheitsstadien für den Nachweis von cCD137L**

37°C bebrütet und gewaschen. Im Anschluss kam streptavidin-meerrettich Peroxidase hinzu (ein Gemisch im Verhältnis 1:2000 in 10%-igem fetalen Kalbserum-PBS). Daraufhin wurden sie wieder für 1 h bebrütet und gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe des „TMB Peroxidase Substrate System“ (KPL, Gaithersburg, MD, USA). Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen (Referenz 750 nm).

Um die Menge an löslichem Faktor CD178 nachzuweisen, wurden 96 well Platten über Nacht bei 4°C mit 100 µl des capture Ab Klon 4H9 mit 1,0 µg/ml pro well bebrütet. Nach abgeschlossener Inkubation fügten wir 100 µl pro well einer 15%-igen BSA hinzu. Die Fixierung der Platten erfolgte bei 37°C über 2 h. Zu den gewaschenen Platten fügten wir Standardlösungen und Proben zu den wells hinzu. Im Anschluss folgte eine Inkubation für 2 h bei 37°C. Zu den gewaschenen Platten fügten wir 100 µl einer Lösung aus biotinolysiertem detection Antikörper Klon 4A5 im Verhältnis 1,0 µg/ml in 3%-igem BSA hinzu und inkubierten die Platten für 2 h bei 37°C. Die Platten wurden gewaschen. Danach fügten wir das Konjugat Streptavidin-alkaline Phosphatase hinzu (ein Gemisch im Verhältnis 1:2000 in 3%-igem BSA) und bebrüteten sie im Anschluss wieder für 1 h bei 37°C und wuschen sie. Hierauf wurden sie mit Hilfe des ELISA Amplifikationssystems (Life Sciences Inc., Bethesda, MA, USA), nach den Anleitungen des Herstellers, entwickelt. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen (Referenz 750 nm). Die Konzentrationen des sCD137L und sCD178 in Supernatants wurden als Mittelwerte und im Verhältnis zu 4000 Leukozyten angegeben.

Die Serumproben wurden im Labor von Professor Schmetzer gesammelt; die Ergebnisse der Elisa-Untersuchung wurden im Labor von Professor Salih ermittelt und mir zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

## 2.4 Analyse der Oberflächenexpression des cCD137L bei MNC oder DC

Um die Menge und die Phänotypen leukämischer Zellen, DC, B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen in den von uns untersuchten PB- oder BM-Proben analysieren zu können, führten wir eine Flow-Zytometrie mit einem von uns zusammengestellten Panel aus monoklonalen Maus-Antikörpern (moABS), das direkt mit Fluorescin Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Tandem Cy5-PE-Konjugation (PC5) konjugiert wurde, durch. Die Antikörper erhielten wir von Coulter-Immunotech (Marseille, Frankreich)\*, Beckton Dickinson (BD, Heidelberg, Deutschland)\*\*, R&D (Minneapolis, USA)\*\*\*, Serotec (Düsseldorf, Deutschland)\*\*\*\* und Biozol (Burlingame, USA)\*\*\*\*\* (CD1a\*; CD3\* [T3]; CD14\* [LPS-R]; CD15\* [Lewis X]; CD19\* [B4]; CD28\* [CD80/86-Ligand]; CD33\*; CD34\*; CD40\*; CD56\* [N-CAM]; CD71\* [Transferrin Rezeptor]; CD80\*\*\*\* [B7.1]; CD83\* [HB15]; CD86\*\*\*\* [B7.2]; CD117\* [c-kit]; CD135 [FLT3]; CD137\*\* [4-1BB]; CD137L\*\*\*\*\* [4-1BBL]; CD152\* [CTLA-4]; CD154\*\* [CD40L]; CD197\*\*\* [CCR7]; HLA-Dr\* [MHC Klasse II]; 7.1\* [NG2-Antigen]).

Wir gaben MNC oder Zellkulturen in PBS mit 10% FCS (Biochrome). Diese inkubierten wir mit moAbs unter Beachtung der Herstellerhinweise. Letztendlich wurden 5000 Ereignisse an einem FACS Calibur Flow-Zytometer (BD) mit Hilfe der Datenerhebung von Cell Quest und einer Software für Analysen (BD) evaluiert. Um alle unspezifischen Bindungen herauszufiltern wurden parallel dazu Kontrollen mit Isotypen durchgeführt. Für die Analysen leukämischer Zellen oder DC wurde die gesamte MNC/DC Fraktion gegated. Mit Hilfe von CellQuest Software (BD) wurden die Anteile der positiven Zellen in den von uns definierten Gates im Vergleich zu den Isotypen kalkuliert. Der Phänotyp der Blasten in Fällen mit AML wurde wie folgt evaluiert: in dem Fall, dass der Prozentsatz von positiven Ereignissen in einem Gate im Umkreis von Blasten, Lymphozyten und Monozyten über 20% betrug, betrachteten wir diese als positiv für den jeweiligen Oberflächenmarker [15].

DC-Generierungsmethoden / Medium	Stimulierungs- substanzen der DC-Differenzie- rung	Art der Wirkung	Kulturzeit	Literatur
„MCM-Mimic“	GM-CSF, IL-4, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE2	Zytokin basierte DC-Differenzierung, PGE2 führt zu gesteigerter CCR7-Expression und erhöhter Migration	10-14 Tage	[95, 172]
„Picibanil“	GM-CSF, IL-4, TNF $\alpha$ -Lysat von <i>Streptococcus pyogenes</i> , PGE2	Bakterienlysat und PGE2 stimulieren die DC-Differenzierung	7-8 Tage	[165]
„Ca-Ionophore“	IL-4, A23187	Umgehung der zytokin-basierten DC-Differenzierung	3-4 Tage	[76]

**Tabelle 8: DC-Differenzierungsmethoden**

## 2.5 DC-Generierung

DC wurden mit drei verschiedenen, parallel verlaufenden, DC-Differenzierungsmethoden generiert: *MCM-Mimic* [101, 197], *Picibanil* und *Ca-Ionophore* [76] (siehe Tab. 8). MNC von AML-Patienten in aktiven, blastenreichen Stadien der Krankheit wurden in 12-well multiwell Gewebekulturplatten in Xvivo 15 (BioWhittaker, Europe) FCS-freiem Medium inkubiert.

**MCM-Mimic:** DC wurden aus  $2,5 \times 10^6$  MNC/ml in einem 'MCM-Mimic'-Medium, das 800 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4 und 40 ng/ml FLT-3 enthält, angezüchtet. Nach vier bis fünf Tagen wurden dieselben Zytokine erneut zur Kultur hinzugegeben. An Tag sieben oder acht wurde das halbe Medium ausgewechselt und erneut GM-CSF, IL-4 und FLT-3 zusammen mit 150 ng/ml IL-6, 5 ng/ml IL-1 $\beta$ , 1  $\mu$ g/ml PGE2 und 5 ng/ml TNF $\alpha$  hinzugegeben. Nach zehn bis 15 Tagen wurden die generierten DC für darauf folgende Experimente geerntet.

**Ca-Ionophore:** bei dieser Methode wurden DC aus  $7 \times 10^5$  MNC/ml in 'Ca-Ionophore' [76] mit zusätzlichen 375 ng/ml A23187 und 250 U/ml IL-4 generiert und nach drei bis vier Tagen geerntet.

**Picibanil:** 'Picibanil' ist ein lösliches Produkt des *Streptococcus pyogenes* und besitzt unspezifische immunmodulatorische Effekte. Mit Hilfe dieses Produktes, 500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 wurden DC aus  $1-1,25 \times 10^6$  MNC/ml angezüchtet. Nach sieben bis acht Tagen wurden 5 oder 10  $\mu$ l/ml OK-432 (= Picibanil) und 1  $\mu$ g/ml PGE2 hinzugegeben. Nach neun bis elf Tagen Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet.

Diese Untersuchungen führte ich zum Teil selbst durch, oder mir wurden Ergebnisse vom Labor von Frau Prof. Schmetzer zur Auswertung überlassen.

## 2.6 Statistische Analyse

Die statistische Evaluierung und Ermittlung von Cut-off Kurven wurde, wie von Mazumdar und Glassman beschrieben, durchgeführt [115]: ein 'walking cut-off' verläuft von den niedrigsten zu den höchsten Werten des sCD137L oder sCD178 der Serum-

proben. Für jeden Cut-off Wert teilten wir die Seren der Patienten in zwei Gruppen, in Werte über oder unter dem spezifischen Cut-off. Für jede Separation führten wir einen Log-rank Test durch, der innerhalb der jeweiligen Gruppen die Dauer des progressiven Überlebens der Patienten verglich. Jeder Test ergab einen Chi-Quadrat Wert, der die unterschiedliche Dauer des progressiven Überlebens der Patienten repräsentierte. Der Chi-Quadrat Wert hängt von der Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe ab. Ein großer Unterschied der Patientenzahl in jeder Gruppe führt zu einem kleineren Chi-Quadrat Wert als bei Gruppengrößen mit ähnlicher Anzahl. Dies ist selbst dann der Fall, wenn der Unterschied in der durchschnittlichen Überlebenszeit unverändert bleibt.

Die Cut-off Werte des sCD137L und des sCD178, die die höchsten Chi-Quadrat Werte erzielten, wählten wir für die Analyse. Sie repräsentieren die Werte mit einer maximalen Wahrscheinlichkeit für eine relevante Differenzierung zwischen Fällen mit längerer oder kürzerer Dauer progressiven Überlebens.

Beim Log-Rank Test wurden Patienten, denen zu diesem Zeitpunkt Knochenmark transplantiert wurde, oder die während der letzten Messung innerhalb des Intervalls der Nachbehandlung in einem stabilen Zustand waren, censiert.

Nachdem die Cut-off Werte zur Verfügung standen, evaluierten wir korrespondierende Zeiträume progressiven Überlebens und stellten sie laut Kaplan-Meier dar. Um die Relevanz der gezeigten Cut-off Werte zu illustrieren, verwendeten wir P-Werte.

Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient wurde für die statistische Analyse der möglichen Zusammenhänge zwischen den Mittelwerten der Serumwerte des sCD137L und sCD178 mit den unterschiedlichen Kriterien des IPSS, des zytogenetischen Risikos, den verschiedenen Untergruppen der jeweiligen Krankheit und den unterschiedlichen Blastenwerten verwendet. Die statistische Analyse wurde mit 'Statistica 5.0' (StatSoft Inc., Seattle, WA, USA) und 'SAS 6.12' (SAS Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Unterschiede wurden bei  $P < 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. Die statistische Evaluierung und Ermittlung von Cut-off Werten wurde nur in Fällen mit erzielbaren Daten zum klinischen Verlauf durchgeführt. Falls vorhanden, verfolgten wir den Verlauf von Werten einzelner Patienten über einen längeren Zeitraum.

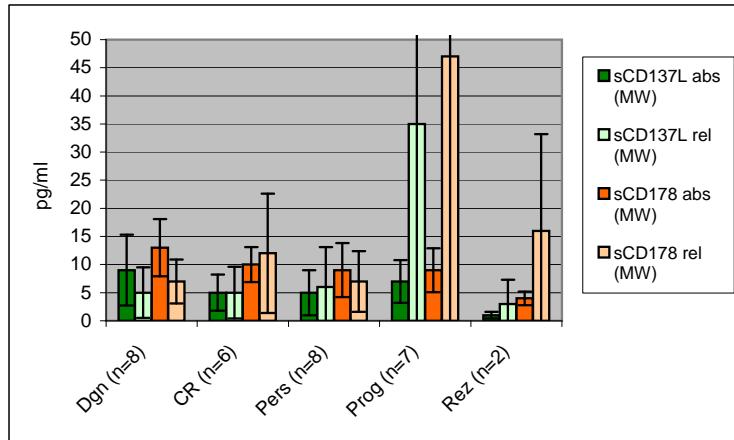
Ziel der statistischen Analyse war es, Cut-off Werte mit statistischer Signifikanz zu erlangen, die eine von den bisherigen Score-Parametern unabhängige, höchst signifikante Aufteilung der einzelnen Fälle in eine prognostisch günstige und eine prognostisch ungünstige Gruppe erlauben.

Zusammenfassend war es unser Anliegen neue Erkenntnisse über die Bedeutung der beiden löslichen Faktoren sCD137L und sCD178, über den Zusammenhang zwischen sCD137L und cCD137L, sowie über die zelluläre Expression des CD137L und dessen Bedeutung zu erlangen. Die Konzentration des sCD137L und sCD178 wurden in dreifacher Ausführung bestimmt, die Werte sind als Mittelwerte der Triplets angegeben.

---

**Abbildung 1** sCD137L und sCD178 bei B- und T-Zell Lymphomen

---



abs: absolut, MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben

---

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Serummenge der löslichen Faktoren sCD137L und sCD178 bei NHL

**sCD137L und sCD178 bei B- und T-Zell-Lymphomen in verschiedenen Stadien und Subtypen des NHL** Die Werte des sCD137L und des sCD178 jedes einzelnen Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Tabelle 5 aufgezeigt.

Patienten mit einem T-Zell-Lymphom stellten sich im Vergleich zu Patienten mit einem B-Zell-Lymphom mit geringfügig höheren Werten des sCD137L und des sCD178 zur Zeit der Diagnosestellung vor. SCD137L erreichte bei Patienten mit einem T-Zell-Lymphom einen Mittelwert von 13 pg/ml, bei Patienten mit einem B-Zell-Lymphom nur 7 pg/ml. Beim sCD178 zeigte sich ein Mittelwert von 14 pg/ml bei Patienten mit einem T-Zell-Lymphom und 12 pg/ml bei Patienten mit einem B-Zell-Lymphom (siehe Abbildung 1).

Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf wiesen im Vergleich zu Patienten in anderen Krankheitsstadien (bezogen auf 4000 Leukozyten) höhere Werte des sCD137L und sCD178 auf (siehe Abbildung 2). Eine genauere Analyse dieser Gruppe ergab, dass keiner der sieben Patienten im Progress einen Knochenmarkbefall mit Lymphomzellen präsentierte.

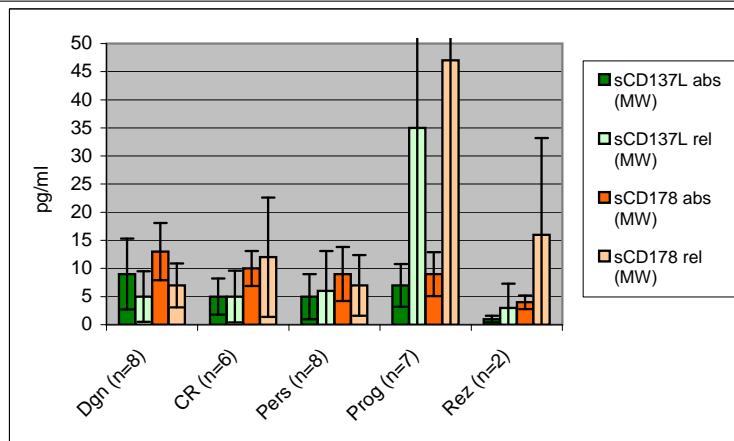
Ein Vergleich der Werte des sCD137L und des sCD178 von Patienten mit oder ohne Knochenmarkbefall zeigte geringere Werte beider Faktoren bei Patienten mit Tumorbefall des Knochenmarks (siehe Abbildung 3).

Außerdem untersuchten wir den Zusammenhang zwischen sCD137L und sCD178 und dem Alter der Patienten. Hierbei stellten wir einen Unterschied zwischen den jeweiligen Stadien der Krankheit fest. Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und in kompletter Remission, die jünger als 60 Jahre alt waren, zeigten höhere Werte des sCD137L im Vergleich zu älteren Patienten. Im Gegensatz dazu wiesen Patienten zum Zeitpunkt einer Progression des NHL und einem persistierenden Stadium, die jünger waren als 60 Jahre, niedrigere Werte des sCD137L auf (siehe Abbildung 4).

Wir fanden jedoch keinen Zusammenhang zwischen Werten des sCD137L und des sCD178 und normalen oder erhöhten LDH-Werten (Daten dazu werden nicht gezeigt) oder einer extranodalen Manifestation (siehe Abbildung 5).

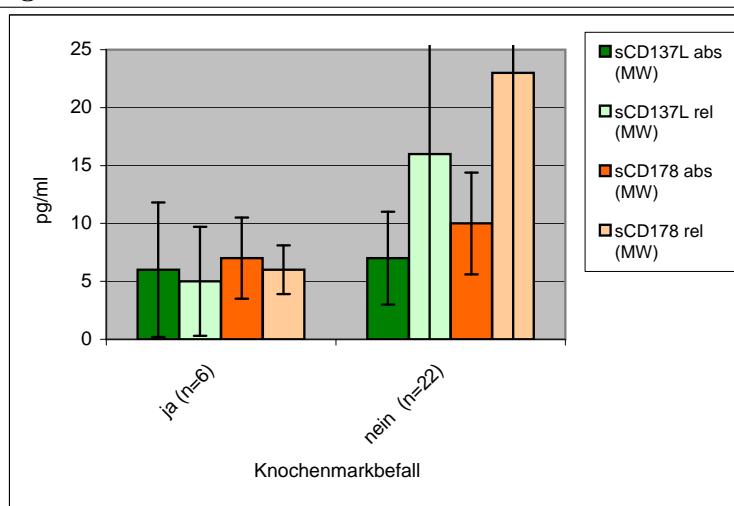
Eine Unterteilung der Patienten nach der Ann-Arbor-Klassifikation ergab, dass

**Abbildung 2** sCD137L und sCD178 in verschiedenen Stadien von NHL



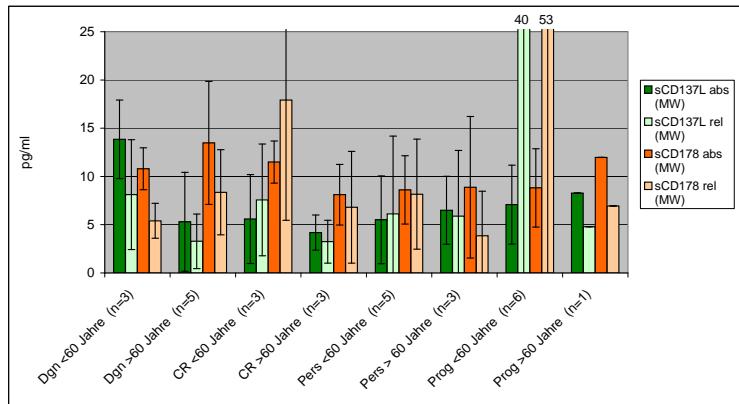
abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben

**Abbildung 3** sCD137L und sCD178 bei NHL-Patienten mit oder ohne KM-Befall



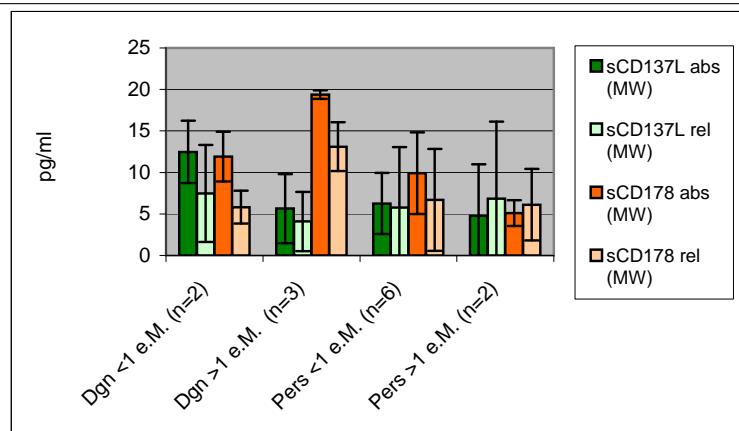
abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben

**Abbildung 4** sCD137L und sCD178 bei NHL-Patienten unterschiedlichen Alters



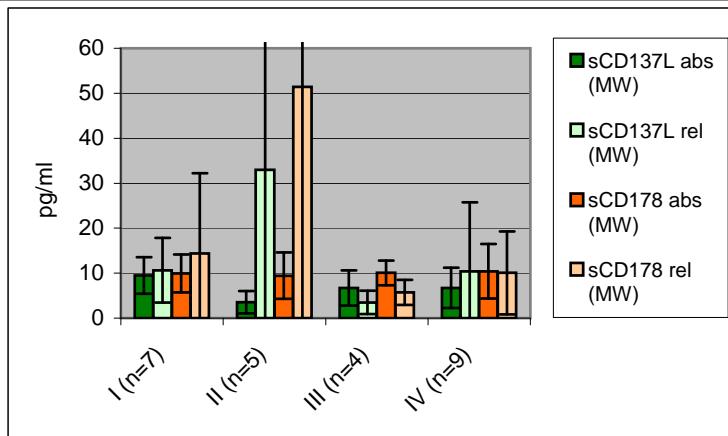
abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben

**Abbildung 5** sCD137L und sCD178 bei NHL-Patienten mit oder ohne extranodaler Manifestation



abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben, e.M.: extranodale Manifestation

**Abbildung 6** sCD137L und sCD178 bei NHL-Patienten in Abhängigkeit zur Ann-Arbor-Klassifikation



abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben I, II, III, IV: Stadien der Ann-Arbor-Klassifikation

Patienten im Stadium I die höchsten Werte und im Stadium II die niedrigsten Werte des sCD137L aufwiesen (siehe Abbildung 6).

**sCD137L und sCD178 in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf der Patienten mit NHL** Wir fanden keinen Zusammenhang zwischen Werten des sCD137L oder des sCD178 und dem klinischen Verlauf von sieben Patienten mit NHL. Hierfür wurde die Überlebenszeit der Patienten, die Wahrscheinlichkeit für das Erreichen einer kompletten Remission oder der Zeitpunkt des Todes der Patienten untersucht. Cut-off Werte für sCD137L zeigten keine signifikanten Ergebnisse, die einen Zusammenhang zwischen der Prognose der Patienten mit NHL und der Menge des löslichen Faktors zeigten (Daten dazu werden nicht gezeigt).

### 3.2 Serummenge der löslichen Faktoren sCD137L und sCD178 bei AML

**sCD137L und sCD178 in verschiedenen Stadien und Subtypen der AML** Die Werte des sCD137L und des sCD178 jedes einzelnen Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Tabelle 6 aufgezeigt.

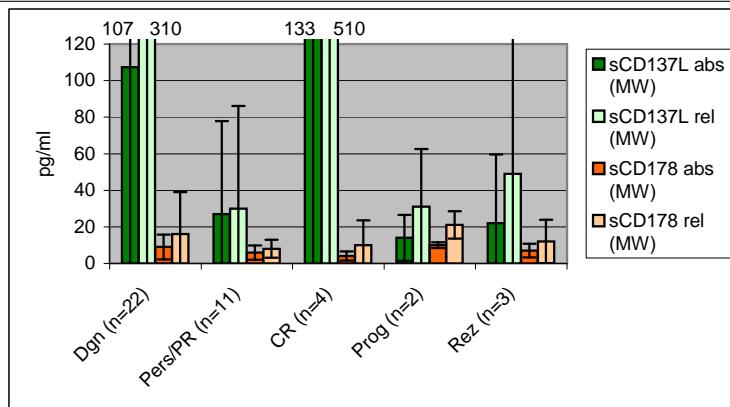
Patienten bei Diagnosestellung oder in kompletter Remission zeigten höhere Werte des sCD137L im Vergleich zu Patienten zum Zeitpunkt eines Rezidivs, in partieller Remission (PR), während dem Progress oder dem Persistieren der Krankheit ( $P=0,16$ ; siehe Abbildung 7).

Im Mittel waren die Werte von den Fällen mit sAML, im Vergleich zu den Fällen mit pAML, niedriger ( $P=0,31$ ). Patienten, die an einer sAML erkrankt waren, zeigten die höchsten Werte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Vergleich zu anderen Stadien der Krankheit ( $P=0,25$ ). Die Seren von Patienten mit pAML wiesen die höchsten Werte des sCD137L bei Patienten mit CR und zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Vergleich zu anderen Stadien der Krankheit auf ( $P=0,27$ ; siehe Abbildung 8).

Im Hinblick auf den Faktor sCD178 fanden wir keine Zusammenhänge mit den hier genannten Kriterien.

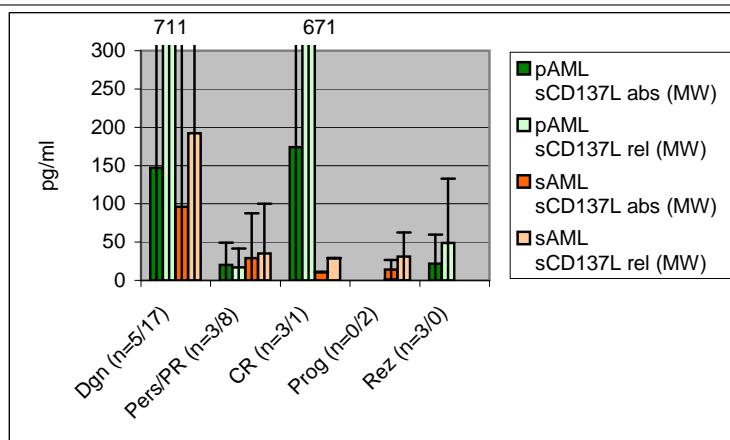
Es fiel auf, dass bei Patienten, die an einer AML-M2 erkrankt waren, im Vergleich zu den Patienten, die an einer AML-M4 erkrankt waren, höhere Werte des

**Abbildung 7** sCD137L und sCD178 bei AML-Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien



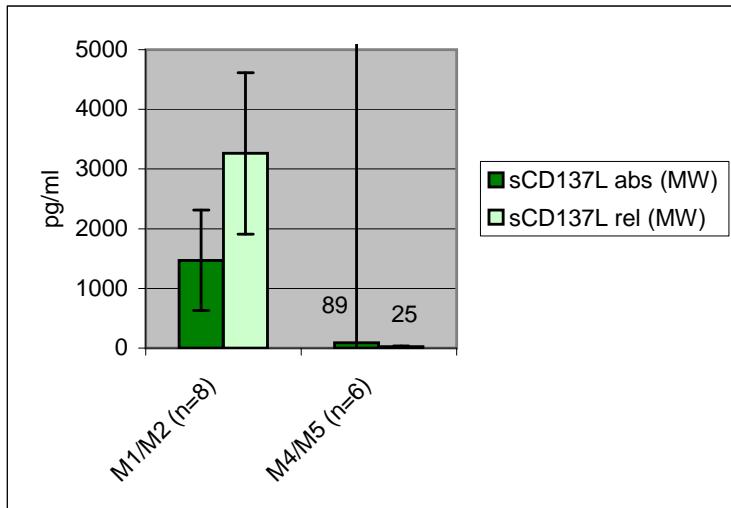
abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben

**Abbildung 8** sCD137L und sCD178 bei Patienten mit pAML und sAML



abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben primäre/sekundäre AML, pAML: primäre AML, sAML: sekundäre AML

**Abbildung 9** sCD137L und sCD178 in Abhängigkeit der FAB-Klassifikation bei AML-Patienten



abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben, M1/M2: undifferenzierte AML, M4/M5: monozytoide AML

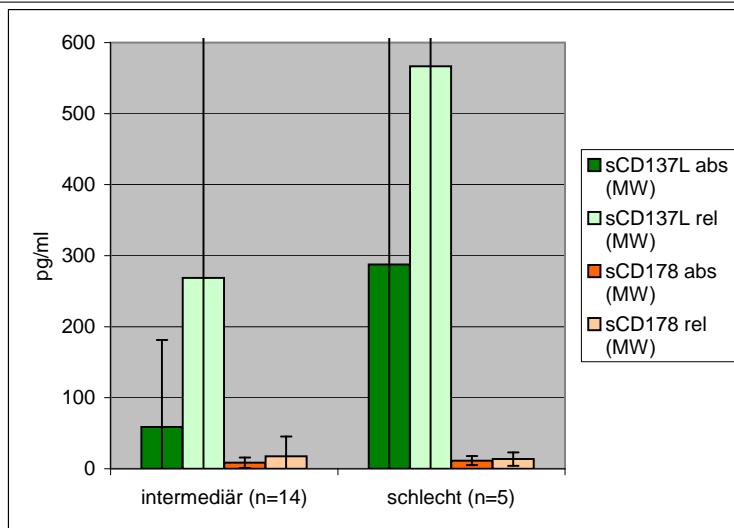
sCD137L gemessen wurden ( $P=0,30$ ). Da wir jedoch eine zu geringe Anzahl an Patienten mit verschiedenen FAB-Typen zur Verfügung hatten, war es uns nicht möglich, nach einem Zusammenhang zwischen den einzelnen FAB-Typen und dem sCD137L zu suchen. Deshalb fassten wir die Patienten nach Fällen mit undifferenzierter AML (AML-M0, -M1 und -M2) und monozytoider AML (AML-M4 und -M5) zusammen. Wir fanden heraus, dass die Werte der Patienten mit undifferenzierter AML höher ausfielen als diejenigen mit monozytoider AML ( $P=0,29$ ; siehe Abbildung 9).

Patienten mit einem intermediären zytogenetischen Risiko ( $n=14$ ) wiesen zur Zeit der Diagnosestellung geringere Werte des sCD137L auf als Patienten mit einer schlechten Prognose ( $n=5$ ; siehe Abbildung 10). Die Werte des sCD178 wiesen keine signifikante Korrelation mit den zytogenetischen Risikogruppen oder dem FAB-Typ der Patienten auf.

Um eine mögliche Abhängigkeit der Mengen der löslichen Faktoren mit Blasenzahlen im Knochenmark bei Diagnose aufzudecken, unterteilten wir die Patientendaten in zwei Gruppen mit mehr ( $n=12$ ) oder weniger ( $n=10$ ) als 40% Blasten im Knochenmark. Es zeigte sich wiederum, dass Patienten mit günstigeren Bedingungen, hier mit weniger Blasten im Knochenmark, auch die geringere Menge an löslichem CD137L aufwiesen ( $P=0,16$ ). Ähnlich wie bei den vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich keine Assoziation zwischen sCD178 und der Menge der Blasten im Knochenmark (siehe Abbildung 11).

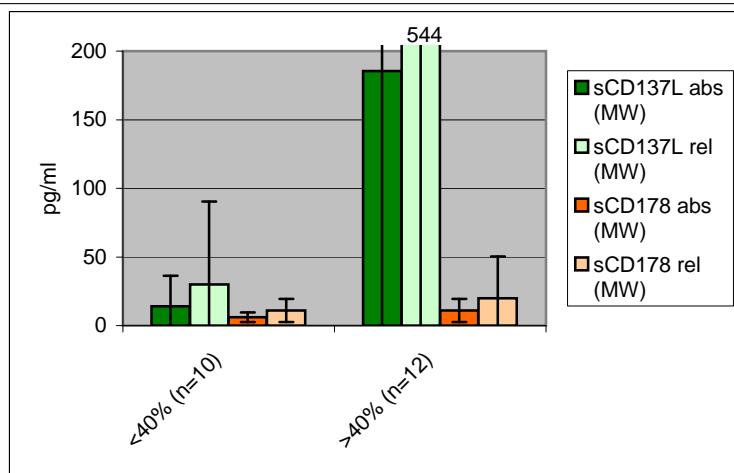
**sCD137L und sCD178 in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf der Patienten mit AML** Die Werte des sCD137L waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit denen während CR vergleichbar (siehe Abbildung 7). In diesen beiden Stadien zeigten sich im Vergleich zu allen anderen Stadien die höchsten Werte. Um den Grund für die hohen Werte des sCD137L während der Zeit der kompletten Remission heraus zu finden, versuchten wir besondere Ereignisse, wie eine Behandlung mit Chemotherapeutika, mit einzubeziehen. Hierbei bemerkten wir im Verlauf der kompletten Remission die höchsten Werte nach dem ersten Zyklus Chemotherapie, vergleichbar mit den ersten Monaten nach dem Zeitpunkt der Diagnosestellung, mit

**Abbildung 10** sCD137L und sCD178 in Abhängigkeit von zytogenetischen Risikogruppen bei AML-Patienten



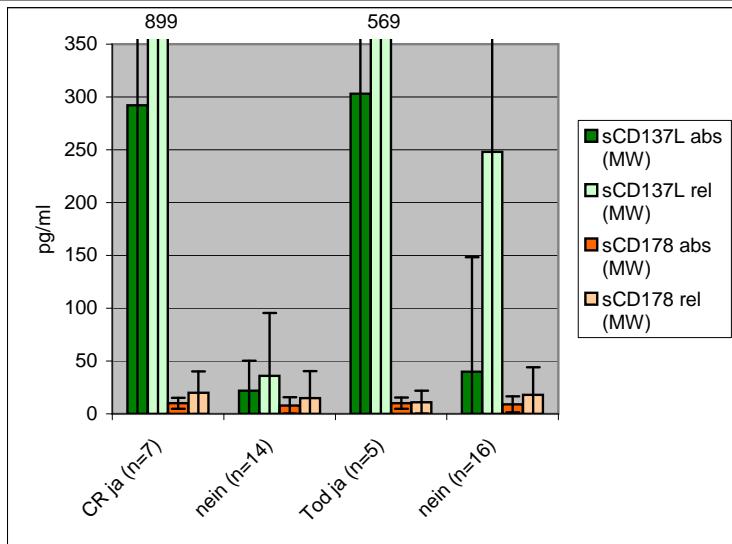
abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben

**Abbildung 11** sCD137L und sCD178 in Abhängigkeit mit der Blastenanzahl im Knochenmark bei AML bei Diagnosestellung



abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben, </>40%: %Blasten im Knochenmark

**Abbildung 12** sCD137L bei AML-Patienten mit CR bzw. bei Patienten die verstorben oder nicht



abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert, n: Anzahl Proben

sinkenden Werten im weiteren Verlauf der CR ( $P=0,20$ ; Abbildung 12).

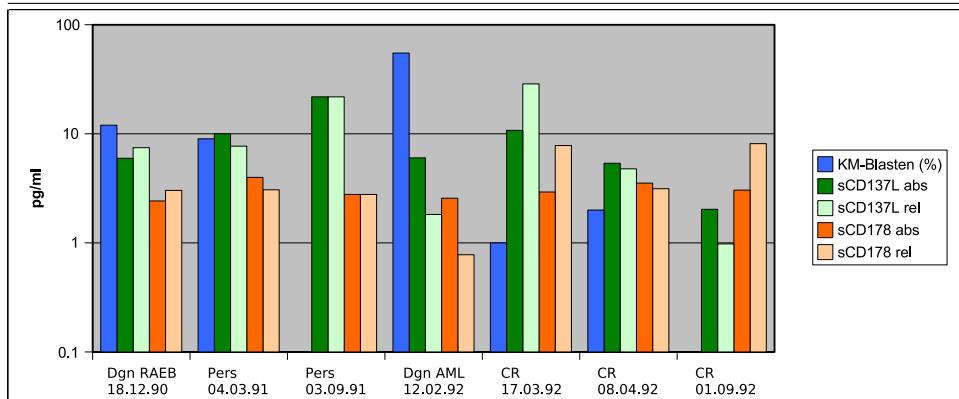
Bei Patienten, deren Werte wir zum Zeitpunkt der Diagnosestellung von AML studiert hatten und die an den Folgen der Krankheit innerhalb von vier Monaten starben ( $n=5$ ), zeigten sich höhere Werte des sCD137L ( $> 20 \text{ pg/ml}$ ) im Vergleich zu denjenigen Patienten, die länger überlebten ( $P=0,27$ ;  $n=16$ ; siehe Abbildung 12).

Wir fanden wiederum keine signifikanten Unterschiede der Serumwerte des sCD178. Im Allgemeinen zeigten die Mittelwerte des sCD178 weniger Schwankungen im Vergleich zu den unterschiedlichen Werten des sCD137L.

Die folgenden Abbildungen zeigen Serumwerte des sCD137L und des sCD178 im Zusammenhang mit der Expression von Blasten im Knochenmark während des klinischen Verlaufs zweier MDS-Patienten. In Abbildung 13 sind die Werte zum Zeitpunkt des Übergangs von einem MDS zu einer AML und der Phase der Remission zu sehen. Wir fanden hohe Werte des sCD137L während persistierender MDS und AML und ebenfalls während der ersten Phase der kompletten Remission. Abbildung 14 zeigt ebenfalls Serumwerte des sCD137L, des sCD178 und die Expression von Blasten im Knochenmark während des klinischen Verlaufs eines AML-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, sowie während der Phase der persistierenden Erkrankung. Hier wird ersichtlich, dass die Serumwerte des sCD137L während des Verlaufs der Krankheit anstiegen. Bei beiden Patienten konnten wir keinen Zusammenhang zwischen dem klinischen Verlauf und den Werten des sCD178 erkennen.

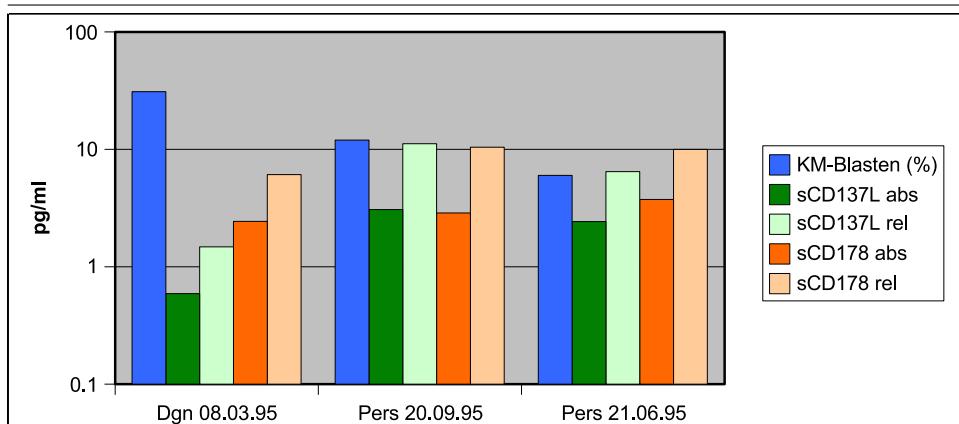
Um die prognostische Relevanz des sCD137L und des sCD178 in Fällen mit pAML und sAML zum Zeitpunkt der Diagnosestellung für den weiteren Verlauf der Krankheit zu evaluieren, ermittelten wir Cut-off-Werte. Anhand derer war es uns möglich, Fälle mit einem günstigen von denjenigen mit einem ungünstigen Verlauf zu unterscheiden. Der für sCD137L evaluierte Cut-off-Wert von  $10,5 \text{ pg/ml}$  für Patienten mit sAML und pAML teilt die Gruppen in zehn Fälle mit niedrigeren und in zwölf Fälle mit höheren Serumwerten des sCD137L auf (siehe Tabelle 9). Wir konnten zeigen, dass niedrigere Werte des sCD137L mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines längeren progressfreien Überlebens korrelieren ( $P=0,07$ ; siehe Abbildung 15).

**Abbildung 13** sCD137L und sCD178 Serumwerte eines Patienten im Verlauf während MDS und AML



KM-Blasten (%): Blasten im Knochenmark in Prozent, abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert

**Abbildung 14** sCD137L und sCD178 Serumwerte eines AML-Patienten im Verlauf



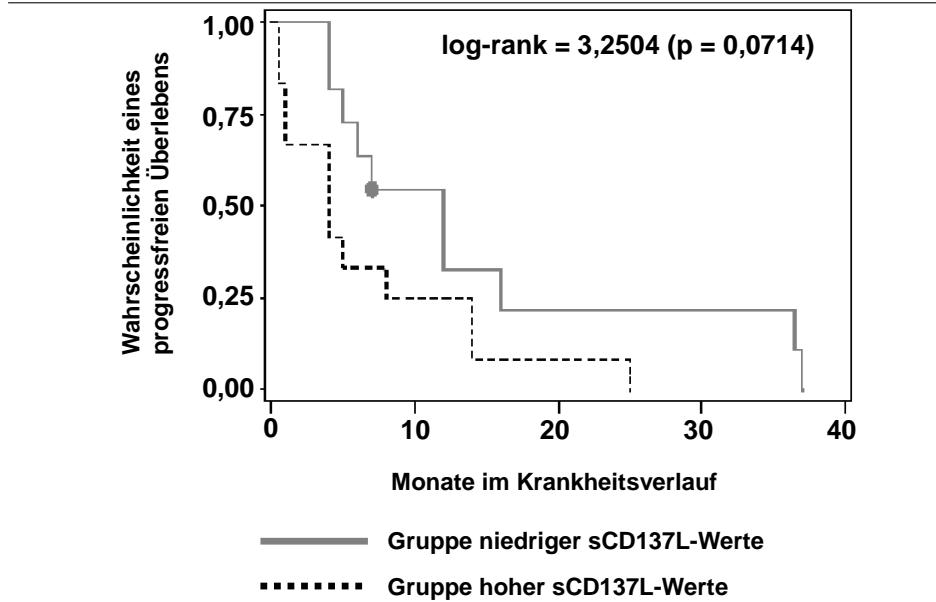
KM-Blasten (%): Blasten im Knochenmark in Prozent, abs: absolut, rel: relativ (bezogen auf 4000 Leukozyten), MW: Mittelwert

	Fälle weniger als 10,5 pg/ml (p+sAML)	mit 10,5 pg/ml (p+sAML)	Fälle mit mehr als 10,5 pg/ml (p+sAML)
sAML/pAML	8/2	9/3	
g/i/s	0/7/2	0/7/3	
KM-Blasten > 40% / < 40%	5/5	7/5	
undifferenzierte AML/ monozytoider AML	4/2	4/4	

s: sekundär, p: primär, g: günstig, i: intermediär, s: schlecht

**Tabelle 9: Charakterisierung der Patienten der Cut-off-Kurve**

**Abbildung 15** Längeres progressfreies Überleben bei AML-Fällen mit niedrigeren sCD137L-Werten



Eine Einzelbetrachtung der Fälle mit sekundärer AML ( $n=17$ ) ergab einen Cut-off-Wert von 8 pg/ml, der die Fälle in neun mit niedrigeren und 13 mit höheren sCD137L Werten unterteilte. Obwohl wir keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf ein progressfreies Überleben der Patienten feststellen konnten, war eine Tendenz für ein längeres progressfreies Überleben bei Patienten mit niedrigeren Werten des sCD137L ersichtlich (Daten dazu werden nicht gezeigt).

Für sCD178 konnten wir einen Cut-off-Wert von 9 pg/ml ermitteln, der eine Unterteilung der Gruppe von 22 Patienten mit pAML oder sAML zum Zeitpunkt der Diagnose in 13 Fälle mit niedrigeren sCD178 Werten und neun Fälle mit höheren sCD178 Werten ergab. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen waren nicht signifikant (Daten dazu werden nicht gezeigt).

Ein Vergleich von AML-Patienten in anderen Stadien der Krankheit war durch die niedrige Fallzahl nicht möglich.

Insgesamt zeigte sich eine, wenn auch aufgrund der niedrigen Fallzahlen nicht signifikante, Tendenz für eine Korrelation zwischen hohen sCD137L Werten und einem ungünstigen Subtyp oder einer schlechten Prognose.

### 3.3 Oberflächenexpression von cCD137L auf Tumorzellen bei AML, MDS oder NHL

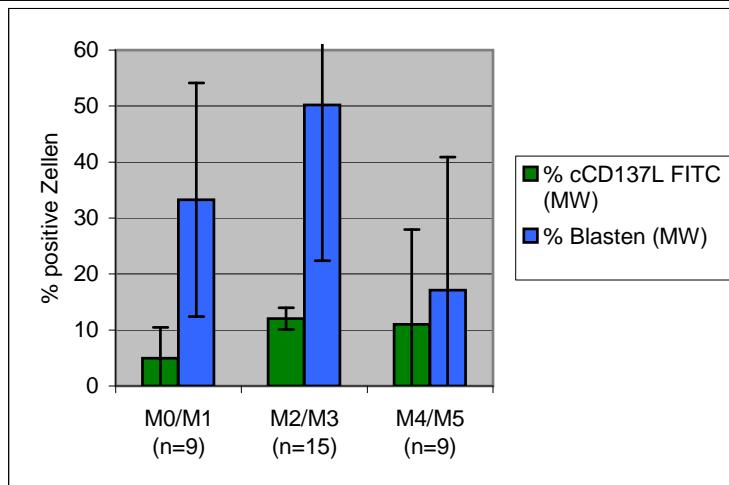
#### 3.3.1 Oberflächenexpression von cCD137L bei AML, MDS oder NHL

**CD137L Expression auf MNC bei Patienten mit AML** Die Expression von CD137L in MNC-Fraktionen bei AML in akuten Krankheitsstadien mit einem FITC-konjugierten Antikörper war insgesamt niedrig. Zwischen 5-15% CD137L<sup>+</sup> Zellen ließen sich nachweisen, bei granulär/promyelozytärer und monozytärer AML, sowie bei Fällen mit einem ungünstigen Karyotyp etwas mehr als bei den restlichen Subtypen (siehe Abbildungen 16 und 17).

Dabei war die Expression zum Zeitpunkt des Rezidivs am höchsten (siehe Abbildung 18).

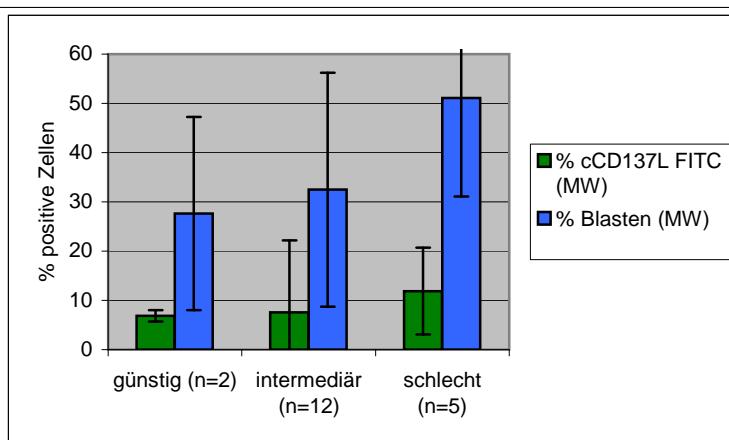
Koexpressionsanalysen von cCD137L und Blasten zeigten, dass 22% der Blasten

**Abbildung 16** Expression des cCD137L in verschiedenen FAB-Subtypen bei AML



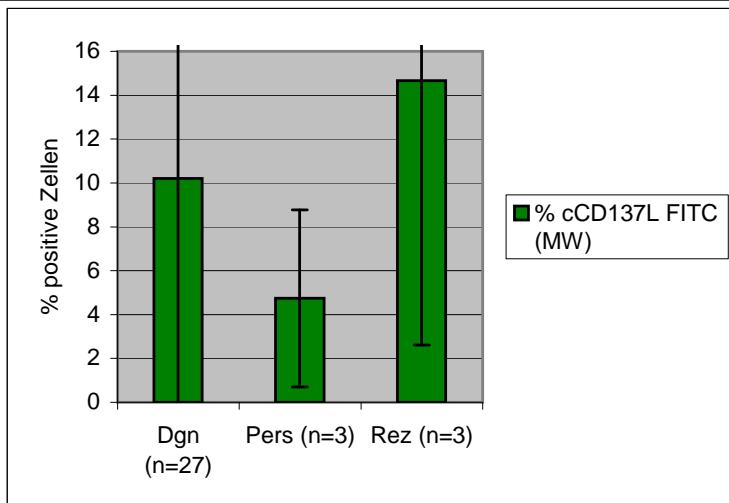
n: Anzahl Proben, M0, M1, M2, M3, M4, M5: FAB-Subtypen, MW: Mittelwert

**Abbildung 17** Expression des cCD137L in verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen bei AML



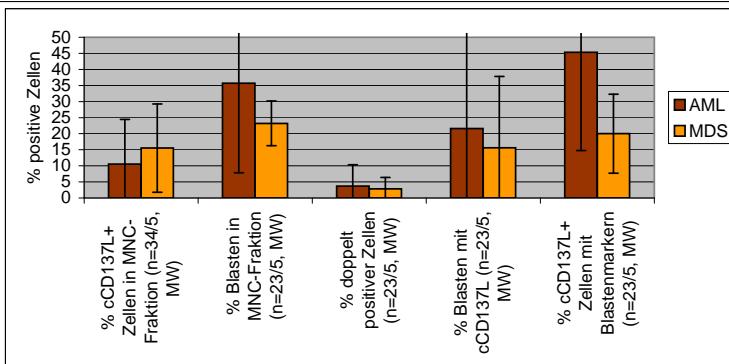
n: Anzahl Proben, MW: Mittelwert

**Abbildung 18** Expression des cCD137L in unterschiedlichen Stadien der AML



n: Anzahl Proben, MW: Mittelwert

**Abbildung 19** Expression des cCD137L auf Blasten bei AML und MDS



n: Anzahl Proben (AML/MDS), MW: Mittelwert

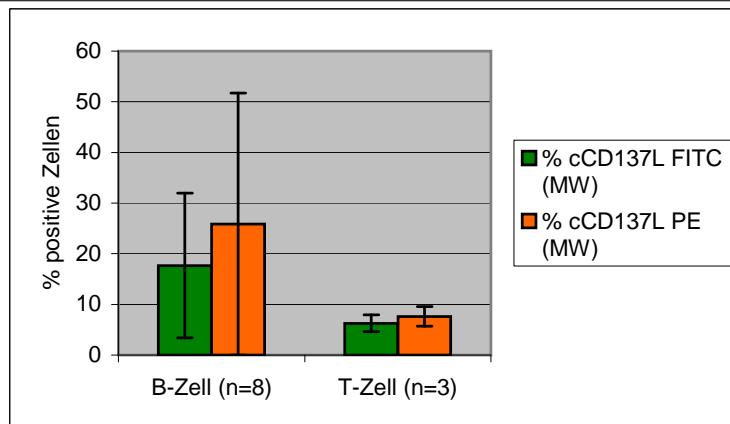
CD137L bzw. 45% der CD137L<sup>+</sup> Zellen Blastenmarker exprimieren - insgesamt fanden sich in der gesamten MNC-Faktion 4% doppelpositive Zellen (siehe Abbildung 19).

**CD137L Expression auf MNC bei Patienten mit MDS** Die Expression von CD137L in MNC-Fraktionen bei MDS mit einem FITC-konjugierten Antikörper war auch hier niedrig: sie wies 16% CD137L<sup>+</sup> Zellen in der MNC-Faktion von fünf MDS-Patienten auf. Bei einem Vergleich der einzelnen Stadien der Krankheit fiel uns eine höhere Expression von cCD137L in Seren von Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (17%, n=3) im Vergleich zu Seren von Patienten mit persistierender Krankheit auf (14%, n=2, Daten dazu werden nicht gezeigt).

**CD137L Expression auf MNC bei Patienten mit NHL** Die Expression des CD137L in MNC-Fraktionen bei NHL, einschließlich eines cALL-Falles, mit einem FITC-konjugierten Antikörper ergab insgesamt niedrige Werte mit höheren bei B-Zell-Lymphomen und bei Patienten mit persistierender NHL (siehe Abbildungen 20 und 21).

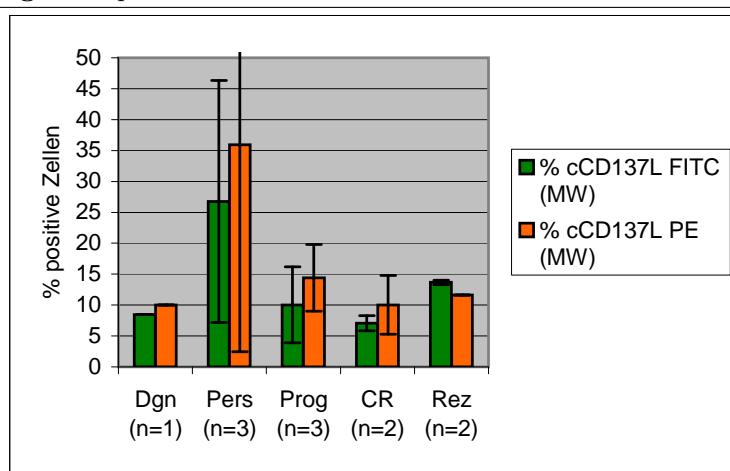
Ein paralleler Vergleich mittels FITC- und PE-konjugierten Antikörpern zeigt

**Abbildung 20** Expression des cCD137L bei Patienten mit T- oder B-Zell-Lymphomen



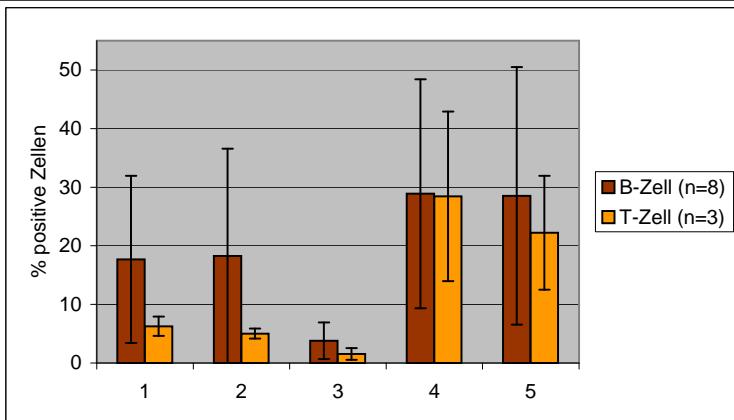
n: Anzahl Proben, MW: Mittelwert

**Abbildung 21** Expression des cCD137L im Krankheitsverlauf bei NHL-Patienten



n: Anzahl Proben, MW: Mittelwert

**Abbildung 22** Expression des cCD137L auf Lymphomzellen bei NHL



n: Anzahl Proben

- 1: % an CD137L<sup>+</sup> positiven Zellen in der MNC-Fraktion (Mittelwert)
- 2: % an immunologisch determinierten B- und T-Zellen in der MNC-Fraktion (Mittelwert)
- 3: % an B-/T-Zell und CD137L doppelpositiven Zellen in der MNC-Fraktion (Mittelwert)
- 4: % an B-/T-Zellen, die CD137L koexprimieren (Mittelwert)
- 5: % an CD137L<sup>+</sup>, die B-/T-Zell-Marker koexprimieren (Mittelwert)

ähnliche Ergebnisse, der PE-markierten Antikörper färbt die Zellen jedoch besser an und erzieht dadurch höhere Werte (siehe Abbildungen 20 und 21).

Eine Untersuchung der Koexpression von CD137L mit Lymphomzellen bei Patienten mit NHL, einschließlich eines Patienten mit cALL, zeigte, dass 29% der T-Zellen und 28% der B-Zellen CD137L exprimieren. 29/22% der CD137L positiven Zellen koexprimierten T-/B-Zell Marker, wohingegen 4/2% doppelt positive Zellen in der MNC-Fraktion nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 22).

**CD137L Expression auf MNC bei gesunden Spendern** Mit Hilfe eines FITC konjugierten, gegen CD137L gerichteten Antikörpers, konnten wir 24% CD137L<sup>+</sup> Zellen in einer MNC-Fraktion von neun gesunden Spendern feststellen.

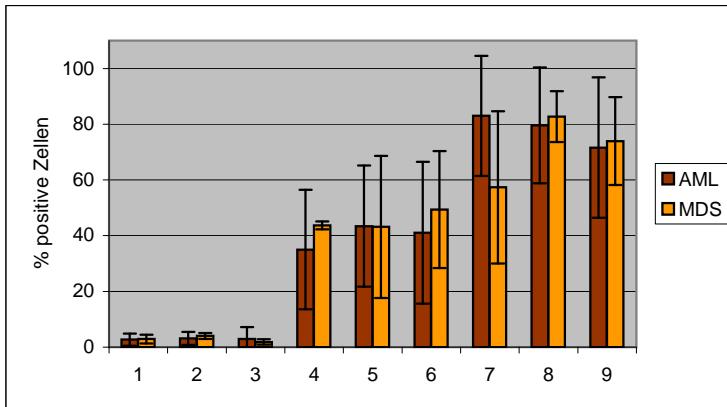
Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass CD137L in der MNC-Fraktion von gesunden Probanden nachzuweisen ist und zu unterschiedlichen Konzentrationen auf Blasten bei AML und MDS Patienten und auf B- und T-Zellen bei Patienten mit NHL koexprimiert wird.

### 3.3.2 cCD137L - ein DC-Marker

**Expression des CD137L auf DC bei Patienten mit AML und MDS** Um die Expression des CD137L in der jeweiligen MNC-Fraktion von Patienten mit AML und MDS, die wir während des Stadiums der Erstdiagnose, während persistierender Krankheit und während eines Rezidivs untersucht hatten, nachweisen zu können, benutzten wir einen FITC konjugierten, gegen CD137L gerichteten Antikörper. In der MNC-Fraktion von Patienten mit AML (n=32) konnten wir neun % CD137L<sup>+</sup> Zellen feststellen, in der von Patienten mit MDS (n=5) 16%.

Im nächsten Schritt generierten wir DC mit den drei in Kapitel 2.5 beschriebenen Methoden Picibanil, MCM-Mimic und Ca-Ionophore. Mittels Picibanil generierten wir bei Patienten mit AML (n=28) 12% und bei Patienten mit MDS (n=3) 14% DC, mit MCM-Mimic 12% bei Patienten mit AML (n=26) und 16% bei Patienten

**Abbildung 23** Die Expression des cCD137L auf ex vivo generierten DC bei AML und MDS



- 1: % an DC/CD137L doppelpositiven Zellen in der MNC-Fraktion (Picibanil, MW)
  - 2: % an DC/CD137L doppelpositiven Zellen in der MNC-Fraktion (MCM-Mimic, MW)
  - 3: % an DC/CD137L doppelpositiven Zellen in der MNC-Fraktion (Ca-Ionophore, MW)
  - 4: % an DC, die CD137L koexprimieren (Picibanil, MW)
  - 5: % an DC, die CD137L koexprimieren (MCM-Mimic, MW)
  - 6: % an DC, die CD137L koexprimieren (Ca-Ionophore, MW)
  - 7: % an CD137L+ Zellen, die DC-Marker koexprimieren (Picibanil, MW)
  - 8: % an CD137L+ Zellen, die DC-Marker koexprimieren (MCM-Mimic, MW)
  - 9: % an CD137L+ Zellen, die DC-Marker koexprimieren (Ca-Ionophore, MW)
- MW: Mittelwert

mit MDS ( $n=4$ ) und mit Ca-Ionophore 10% bei Patienten mit AML ( $n=27$ ) und 7% bei Patienten mit MDS ( $n=4$ ). In der Annahme, CD137L sei auch ein DC Marker, fanden wir 3/8% CD137L<sup>+</sup> Zellen in der AML-/MDS-DC-Kultur mittels Picibanil ( $n=32/4$ ), 4/5% mittels MCM-Mimic ( $n=30/5$ ) und 4/3% mittels Ca-Ionophore ( $n=31/5$ ).

Koexpressionsanalysen von CD137L auf DC, die mit Picibanil, MCM-Mimic und Ca-Ionophore ex vivo generiert wurden, ergaben mittels Picibanil 3/3% doppelpositive Zellen ( $n=29/3$ ), mittels MCM-Mimic 3/4% ( $n=25/4$ ) und mittels Ca-Ionophore 3/2% in der AML-/MDS-DC-Kultur. DC zeigten mittels Picibanil eine 35/44%-ige ( $n=26/3$ ), mittels MCM-Mimic eine 43/43%-ige ( $n=25/4$ ) und mittels Ca-Ionophore eine 41/49%-ige ( $n=25/4$ ) zusätzliche Expression von CD137L. CD137L<sup>+</sup> Zellen wiesen eine zusätzliche Expression von DC-Markern von 83/57% bei Picibanil ( $n=27/3$ ), von 80/83% bei MCM-Mimic ( $n=25/4$ ) und von 72/74% bei Ca-Ionophore ( $n=26/4$ ) in AML-/MDS-Proben auf (siehe Abbildung 23).

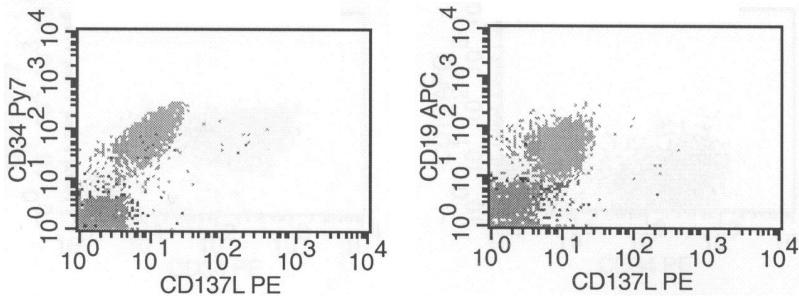
Vergleicht man den Prozentsatz von CD137L<sup>+</sup> Zellen vor und nach der DC-Generierung, fällt ein Rückgang von CD137L<sup>+</sup> Zellen von 9/16% auf 3/8% mittels Picibanil ( $n=32/5$ ), auf 4/5% mittels MCM-Mimic ( $n=30/5$ ) und auf 4/3% mittels Ca-Ionophore ( $n=31/5$ ) bei Fällen mit AML/MDS auf. Bei der Betrachtung individueller Einzelproben konnten wir bei über 50% der Fälle eine Hochregulation CD137L<sup>+</sup> Zellen feststellen (Daten dazu werden nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigen unsere Daten eine Expression des CD137L auf DC, eine Koexpression mit Lymphomzellen bei Patienten mit NHL und eine Koexpression mit Blastenmarkern bei Proben von Patienten mit AML und MDS.

---

**Abbildung 24** Koexpression von CD137L auf leukämischen Zellen

---



### 3.3.3 CD137L-FITC und CD137L-PE Antikörper im Vergleich

Erst zu einem späteren Zeitpunkt im Verlauf der Arbeiten stand uns ein PE-markierter Antikörper zur Verfügung. Vergleichsuntersuchungen zwischen beiden Antikörpern wiesen mittels FITC-konjugiertem anti-CD137L Antikörper nur 19% CD137<sup>+</sup> Zellen im MNC-Gate von 34 Patienten mit AML im Vergleich zu 31% mittels PE-konjugiertem anti-CD137L Antikörper in einem Gate von sechs AML-Patienten auf. Beim direkten Vergleich von fünf Patienten zeigte sich bei vier Patienten, dass der PE-konjugierte anti-CD137L Antikörper die Zellen besser anfärbt (Daten dazu werden nicht gezeigt).

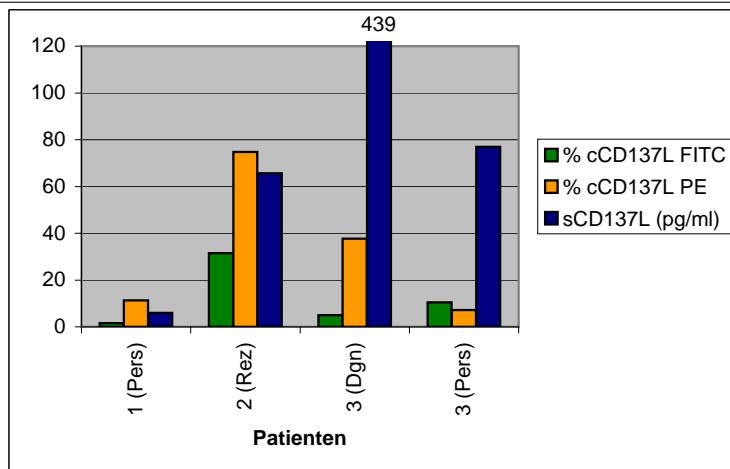
Abbildung 24 zeigt Beispiele von hohen Expressionsraten (ca. 50%) des CD137L auf leukämischen Zellen bei einem Patienten mit cALL mittels CD137L-PE Antikörper: eine Koexpression von CD137L mit CD34<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellenpopulationen wird hier sichtbar (siehe Abbildung 24).

### 3.3.4 sCD137L - ein Marker für Mechanismen des „Immune-Escape“ im Zusammenhang mit seiner zellulären Expression

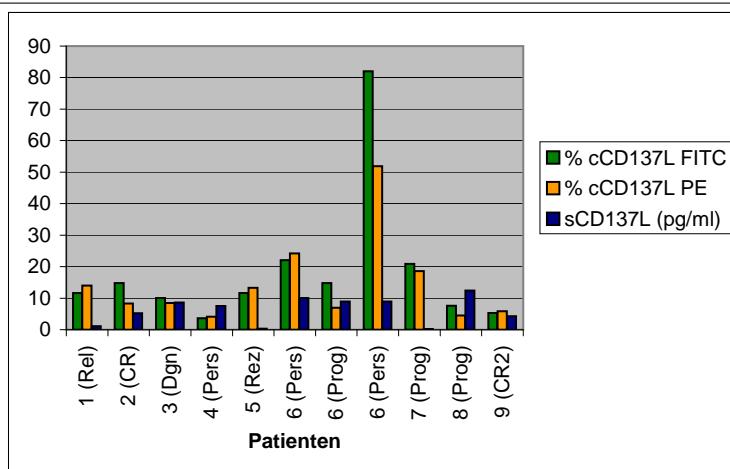
Wir konnten bereits zeigen, dass hohe Serumwerte des sCD137L bei MDS und AML mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Deshalb verglichen wir Werte des sCD137L mit der zellulären Expression des CD137L. Hierfür standen uns vier Proben von AML-Patienten und elf von NHL-Patienten zur Verfügung. Vergleichsuntersuchungen mit löslichem und zellständigem CD137L bei AML-Patienten zeigten bei zwei von vier Fällen eine Korrelation (Patient eins und zwei, Abbildung 25). Werte des dritten Patienten in Fall drei und vier wiesen eine hohe zelluläre Expression des CD137L mittels PE-konjugiertem Antikörper und eine extrem hohe Menge an löslichem CD137L zum Zeitpunkt der Diagnose, sowie niedrige Werte des zellulären und hohe Werte des löslichen CD137L während der Persistenz auf (siehe Abbildung 25).

Bei Patienten mit NHL fanden wir korrespondierend niedrige Werte des zellulären und löslichen CD137L bei acht von elf Fällen. Die übrigen drei Fälle wiesen eine relativ hohe Expression des zellulären und relativ niedrige Werte des löslichen CD137L auf (siehe Abbildung 26).

**Abbildung 25** sCD137L und cCD137L bei Patienten mit AML



**Abbildung 26** sCD137L und cCD137L bei Patienten mit NHL





## 4 Diskussion

### 4.1 Die Rolle des sCD178 bei Patienten mit AML, MDS und NHL

Die Expression des CD178, Mitglied der TNF-Familie und Ligand für den Todesrezeptor CD95 (Fas/APO-1), spielt bekanntlich eine Rolle bei der Pathophysiologie von MDS [57, 125, 63, 32]. Es konnte mitunter von uns gezeigt werden, dass CD178 auf akuten leukämischen Zelllinien und auf Zellen von pAML exprimiert wird. Dies lässt vermuten, dass jener Ligand ebenfalls bei Leukämien wie AML von Bedeutung ist und auch dort einen Einfluss auf die Pathophysiologie hat. Die Erkenntnis, dass die Interaktion zwischen leukämischen Zellen mit in der Kultur vorhandenen T-Zellen durch CD178 beeinflusst wird, bekräftigt seine Rolle bei der Immunreaktion. Oben genannte Fakten könnten sowohl bei der Vermittlung des „Immune-Escape“ von leukämischen Zellen, als auch bei Immunreaktionen eine Rolle spielen [156, 25]. Es wird darüber diskutiert, ob die Absonderung des CD178 als lösliche Form von der Zelloberfläche zu einer Verminderung seiner Fähigkeit, Apoptose in CD95-sensitiven Zielzellen auszulösen, führt [171]. Salih und Schmetzner zeigten, dass Werte des sCD178 unter 15pg/ml signifikant mit einer raschen Progression der Krankheit bei Patienten mit MDS einhergehen [160]. Das weist darauf hin, dass sCD178 bei MDS eine immunologisch prognostische Rolle für den Krankheitsverlauf hat, der unabhängig von anderen, derzeit benutzten Parametern, wie der zytogenetischen Risikogruppe ist.

In dieser Studie analysierten wir den Zusammenhang des sCD178 mit Subtypen und prognostischen Faktoren bei Patienten mit AML oder NHL. Wir konnten weder einen signifikanten Zusammenhang mit sCD178 und den LDH-Werten, der extranodalen Manifestation und der Ann-Arbor-Klassifikation bei Patienten mit NHL, noch mit den Stadien der AML, undifferenzierter und monozytoider AML, der Anzahl von Blasten im Knochenmark und dem klinischen Verlauf der Krankheit bei Patienten mit AML beobachten. Die Werte des sCD178 wiesen, im Vergleich zum sCD137L, eine sehr geringe Schwankungsbreite auf. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die von uns untersuchte Patientenzahl zu gering war, zum anderen daran, dass die Absonderung des sCD178 für den klinischen Verlauf der Krankheit nicht pathophysiologisch relevant ist. Es ist jedoch derzeit zu wenig über die Rolle des sCD178, vor allem über dessen prognostische und klinische Relevanz bei Patienten mit AML und NHL bekannt, um darüber eine sichere Aussage treffen zu können.

### 4.2 Die Rolle des sCD137L bei Patienten mit AML, MDS und NHL

Wir und andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass CD137L konstitutiv auf Tumorzellen, akut leukämischen Zellen und Zellen des B- und T-NHL exprimiert wird [158, 161, 138, 39, 124]. Noch dazu wurde aufgezeigt, dass CD137L eine wichtige Rolle bei der Interaktion von leukämischen Zellen mit dem Immunsystem spielt [79, 20]. Vor kurzem demonstrierten wir, dass auch eine lösliche Form des CD137L existiert, die in Seren von Patienten mit verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen wie AML und MDS nachgewiesen werden kann [161, 160]. Erhöhte Serumwerte des sCD137L wurden auch bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass diese mit der Schwere der Krankheit korrelierten [89, 160]. Wir zeigten außerdem, dass niedrige Werte des sCD137L und hohe Werte des sCD178 bei Patienten, die an MDS erkrankt waren, mit einer längeren progressfreien Zeit korrelierten [160].

In dieser Studie analysierten wir den Zusammenhang der Serumwerte des sCD137L mit Subtypen und prognostischen Faktoren bei Patienten mit AML oder

NHL. Obwohl die Serumwerte des sCD137L bei Patienten mit NHL signifikant höher waren, als bei gesunden Probanden ( $P=0,03$ ), fielen sie im Vergleich zu den Werten bei Patienten mit AML und MDS viel geringer aus [161]. Außerdem zeigte sich kein Zusammenhang mit verschiedenen Subtypen des NHL. Dies könnte an der Tatsache liegen, dass das NHL seinen Ursprung im lymphatischen Gewebe hat. Bei Patienten mit AML spielt sich auf Grund der hohen Tumormasse im Blut die zelluläre Interaktion im peripheren Blut ab. Im Gegensatz dazu ist das NHL, laut Definition, hauptsächlich in Lymphknoten auffindbar und nur zu einem geringen Teil im peripheren Blut.

Weiterhin ermittelten wir Serumwerte des sCD137L bei Patienten mit NHL und forschten nach einem Zusammenhang mit verschiedenen histologischen oder klinischen Aspekten, wie der Tumorlast, dem Ansprechen auf eine Chemotherapie oder prognostischen Parametern. Wir suchten nach einer Korrelation zwischen Mengen des sCD137L und der Ann-Arbor-Klassifikation und prognostischen Faktoren, wie dem Alter, dem LDH-Spiegel und der extranodalen Manifestation. Es ließ sich jedoch kein Zusammenhang feststellen. Dies lässt darauf schließen, dass sCD137L kein geeigneter prognostischer Faktor ist, um ein rasch fortschreitendes NHL erkennen zu können. Um zu einem endgültigen Ergebnis zu kommen, bedarf es jedoch noch weiterer Forschung im Hinblick auf die Bedeutung des sCD137L im Zusammenhang mit NHL.

Bei Patienten mit AML demonstrierten wir eine Korrelation von Werten des sCD137L mit ungünstigen Subtypen (wie sAML, undifferenzierter AML und einer schlechten Prognose) und mit einer hohen Blastenzahl im Knochenmark. Dieser Zusammenhang könnte ein Hinweis auf eine erhöhte Absonderung des CD137L bei Fällen mit höheren Blastenzahlen sein und gibt weitere Rätsel über den Grund der Absonderung des CD137L von Blastenzellen auf. Eine mögliche These besteht darin, dass die Blastenzellen CD137L absondern um vom Immunsystem nicht erkannt zu werden (siehe unten).

Dafür spricht auch unsere nächste Beobachtung: Patienten, die innerhalb von vier Monaten nach Diagnosestellung verstorben waren, zeigten höhere Werte des sCD137L im Vergleich zu denjenigen Patienten, die länger lebten. Hohe Serumwerte des sCD137L waren im allgemeinen mit einem kürzeren progressfreien Überleben der Patienten assoziiert. Dies zeigt, dass die Serumwerte des sCD137L einen zusätzlichen, immunologisch prognostisch relevanten Faktor darstellen, um das Risiko des Fortschreitens der Krankheit einschätzen zu können.

Ein für uns überraschendes Ergebnis stellten die hohen Serumwerte des sCD137L während frühen Phasen der Krankheit dar, nämlich einen Monat nach Chemotherapie, mit im weiteren Verlauf der kompletten Remission abnehmenden Werten. Dieser vermehrte Nachweis des sCD137L kann durch die Zellyse der Chemotherapie erklärt werden.

Die Absonderung des CD137L von der Zelloberfläche könnte, wie bereits oben angedeutet, zu einer Herabregulierung der Immunantwort gegen diese Zellen führen, indem das kostimulatorische Signal über den auf T- und NK-Zellen exprimierten Rezeptor CD137 vermindert wird. Noch dazu könnte der Verlust des CD137L von der Zelloberfläche entarteter Zellen ein rückwärtiges Signal in die jeweilige Zelle verhindern. Dies ist seit dem Nachweis, dass ein rückwärtiges Signal über CD137L in Lymphozyten und Monozyten zur Apoptose führt, von Bedeutung [119, 99]. Folglich könnte die Absonderung des CD137L von der Zelloberfläche in einem erhöhten Überleben der jeweiligen Tumorzellen resultieren, indem die über CD137L übermittelte Apoptose-Signale abgeschwächt werden.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass sCD137L als prognostischer Faktor für die Evaluation des Risikos für ein rasches Fortschreiten der Erkrankung bei Patienten mit AML und MDS [160] geeignet ist. Dies war jedoch bei Patienten mit NHL nicht der Fall. Der pathophysiologische Hintergrund über die Korrelation der Serumwer-

te des sCD137L mit der Progression der Krankheit ist zwar noch nicht bekannt, die Analyse der Serumwerte des sCD137L kann jedoch zu einem besseren Monitoring des Krankheitsverlaufs führen. Dies ist vor allem hilfreich, um in einer Phase des drohenden Risikos einer Progression der Krankheit diese durch eine frühe therapeutische Intervention abwenden zu können. Es ist jedoch immer noch wenig über die Auswirkungen des löslichen Moleküls sCD137L selbst und die Rolle der Absondierung des CD137L bekannt und dessen Anteil an der Pathophysiologie der AML und des MDS bedarf weiterer Forschung.

### 4.3 Die Rolle des zellständigen CD137L bei der Vermittlung und Modulation der Immunreaktion

Die Entstehung maligner Erkrankungen ist von der Interaktion der Tumorzellen mit dem Immunsystem abhängig. Dies ist ein langwieriger Prozess, der entweder frühzeitig durch eine Elimination der entarteten Zellen unterbunden wird, oder nach längerer Zeit zu einer klinisch manifesten Tumorerkrankung führt. Die Toleranz der Tumorzellen durch das Immunsystem, bei der viele Mitglieder der TNF-Familie involviert sind, spielt hierbei eine bedeutende Rolle.

CD137L, ein Mitglied der TNFR Genfamilie ist an der Regulation der Zellproliferation, der Differenzierung und dem programmierten Zelltod beteiligt [180]. Viele Rezeptoren treten mit ihren dazugehörigen löslichen oder zellulären Liganden, wie CD40L, FasL oder CD137L in Kontakt [8, 183, 7]. Es konnte gezeigt werden, dass CD137L ein kostimulatorisches Molekül für CD4<sup>+</sup> und speziell für CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist [158, 184]. Außerdem wissen wir, dass CD137L konstitutiv auf APC Zellen (z.B B-Zellen, Monozyten und DC) exprimiert wird [40]. Die Interaktion zwischen CD137 und seinem Liganden stimuliert die Zellproliferation und die Produktion einiger immun relevanter Zytokine, wie IL-2, IL-4 und IFN $\gamma$  über eine von CD28 unabhängige Kostimulation [164]. Die Expression einiger dieser Marker auf Tumorzellen scheint eine Rolle beim Entkommen der malignen Zellen vor dem Immunsystem zu spielen, indem sie bei Lymphozyten, die den Tumor infiltrieren Apoptose auslösen [194]. Es konnte von uns und anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass CD137L konstitutiv auf Tumorzellen exprimiert wird [158, 138], wobei bis jetzt nur wenige Daten über die zelluläre Expression des CD137L auf naiven leukämischen Zellen von Patienten mit AML und MDS existieren. Wir fanden jedoch bereits heraus, dass der lösliche CD137L im Serum von Patienten mit AML und MDS in größerem Ausmaß vorhanden ist als in Seren gesunder Probanden [160, 70]. Außerdem sind einige Daten über die Hochregulation von CD137L auf DC während der DC-Generierung auf Zellen gesunder Probanden und bei Patienten mit Leukämie bekannt [98, 95, 170].

Mit unserer Studie führten wir Daten auf, die Auskunft über die Werte des CD137L als „Tumormarker“, der auf naiven malignen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, als DC-Marker, der auf gesunden Zellen oder Zellen mit leukämischer Abstammung exprimiert wird und als Molekül, das als Vermittler zum Entkommen vor der Immunantwort agiert, Auskunft geben.

**CD137L - Ein Tumormarker** Basierend auf der Beobachtung, dass CD137L auf Zellen von soliden Tumoren oder auf Zellen hämatopoetischer Tumoren exprimiert wird [158], untersuchten wir dessen Expression auf naiven malignen Zellen von Patienten mit AML, MDS und NHL mittels eines FITC- oder PE-konjugierten CD137L Antikörpers. Ein Vergleich von PE- und FITC-konjugierten Antikörpern zeigte, dass der PE-Antikörper sensitiver für CD137L ist, und somit die Zellen besser anfärbt. Dies bedeutet, dass der Gebrauch des PE-konjugierten CD137L Antikörper aussagekräftiger ist als der des FITC-konjugierten.

Unsere Daten zeigten eine zelluläre Koexpression von CD137L auf Blasten von

AML- oder MDS-Patienten, wie auch auf Lymphomzellen von Patienten mit NHL. Noch dazu konnten wir eine höhere Expressionsrate des CD137L während aktiver AML-Stadien, besonders während der Persistenz der Krankheit, feststellen. Für eine zuverlässige Aussage über die Tumorlast während des Krankheitsverlaufs benötigt man jedoch zusätzlich zu CD137L eine Kombination anderer, für den jeweiligen Patienten spezifischer, Antikörper, wie CD117, da CD137L auch auf anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird.

Mit unseren Daten bekräftigen wir eine Koexpression des CD137L auf lymphatischen malignen Zellen [158] und können zusätzlich eine Koexpression auf myeloiden malignen Zellen nachweisen, was bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht gezeigt werden konnte. Trotz geringer Probenanzahl darf man vermuten, dass CD137 und sein Ligand in der spezifischen, über T-Zellen stimulierten, Immunantwort myeloidischer Krankheiten involviert ist.

**CD137L - ein DC-Marker** Wir untersuchten die Expression des CD137L bei Patienten mit AML und MDS vor und nach der Umwandlung leukämischer Zellen zu DC.

Es wurde bereits gezeigt, dass DC gesunder Probanden eine CD137L mRNA besitzen und CD137L auf ihrer Zelloberfläche exprimieren - vor allem bei DC-Kulturen mit IL-1 und solchen DC, die T-Zellen aktivieren. Dies konnte über die Hochregulation von CD137L auf T-Zellen gezeigt werden [98, 95]. Außerdem weiß man, dass Lipopolysaccharide in einer Kultur hauptsächlich eine Expression des CD137L auf DC induzieren [102]. Im Zusammenhang dazu konnten Lee et al. zeigen, dass CD137L im Vergleich zu CD30, ein Marker für aktivierte T- und B-Zellen, zu einer geringeren Menge exprimiert wird. Es kann jedoch eine Stimulation und Expansion von T-Zellen mit ausgewählten CD137L<sup>+</sup> Zellen erreicht werden [102], was wiederum auf die Rolle des CD137L als T-Zell-Stimulator hinweist.

Unsere Gruppe konnte eine Expression des CD137L, sowohl auf DC gesunder Probanden, als auch auf DC von Patienten mit AML oder MDS während aktiver Stadien der Krankheiten nachweisen [95, 94, 110]. Jedoch zeigt sich die Koexpression des CD137L auf DC sehr variabel und relativ niedrig (35-50% CD137L<sup>+</sup> DC). Das bedeutet, dass CD137L nur als DC-Marker verwendet werden kann, wenn sich in den unkultivierten Proben niedrige Werte, und in den kultivierten hohe Werte des CD137L zeigen, da er auch auf Tumorzellen exprimiert wird. Außerdem konnten wir sowohl einen Anstieg als auch einen Rückgang der Expression des CD137L nach der DC-Generierung feststellen. Zu einem anderen Zeitpunkt wiesen wir eine Hochregulation von CD137L auf CD3 positiven T-Zellen, die „DC-Kontakt“ hatten, nach [95, 170].

Um die beste Methode für eine DC-Generierung und die Stimulation von NK- oder T-Zellen herauszufinden, wird eine detaillierte Studie über die Expressionsraten von CD137L auf DC, abhängig von verschiedenen DC-Generierungsmethoden, benötigt [110, 139].

**CD137L - Ein Marker für „Immune Escape“** Unsere Gruppe konnte bereits die Absonderung des CD137L und die lösliche Form des CD137L in Seren von Patienten mit soliden oder hämatopoetischen Tumoren nachweisen [163]. Weiterhin konnten wir zeigen, dass, vor allem bei Patienten mit AML und MDS, die Werte des sCD137L mit der Prognose der Patienten korrelierten [160, 70]. Trotz einer hohen Expression kostimulierender Faktoren kann man beobachten, dass Immunantworten von löslichen Faktoren wie IL-2R, IL-3R, FasL und CTLA-4, die gemeinsam mit zellulären Mechanismen wirken, beeinflusst werden [105]. Korrelationen zwischen löslichen und zellulären immunologischen Markern wurden bis jetzt noch nicht untersucht. Theoretisch könnte die Intensität der Expression der

löslichen Marker mit der Rate der Absonderung und konsequenterweise mit dem Einfluss auf die Immunantwort zusammenhängen.

Unsere Daten ergaben keine eindeutige Korrelation zwischen zellulärer Expression des CD137L und der Menge des löslichen CD137L bei vier von uns untersuchten Proben dreier AML-Patienten, von denen wir gleichermaßen Zellen und Serum zur Verfügung hatten, oder bei elf Proben von neun NHL-Patienten. Eine Korrelation zwischen löslichen und zellulären Markern, wie z.B FasL und CTLA-4 ist bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht untersucht worden.

In dieser Studie zeigten wir, dass CD137L auf mononukleären Zellen bei Patienten mit NHL, MDS oder AML exprimiert wird. Wir konnten eine Expression des CD137L auf DC bekräftigen, und damit die multifunktionale Rolle des CD137L deutlich machen. CD137L kann nur als Tumormarker verwendet werden, wenn es nicht auf DC exprimiert wird und als DC-Marker, wenn in der unkultivierten Probe nur niedrige Werte des CD137L und in der kultivierten Probe hohe Werte des CD137L nachweisbar sind. Wir konnten eine Expression des CD137L auf malignen lymphatischen Zellen aufzeigen und bewiesen eine Expression des CD137L auf malignen myeloischen Zellen. Obwohl eine direkte Korrelation zwischen der Menge an sCD137L und dem klinischen Verlauf des MDS und der AML gezeigt werden konnte, sahen wir keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der zellulären Expression und der löslichen Form des sCD137L. Möglicherweise korreliert die zelluläre Expression von CD137L auf malignen Zellen mit einer guten Prognose der Patienten.

Kontinuierliche Erfolge in der Entwicklung neuer Therapien gegen Krebs haben zu einem besseren Verständnis des komplexen Themas der zellulären und molekularen Interaktion des Immunsystems geführt. Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist die Kenntnis von möglichen Tumor-Escape-Mechanismen von zentraler Wichtigkeit. Bislang in diesem Kontext bekannt sind Wechselwirkungen zwischen TNFen und ihren Rezeptoren. Als Beispiel für resultierende Immunstrategien seien Bestrebungen genannt, CD137L-negative Tumore in CD137L-positive zu konvertieren um somit deren Immunogenität zu steigern [84]. Das CD40/CD40L-System ist für die Regulation der durch B- und T-Zell vermittelten Immunantwort wichtig. Ähnlich wie bei sCD137L korrelierte bei Patienten mit multiplen Myelom und AML eine hohe Menge an sCD40 im Serum mit einer schlechteren Prognose für die Patienten [74].

Diese Erkenntnisse zeigen, dass sowohl lösliche als auch zelluläre Formen eines Moleküls die Immunantwort beeinflussen können, wodurch sich mögliche immuntherapeutische Behandlungsansätze ergeben könnten mit dem Ziel, das Wechselspiel zwischen Liganden und Rezeptoren bzw. deren löslichen Faktoren mit Zellen der Immunantwort zu manipulieren. Erkenntnisse aus unseren Untersuchungen tragen dazu bei, einerseits das Wechselspiel zwischen dem CD137 und seinem Liganden bzw. die Rolle des sekretierten Liganden bei der Modulation von Immunreaktionen besser zu verstehen und könnten helfen diese Wechselspiele im Sinne zielgerichteter Tumor-Immuntherapien zu beeinflussen.



## 5 Ausblick

Es wurde anhand dieser Arbeit offensichtlich, dass der lösliche CD137L, der in Seren gesunder Probanden in einer wesentlich geringeren Menge nachgewiesen werden konnte als bei Patienten mit AML, MDS und NHL, mit dem klinischen Verlauf von AML- und MDS-Patienten korreliert und dass zusätzlich ein Zusammenhang zwischen dem zellulären CD137L und dem klinischen Verlauf von AML-Patienten besteht. Unsere Daten zeigen, dass CD137L, auf Grund seiner zusätzlichen Expression auf anderen hämatopoetischen Zellen, nicht als zuverlässlicher Tumormarker verwendet werden kann, obwohl eine zelluläre Expression von CD137L auf Zellen von Patienten mit MDS, AML und NHL nachgewiesen werden konnte. Er ist trotz seiner Expression auf DC aus demselben Grund kein zuverlässiger DC-Marker.

Mit dieser retrospektiven Studie konnten wir demonstrieren, dass die Analyse des sCD137L und des sCD178 bei Patienten mit AML und MDS von klinischer Bedeutung sein kann. Auf Grund des Zusammenhangs, sowohl zwischen der Menge an löslichem CD137L, als auch der Expression von zellulärem CD137L mit dem klinischen Verlauf von Patienten mit AML, und der Korrelation zwischen dem löslichen CD137L mit dem klinischen Verlauf von Patienten mit MDS besteht die Möglichkeit, diese Erkenntnisse therapeutisch zu nutzen und Patienten mit AML und MDS im Hinblick auf CD137L besser behandeln zu können. Hierfür ist eine prospektive Analyse dieser Parameter geplant, um mehr über deren Rolle bei der Diagnosestellung und das Monitoring des klinischen Verlaufs der Krankheit zu erfahren.

Therapeutische Interventionen wie das Verhindern der Absonderung des CD137L von der Zelloberfläche von Tumorzellen, oder eine Beeinflussung der Interaktionen zwischen CD95 und CD178 oder CD137 und CD137L könnten neue Möglichkeiten zur Behandlung hämatologischer Erkrankungen, wie AML und MDS, bieten.



## 6 Danksagung

Frau Prof. Helga Schmetzer danke ich sehr herzlich für die Überlassung dieses Themas und die freundliche und persönliche Betreuung. Sie nahm sich immer Zeit für meine Fragen und schaffte im Labor ein Klima, in dem man sich wohl fühlte.

Herrn Prof. Helmut Salih danke ich für die Daten des sCD137L und die überaus freundliche und tatkräftige Unterstützung.

Herrn Prof. Kolb danke ich für seine hilfreichen Anregungen und Diskussionsbeiträge.

Bei Herrn Prof. Hiddemann möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Allen Ärzten und dem Pflegepersonal danke ich für die Überlassung von Blut- und Knochenmarkproben und Patientenbefunden.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Tanja Kröll für die gute Zusammenarbeit und die fachkundige Unterstützung bedanken.

Meinen Mitdoktoranden und -doktorandinnen Andreas Kremser, Julia Loibl, Dorothea Fischbacher, Marion Merle, Christine Grabrucker und ganz besonders Anja Liepert danke ich für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre untereinander.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Tobias Scholl, der mich in jeglicher Hinsicht unterstützt, für mich da ist und mich immer wieder aufbaut. Ohne ihn wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Für die Unterstützung durch meine Familie über all die Jahre bin ich sehr dankbar.



## 7 Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

### Originalpublikationen

- **Hentschel N**, Krusch M, Kiener A, Kolb HJ, Salih HR, Schmetzer HM. Serum levels of sCD137 (4-1BB) ligand are prognostic factors for progression in Acute Myeloid Leukemia but not in non-Hodgkin's lymphoma. Eur. J. Hematology 77:91 - 101, 2006
- **Scholl N**, Loibl J, Kremser A, Liepert A, Grabrucker C, Salih HR, Kolb HJ, Schmetzer HM. The role of soluble and cell-surface expressed 4-1BBL ligand in patients with malignant hematopoietic disorders. Leukemia Lymphoma 50(3):427 - 436, 2009
- Kremser A, Loibl J, Grabrucker C, Liepert A, Kroell T, **Scholl N**, Schmid C, Tischer J, Schweiger C, Kufner S, de Valle F, Salih H, Doehner C, Schwartz S, Kolb HJ, Schmetzer H. Dendritic cells can be successfully generated from leukemic blasts in individual patients with AML or MDS: an evaluation of different methods. Eingereicht zur Publikation 2008
- Loibl J, Kremser A, Scmid C, Kroell T, **Scholl N**, Tischer J, Kufner S, Schweiger C, de Valle F, Salih H, Doehner C, Schwartz S, Kolb HJ, Schmetzer H. Surface marker expression profiles of dendritic cells (DC) from blasts in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS): valuable tools to characterize and quantify DC in experimental settings. Eingereicht zur Publikation 2008

### Kongressbeiträge

- **Hentschel N**, Salih HR, Hiddemann W, Kolb HJ, Schmetzer HM. High serum levels of sDC137L are associated with a worse prognosis in AML VII. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Bad Irsee,p32 (2005).
- **Hentschel N**, Salih HR, Hiddemann W, Kolb HJ, Schmetzer HM. High serum levels of sDC137L are associated with a worse prognosis in AML Onkologie, Supp3, 28, Abstr. 347(2005).
- Schmetzer HM, Kremser A, Loibl J, **Hentschel N**, Steiner K, Schmid C, Kroell T, Kufner S, Salih H, de Valle F, Doehner C, Schweiger C, Schwartz C, Hiddemann W, Kolb HJ. Effective ex vivo generation and quantification of eukemia-derived DC has to precede a specific T-cell stimulation for adoptive immunotherapy in AML and MDS Blood Vol 106, 1,abstr 5241 (2005).
- Schmetzer HM, Kremser A, Loibl J, Grabrucker C, Liepert A, **Hentschel N**, Kaiser S, Kroell T, Kufner S, Salih H, Schmid C, Tischer J, de Valle F, Doehner C, Treder W, Schwartz S, Zitzelsberger H, Hiddemann W, Kolb HJ. Generability and quality of leukaemia-derived DC in AML or MDS: conditions and consequences. Bone marrow Transplantation 37,supp1,P404,S69 (2006)
- Liepert A, Grabrucker C, Kremser A, Loibl J, **Hentschel N**, Kroell T, Buhmann R, Yang T, Kaiser S, Schmid C, Tischer J, Zitzelsberger H, Kolb HJ, Schmetzer HM. Leukemia-derived Dendritic cells (Dcleu) are stronger stimulators of T-cells than blasts and give rise to Memory T-cells and Leukemia-cytotoxic T-cells VIII. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Herrsching,p46 (2006).

- Grabrucker C, Liepert A, Kremser A, Freudenreich M, Loibl J, **Hentschel N**, Kroell T, Kern W, Schoch C, Haferlach T, Doehner C, Thiel E, Schmid C, Tischer J, Zitzelsberger H, Kolb HJ, Schmetzer HM. Leukemia-derived Dendritic cells (Dcleu) can be generated in every case of AML and MDS using 3 alternative culture methods in combination, they can be used to stimulate T-cells and are possibly predictive for the clinical response to a DLI/GM-CSF-based (prophylactic) therapy VIII. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Herrsching, p32 (2006).

## Literatur

- [1] Richtlinien der Bundesärztekammer zur Transplantation peripherer Blutstammzellen. *DT Arztbl*, 94:B1268–1276, 1997.
- [2] Akute Leukämien. In Herold G, Herausgeber, *Innere Medizin*, Seiten 75–80. Gerd Herold, Köln Germany, 2005.
- [3] B- und T-Zell-Lymphome (NHL). In GmbH WZV, Herausgeber, *Onkologie 2004/2005*, Seiten 44–57. Preiß, J. and Dornoff, W. and Hagmann, F. G. and Schmieder, A., München Germany, 2005.
- [4] Myelodysplastische Syndrome (MDS). In Herold G, Herausgeber, *Innere Medizin*, Seiten 87–89. Gerd Herold, Köln Germany, 2005.
- [5] Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). In Herold G, Herausgeber, *Innere Medizin*, Seiten 62–65. Gerd Herold, Köln Germany, 2005.
- [6] Ahmed A und Tollefssbol TO. Telomerase, telomerase inhibition, and cancer. *J Anti-Aging Med* 6, 4:315–325, 2003.
- [7] Alderson MR, Smith CA, Tough TW, Davis-Smith T, Armitage SJ, Falk B, Roux E, Baker E, Sutherland GR, und Din WS. Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *Eur J Immunol*, 24:2219–2227, 1994.
- [8] Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson D, Gimpel SG, Davis-Smith T, und Maliszewski CR. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*, 357:80, 1992.
- [9] Aul C, Germing U, Gattermann, und Minning H. Increased incidence of myelodysplastic syndromes: real or fictitious? *Leuk Res*, 22 (1):93–100, 1998.
- [10] Aul C, Giangounidis A, und Germing U. Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. *Int J Hematol*, 73:405–410, 2001.
- [11] Austin H, Delzell E, und Cole P. Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. *Amer J Epidem*, 127:419–439, 1988.
- [12] Büchner T. Akute myeloische Leukämie (AML). In von Ostendorf PC und Seeber S, Herausgeber, *Hämatologie-Onkologie*, Seiten 473–474. Urban und Schwarzenberg, München, 1997.
- [13] Begemann M. Akute Leukämien. In Begemann M, Herausgeber, *Praktische Hämatologie*, Seiten 183–218. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart- New York, eleventh Auflage, 1999.
- [14] Begemann M. Maligne Non-Hodgkin-Lymphome. In Bergmann M, Herausgeber, *Praktische Hämatologie, Klinik Therapie Methodik*, Seiten 296–300. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999.
- [15] Bene MC, Bernier M, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, und others for the European Group for the Immunological Classification of Leukemias ( EGIL. Proposals for the immunological Classification of leukemias. *Leukemia*, 9:1783–1788, 1995.
- [16] Bennett J. The myelodysplastic/myeloproliferative disorders: the interface. *Hematol Oncol Clin North Am* 17, 5:1095–1100, 2003.

- [17] Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Brady C, Roche D, Collins JK, und Shanahan F. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol*, 160:5669, 1998.
- [18] Bevan MJ. In thymic selection, peptide diversity gives and takes away. *Immunity*, 7:175–178, 1997.
- [19] Biesma DH, van den Tweel JG, und Verdonck LF. Immunosuppressive therapy for hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Cancer*, 79:1548–1551, 1997.
- [20] Blazar BR, Kwon BS, Panoskahsis-Mortari A, Kwak KB, Peschon JJ, und Taylor PA. Ligation of 4-1BB (CD137) regulates graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Immunol*, 166:3174–3183, 2001.
- [21] Boon , T and Coulie , P G and Van den Eynde , B . Tumor antigens recognized by t-cells. *Immunol Today*, 18:267–268, 1997.
- [22] Braun J und Renz-Polster H. Blut und blutbildende Organe, Maligne hämatologische Erkrankungen, Leukämien. In Renz-Polster H, Krautzig S, und Braun J, Herausgeber, *Basislehrbuch Innere Medizin*, Seiten 298–302. Urban und Fischer, München Jena, 3. Auflage, 2004.
- [23] Braun J und Renz-Polster H. Blut und blutbildende Organe, Maligne hämatologische Erkrankungen, Maligne Non-Hodgkin-Lymphome. In Renz-Polster H, Krautzig S, und Braun J, Herausgeber, *Basislehrbuch Innere Medizin*, Seiten 306–308. Urban und Fischer, München Jena, 3. Auflage, 2004.
- [24] Bukczynski J, Wen T, und Watts TH. Costimulation of human CD28- T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol*, 33:446–454, 2003.
- [25] Buzyn A, Ostankovitch M, Figueiredo S, Varet B, Guillet JG, Ameisen JC, und Estaquier J. Membrane-bound Fas (Apo-1/CD95) ligand on leukemic cells: a mechanism of tumor immune escape in leukemia patients. *Blood*, 117:76–85, 1999.
- [26] Caligiuri MA, Strout MP, und Gilliland DG. Molecular biology of acute myeloid leucemia. *Semin Oncol*, 24 (1):32–44, 1997.
- [27] Candoni A, Silvestri F, Buonamici S, et al. Targeted therapies in myelodysplastic syndrome: ASH 2003 review. *Semin Hematol*, 41:13–20, 2003.
- [28] Cannons JL, Lau P, Ghuman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, und Watts TH. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol*, 167:1313–1324, 2001.
- [29] Catenacci DVT und Schiller GJ. Myelodysplastic syndromes: A comprehensive review. *Division of Hematology and Oncology*, 2005.
- [30] Chan EM, Comer EM, Brown FC, et al. AML1-FOG2 Fusion Protein in Myelodysplasia. *Blood*, 2005.
- [31] Chandran G, Ahern MJ, Seshadri P, und Coghlan D. Rheumatic manifestation of the myelodysplastic syndromes: a comparative study. *Aust N Z J Med*, 26(5):683–8, 1996.

- [32] Claessens YE, Bouscary D, Dupont JM, Picard Fand Melle J, Gisselbrecht S, Lacombe C, Dreyfus F, Maveux P, und Fontenay-Roupie M. In vitro proliferation and differantiation of eythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood*, 99:1594–1601, 2002.
- [33] Cormier JN, Panelli MC, Hackett JA, Bettinotti MP, Mixon A, Wunderlich A, Parker LL, Restifo NP, Ferrone S, und Marincola FM. Natural variation of the expression of HLA and endogenous antigen modulates CTL recognition in an in vitro melanoma model. *Int J Cancer*, 80:781–790, 1999.
- [34] Cortes J. A biological distinct myeloproliferative disease. *Curr Hematol Rep*, 3:202–208, 2003.
- [35] Cuzick J, Erskine S, Edelman D, und Galton DA. A comparison of the incidence of the myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia following melphalan and cyclophosphamide treatment for myelomatosis. A report to the Medical Research Council's working party on leukaemia in adults. *Br J Cancer*, 55 (5):523–529, 1987.
- [36] Dalamaga M, Petridou E, Cook FE, und Trichopolous D. Risk factors for myelodysplastic syndromes: a case control study in Greece. *Cancer Cause Control*, 13:603–608, 2002.
- [37] De Baetselier P, Katzav S, Gorelik E, Feldman M, und Segal S. Differential expression of H-2 gene products in tumour cells is associated with their metastato-genic properties. *Nature*, 288:179–181, 1980.
- [38] De Benedette MA, Chiu NR, Pollok KE, Hurtado J, Wade WF, Kwon BS, und Watts TH. Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP. *J Exp Med*, 181:985–992, 1995.
- [39] DeBenedette MA, Chu NR, Pollok KE, Hurtado J, Wade WF, Kwon BS, und Watts TH. Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP. *J Exp Med*, 181:985–992, 1999.
- [40] DeBenedette MA, Shahinian A, Mak TW, und Watts TH. Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol*, 158:551, 1997.
- [41] Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, und Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, 392:505–509, 1998.
- [42] Dührsen U. Lymphome. In Petrasch S und Ehninger G, Herausgeber, *Kolloquium Onkologie, Update Hämatologie/Onkologie 2005*, Seiten 34–45. Lukon-Verlagsgesellschaft mbH, München, 2005.
- [43] Evans LS und Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, 362:139–146, 2003.
- [44] Faderi S und Kantarjian HM. Novel therapies for myelodysplastic syndromes. *Cancer* 101, 20:226–241, 2004.
- [45] Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, f M, und Marshall CJ. Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:1629–1633, 1988.

- [46] Fenaux P. Myelodysplastic syndromes: from pathogenesis and prognosis to treatment. *Semin Hematol*, 41:13–20, 2004.
- [47] Fialkow PJ, Singer JW, Raskind WH, Adamson JW, Jacobson RJ, Bernstein ID, Dow LW, Najfeld V, und Veith R. Clonal development , stern cell differentiation and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 317:1468–1473, 1987.
- [48] Fialkow PJ, Singer JW, Vaidya K, Dow LW, Ochs J, und Moohr JW. Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin. *Blood*, 57:1068–1073, 1981.
- [49] Finch SC. Myelodysplasia and radiation. *Rad Res*, 161:603–606, 2004.
- [50] Finke J. Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). In Berger DP, Engelhardt R, und Mertelsmann R, Herausgeber, *Das rote Buch, Hämatologie und internistische Onkologie*, Seite 410. ecomed Verlagsgesellschaft mbH und Co. KG, 2002.
- [51] Friesen C, Herr I, Krammer PH, und Debatin M K. Involvement of the CD95 (Apo-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature*, 2:574–577, 1996.
- [52] Garido F, Festenstein H, und Schirrmacher V. Further evidence for depression of H-2 and Ia-like specificities of foreign haplotypes in mouse tumour cell lines. *Nature*, 261:705–707, 1976.
- [53] Garni-Wagner BA, Lee ZH, Kim YJ, Wilde C, Kang CY, und Kwon BS. 4-1Bbis expressed on CD45RAhiROhi transitional T cell in humans. *Cell Immunol*, 169:91–98, 1996.
- [54] Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, und Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*, 18:89–95, 1997.
- [55] Gastmann BR, Atarashi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H, und Whiteside TL. Fas ligand is expressed in human Squamous Cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res*, 59:5356–5364, 1999.
- [56] Germain RN. The ins and outs of antigens processing and presentation. *Nature*, 322:687–689, 1996.
- [57] Gersuk GM, Beckham C, Loken MR, Kiener P, Anderson JE, Farrand A, Troutt AB, Ledbetter JA, und Deeg HJ. A role for tumor necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, 103:176–188, 1998.
- [58] Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, Maliszewski CR, Brannan CI, Copeland NG, und Jenkins NAea. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol*, 23:2631–2641, 1993.
- [59] Graf N. Maligne Erkrankungen im Kindesalter. In Sitzmann CF, Herausgeber, *Pädiatrie - Duale Reihe*, Seite 540. Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1995.

- [60] Gramaglia I, Cooper D, Miner KT, Kwon BS, und Croft M. Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol*, 30:392–402, 2000.
- [61] Griffith T, Brunner T, Fletcher S, Green D, und Ferguson T. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, 270:1189–1192, 1995.
- [62] Guinn BA, DEBenedette MA, Watts TH, und Berinstein NL. 4-1BBL cooperates with B7-1 and B7-2 in converting a B cell lymphoma cell line into a long-lasting anti-tumor vaccine. *J Immunol*, 162:5003–5010, 1999.
- [63] Gupta P, Niehans GA, LeRov SC, Gupta K, Morrison VA, Schultz C, Knapp DJ, und Kratzke RA. Fas ligand expression in the bone marrow in myelodysplastic syndromes correlates with FAB subtype and anemia, and predicts survival. *Leukemia*, 13:44–53, 1999.
- [64] Haferlach T, Schoch C, Loeffler H, et al. Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J Clin Oncol*, 21:256–265, 2003.
- [65] Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, und Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, 274(5291):1363–6, 1996.
- [66] Heaney ML und Golde DW. Myelodysplasia. *N Engl J Med*, 340:1649–1660, 1999.
- [67] Heinrich PC, Schaper F, Timmermann A, Martens AS, und Lehmann U. Endokrine Funktionen II: Zytokine. In Verlag S, Herausgeber, *Biochemie und Pathobiochemie*, Seite 824. Löffler, G. and Petrides, P. E., Berlin Heidelberg New York, seventh Auflage, 2003.
- [68] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, und Scharper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem*, 374:1–20, 2003.
- [69] Hellstrom-Lindberg E, Willman C, Barret J, et al. Achievements in understanding and treatment of myelodysplastic syndromes. *Hematology*, 44:110–132, 2000.
- [70] Hentschel N, Krusch M, Kiener PA, Kolb HJ, Salih HR, und Schmetzer HM. Serum levels of sCD137 (4-1BB) ligand are prognostic factors for progression in acute myeloid leukemia but not in non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*, 77:91–101, 2006.
- [71] Herman JG und Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 21:2042–2054, 2003.
- [72] Hildebrandt W. *Pschyrembel*. Walter de Gruyter, Berlin New York, 1998.
- [73] Hirano T, Hiratsuka N, Iwahori T, Oka K, und Wakasugi K. Fas/Fas-ligand expressions in peripheral-blood mononuclear cells of patients with myelodysplastic syndromes. *Commun Mol Pathol Pharmacol*, 113–114:315–28, 2003.

- [74] Hock BD, McKenzie JL, Patton NW, Drayson M, Taylor K, Wakeman C, Kantarjian H, Giles F, und Albitar M. Circulating Levels and Clinical Significance of Soluble CD40 in Patients with Hematologic Malignancies. *Cancer*, 106:2148–2157, 2006.
- [75] Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, und Münster B. *Biochemie des Menschen*, Seiten 554–555. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 2. Auflage, 2002.
- [76] Houtenbos I, Westers TM, Stam AG, et al. Serum-free generation of antigen presenting cells from acute myeloid leukaemic blasts for active specific immunisation. *Cancer Immunol Immunother*, 52:455–62, 2004.
- [77] Hui K, Grosveld F, und Festenstein H. Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature*, 311:1407–1412, 1984.
- [78] Hurtado JC, Kim SH, Pollok KE, Lee ZH, und Kwon BS. Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J Immunol*, 155:3360–3367, 1995.
- [79] Imai C, Iwamoto S, und Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*, 106:367–383, 2005.
- [80] Ioachim HL, Decuseara R, Giancotti F, und Dorsett BH. FAS and FAS-L expression by tumor cells and lymphocytes in breast carcinomas and their lymph node metastases. *Pathol Res Pract*, 200(11–12):743–51, 2005.
- [81] Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hoffman K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmanns C, Rimoldi D, French LE, und Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388:190–195, 1997.
- [82] Jackson N, Menon BS, Zarina W, Zawani N, und Naing NN. Why is acute leukemia more common in males? A possible sex-determined risk linked to the AB0 blood group genes. *Ann Hematol*, 78:233–236, 1999.
- [83] Jewell JW und Bennink JR. The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell*, 62:203–206, 1990.
- [84] Jiang W, Xiong D, Liu F, Guo H, Su Y, Lü J, und Yang C. Study on the construction and expression of the human 4-1BBL extracellular domain/anti-CD20 Fab' fusion protein. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 24:371–80, 2008.
- [85] Jodo S, Kobayashi N, et al. Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol*, 107:89–95, 1997.
- [86] Jodo S, Pidivari VJ, Xiao S, Furusaki A, Sharma R, Koike T, und Ju ST. Fas ligand (CD178) cytoplasmic tail is a positive regulator of Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Immunol*, 174(8):4470–4, 2005.
- [87] Jodo S, Xiao S, Hohlbaum A, Strehlow D, Marshak-Rothstein A, und Ju T S. Apoptosis-inducing membrane vesicles: a novel agent with unique properties. *J Biol Chem*, 276:39938, 2001.

- [88] Jonasova A, Neuwirtova R, Cermak J, Vozobulova V, Mocikova K, Siskova M, und Hochova I. Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. *Br J Haematol*, 100:304–309, 1998.
- [89] Jung HW, Choi JI, und Kwon BS. Serum concentrations of soluble 4-1BB and 4-1BB ligand correlate with the disease severity in rheumatoid arthritis. *Exp Mol Med*, 36:13–22, 2004.
- [90] Karp JE und Smith MA. The molecular pathogenesis of treatment-induced (secondary) leukemias: foundations for treatment and prevention. *Semin Oncol*, 24:103–113, 1997.
- [91] Kaufmann DC, Baer MR, Gao XZ, Wang Z, und Preisler HD. Enhanced expression of the granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor gene in acute myelocytic leukemia cells following in vitro blast cell enrichment. *Blood*, 72:1329–1332, 1988.
- [92] Kern W, Behre G, v Schilling C, Haferlach T, Adorf D, Jehn U, Waterhouse C, Brack N, Schmittger S, Petrides PE, und Hiddemann W. Akute myeloische Leukämie (AML) beim Ewachsenen. In Hiddemann W und Haferlach T, Herausgeber, *Manual, Leukämien, myelodysplastische und lyeloproliferative Syndrome*, Seiten 17–36. W. Zuckschwerdt Verlag, Tumorzentrum München, 2003.
- [93] Kiyoi H, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Ninnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, und Ueda S. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 93:3074–3080, 1999.
- [94] Kremser A, Loibl J, Grabrucker C, Liepert A, Kroell T, Scholl N, Schmid C, Tischer J, Schwieger C, Kufner S, de Valle F, Salih H, Doehner C, Schwartz S, Kolb HJ, und Schmetzer HM. Dendritic cells can be successfully generated from leukaemic blasts in individual patients with AML or MDS: an evaluation of different methods. *eingereicht zur Publikation*, 2008.
- [95] Kufner S, Pelka Fleischer R, Kroell T, Schmid C, Zitzelsberger H, Salih H, de Valle F, und Treder W. Serum free generation and quantification of functionally active Leukemia-derived DC is possible from malignant blasts in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cancer Immunol Immunother*, 54:953–970, 2005.
- [96] Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, Miller JF, und Heath WR. Class I-restricted cross presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med*, 186:239–245, 1997.
- [97] Kwong YL. Leukemic risk in polycythaemia vera and essential thrombocytopenia. *Eur J Haematol*, 56:90–92, 1996.
- [98] Laderach D, Wesa A, und Galy A. 4-1BB-ligand is regulated on human dendritic cells and induces the production of IL-12. *Cellular Immunology*, 226:37–44, 2003.
- [99] Langstein J, Michel J, und Schwarz H. CD137 induces proliferation and endomitosis in monocytes. *Blood*, 94:3161–3168, 1999.

- [100] Langstein J und Schwarz H. Identification of CD137 as a potent monocyte survival factor. *J Leukocyte Biol*, 65:8929–8933, 1999.
- [101] Lee AW, Truong T, Bickham K, Fonteneau F J, Larsson M, Da Silva I, Somersan S, Thomas EK, und Bhardwaj N. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine*, 20:A8–A22, 2002.
- [102] Lee PK, Chang CJ, und Lin CM. Lipopolysaccharide preferentially induces 4-1BB ligand expression on human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology Letter*, 90(2-3):215–221, 2003.
- [103] Leone G, Voso MT, Teofili L, und Lubbert M. Inhibitors of DNA methylation in the treatment of hematological malignancies and MDS. *Clin Immunol*, 109:89–102, 2003.
- [104] Löffler G und Montenarh M. Replikation und Gentechnik. In Verlag S, Herausgeber, *Biochemie und Pathobiochemie*, Seite 214. Löffler, G. and Petrides, P. E., Berlin Heidelberg New York, seventh Auflage, 2003.
- [105] Lickliter JD, Kratzke RA, Nguyen PL, Niehans GA, und Miller JS. Fas ligand in highly expressed in acute leukemia and during the transformation of chronic myeloid leukemia to blast crisis. *Experimental Hematology*, 27:1519–1527, 1999.
- [106] Liesveld JL, Jordan CT, und Phillips GLn. The hematopoietic stem cell in myelodysplasia. *Stem Cells* 22, 4:590–599, 2004.
- [107] Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvath G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, und Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, 379:349–353, 1996.
- [108] Ljundggren HG und Karre K. Host resistance directed selectively against H2-deficient lymphoma variants. *J Exp Med*, 162:1745–1759, 1985.
- [109] Loftus DJ, Squarcina P, Nielsen MB, Geisler C, Castelli C, Odum N, Appella E, Parmiani G, und Rivoltini L. Peptides derived from self-proteins as partial agonists and antagonists of human CD8+ T-cell clones reactive to melanoma/melanocyte epitope MART1(27-35). *Cancer Res*, 58:2433–2439, 1998.
- [110] Loibl J, Kremser A, Schmid C, Kroell T, Scholl N, Tischer J, Kuffer S, Schweiger C, de Valle F, Salih H, Doehner C, Schwartz S, Kolb HJ, und Schmetzger HM. Surface marker expression profiles of dendritic cells (DC) from blasts in acute myeloid leukaemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS): valuable tools to characterize and quantify DC in experimental settings. *eingereicht zur Publikation*, 2008.
- [111] Loo DT, Chalupny NJ, Bajorath J, Shuford WW, Mittler RS, und Aruffo A. Analysis of 4-1BBL and laminin binding to murine 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, and comparison with human 4-1BB. *J Biol Chem*, 272:6448–6456, 1997.
- [112] Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, Robbins G P Parmiani, Storkus WJ, und Lotze MT. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the

- immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J Clin Invest*, 98:1633–1641, 1996.
- [113] Marincola FM, Jaffe EM, Hicklin DJ, und Ferrone S. Escape of human solid tumors from T cell recognition: molecule mechanism and functional significance. *Adv Immunol*, 74:181–273, 2000.
- [114] Martinez-Ramirez A, Urioste M, Melchor L, et al. Analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes by high-resolution comparative genomic hybridisation and subtelomeric CGH array. *Genes Chromosomes Cancer*, 3:287–298, 2005.
- [115] Mazumdar M und Glassman JR. Categorizing a prognostic variable: review of method, code for easy implementation and application to decision-making about cancer treatments. *Stat Med*, 19:113–132, 2000.
- [116] McLaughlin P, Estey E, Glassman A, et al. Myelodysplastic and acute myeloid leukemia following therapy for indolent lymphoma with Fludarabine, Mitoxantrone, Dexamethasone (FND) plus Rituximab and Interferon Alfa. *Blood*, 105(12):4573–5, 2005.
- [117] Melero I, Bach N, Hellstrom KE, Aruffo A, Mittler RS, und Chen L. Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur J Immunol*, 28:1116–1121, 1998.
- [118] Melero I, Shufford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellstrom KE, Mittler RS, und Chen L. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med*, 3:682–685, 1997.
- [119] Michel JS, Pauly P P Langstein, Kramer PH, und Schwarz H. CD137-induced apoptosis is independent of CD95. *Immunology*, 98:42–46, 1999.
- [120] Microsoft Encarta Online-Enzyklopädie. Histokompatibilität. [http://de.encarta.msn.com/text\\_721528397\\_0/Histokompatibilit%C3%A4t.html](http://de.encarta.msn.com/text_721528397_0/Histokompatibilit%C3%A4t.html), 2009. Letzter Zugriff: 08.05.2009.
- [121] Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Leone S, und Tsokos M. Fas ligand is present in tumors of the Ewing's sarcoma family and is cleaved into a soluble form by a metalloproteinase. *Am J Pathol*, 153:1947, 1998.
- [122] Molldrem JJ, Caples M, Mavroudis D, Plante M, Young NS, und Barret AJ. Antithymocyte globulin for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, 99:699–705, 1997.
- [123] Mugnaini EN, Spurkland A, Egeland T, Sannes M, und Brinchmann JE. Demonstration of identical expanded clones within both CD8+CD28+ and CD8+CD28- T cell subsets in HIV type 1-infected individuals. *Eur J Immunol*, 28:1738–1742, 1998.
- [124] Mullauer L, Mosberger I, und Chott A. Fas ligand expression on nodal Non-Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol*, 11:369–375, 1998.
- [125] Mundle S, Ali A, et al. Fas/CD178 system could be one of the mediators of excessive apoptosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 90:202, 1997.
- [126] Mundle S, Allampallam K, Rashid K, et al. Presence of activation-related mRNA for EBV and CMV in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer Lett*, 164:197–205, 2001.

- [127] Muntau A. Onkologie, Akute myeloische Leukämie (AML). In Muntau A, Herausgeber, *Intensivkurs Pädiatrie*, Seiten 205–206. Urban und Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München, 3. Auflage, 2004.
- [128] Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88:355–365, 1997.
- [129] Nakamura F, Kishimoto Y, Handa T, Arai Y, und Mitani K. Myelodysplastic syndrome with central diabetes insipidus manifesting hypodipsic hypernatremia and dehydration. *Am J Hematol*, 75 (4):213–6, 2004.
- [130] Needleman SW, Kraus MH, Srivastava SK, Levine PH, und Aaronson SA. High frequency of N-ras activation in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 67:753–757, 1986.
- [131] network NCC. NCCN practice guidelines for the myelodysplastic syndromes. *Oncology (Huntingt)*, 12 (11A):53–80, 1998.
- [132] Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salemo CT, Knapp DJ, Green DR, und Kratzke RA. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res*, 57:1007, 1997.
- [133] Nisse JM, Haguenor JM, Grandbastien B, et al. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. *Br J Haematol*, 112:927–935, 2001.
- [134] O’Connell J, O’Sullivan GC, Collins JK, und Shanahan F. The Fas counter-attack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med*, 184:1075, 1996.
- [135] Ohyashiki K, Iwama H, Yahata N, et al. Telomere dynamic in myelodysplastic syndromes and acute leukemic transformation. *Leuk Lymphoma* 42, 3:291–299, 2001.
- [136] Old LJ und Chen YT. New paths in human cancer serology. *J Exp Med*, 187:1163–1167, 1998.
- [137] Olney HJ und LeBeau MM. The cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Best Practice Res Clin Haematol*, 3:479–495, 2001.
- [138] Palma C, Binaschi M, Bigioni M, Maggi CA, und Goso C. CD137 and CD137 ligand constitutively coexpressed on human T and B leukemia cells signal proliferation and survival. *Int J Cancer*, 108 (3):390–8, 2004.
- [139] Pan Y P, Gu P, Qingsheng L, Xu D, Weber K, und Chen H S. Regulation of Dendritic Cell Function by NK Cells: Mechanisms Underlying the Synergism in the Combination Therapy of IL-12 and 4-1BB Activation. *The Journal of Immunology*, 172:4779–4789, 2004.
- [140] Paulie S, Ehlin-Henriksson B, Mellstedt H, Koho H, Ben-Aissa H, und Perlmann P. A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinoma and B lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*, 20:23–28, 1985.
- [141] Pedersen-Bjergaard J und Larsen SO. Incidence of acute non lymphocytic leukemia, preleukemia and acute myeloproliferative syndrome up to 10 years after treatment of Hodgkin’s disease. *New Engl J Med*, 307:965–971, 1984.
- [142] Petrides PE und Ansorge S. Immunsystem. In Löffler G und Petrides PE, Herausgeber, *Biochemie und Pathobiochemie*, Seiten 1121–1151. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, seventh Auflage, 2003.

- [143] Petrides PE und Ansorge S. Immunsystem; cytotoxische t-zellen in der adaptiven immunantwort. In Löffler G und Petrides PE, Herausgeber, *Biochemie und Pathobiochemie*, Seiten 1133–1134. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, seventh Auflage, 2003.
- [144] Pollok KE, Kim SH, und Kwon BS. Regulation of 4-1BB expression by cell-cell interactions and the cytokines, interleukin-2 and interleukin-4. *Eur J Immunol*, 25:488–494, 1995.
- [145] Pollok KE, Kim YJ, Hurtado J, Zhou KK Z Kim, und Kwon BS. 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-m-primed splenic B cells. *Eur J Immunol*, 24:367–374, 1994.
- [146] Pordzik S, Kroell T, Schmid C, Schweiger C, dell Valle F, und Schmetzter H. Expression and Prognostic value of FAS receptor/FAS ligand and TrailR1/TrailR2 in Acute Myeloid Leukemia (AML). 2008 eingereicht zur Publikation.
- [147] Pui CH, Behm FG, Raimond SC, et al. Secondary acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllo-toxins for acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med*, 321:136–142, 1989.
- [148] Rabinowitch H, Reichert TE, Kashii Y, und Bell MC. Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand expressing ovarian carcinoma cells: implications for altered expression of TcR in tumor-associated lymphocytes. *J Clin Invest*, 101:2579–2588, 1998.
- [149] Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, und Bennink JR. Identification of human cancer deficient in antigen processing. *J Exp Med*, 177:265–272, 1996.
- [150] Restifo NP und Wunderlich JR. Principles of tumor immunity: biology of cellular immune responses. In De Vita VT, Hellman S, und Rosenberg SA, Herausgeber, *Biologic therapy of cancer*, Seiten 3–21. Lippincott, J. B., Philadelphia, 1. Auflage, 1996.
- [151] Riede UN, Walch A, und Wiestler OD. Störungen des Zellwachstums. In Riede UN, Werner M, und Schäfer HE, Herausgeber, *Allgemeine und spezielle Pathologie*, Seiten 358–361. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, 2004.
- [152] Rosenfeld C und List A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. *Leukemia*, 14:2–8, 2000.
- [153] Rosner F und Lee SL. Down's syndrome and acute leukaemia: myeloblastic or lymphoblastic? *Am J Med*, 53:203–218, 1972.
- [154] Rund D und Ben-Yehuda D. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: evolving concepts of pathogenesis and treatment. *Hematology*, 9 (3):179–187, 2004.
- [155] Saif MW, Hopkins JL, und Gore SD. Autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*, 43 (11):2083–92, 2002.
- [156] Salih HR, Starling GC, Brandl SF, Pelka-Fleischer R, Haferlach T, Hiddemann W, Kiener PA, und Nüssler V. Differentiation of promyelocytic leukemia: alterations in Fas (CD95/Apo-1) and Fas ligand (CD178) expression. 2002, 117:76–85, Br J Haematol.

- [157] Salih HR, Kiener PA, und Nüssler V. 4-1BB ligand - just another costimulating molecule? *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 40 (8):348–353, 2002.
- [158] Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, Starling GC, Loo DT, Lee F, Aruffo AA, Trail PA, und Kiener PA. Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol*, 165:2903–2910, 2000.
- [159] Salih HR und Nüssler V. Commentary: Immune Escape versus tumor tolerance: how do tumors evade immune surveillance? *Eur J Med Res*, 6:323–332, 2001.
- [160] Salih HR, Nüssler V, Denzlinger C, Starling GC, Kiener PA, und Schmetzer HM. Serum levels of CD137 ligand and CD178 are prognostic factors for progression of myelodysplastic syndrome. *Leukemia and Lymphoma*, 45:301–308, 2004.
- [161] Salih HR, Schmetzer HM, Burke C, Starling GC, Dunn R, Pelka-Fleischer R, Nüssler V, und Kiener PA. Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies. *J Immunol*, 167:4059–4066, 2001.
- [162] Salih HR, Starling GC, Knauff M, Davis PM, Pitts WJ, Aruffo A, und Kiener PA. Retinoic acid and vitamin E modulate expression and release of CD178 in carcinoma cells: consequences for induction of apoptosis in CD95 sensitive cells. *Exp Cell Res*, 270:248–258, 2001.
- [163] Salih HR, Starling GC, Knauff M, Davis PM, Pitts WJ, Aruffo A, und Kiener PA. Retinoic acid and vitamin e modulate expression and release of cd178 on carcinoma cells: consequences for induction of apoptosis in cd95-sensitive cells. *Exp Cell Res*, 2001.
- [164] Saoulli K, Lee SY, Cannons JL, Yeh WC, Santana A, Goldstein MD, Bangia N, DeBenedette MA, Mak TW, Choi Y, und Watts TH. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med*, 187:1849, 1998.
- [165] Sato M, Takayama T, Tanaka H, Konishi J, Suzuki T, Kaiga T, und Tahara H. Generation of mature dendritic cells fully capable of T helper type 1 polarization using OK-432 combined with prostaglandin E2. *Cancer Sci*, 94:1091–1098, 2003.
- [166] Satoh T, Nakafuku M, Miyajima A, und Kaziro Y. Involvement of ras p21 protein in signal transduction pathways from interleukin 2, interleukin 3 and granulocyte/macrophage colony stimulating factor, but not from interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:3314–3318, 1991.
- [167] Schäfer HE, Müller-Hermelink, Rüdiger T, Marx A, Herbst EW, und Riede UN. Hämatopoetisches und lymphatisches System, Akute myeloische Leukämien, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Seiten 526–532. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, 2004.
- [168] Schäfer HE, Müller-Hermelink, Rüdiger T, Marx A, Herbst EW, und Riede UN. Hämatopoetisches und lymphatisches System, Non-Hodgkin-Lymphome, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Seiten 558–569. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, 2004.

- [169] Schmetzer HM und Gerhartz HH. Acute myeloid leukemia (AML) can be oligoclonal. *Leukemia*, 7:1965–1970, 1993.
- [170] Schmetzer HM, Kremser A, Loibl J, Kroell T, und Kolb HJ. Quantification of ex vivo generated dendritic cells (DC) and leukemia-derived DC contributes to estimate the quality of DC, to detect optimal DC-generating methods or to optimize DC-mediated T-cell-activation-procedures ex vivo or in vivo. *Leukemia*, 21(6):1338–41, 2007.
- [171] Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, und Tschopp J. Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med*, 187:1205–1213, 1998.
- [172] Schuler G, Schuler-Turner B, und Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 15:138–147, 2003.
- [173] Schwarz H, Arden K, und Lotz M. CD137, a member of the tumor necrosis factor receptor family, is located in chromosome 1p36, in a cluster of selected genes, and colocalizes with several malignancies. *Biochem Biophys Res Commun*, 235:699–703, 1997.
- [174] Schwarz H, Blanco FJ, von Kempis J, Valbracht J, und Lotz M. ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation und survival. *Blood*, 87:2839–2845, 1996.
- [175] Scott-Algara D, Buseyne F, Blanche S, Rouzioux C, Jouanne C, Romagne F, und Riviere Y. Frequency and phenotyping of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD8+ T cells in HIV-infected children, using major histocompatibility complex class I peptide tetramers. *J Infect*, 183:1565–1573, 2001.
- [176] Sekeres MA. AML in older adults: are we listening? In *Hematology 2004*. Hematology and Medical Oncology, The Cleveland Clinic Foundation, 2004.
- [177] Shiraki K, Tsuji N, Shioda T, Isselbacher KJ, und Takahashi H. Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:6420–6425, 1997.
- [178] Shufford WW, Klussman K, Trichtler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown TJ, Emswiler J, Raecho H, Larsen CP, Pearson TC, Ledbetter JA, Aruffo A, und Mittler RS. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med*, 186:47–55, 1997.
- [179] Sica G und Chen L. Biochemical and Immunological Characteristics of 4-1BB (CD137) Receptor and Ligand and Potential Applications in Cancer Therapy. *Department of Immunology, Mayo Clinic, First Street SW, Rochester, Minnesota 55905, USA, Archivum Immunologicum et Therapiae Experimentalis*, 47:275–279, 1999.
- [180] Smith CA, Farrah T, und Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell*, 76:959, 1994.

- [181] Southam CM, Craver LF, Dargeon HW, et al. A study of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer*, 4:39–59, 1951.
- [182] Stone RM, MR O 'Donnell, und Sekeres MA. Acute Meloid Leukemia. *Hematology*, Seiten 98–114, 2004.
- [183] Suda T, Takahashi T, Golstein P, und Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas Ligand: a novel member of the TNF family. *Cell*, 75:1169–1178, 1993.
- [184] Takahashi C, Mittler RS, und Vella AT. Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol*, 162:5037, 1999.
- [185] Tanaka M, Itai T, Adachi M, und Nagata S. Down-regulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med*, 4:31, 1998.
- [186] Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F, Motoyoshi K, Mizuki M, TagawaS, Ohga S, et al. Fas ligand in human serum. *Nat Med*, 2:317–322, 1996.
- [187] Tichelli A, Gratwohl A, Wuersch A, Nissen C, und Speck B. Antilymphocyte globulin for myelodysplastic syndrome. *BR J Haematol*, 68:139–140, 1998.
- [188] Trimble LA, Shankar P, Patterson M, Daily JP, und Lieberman J. Human immunodeficiency virus-specific circulating CD8 T lymphocytes have down-modulated CD3zeta and CD28, key signaling molecules for T-cell activation. *J Virol*, 74:7320–7330, 2000.
- [189] v Schilling C, Günther C, Haferlach T, Ruelfs C, und Lipp T. Myelodysplastische Syndrome (MDS). In Hiddemann W und Haferlach T, Herausgeber, *Manual, Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome*, Seiten 97–111. W. Zuckschwerdt Verlag, Tumorzentrum München, 2003.
- [190] Van Essen D, Kikutani H, und Gray D. CD40 ligand-transduced costimulation of T cells in the development of helper function. *Nature*, 378:620–623, 1995.
- [191] Villunger A, Egle A, Marschitz I, Kos M, Bock G, Ludwig H, Geley S, Kofler R, und Greil R. Constitutive expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand on multiple myeloma cells: a potential mechanism of tumor-induced suppression of immune surveillance. *Blood*, 90:12, 1997.
- [192] Voglova J, Chrobak L, Neuwirova R, Malaskova V, und Straka L. Myelodysplastic and myeloproliferative type of chronic myelomonocytic leukemia distinct subgroups or two stages of the same disease. *Leuk Res*, 25:493–499, 2001.
- [193] Voulgarelis M, Giannouli S, Ritis K, und Tzioufas AG. Myelodysplastic-associated autoimmunity: clinical and pathophysiologic concepts. *Eur J Clin Invest*, 34 (10):690–700, 2004.
- [194] Walker PR, Saas P, und Dietrich Y P. Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol*, 158:4521, 1997.
- [195] Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, und Nagata S. Lymphoproliferative disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 356:314, 1992.

- [196] Weekes MP, Carmichael AJ, Wills MR, Mynard K, und Sissons JG. Human CD28-CD8+ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones. *J Immunol*, 162:7569–7577, 1999.
- [197] Westers TM, Stam AGM, Scheper RJ, et al. Rapid generation of antigen-presenting cells from leukemic blasts in acute myeloid leukaemia. *Cancer Immunol Immunother*, 52:17–27, 2003.
- [198] Willey RW, Goodwin RG, und Smith CA. Reverse signaling via CD30 ligand. *J Immunol*, 157:3635–3639, 1996.
- [199] Williamson PJ, Kruger AR, Reynolds PJ, Hamblin TJ, und Oscier DG. Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, 87 (4):743–745, 1994.
- [200] Wilms K. Akute Leukämien. Erkrankungen der Leukopoese. In Siegenthaler W, Herausgeber, *Lehrbuch der Inneren Medizin*, Seite 699. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart- New York, 3. Auflage, 1992.
- [201] Ye Z, Hellström I, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Ledbetter JA, und Hellström KE. Gene therapy for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB. *Nature Medicine*, 8:343–348, 2002.
- [202] Young DC und Griffin JD. Autocrin secretion of GM-CSF in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 68:1178–1181, 1986.
- [203] Zavazava N. Soluble HLA class I molecules: biological significance and clinical implications. *Mol Med Today*, 4:116–121, 1998.
- [204] Zavazava N und Kronke M. Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nature Med*, 2:1005–1010, 1996.
- [205] Zhou Z, Kim S, Hurtado J, Lee ZH, Kim KK, Pollok KE, und Kwon BS. Characterization of human homologue of 4-1BB and its ligand. *Immunol Lett*, 45:67–73, 1995.