
Effekte der zytotoxischen
Erhaltungstherapie auf Zellzahl und
Funktion von T-Zellen, regulatorischen
T-Zellen und NK-Zellen erwachsener
AML-Patienten

Robin Lorenz



München 2020

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt-Baildon

Effekte der zytotoxischen
Erhaltungstherapie auf Zellzahl und
Funktion von T-Zellen, regulatorischen
T-Zellen und NK-Zellen erwachsener
AML-Patienten

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

vorgelegt von
Robin Lorenz
aus Wittenberg
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Marion Subklewe
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Hanna-Mari Baldauf Prof. Dr. Marcus Hentrich
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Felix Lichtenegger
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	26.11.2020

Eidesstattliche Versicherung

Lorenz, Robin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Effekte der zytotoxischen Erhaltungstherapie auf Zellzahl und Funktion von T-Zellen, regulatorischen T-Zellen und NK-Zellen erwachsener AML-Patienten

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

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

München, 26.11.2020

Ort, Datum

Robin Lorenz

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Definition der Akuten Myeloischen Leukämie	1
1.2	Epidemiologie.....	2
1.3	Pathophysiologie.....	2
1.3.1	Two-hit-Hypothese.....	3
1.3.2	Immunoediting-Hypothese	3
1.4	Klinik und Diagnostik.....	4
1.5	Klassifikation.....	4
1.6	Therapie und Prognose	4
1.6.1	Induktionstherapie	5
1.6.1.1	Standardinduktionstherapie.....	5
1.6.1.2	Induktionstherapieschema der AML-CG 2008-Studie.....	5
1.6.2	Postremissionstherapie.....	7
1.6.2.1	Konsolidierungstherapie	7
1.6.2.2	Erhaltungstherapie	8
1.6.3	Subgruppenspezifische Therapieoptionen	9
1.6.4	Immuntherapie.....	10
1.6.4.1	Hämatopoetische Stammzelltransplantation	10
1.6.4.2	Antibody-Drug Conjugates und bispezifische Antikörper	11
1.6.4.3	Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cells.....	11
1.6.4.4	Checkpoint-Inhibitoren.....	12
1.6.4.5	Vakzinierung.....	12
1.7	Pathophysiologie von Krankheitsrezidiven	13
1.8	Tumorimmunologie	14
1.8.1	Natürliche Killer-Zellen	14
1.8.2	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	14
1.8.3	Regulatorische T-Zellen.....	14
1.8.4	Interleukin-17.....	15

1.9	Studienrationale	15
2	Studienaufbau, Material und Methoden	17
2.1	Studienaufbau.....	17
2.1.1	Probanden	17
2.1.2	Therapieprotokoll	18
2.1.3	Blutproben.....	21
2.2	Material	22
2.2.1	Geräte.....	22
2.2.2	Einwegmaterial	24
2.2.3	Lösungen, Reagenzien und Chemikalien.....	26
2.2.4	Standardlösungen	28
2.2.5	Kits	28
2.2.6	Antikörper	28
2.2.7	Software.....	30
2.3	Methoden.....	31
2.3.1	Dichtegradientenzentrifugation.....	31
2.3.2	Kryokonservierung.....	32
2.3.3	Differentialblutbild	32
2.3.4	Durchflusszytometrie	33
2.3.5	Immunphänotypisierung	33
2.3.6	T-Cell-Proliferation Assay.....	34
2.3.7	Cytometric Bead Array.....	35
2.3.8	NK-Cell-Activation Assay	36
2.3.9	DNS-Isolierung und Methylation Assay	36
2.3.10	Statistische Analyse	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Die Zahlen verschiedener Lymphozytensubpopulationen unterscheiden sich zum Teil zwischen AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus und gesunden Spendern	38
3.1.1	Die Zahl der T-Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern.....	39

3.1.1.1	Die Zahl der CD4 ⁺ T _H -Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern.....	39
3.1.1.2	Die Zahl der T _{reg} -Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern.....	40
3.1.1.3	Die Zahl der CD8 ⁺ zytotoxischen T-Zellen unterscheidet sich nicht zwischen AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus und gesunden Spendern	42
3.1.1.4	Die CD4/CD8-Ratio ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern.....	43
3.1.2	Die Zahl der CD3 ⁻ /CD56 ⁺ /CD16 ⁺ NK-Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern.....	44
3.2	Die Leukozytenzahlen von AML-Patienten fallen während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab	46
3.3	Die Lymphozytenzahlen von AML-Patienten fallen während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab	47
3.4	Die Zahlen der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen verhalten sich während eines Erhaltungstherapiezyklus unterschiedlich	49
3.4.1	Der Anteil der T-Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend zu	49
3.4.1.1	Der Anteil der CD4 ⁺ T _H -Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend zu	50
3.4.1.2	Der Anteil der T _{reg} -Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend zu.....	51
3.4.1.3	Der Anteil der CD8 ⁺ zytotoxischen T-Zellen an den Lymphozyten bleibt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus konstant	53
3.4.1.4	Die CD4/CD8-Ratio steigt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend an	54
3.4.2	Sowohl der Anteil der CD3 ⁻ /CD56 ⁺ /CD16 ⁺ NK-Zellen als auch der Anteil der CD3 ⁻ /CD56 ⁺ /CD16 ⁻ NK-Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab	55
3.5	Die Methylierungsanalyse liefert qualitativ ähnliche, quantitativ jedoch unterschiedliche Ergebnisse verglichen mit der FACS-Analyse bezüglich des Anteils der T _{reg} -Zellen an den Lymphozyten während eines Erhaltungstherapiezyklus.....	58
3.6	Die Aktivierbarkeit von NK Zellen durch IL-2 ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus reduziert	59
3.6.1	Nach Stimulation mit IL-2 präsentieren NK-Zellen von AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus weniger CD69 als NK-Zellen gesunder Spender	60

3.6.2	Nach Stimulation mit IL-2 synthetisieren NK-Zellen von AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus weniger IFN γ als NK-Zellen gesunder Spender.....	61
3.7	Die Proliferationsfähigkeit von T-Zellen fällt nach Stimulation mit PHA oder SEB während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab	63
3.7.1	Die Proliferationsfähigkeit von CD4 ⁺ T _H -Zellen fällt nach Stimulation mit PHA oder SEB während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab.....	65
3.7.2	Die Proliferationsfähigkeit von CD8 ⁺ zytotoxischen T-Zellen fällt nach Stimulation mit PHA oder SEB während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab	66
3.8	Nach Stimulation mit PHA sezernieren die PBMCs von AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus weniger IL-17 im Vergleich zu den PBMCs gesunder Spender	68
4	Diskussion.....	69
4.1	Kombination konventioneller Chemotherapie mit immuntherapeutischen Konzepten.....	69
4.2	Immunstatus vor einem Erhaltungstherapiezyklus	70
4.2.1	Zellzahlen.....	70
4.2.2	Zellfunktion.....	71
4.3	Immunstatus während eines Erhaltungstherapiezyklus.....	72
4.3.1	Zelluläre Veränderungen	72
4.3.2	Humorale Veränderungen	73
4.4	Konklusion und Ausblick.....	73
5	Zusammenfassung.....	75
	Abkürzungsverzeichnis	77
	Literaturverzeichnis.....	81
	Danksagung	90
	Veröffentlichungen.....	91

1 Einleitung

1.1 Definition der Akuten Myeloischen Leukämie

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne, klonale Erkrankung unreifer hämatopoetischer Zellen [1, 2]. Neben der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL), der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) und der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) ist sie eine der vier Haupttypen der Leukämie [3, 4]. Bei den myeloischen Leukämien weisen die entarteten Zellen phänotypische Charakteristika der myeloischen Zellreihe auf, bei den lymphatischen Leukämien hingegen phänotypische Charakteristika der lymphatischen Zellreihe. In 2–5 % der Fälle akuter Leukämien tragen die malignen Zellen phänotypische Merkmale beider Zellreihen. Hier finden sich entweder Zellen, welche Merkmale beider Zellreihen zugleich tragen (biphänotypische Leukämie), oder aber es existieren Zellen, welche Merkmale der einen Zellreihe tragen, neben Zellen, welche Merkmale der anderen Zellreihe tragen (bilineale Leukämie) [3]. Ist in diesen Fällen eine sichere Zuordnung der akuten Leukämie zur myeloischen oder lymphatischen Zellreihe nicht möglich, spricht man von einer gemischtphänotypischen akuten Leukämie. Ursache hierfür kann die Entartung einer gemeinsamen Vorstufe der myeloischen und lymphatischen Zellreihe sein [3, 4]. Als „akut“ ist die Erkrankung in Abgrenzung zu den chronischen Leukämietypen zu bezeichnen, da sie in der Regel rasch progredient verläuft. Unbehandelt führt die AML als eine „maligne“ Erkrankung zum Tod [5]. Das Attribut „klonal“ trägt der Tatsache Rechnung, dass sich alle leukämischen Zellen eines Patienten letztlich auf eine einzige Ausgangszelle zurückführen lassen und somit „Klone“ dieser Ausgangszelle sind [1]. Im Krankheitsverlauf kommt es in einzelnen Zellen des ursprünglichen Klons zu genetischen Alterationen; aus diesen Zellen entwickeln sich Tochterklone. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung existieren in der Regel bereits mehrere Leukämieklone nebeneinander. Unter Therapie kann es zu einer weiteren Diversifikation der Erkrankung mit der Entwicklung neuer Tochterklone kommen [6].

1.2 Epidemiologie

Mit einer jährlichen Inzidenz von 3,66/100000 Einwohner ist die AML die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter; die ALL ist mit einer Inzidenz von 1,39/100000 Einwohner deutlich seltener. Das mediane Erkrankungsalter der AML liegt bei 68 Jahren. Männer sind etwa 1,5 Mal so häufig betroffen wie Frauen. Die 5-Jahres-Überlebensrate der AML wird in den Jahren 2009 bis 2015 mit 29,4 % angegeben. Die in diesem Absatz zitierten Zahlenwerte wurde anhand von Untersuchungen der Bevölkerung der Vereinigten Staaten von Amerika erhoben [4].

1.3 Pathophysiologie

Ursächlich für die Entstehung einer AML sind genetische Alterationen, welche zu einer Aktivierung von Onkogenen bzw. zu einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen führen [2]. Potentielle Ätiologien genetischer Alterationen dieser Art sind Fehler bei der DNS-Replikation während der Zellteilung, Entzündungsprozesse, virale Infektionen oder die Einwirkung von Noxen wie z.B. ionisierender Strahlung. Es existieren verschiedene Mechanismen, die verhindern, dass Veränderungen oder Schädigungen der DNS einer Zelle zur Entstehung von malignen Krankheiten führen. Hierbei werden „intrinsische“ und „extrinsische“ Tumorsuppressionsmechanismen unterschieden [7]. Als Beispiel für „intrinsische“ Tumorsuppressionsmechanismen seien das Tumorsuppressorgen TP53 und das durch dieses Gen kodierte Protein p53 erwähnt. Das Protein p53 induziert im Falle von DNS-Schädigungen Reparaturvorgänge und führt zu einem potentiell reversiblen Zellzyklusarrest. Gelingt die Wiederherstellung der Integrität der geschädigten DNS nicht, induziert p53 die Apoptose oder die Seneszenz der betroffenen Zelle [8]. Als „extrinsisch“ werden diejenigen Tumorsuppressionsmechanismen bezeichnet, welche aktiviert werden, falls die betroffene Zelle die Hürde der intrinsischen Tumorabwehr überwindet. Hierunter werden diverse Möglichkeiten des Immunsystems subsumiert, maligne Zellen zu bekämpfen [7].

1.3.1 Two-hit-Hypothese

Gemäß der „*Two-hit*“-Hypothese sind für die Entstehung einer AML mindestens zwei Genmutationen erforderlich. Eine „Klasse-I“-Mutation führt zunächst zu einem Proliferationsvorteil oder einem Überlebensvorteil der betroffenen hämatopoetischen Zelle. Klasse-I-Mutationen betreffen typischerweise intrazelluläre Signaltransduktionswege (z.B. interne Tandemduplikationen (ITD) oder Mutationen der Tyrosinkinase-Domäne (TKD) des FLT3-Gens) und führen zur Entstehung eines präleukämischen Klon. Eine „Klasse-II“-Mutation in einer Zelle dieses Klon führt dann wiederum zu einer Dysregulation der Zelldifferenzierung. Hierbei sind oft Transkriptionsfaktoren betroffen, welche normalerweise die Differenzierung fördern (z.B. Fusionen des MLL-Gens, Mutationen des NPM1-Gens oder Mutationen des CEBPA-Gens). Aus einer Zelle des präleukämischen Klon entwickelt sich nach einer Klasse-II-Mutation ein leukämischer Klon [1, 9].

1.3.2 Immunoediting-Hypothese

Die „*Immunoediting*“-Hypothese beschreibt die Interaktion zwischen dem Immunsystem und maligne transformierten Zellen. Im Anschluss an die maligne Transformation durch die oben beschriebenen genetischen Alterationen durchläuft die Interaktion zwischen den entarteten Zellen und dem Immunsystem im Verlauf der Entstehung einer malignen Erkrankung drei Phasen [10]. Die erste Phase, in der das Immunsystem entartete Zellen eliminiert, wird als „*Elimination*“-Phase bezeichnet. Der Selektionsdruck durch das Immunsystem führt im Weiteren zu einem Überlebensvorteil von entarteten Zellen, die weniger vulnerabel gegenüber den Eliminationsmechanismen des Immunsystems sind, sodass es zu einem Gleichgewicht zwischen Elimination und Regeneration/Proliferation entarteter Zellen kommt („*Equilibrium*“-Phase). Nimmt die Fähigkeit der entarteten Zellen zu, dem Immunsystem durch Akkumulation weiterer Mutationen zu trotzen, übersteigt die Regeneration/Proliferation der entarteten Zellen deren Elimination; man spricht nun von der „*Escape*“-Phase [10].

1.4 Klinik und Diagnostik

Im Verlauf einer AML verdrängen entartete Vorläuferzellen (leukämische Blasten) die gesunden hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und führen so zu einer Knochenmarkinsuffizienz mit den für eine AML typischen Symptomen. Die Verdrängung der Erythropoese führt zu einer Anämie, welche sich durch Blässe, Müdigkeit, Schwindel, Dyspnoe, pektanginöse Beschwerden, etc. manifestieren kann. Durch die Verdrängung der Thrombopoese kann es zu einer Thrombozytopenie mit hämorrhagischer Diathese kommen. Die Verdrängung der Granulopoese kann zu einer Neutropenie mit erhöhter Anfälligkeit für Infektionen führen. Möglich sind außerdem unspezifische Allgemeinsymptome wie Fieber, Abgeschlagenheit oder Nachtschweiß. Letztendlich kann jede der drei Komponenten der Knochenmarkinsuffizienz zum Exitus letalis führen [2, 5].

In der Diagnostik sind zytomorphologische, zytochemische, durchflusszytometrische und genetische Untersuchungen von peripherem Blut und Knochenmark wegweisend [2, 4, 5].

1.5 Klassifikation

Durch die *French-American-British-Group* (FAB-Group) wird die AML nach zytomorphologischen, zytochemischen und immunologischen Kriterien in acht Subtypen (M0–M7) eingeteilt [11]. Die Klassifikation der *World Health Organization* (WHO), eine Weiterentwicklung der FAB-Klassifikation, bezieht zusätzlich genetische sowie ätiologische Kriterien (z.B. therapieassoziierte Leukämie) ein [12]. Zunehmende klinische Relevanz erlangen Einteilungen, die darauf abzielen, prognostische Vorhersagen zu treffen. Solche Einteilungen wurden beispielsweise vom *United Kingdom Medical Research Council* (MRC) sowie vom *European Leukemia Net* (ELN) auf der Basis zytogenetischer und molekulargenetischer Befunde entwickelt [13, 14].

1.6 Therapie und Prognose

Um die Prognose der AML zu verbessern, erfolgt die Therapie in der Regel innerhalb klinischer Studien, welche die Standardtherapie gegen neue Therapiestrategien testen. Grundsätzlich werden in kurativer Absicht eine

remissionsinduzierende Chemotherapie (Induktionstherapie) und eine Postremissionstherapie miteinander kombiniert [2].

1.6.1 Induktionstherapie

Therapieregime der Induktionstherapie setzen sich zusammen aus Cytarabin (AraC) und einem Anthrazyklin, wie z.B. Daunorubicin oder Idarubicin [2].

1.6.1.1 Standardinduktionstherapie

Das in den 1970er Jahren etablierte 7+3-Schema (7 Tage Cytarabin als Dauerinfusion sowie 3 Tage Daunorubicin als einstündige Infusion) gilt noch heute als Referenz-Induktionstherapie. Damit, sowie unter den üblichen supportiven Therapiemaßnahmen, lassen sich nach zytomorphologischen Kriterien komplette Remissionen (CR) bei etwa 70 % der Patienten unter 60 Jahre bzw. bei etwa 45–55 % der Patienten über 60 Jahre erreichen [2, 15].

1.6.1.2 Induktionstherapieschema der AML-CG 2008-Studie

Auf der Grundlage von Ergebnissen zellexperimenteller Untersuchungen wurde das sogenannte TAD-9-Schema (TAD) entwickelt (Abbildung 1a) [16, 17, 18]. Hierin wird über einen Zeitraum von insgesamt 9 Tagen eine Kombination aus Thioguanin, Cytarabin und Daunorubicin verabreicht. In klinischen Studien erwies sich diese Kombination als effektiv und gut verträglich; es wurden CR-Raten von 65 bis 79 % erzielt [19, 20, 21]. Das Schema der Doppelinduktion, bei dem zwei Blöcke TAD nacheinander verabreicht werden, führte im Vergleich zu einem einzelnen Block TAD zu einer verlängerten Remissionsdauer und einem gesteigerten Gesamtüberleben [22]. Auch durch den Einsatz von hoch dosiertem Cytarabin (HD-AraC) in der Induktionstherapie konnte eine Verbesserung des Gesamtüberlebens von AML-Patienten erzielt werden [23, 24]. Es wurde daher das sogenannte HAM-Schema entwickelt, in welchem HD-AraC zusammen mit Mitoxantron verabreicht wird (Abbildung 1b). Die *AML-Cooperative Group* (AML-CG) untersuchte, ob die Sequenz TAD-HAM einen Vorteil gegenüber der Sequenz TAD-TAD bietet. Tatsächlich konnte durch den Ersatz des zweiten TAD-Blocks der Doppelinduktion durch einen HAM-Block eine Verbesserung des 5-Jahres-Gesamtüberlebens, zumindest bei Hochrisikopatienten, erreicht werden [25]. Da eine weitere Verbesserung der CR-Rate oder des 5-Jahres-Gesamtüberlebens durch die Kombination zweier HAM-Blöcke (HAM-HAM) nicht möglich war, dient

das TAD-HAM-Schema als Standardtherapie der AML-CG 2008-Studie und wird mit dem sequenziellen HAM-Schema (S-HAM, Abbildung 1c) verglichen [25]. Letzteres sieht die Applikation zweiter HAM-Blöcke im Abstand von nur 3 Tagen vor. Der Ansatz des S-HAM-Schemas basiert auf der Überlegung, dass eine weitere zeitliche Verdichtung der Chemotherapie, wie sie sich im Rahmen des Doppelinduktionsschema bereits als effektiv erwiesen hat, zu einer Prognoseverbesserung führen könnte [26]. In mehreren klinischen Studien hat sich das Schema bereits als effektiv erwiesen und führte unter adäquater supportiver Therapie zu keiner Steigerung der Toxizität [27, 28, 29].

Bei älteren Patienten (≥ 60 (-70) Jahre) dient in der AML-CG 2008-Studie nicht das TAD-HAM-Schema als Standardtherapie. Um die toxischen Nebenwirkungen der Chemotherapie so gering wie möglich zu halten, wird in dieser Patientengruppe zunächst nur ein Induktionstherapieblock verabreicht. Da mit einem HAM-Block tendenziell höhere CR-Raten erreicht werden können als mit einem TAD-Block, stellt ein singulärer HAM-Block innerhalb der AML-CG 2008-Studie bei älteren Patienten die Standard-Induktionstherapie dar. Sollten im Anschluss daran ≥ 5 % Blasten im Knochenmark nachweisbar sein, wird ein zweiter HAM-Block verabreicht [26, 30].

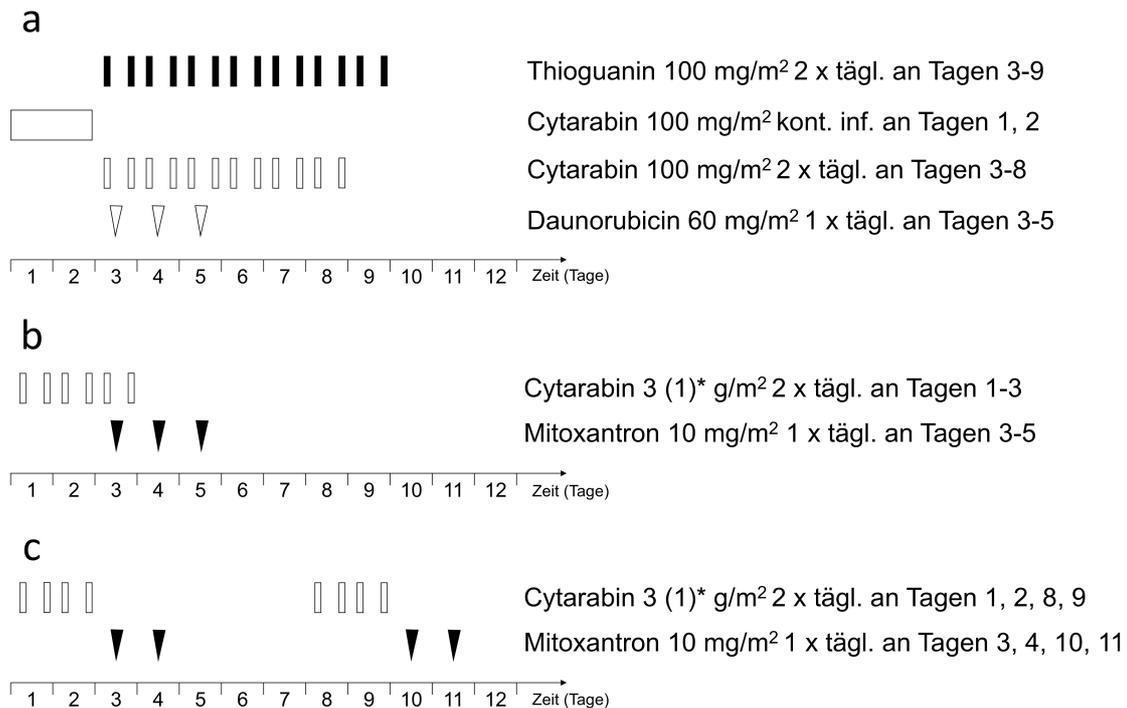


Abbildung 1: Induktiontherapieschema nach dem Prüfplan der German AML-CG

a) TAD-9-Schema (TAD): Über die ersten 48 Stunden wird Cytarabin in einer Dosis von 100 mg/m² kontinuierlich i.v. infundiert. An den Tagen 3-8 werden 100 mg/m² Cytarabin zweimal täglich über 30 Minuten i.v. verabreicht. An den Tagen 3-5 werden 60 mg/m² Daunorubicin einmal täglich über 60 Minuten i.v. verabreicht. An den Tagen 3-9 werden 100 mg/m² Thioguanin zweimal täglich p.o. verabreicht. b) HAM-Schema: An den Tagen 1-3 werden 3 g/m² Cytarabin zweimal täglich über 3 Stunden i.v. verabreicht. An den Tagen 3-5 werden 10 mg/m² Mitoxantron einmal täglich über 60 Minuten i.v. verabreicht. c) S-HAM-Schema: An den Tagen 1, 2, 8 und 9 werden 3 g/m² Cytarabin zweimal täglich über 3 Stunden i.v. verabreicht. An den Tagen 3, 4, 10 und 11 werden 10 mg/m² Mitoxantron einmal täglich über 60 Minuten i.v. verabreicht.

* Bei Patienten ≥ 60 Jahre wird nur 1 g/m² Cytarabin verabreicht [26].

1.6.2 Postremissionstherapie

1.6.2.1 Konsolidierungstherapie

Obschon die Induktionstherapie die Zahl leukämischer Zellen etwa um den Faktor 10^3 bis 10^4 dezimiert, besteht der leukämische Klon bei Patienten in CR noch immer aus etwa 10^8 bis 10^9 Zellen. Daher ist in der Regel innerhalb weniger Monate nach Erreichen der Remission mit einem Rezidiv zu rechnen, woraus sich die Indikation zu einer Postremissionstherapie ergibt [2, 31]. Hierfür stehen verschiedene Optionen zur Verfügung, z.B. die Chemokonsolidierung, welche im Wesentlichen auf den gleichen Chemotherapeutika basiert wie die Induktionstherapie, sowie die allogene Stammzelltransplantation. Die Entscheidung darüber, welche dieser Optionen gewählt wird, richtet sich u.a. nach der zytogenetischen und molekulargenetischen Risikostratifizierung, nach dem Ansprechen auf die Induktionstherapie, nach Alter und Komorbiditäten des

Patienten sowie nach der Verfügbarkeit eines HLA-kompatiblen (HLA = *Human Leukocyte Antigen*) Knochenmarkspenders [2]. Durch die Postremissionstherapie können 5-Jahres-Überlebensraten von etwa 47 % bei Patienten in einem Alter von 15 bis 59 Jahren bzw. von etwa 20 % bei Patienten in einem Alter ab 60 Jahren erzielt werden [32]. In der AML-CG 2008-Studie erhalten Patienten, die sich nicht für eine Stammzelltransplantation qualifizieren, eine Chemokonsolidierung nach dem TAD-9-Schema [26].

1.6.2.2 **Erhaltungstherapie**

Das AML-CG 2008-Studienprotokoll sieht im Anschluss an eine Chemokonsolidierung die Applikation einer Erhaltungstherapie vor. Hierin wird für die Dauer von 3 Jahren nach Ende der Chemokonsolidierung Cytarabin in wiederkehrenden Zyklen jeweils im Wechsel kombiniert mit Daunorubicin, Thioguanin oder Cyclophosphamid verabreicht (Abbildung 2) [26]. Durch dieses Erhaltungstherapieschema konnten Büchner et al. im Jahr 1985 eine Steigerung des rezidivfreien Überlebens zweieinhalb Jahre nach Erreichen einer CR von 17 % auf 30 % zeigen [31]. Da diese Ergebnisse jedoch in späteren Untersuchungen nicht reproduziert werden konnten, wurde dieses Konzept der Erhaltungstherapie inzwischen weitgehend verlassen. Möglicherweise ist der Effekt einer Erhaltungstherapie mit Cytarabin, Daunorubicin, Thioguanin und Cyclophosphamid, wie er in früheren Untersuchung, wie etwa der zitierten Arbeit von Büchner et al. aus dem Jahr 1985 nachweisbar war, auf früher übliche, im Vergleich zu aktuellen Therapieschemata weniger potente Induktions- und Postremissionsprotokolle zurückzuführen [33].

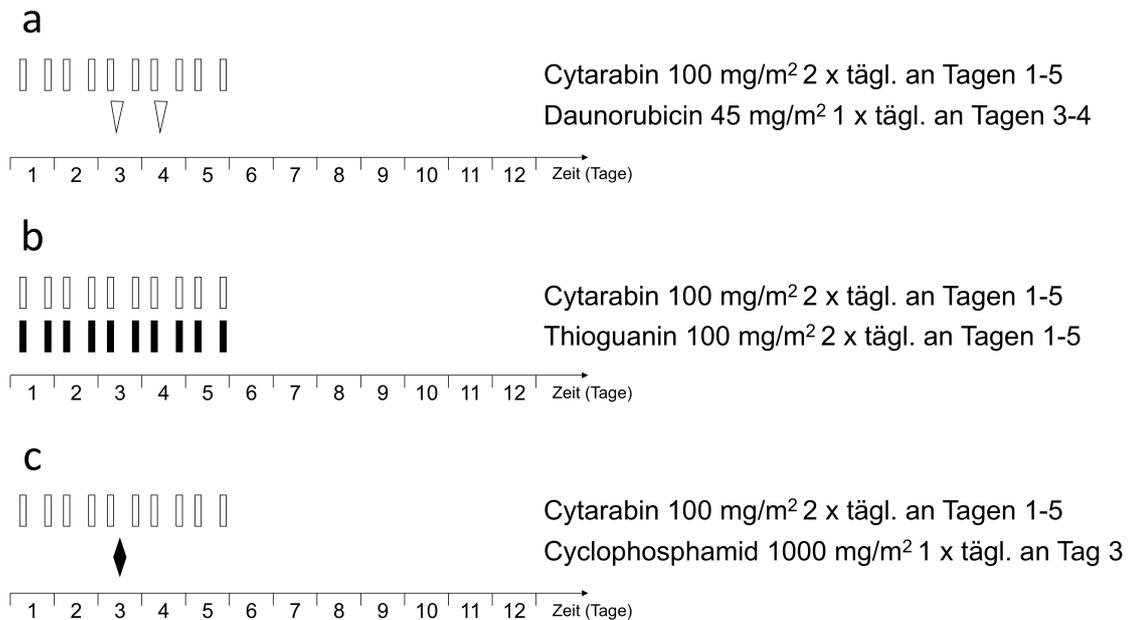


Abbildung 2: Erhaltungstherapieschema nach dem Prüfplan der German AML-CG

a) Zyklus Cytarabin mit Daunorubicin (AD). b) Zyklus Cytarabin mit Thioguanin (AT). c) Zyklus Cytarabin mit Cyclophosphamid (AC). Die Zyklen AD, AT und AC werden alternierend verabreicht. Die Abfolge AD-AT-AC-AT wird wiederholt, bis eine kumulative Daunorubicinesamtdosis von 550 mg/m² erreicht ist, anschließend wird Daunorubicin durch Thioguanin ersetzt. Die Erhaltungstherapie wird über eine Gesamtdauer von 3 Jahren durchgeführt. In Abhängigkeit von den auftretenden Zytopenietiefen und -dauern wird die Dosis der Chemotherapeutika im Verlauf der Therapie ggf. reduziert [26].

1.6.3 Subgruppenspezifische Therapieoptionen

Eine Reihe weiterer Substanzen steht für die Therapie der AML zur Verfügung. Diese sind jedoch nur in Kombination mit der Standardtherapie bzw. nur für spezielle Untergruppen von AML-Patienten zugelassen [34].

So ist z.B. auch All-Trans-Retinoinsäure (ATRA) Teil des Therapieprotokolls der AML-CG 2008-Studie. ATRA wird zusätzlich zur konventionellen Chemotherapie verabreicht, wenn eine Akute Promyelozytenleukämie (APL) vorliegt [26]. Anfang der 1990er Jahre wurde gezeigt, dass 12 Monate nach Diagnosestellung die Rezidivrate von APL-Patienten durch die Kombination der konventionellen Chemotherapie mit ATRA von 40 % auf 19 % reduziert werden kann [35]. Durch nachfolgende Studien wurde der Einsatz von ATRA bei APL weiterentwickelt, sodass die 10-Jahres-Überlebensraten bei Patienten mit dieser Form der AML heute bei über 77 % liegt [36].

Ein weiteres Beispiel ist die seit 2017 zugelassene Substanz Midostaurin. Es handelt sich hierbei um einen Kinase-Inhibitor, welcher bei AML-Patienten mit Mutationen im FLT3-Gen, d.h. einer FLT3-ITD oder einer FLT3-TKD-Mutation, zu

einer deutlichen Verbesserung des Gesamtüberlebens führt. Auch Midostaurin wird in Kombination mit der Standardchemotherapie appliziert [37, 38].

Für die Therapie älterer AML-Patienten mit geringer Blastenzahl im Knochenmark und Mehrlinien-Dysplasie steht seit dem Jahr 2010 Azacitidin zur Verfügung. Azacitidin ist eine sogenannte hypomethylierende Substanz. Über eine Deaktivierung von DNS-Methyltransferasen führt Azacitidin zu einer Hypomethylierung von DNS. Auf diese Weise können aberrant methylierte Zellzyklusregulatorgene reaktiviert werden, so ihre im Zuge der Malignisierung verlorengegangene Funktion wiedererlangen und eine antineoplastische Wirkung ausüben [39]. In der AZA001 Studie, welche Grundlage für die Zulassung der Substanz in den USA war, konnte gezeigt werden, dass ältere AML-Patienten, welche mindestens 6 Zyklen Azacitidin erhalten hatten eine signifikant höhere 2-Jahres-Überlebensrate (50 % vs. 16 %, $p = 0,001$) hatten als nach einer Therapie mit ausschließlich supportiven Maßnahmen, niedrig dosiertem Cytarabin oder intensiver Chemotherapie ohne Azacitidin [39].

1.6.4 Immuntherapie

1.6.4.1 *Hämatopoetische Stammzelltransplantation*

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist bereits seit vielen Jahren ein etabliertes Verfahren in der Therapie maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. AML-Patienten mit ungünstigem zytogenetischem Risikoprofil sollten, AML-Patienten mit intermediärem Risikoprofil können den Empfehlungen des *National Comprehensive Cancer Network* gemäß einer allogenen HSZT zugeführt werden [40]. Entscheidende Nachteile dieses Verfahrens sind die eingeschränkte Verfügbarkeit kompatibler Stammzellspender sowie die erhebliche therapieassoziierte Morbidität und Mortalität, v.a. bei älteren Patienten. Durch die Entwicklung weniger toxischer Konditionierungsprotokolle konnten Morbidität und Mortalität in den vergangenen Jahren deutlich reduziert werden. Sogenannte „*Reduced-Intensity-Conditioning*“-Regime sind myeloablativen Konditionierungsregimen bei älteren Patienten – gemessen am Gesamtüberleben – nicht unterlegen [41]. Hierfür scheint vor allem der „*Graft Versus Leukemia*“-Effekt (GVL) maßgeblich zu sein [42–44]. Diesem Effekt liegt das Prinzip zugrunde, dass aufgrund ihrer genetisch determinierten Unterschiede

Empfänger-Leukämiezellen von Spender-Lymphozyten als fremd erkannt und eliminiert werden können [45].

1.6.4.2 ***Antibody-Drug Conjugates und bispezifische Antikörper***

Der Einsatz von Antikörpern stellt einen weiteren, bei diversen Tumorerkrankungen bereits etablierten, immunologischen Therapieansatz dar. Antikörper werden z.B. in Form sogenannter *Antibody-Drug Conjugates* (ADCs), als bispezifische Antikörper oder als *Checkpoint*-Inhibitoren verwendet [46]. Ein prominentes Beispiel für ADCs ist das im Jahr 2000 von der *Food and Drug Administration* (FDA) in den Vereinigten Staaten von Amerika für die Therapie von AML-Patienten mit erstem Rezidiv zugelassene Gemtuzumab-Ozogamizin (GO) [47]. Es handelt sich hierbei um einen gegen das Leukämie-assoziierte Antigen CD33 gerichteten Antikörper, gekoppelt an Calicheamicin, ein Zellgift, welches DNS-Doppelstrangbrüche verursacht. Im ersten Rezidiv konnte GO bei 30 % der behandelten Patienten eine Remission induzieren und zeigte ein günstiges Nebenwirkungsprofil. Nachdem mehrere Phase-III-Studien nach der Zulassung des Medikaments die Ergebnisse der Zulassungsstudie jedoch nicht bestätigen konnten, wurde GO im Jahr 2010 vom Hersteller vom Markt genommen [48]. Derzeit wird die Substanz erneut klinisch getestet, da sich bei einigen AML-Patienten-Subgruppen durch den Einsatz des Medikaments eine Prognoseverbesserung abzeichnet [49].

Bispezifische Antikörper sind Antikörperkonstrukte, die mit zwei Bindungsstellen ausgestattet sind. Eine davon bindet ein tumor- oder leukämiespezifisches Antigen, die andere bindet T-Zell-Rezeptoren. Die Konstrukte stellen so eine enge räumliche Nähe zwischen Tumor- oder Leukämiezellen und T-Zellen her. Letztere werden hierbei aktiviert und induzieren den Tod der malignen Zelle. Für die Therapie der ALL sind bispezifische Antikörper bereits in einigen Fällen zugelassen [50], für die Therapie der AML werden sie aktuell noch in klinischen Studien untersucht [NCT02520427, NCT02152956].

1.6.4.3 ***Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cells***

Bei den sogenannten *Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells* handelt es sich um T-Zellen mit einem veränderten T-Zell-Rezeptor. Dieser T-Zell-Rezeptor besitzt auf der Zelloberfläche eine tumor- oder leukämiespezifische, antigenbindende

Domäne und im Zellinneren eine oder mehrere Signaldomänen. Ähnlich dem Prinzip der bispezifischen Antikörperkonstrukte führt dieser veränderte Rezeptor dazu, dass T-Zellen räumlich nahe an Tumor- oder Leukämiezellen herangebracht werden um sie zu eliminieren. Im Gegensatz zu bispezifischen Antikörpern ist dieses Konzept jedoch nicht auf funktionsfähige patienteneigene T-Zellen angewiesen [51]. Bisher existieren nur wenige abgeschlossene klinische Studien zu dieser Methode bei Patienten mit AML, allerdings sind deren Ergebnisse vielversprechend [46, 52].

1.6.4.4 **Checkpoint-Inhibitoren**

Bei der Aktivierung von T-Zellen spielen neben der Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor und Antigen-MHC-Komplex (MHC = *Major Histocompatibility Complex*) auch Interaktionen von kostimulatorischen und koinhibitorischen Rezeptoren auf der T-Zelloberfläche mit ihren jeweiligen Liganden eine Rolle [53]. Beispiele für koinhibitorische Rezeptoren sind CTLA-4 und PD-1. Die Bindung von CD80/CD86 bzw. PD-L1 an diese Rezeptoren führt zu einer Inhibition der T-Zellen und verhindert so unter physiologischen Bedingungen u.a. überschießende Immunreaktionen, daher die Bezeichnung *Immune-Checkpoint Molecules* [54]. Maligne Zellen nutzen diesen Mechanismus indem sie z.B. PD-L1 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren und so eine effektive Immunantwort verhindern. Durch monoklonale, gegen koinhibitorische Rezeptoren gerichtete Antikörper, kann diese Interaktion unterbunden werden. Bei soliden Tumoren, z.B. dem malignen Melanom und dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom sind *Checkpoint-Inhibitoren* etablierte Therapien [55, 56]. Für die AML liegen vor allem präklinische Studien zu diesem Therapiekonzept vor; die klinische Evaluation dieses Therapiekonzeptes in Form von Studien erfolgt jedoch bereits [57, 58, NCT02275533, NCT02532231, NCT02708641].

1.6.4.5 **Vakzinierung**

Schließlich sind Vakzinierungsstrategien in der Reihe der neuen Immuntherapien zu nennen. Unter Vakzinierung wird im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen ein therapeutischer Ansatz verstanden und nicht wie meist bei infektiösen Erkrankungen ein prophylaktischer. Das Ziel einer Vakzinierung ist jedoch das gleiche, nämlich die Induktion einer effektiven Immunreaktion.

Typischerweise handelt es sich bei Vakzinierungen in Bezug auf maligne Erkrankungen um eine für den jeweiligen Patienten maßgeschneiderte Therapie, bei welcher patienteneigene monozytäre Zellen entnommen werden um aus ihnen dendritische Zellen (DCs) zu generieren, welche wiederum nach Beladung mit leukämiespezifischen Antigenen dem jeweiligen Patienten zurückgegeben werden. Rosenblatt et al. veröffentlichten im Jahr 2016 Daten ihrer Arbeit, in welcher ein davon abweichendes Konzept verfolgt wurde: Patienteneigene AML-Zellen wurden mit patienteneigenen dendritischen Zellen hybridisiert und den Patienten nach Erreichen einer CR zurückgegeben. Es konnten eine langanhaltende Expansion leukämiespezifischer T-Zellen sowie eine potentiell protektive Wirkung gegen ein Rezidiv gezeigt werden [59].

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Vorbereitung einer Studie der Münchener Arbeitsgruppe *Translational Cancer Immunology* am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt. Innerhalb dieser übergeordneten Studie erfolgt die Vakzinierung von AML-Patienten mit DCs. Hierfür werden DCs unter Verwendung eines TLR7/8 Agonisten generiert und anschließend mit für die leukämiespezifischen Antigene WT1 und PRAME kodierender RNS beladen [NCT01734304].

1.7 Pathophysiologie von Krankheitsrezidiven

Die Ursache für Rezidive nach stattgehabter Therapie sind chemorefraktäre leukämische Blasten, welche durch die Therapie nicht eliminiert werden konnten; man bezeichnet sie als „*Minimal Residual Disease*“ (MRD). Diese Zellen sind dafür verantwortlich, dass der Großteil der Patienten, welche eine komplette morphologische Remission erreichen, innerhalb von 3–5 Jahren ein Rezidiv erleidet [60]. Um ein Rezidiv zu verhindern, ist die vollständige Elimination sämtlicher maligner Zellen, also der MRD, notwendig. Alternativ kann die Schaffung einer Situation angestrebt werden, in der das Immunsystem des Patienten dazu in der Lage ist, die nach einer initialen Therapie verbliebenen malignen Zellen, d.h. die MRD, zu kontrollieren [10]. Im Kontext der „*Immunoediting*“-Hypothese würde dies eine Rückführung in die „*Elimination*“-Phase bzw. in die „*Equilibrium*“-Phase bedeuten [10].

1.8 Tumorimmunologie

Wie bereits erwähnt übernimmt das Immunsystem wesentliche Aufgaben im Rahmen der Tumorabwehr. Im Kontext der „*Immunoediting*“-Hypothese wird diese Funktion des Immunsystems als „*Immune Surveillance*“ bezeichnet [61]. Im Folgenden wird die Rolle wichtiger Akteure des Immunsystems bei der Tumorsuppression beleuchtet.

1.8.1 Natürliche Killer-Zellen

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) spielen als Akteure des angeborenen Immunsystems nachgewiesenermaßen eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung maligne entarteter Zellen, v.a. in der „*Elimination*“-Phase der Tumorentstehung [62]. Über diverse Rezeptoren auf ihrer Oberfläche können NK-Zellen mit Tumorzellen interagieren. Durch den Kontakt zwischen aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen (z.B. NKG2-D) und deren Liganden auf Tumorzellen (z.B. MICA oder MICB) werden NK-Zellen aktiviert. Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen basiert unter anderem auf der Sekretion von Faktoren (z.B. FASL oder TRAIL), welche durch Bindung an Rezeptoren maligne entarteter Zellen (z.B. FAS oder TRAILR) deren Apoptose induzieren können [63].

1.8.2 CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen (T_H-Zellen) und CD8⁺ T-Zellen (zytotoxische T-Zellen, Effektor-T-Zellen) erkennen Tumorzellen an sogenannten tumorspezifischen Antigenen über ihre jeweiligen T-Zell-Rezeptoren. Als Akteure des adaptiven Immunsystems spielen sie eine wichtige Rolle, sowohl in der „*Elimination*“-Phase als auch in der „*Equilibrium*“-Phase der Tumorentstehung. Wichtiger Effektormechanismus von T-Zellen ist die Perforin-vermittelte Apoptose-Induktion in Tumorzellen [7, 64].

1.8.3 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen) stehen einer erfolgreichen Tumorsuppression in vielen Fällen entgegen. Sie sind dazu in der Lage, andere Lymphozyten zu inhibieren, darunter auch CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen. Dies kann zum einen indirekt erfolgen indem T_{reg}-Zellen durch Präsentation des koinhibitorischen Oberflächenmoleküls CTLA-4 Antigen-präsentierende Zellen hemmen, sodass diese in der Folge ihre Fähigkeit verlieren, Lymphozyten zu aktivieren. Zum anderen können T_{reg}-Zellen Lymphozyten direkt

inhibieren z.B. durch Sekretion inhibitorischer Zytokine (IL-10, TGF- β , etc.), Verbrauch stimulatorischer Zytokine (IL-2, etc.) oder Granzym/Perforin-vermittelte Apoptose-Induktion [65]. Um inhibitorisch wirksam zu werden, bedarf es einer Aktivierung der regulatorischen T-Zellen; diese erfolgt über deren T-Zell-Rezeptor in Anwesenheit von IL-2 [66].

1.8.4 Interleukin-17

IL-17, auch IL-17A genannt, ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches in erster Linie von einer CD4⁺ T-Zell-Subpopulation, den Th17-Zellen, produziert wird [67]. In Studien an Patienten mit malignen Erkrankungen wurde gezeigt, dass IL-17 zu einer Förderung des Tumorwachstums und der Metastasierung führt, u.a. durch eine Begünstigung von Hämangiogenese und Lymphangiogenese sowie durch immunsuppressive Effekte [68]. Bei AML-Patienten konnte gezeigt werden, dass eine hohe Zahl von Th17-Zellen mit einer schlechten Prognose einhergeht [69].

1.9 Studienrationale

Die derzeitige schlechte Prognose, besonders älterer Patienten, gibt Anlass zur Entwicklung neuer Therapieansätze für die AML. Hierbei werden große Hoffnungen auf verschiedene immuntherapeutische Strategien gesetzt. Im Zuge der Erprobung immuntherapeutischer Therapieregime im Rahmen von Studien stellt sich die Frage nach sinnvollen Kombinationsmöglichkeiten mit etablierten Verfahren, v.a. also mit chemotherapeutischen Regimen. Es ist bekannt, dass eine Reihe der konventionellen Chemotherapeutika neben ihrer hauptsächlich lymphodepletierenden Wirkung diverse weitere immunmodulatorische Eigenschaften aufweist [70, 71]. Um bei der Konzeption von Kombinationstherapien aus Chemotherapieregimen und Immuntherapieregimen ein möglichst wirkungsvolles Ineinandergreifen beider Ansätze zu erzielen, ist es notwendig, die exakten immunmodulatorischen Effekte der verschiedenen etablierten Therapieprotokolle zu kennen. Ziel der vorliegenden Studie ist es zu ergründen, wie sich die Erhaltungstherapie, welche im Rahmen des AML-CG 2008-Studienprotokolls zur Anwendung kommt, auf den Immunstatus von AML-Patienten auswirkt. Mit den aus der Untersuchung gewonnenen Erkenntnissen soll die Frage adressiert werden, ob und ggf. in welcher zeitlichen Abfolge die

Kombination der im Rahmen der Erhaltungstherapie verwendeten Chemotherapeutika mit neuen immuntherapeutischen Ansätzen sinnvoll ist.

2 Studienaufbau, Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

2.1.1 Probanden

Als Teil der Studie „*DC Vaccination for Postremission Therapy in AML*“ [NCT01734304] liegt für die vorliegende Untersuchung die Zustimmung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München vor. Für die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung durchgeführten Versuche wurden peripher-venöse Blutproben von 18 AML-Patienten sowie 18 gesunden erwachsenen Probanden verwendet. Voraussetzung war die schriftliche Einverständniserklärung nach ausführlicher Information über Gegenstand und Ziel der Studie gemäß der Deklaration von Helsinki. Eingeschlossen wurden AML-Patienten, welche zwischen April 2010 und April 2012 im Klinikum der Universität München behandelt wurden. Zudem wurden retrospektiv Labordaten aus dem Zeitraum Juni 2007 bis August 2008 zur Auswertung herangezogen. Insgesamt wurden die Daten von 10 männlichen und 8 weiblichen AML-Patienten ausgewertet. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Untersuchung 57,6 Jahre. Die AML M1 war mit 6 Fällen der am häufigsten vertretene Subtyp, die AML M2 mit 4 Fällen der zweithäufigste und die AML M4 mit 3 Fällen der dritthäufigste (Tabelle 1). Auch in anderen Untersuchungen ist die Mehrheit der AML-Patienten diesen drei Subtypen zuzuordnen [72].

Patient	Alter (Jahre)	FAB	Karyotyp	Mutationen			Induktions- therapie ^a	Beobachtete Erhaltungstherapiezyklen ^b
				NPM1	FLT3-ITD	CEBPA		
# 1	68	M4eo	46, XX, inv(16)	-	-	-	TAD ^c	AT, AC
# 2	57	M0	46, XX	-	+	-	S-HAM	AD, AC
# 3	63	M4	46, XY	-	-	-	S-HAM	AD, AT, AC, AC
# 4	72	M2	45, X0, -Y	+	+	-	HAM	AT, AC
# 5	59	M2	46, XX	+	+	-	TAD-HAM	AD
# 6	31	M5a	46, XX	-	-	-	TAD-HAM	AT, AT, AC
# 7	46	M3v	46, XY, t(15;17)	-	-	-	TAD-HAM ^d	AT, AC
# 8	41	M1	46, XY	-	-	+	S-HAM	AD
# 9	43	M1	46, XY	+	-	-	TAD-HAM	AD
# 10	54	M4	46, XY	+	-	-	7+3, HAM	AT
# 11	69	M1	46, XX	+	+	-	HAM	- ^e
# 12	71	M1	47, XY, +4	+	-	-	HAM	AD
# 13	61	M4	46, XX	+	-	-	TAD-HAM	AD
# 14	69	M1	46, XX	-	-	-	S-HAM	AD
# 15	57	M1	46, XY, inv(3)	-	-	-	S-HAM	AD
# 16	75	M2	46, XX	-	-	-	S-HAM	AD
# 17	43	M2	46, XY	-	-	+	S-HAM	AD
# 18	50	M3	46, XY	-	-	-	TAD-HAM ^d	AD

Tabelle 1: Patientencharakteristika

In die vorliegende Untersuchung wurden 18 AML-Patienten eingeschlossen. Die Tabelle zeigt das Alter der Patienten sowie morphologische, zytogenetische und molekulargenetische Charakteristika ihrer Erkrankung und die verabreichte Induktionstherapie. Für Patienten, welche auch im Verlauf ihrer Erhaltungstherapie beobachtet wurden, sind die entsprechenden Erhaltungstherapiezyklen angegeben.

a, b TAD (= TAD-9): Cytarabin 100 mg/m² kontinuierlich i.v. an den Tagen 1 und 2 sowie 100 mg/m² zweimal täglich i.v. an den Tagen 3–8 + Daunorubicin 60 mg/m² einmal täglich i.v. an den Tagen 3–5 + Thioguanin 100 mg/m² zweimal täglich i.v. an den Tagen 3–9; HAM: Cytarabin 3 g/m² (1 g/m² für Patienten ≥ 60–70 Jahre) zweimal täglich i.v. an den Tagen 1–3 + Mitoxantron 10 mg/m² einmal täglich i.v. an den Tagen 3–5; TAD-HAM: TAD + HAM, Beginn des zweiten Induktionszyklus (d.h. HAM) an Tag 21; S-HAM = sequential HAM: Cytarabin 3 g/m² (1 g/m² für Patienten ≥ 60–70 Jahre) zweimal täglich i.v. an den Tagen 1, 2, 8 und 9 + Mitoxantron 10 mg/m² einmal täglich i.v. an den Tagen 3, 4, 10 und 11; 7+3: Cytarabin 100mg/m² kontinuierlich i.v. an den Tagen 1–7 + Daunorubicin 45–90 mg/m² einmal täglich i.v. an den Tagen 1–3; AD: Cytarabin 100 mg/m² zweimal täglich s.c. an den Tagen 1–5 + Daunorubicin 45 mg/m² i.v. an den Tagen 3 und 4; AT: Cytarabin 100 mg/m² zweimal täglich s.c. an den Tagen 1–5 + Thioguanin 100 mg/m² zweimal täglich p.o. an den Tagen 1–5; AC: Cytarabin 100 mg/m² zweimal täglich s.c. an den Tagen 1–5 + Cyclophosphamid 1000 mg/m² einmalig i.v. an Tag 3.

c Patient # 1 erhielt aufgrund von Komplikationen nur TAD.

d Patienten # 7 und # 18 erhielten zusätzlich ATRA im Rahmen der Induktionstherapie.

e Patient # 11 wurde nach Erreichen der CR stammzelltransplantiert.

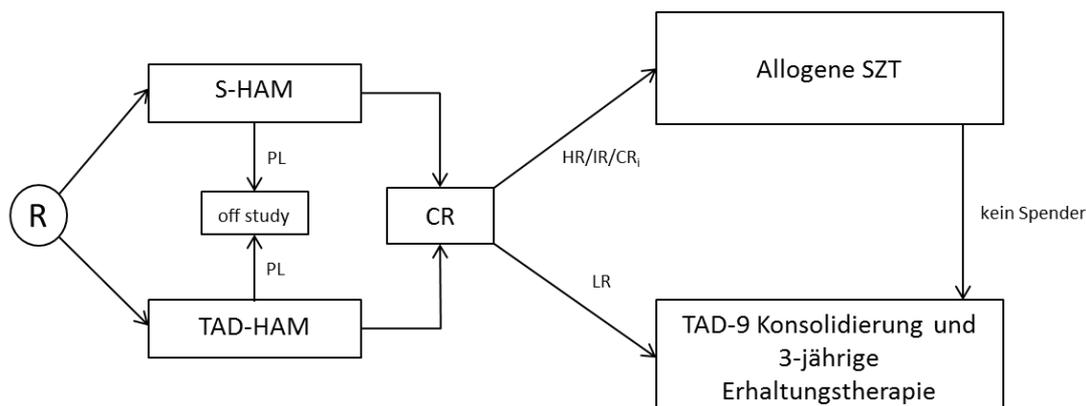
2.1.2 Therapieprotokoll

Die rekrutierten Patienten wurden in der Medizinischen Klinik III des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München im Rahmen der AML-CG 2008-Studie oder gemäß dem Therapieprotokoll dieser Studie behandelt. Nach Diagnosestellung erhielten alle Patienten zunächst eine Induktionstherapie. Diese besteht bei Patienten unter 60–70 Jahren grundsätzlich aus einem einphasigen

dosisdichten Regime aus sequenziellem, hochdosiertem Cytarabin kombiniert mit Mitoxantron (= S-HAM) oder einem zweiphasigen Regime aus 6-Thioguanin kombiniert mit Cytarabin und Daunorubicin (TAD) und anschließend hochdosiertem Cytarabin kombiniert mit Mitoxantron (HAM) (= TAD-HAM). Bei Patienten ab einem Alter von 60–70 Jahren – je nach Komorbiditäten – besteht die Induktionstherapie aus S-HAM oder ein bis zwei Zyklen HAM (Abbildung 3). Das AML-CG 2008-Studienprotokoll sieht vor, dass Patienten nach Erreichen einer CR im Anschluss an die Induktionstherapie in Abhängigkeit ihres Alters, ihres Rezidivrisikos, ihres Risikoprofils bezüglich der möglichen therapieassoziierten Morbidität und Mortalität sowie abhängig von der Verfügbarkeit eines passenden Stammzellspenders entweder eine Stammzelltransplantation erhalten oder einer Konsolidierungstherapie, bestehend aus einem TAD-Zyklus, zugeführt werden, an die sich eine Erhaltungstherapie anschließt. Eine CR liegt laut Studienprotokoll vor bei einem Anteil leukämischer Blasten im Knochenmarkausstrich von $< 5\%$, Regeneration des peripheren Blutbildes mit > 1000 neutrophilen Granulozyten/ μL und > 100000 Thrombozyten/ μL im peripheren Blut, fehlenden extramedullären Manifestationen und Abwesenheit von Auer-Stäbchen im Blutausstrich. Eine CR mit inkompletter Regeneration (CR_i) ist definiert als CR ohne Erreichen der geforderten Zahl neutrophiler Granulozyten oder Thrombozyten im peripheren Blut. Die Erhaltungstherapie wird in Form von Zyklen und für einen Zeitraum von 3 Jahren verabreicht. Mit der Erhaltungstherapie wird begonnen, wenn nach der Konsolidierungstherapie die Kriterien für eine CR erfüllt sind. Zwischen dem Beginn zweier Erhaltungstherapiezyklen liegt in der Regel ein Zeitraum von 4–5 Wochen. Liegen an Tag 15 nach Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus die Leukozytenzahl bei $> 1,5$ G/L und die Thrombozytenzahl bei > 50 G/L wird der nächste Erhaltungstherapiezyklus für Tag 29 des vorangegangenen Erhaltungstherapiezyklus anberaumt. Liegt zwar die Leukozytenzahl bei $> 1,5$ G/L, die Thrombozytenzahl jedoch bei < 50 G/L wird mit dem folgenden Erhaltungstherapiezyklus frühestens an Tag 36 begonnen. Voraussetzungen für den tatsächlichen Beginn des nächsten Zyklus sind eine Thrombozytenzahl von > 100000 / μL sowie eine Neutrophilenzahl von > 1500 / μL . Je nach verwendeten Chemotherapeutika gibt es drei verschiedene Erhaltungstherapiezyklen; in allen kommt Cytarabin (A) zu Einsatz, welches entweder mit Daunorubicin (D),

Cyclophosphamid (C) oder Thioguanin (T) kombiniert wird (Abbildung 2). Die Zyklusfolge AD-AT-AC-AT wird bis zum Erreichen einer kumulativen Daunorubicinmaximaldosis von 550 mg/m² wiederholt, anschließend entfallen die AD-Zyklen und die Abfolge wird zu AT-AT-AC-AT. Die Dosen der im Rahmen der Erhaltungstherapie verwendeten Chemotherapeutika werden im Falle schwerer oder prolongierter Zytopenien für alle folgenden Erhaltungstherapiezyklen reduziert. Bei einer Leukozytopenie von < 1 G/L, einer Neutropenie von < 500/μL und/oder einer Thrombozytopenie von < 20 G/L nach zwei aufeinanderfolgenden Erhaltungstherapiezyklen wird die Dosis aller Medikamente auf 50 % reduziert. Treffen diese Kriterien ein weiteres Mal zu, erfolgt eine Dosisreduktion auf 25 % der ursprünglichen Dosis. Treten erneut Zytopenien auf, welche die genannten Kriterien erfüllen, wird die Erhaltungstherapie vorzeitig beendet. Eine Dosisreduktion um 50 % wird auch ausgelöst, wenn an Tag 36 eines Erhaltungstherapiezyklus die Leukozytenzahl unter 1,5 G/L oder die Thrombozytenzahl unter 50 G/L liegt [26].

a



b

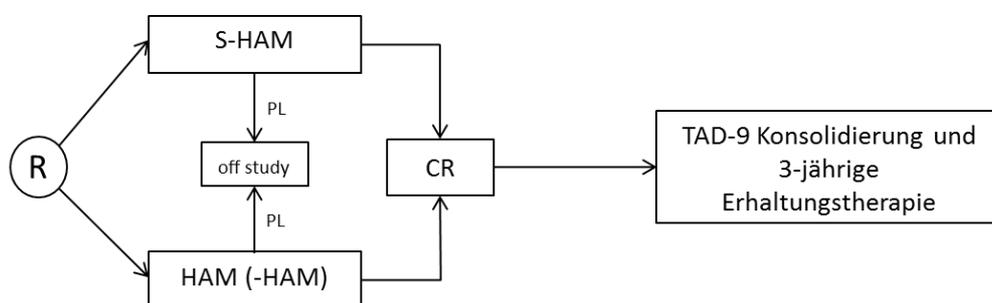


Abbildung 3: Randomisierungsschema nach dem Prüfplan der *German AML-CG*

Jüngere Patienten (< 60 (-70) Jahre) bzw. mit geringer Komorbidität werden entsprechend a) zum experimentellen S-HAM-Arm oder zum TAD-HAM-Standardtherapiearm randomisiert. Ältere Patienten (≥ 60 (-70) Jahre) bzw. mit höherer Komorbidität werden entsprechend b) zum experimentellen S-HAM-Arm oder zum HAM(-HAM)-Standardtherapiearm randomisiert. Der zweite HAM-Block wird bei diesen Patienten nur verabreicht, falls an Tag 16 der Induktionstherapie noch ≥ 5 % residuelle Blasten im Knochenmarkaspirat nachweisbar sind; der zweite Zyklus HAM wird dann an Tag 21 begonnen. Jüngere Patienten werden in der Regel nach Erreichen einer CR einer allogenen Stammzelltransplantation zugeführt; lediglich Patienten mit niedrigem Risikoprofil oder Patienten, für welche kein Stammzellspender zur Verfügung steht, erhalten eine Konsolidierungstherapie mit TAD, gefolgt von einer 3-jährigen Erhaltungstherapie. Bei Patienten ≥ 60–70 Jahre ist eine Konsolidierungstherapie mit TAD und eine 3-jährige Erhaltungstherapie nach Erreichen der CR die Standardtherapie.

R Randomisierung, PL persistierende Leukämie, HR high risk, IR intermediate risk, LR low risk, CR_i Kriterien der CR erfüllt bis auf Thrombozytenzahl [26].

2.1.3 Blutproben

Die Abnahme peripher-venöser Blutproben bei AML-Patienten erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik vor Beginn der Erhaltungstherapie oder während der Erhaltungstherapie vor Beginn des jeweils nächsten Erhaltungstherapiezyklus. Zusätzlich wurden, je nach Verfügbarkeit, weitere Blutentnahmen im Verlauf eines oder mehrerer Erhaltungstherapiezyklen durchgeführt. Im Fall von Patient # 11 erfolgte die einzige Blutentnahme vor Stammzelltransplantation.

Für die Immunphänotypisierung wurden Blutentnahmen vor einem Erhaltungstherapiezyklus sowie zu 5 Zeitpunkten innerhalb eines Erhaltungstherapiezyklus angestrebt, wobei Abweichungen von den geplanten Zeitpunkten um 2–3 Tage toleriert wurden (Toleranzzeiträume in Klammern): Tag 4 (2–6), Tag 9 (7–11), Tag 15 (13–17), Tag 21 (18–24) und Tag 29 (26–32). Für die Bestimmung der T-Zell-Proliferationskapazität wurden Blutproben vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus sowie zu 3 Zeitpunkten innerhalb eines Erhaltungstherapiezyklus untersucht (Toleranzzeiträume in Klammern): Tag 4 (2–6), Tag 13 (8–18) und Tag 24 (19–29). Zur Testung der Aktivierbarkeit natürlicher Killerzellen wurden Blutproben vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus sowie von Tag 15 (Toleranzzeitraum: Tag 14–16) innerhalb eines Erhaltungstherapiezyklus verwendet. Die Blutproben für den *Cytometric Bead Array* wurden vor einem Erhaltungstherapiezyklus sowie an Tag 16 (Toleranzzeitraum: Tag 14–18) innerhalb eines Erhaltungstherapiezyklus gewonnen. Die Blutabnahme erfolgte aus peripheren Venen nach Hautdesinfektion mit 21 G Nadeln. Differentialblutbilder wurden aus Kalium-EDTA-Blut (EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure) angefertigt, für alle anderen Versuche wurde Lithium-Heparin-Blut verwendet.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Gerät	Typ/Bezeichnung	Firma
Sterilwerkbank	Laminar Flow-Sicherheitswerkbank BDK SK 1800	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Baden-Württemberg, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Multifuge 3S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Hessen, Deutschland
	Minicentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
	Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Brutschrank	CO ₂ Begasungsbrutschrank Typ 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Hessen, Deutschland
Wasserbad	SUB 6 Waterbath	Grant Instruments Ltd., Shepreth, Cambridgeshire, England
Fluoreszenz- Durchflusszytometer	FACSCalibur flow cytometer	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
(Tief)Kühlschränke	Premium Kühl- Gefrierkombination KGT 3946	Liebherr International AG, Bulle, Freiburg, Schweiz
	Herafreeze HFU 686 Basic, - 86 °C	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Reagenzglasschüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA
Mikroskop	Leica DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Hessen, Deutschland
Blockthermostat	Blockthermostat TCR 100	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Baden- Württemberg, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies LLC, Wilmington, Delaware, USA
Einkanalpipetten	Research variable 0,5–10 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research variable 2–20 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research variable 10–100 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research variable 20–200 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research variable 100– 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette	Research Mehrkanal 30– 300 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Handdispenser	Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vakuumpipette	Pipetboy acu	Integra Biosciences, Zizers, Graubünden, Schweiz
Tiefkühlbehälter	Mr. Frosty Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Chronograph	2-channel jumbo display clock timer, model TR118	Oregon Scientific Inc., Tualatin, Oregon, USA
Neubauer-Zählkammer	Neubauer - Improved	Laboroptik Ltd., Lancing, West Sussex, England

Tabelle 2: Geräte

2.2.2 Einwegmaterial

Material	Typ/Bezeichnung	Firma
Pipettenspitzen	1000 µL blau	Socorex Isba S.A., Ecublens/ Lausanne, Waadt, Schweiz
	200 µL gelb	Socorex Isba S.A., Ecublens/ Lausanne, Waadt, Schweiz
	10 µL farblos	Socorex Isba S.A., Ecublens/ Lausanne, Waadt, Schweiz
Pasteurpipette	Pasteurpipette 7 mL	VWR International LLC, Radnor, Pennsylvania, USA
Vakuumpipettenaufsätze	Costar Stripette 10 mL	Corning Inc., Corning, New York, USA
	Costar Stripette 5 mL	Corning Inc., Corning, New York, USA
	Costar Stripette 2 mL	Corning Inc., Corning, New York, USA
Handdispenseraufsatz	Combitips plus 5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Laborhandschuhe	Medizinische Untersuchungshandschuhe aus Nitril, puderfrei	Cardinal Health AG, Dublin, Ohio, USA

Verschlussfolie	Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging Inc., Akron, Ohio, USA
Deckgläser	Haemocytometer-Deckgläser 20 x 26 mm # 4	Gerhard Menzel GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Blutentnahmenadeln	Safety-Multifly-Set 21 G 200 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
Blutentnahmeröhrchen	S-Monovette 9 mL, Lithium-Heparin	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
	S-Monovette 2,7 mL, Kalium-EDTA	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
Haut-Desinfektionsmittel	Cutasept F, Haut-Desinfizienz	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Zellstofftupfer	Maicell XT 4 x 5 cm	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland
Konische Röhrchen	BD Falcon 50 mL	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
	BD Falcon 15 mL	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Rundbodenröhrchen	BD Falcon 5 mL	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Eppendorfgefäße	Reagiergefäße 1,5 mL mit anhängendem Deckel, farblos	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
Gefäße zur Antikörperlagerung	T341-2TBR Micrewtube for light sensitive material 0,5 mL, self-standing	Simport Scientific Inc., Belœil, Québec, Kanada
Schraubverschlüsse für Gefäße zur Antikörperlagerung	T340BROSFT Colored Closures	Simport Scientific Inc., Belœil, Québec, Kanada

Gefäße zur Kryokonservierung von PBMCs	Cryo Tubes, 1,8 mL, internal thread, round bottom, starfoot, free standing	Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA
Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen, Rundboden, mit Deckel	96-well Microtest plate	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Tabelle 3: Einwegmaterial

2.2.3 Lösungen, Reagenzien und Chemikalien

Substanz	Typ/Bezeichnung	Firma
Zellkulturmedium	RPMI-1640	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Bayern, Deutschland
DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) Pufferlösung	DPBS without Magnesium, without Calcium, sterile filtered	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Bayern, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Dimethyl sulfoxide, research grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Baden-Württemberg, Deutschland
L-Glutamin	L-Glutamine 200 mM	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) Puffer	Hepes Buffer (1 M)	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Trennlösung	Biocoll separating solution	Biochrom AG, Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Deutschland
Hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS)	Fetal calf serum	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Humanserum	gepooltes Serum AB positiver, erwachsener Männer	Institut für Transfusionsmedizin, Suhl, Deutschland
Humanalbumin	Human Albumin 200 g/L	Baxter International, Deerfield, Illinois, USA
BSA (Bovines Serumalbumin)	MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nordrhein-Westfalen,

		Deutschland
Farbstoff	Trypanblau 0,5 % in physiologischer Kochsalzlösung	Biochrom AG, Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Deutschland
Ethanol	Ethanol 96 %	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Deutschland
PHA (Phytohämagglutinin)	Phytohemagglutinin-L (PHA-L) from <i>Phaseolus vulgaris</i>	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, USA
SEB (Staphylokokken-Enterotoxin B)	Staphylococcal enterotoxin B from <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, USA
IL-2 (Interleukin-2)	Proleukin S	Novartis, Basel, Basel-Stadt, Schweiz
Monensin Natriumsalz	Monensin sodium salt	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, USA
Brefeldin A	Brefeldin A from <i>Penicillium brefeldianum</i>	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	DMSO, anhydrous	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
FcR-Block (Fc-Rezeptor-Block)	FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
FACS Trägerlösung	FACS Flow Sheath Fluid	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FACS Spüllösung	FACS Rinse Solution	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FACS Reinigungslösung	FACS Clean Solution	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
EDTA	EDTA (0,5 M), pH 8,0	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Formaldehyd	Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Baden-Württemberg,

		Deutschland
--	--	-------------

Tabelle 4: Lösungen, Reagenzien und Chemikalien

2.2.4 Standardlösungen

Lösung	Zusammensetzung
Kultur-Medium	RPMI 1640 mit 10 % FCS, L-Glutamin (0,2 mM) und Hepes (0,01 mM)
Golgi-Stopp-Lösung	RPMI 1640 mit 10 µg/mL BFA und Monensin (25 µM)
FACS-Puffer	DPBS mit 0,5 % BSA und EDTA (2 mM)
FACS-Fixierungspuffer	FACS-Puffer mit 2 % Formaldehyd

Tabelle 5: Standardlösungen

2.2.5 Kits

Kit	Firma
T _{reg} Detection Kit (APC), human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	Qiagen N.V., Venlo, Limburg, Niederlande
Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit, for flow cytometry	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Tabelle 6: Kits

2.2.6 Antikörper

Spezifität	Subtyp	Farbe	Klon	Firma
CD3	Maus-IgG1, κ	PerCP-Cy5.5	SK7	eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
CD3	IgG1, κ	APC	UCHT1	eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
CD4	Maus-IgG1, κ	FITC	SK-3	eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc.,

				Waltham, Massachusetts, USA
CD4	Maus-IgG1, κ	PerCP-Cy5.5	RPA-T4	eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
CD8	Maus-IgG1, κ	PE	RPA-T8	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD8	Maus-IgG1, κ	PerCP-Cy5.5	RPA-T8	eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
CD16	IgG1, κ	FITC	3G8	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD25	IgG2b	PE	4E3	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
CD56	IgG1, κ	PE	B159	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD56	IgG1, κ	PE	HCD56	BioLegend, San Diego, California, USA
CD69	Maus-IgG1	APC	FN50	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
CD127	Maus-IgG1	PerCP-Cy5.5	eBioRDR5	eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
CD335	Maus-IgG1	APC	9E2	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
FoxP3	Maus-IgG1	APC	3G3	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nordrhein-Westfalen, Deutschland

IFN γ	IgG2b, κ	FITC	25723.11	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Iso	Maus-IgG1, κ	FITC	11-4714	eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Iso	Maus-IgG1, κ	FITC	MOPC-21	BioLegend, San Diego, California, USA
Iso	Maus-IgG2b, κ	FITC	MPC-11	BioLegend, San Diego, California, USA
Iso	Maus- IgG1, κ	PE	-	eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Iso	Maus-IgG1, κ	PE	MOPC-21	BioLegend, San Diego, California, USA
Iso	Maus-IgG2a, κ	PE	RTK2758	BioLegend, San Diego, California, USA
Iso	IgG2b, κ	PE	-	eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Iso	IgG1, κ	PerCP-Cy5.5	-	eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Iso	IgG1, κ	APC	P.3.6.2.1	eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 7: Antikörper

2.2.7 Software

Programm	Firma
Cell Quest Pro, Version 4.0.2	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FlowJo, Version 8.8.6	Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA
Microsoft Word, Version 2010	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

Microsoft Excel, Version 2010	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
IBM SPSS Statistics, Version 24	IBM, Armonk, New York, USA

Tabelle 8: Software

2.3 Methoden

2.3.1 Dichtegradientenzentrifugation

Grundlage der Versuche der vorliegenden Studie waren mononukleäre Zellen des peripher-venösen Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) von AML-Patienten und gesunden Spendern. Die PBMCs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation innerhalb von maximal 24 Stunden nach der Blutentnahme aus zur Gerinnungshemmung mit Lithium-Heparin versetztem Blut isoliert. Hierfür wurden jeweils 12 mL der Ficoll-Separationslösung mit 25 mL einer 1:1-Mischung aus heparinisiertem Blut und phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS) überschichtet und mit geringer Beschleunigung sowie ohne anschließendes Abbremsen bei 2000 Umdrehungen/Minute für 30 Minuten zentrifugiert. Bei der entstehenden Vierschichtung handelt es sich von oben nach unten um die Plasma/PBS-Phase, PBMCs (*Buffy Coat*), Ficoll-Lösung sowie Sediment aus Erythrozyten, Granulozyten und Zelldebris (Abbildung 4). Die PBMCs wurden vorsichtig abpipettiert, Reste der zytotoxischen Ficoll-Lösung wurden durch drei Waschschrte mit Zellkultur-Medium entfernt. Die Zählung der PBMCs erfolgte lichtmikroskopisch manuell mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

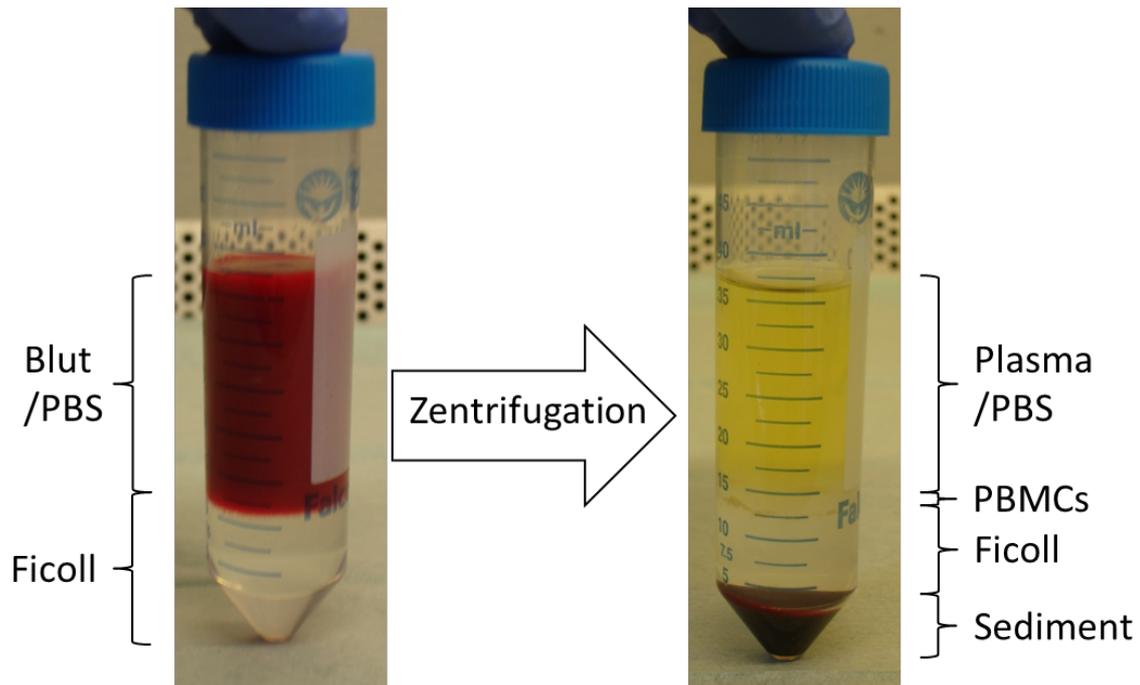


Abbildung 4: Dichtegradientenzentrifugation

Ficoll-Lösung wird mit einer 1:1-Mischung aus heparinisiertem Blut und PBS überschichtet und anschließend zentrifugiert. Bei der entstehenden Vierschichtung handelt es sich von oben nach unten um die Plasma/PBS-Phase, PBMCs (Buffy coat, im dargestellten Fall aufgrund der Leukopenie des Patienten nur wenige weißliche Agglutinate zwischen der Plasma/PBS-Phase und der Ficoll-Lösung), Ficoll-Lösung sowie Sediment aus Erythrozyten, Granulozyten und Zelldebris.

2.3.2 Kryokonservierung

Nicht unmittelbar benötigte Zellen wurden bei -80 °C kryokonserviert. Hierfür wurden die PBMCs nach der Dichtegradientenzentrifugation und den drei anschließenden Waschschritten in einer Konzentration von $1,25\text{--}2,5 \times 10^7$ Zellen/mL in 100 % FCS (*Fetal Calf Serum*, fetales Kälberserum) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 1,8 mL Kryokonservierungsröhrchen überführt. In einem Verhältnis von 1:1 wurde Freeze-Medium bestehend aus FBS mit 20 % DMSO (Dimethylsulfoxid) zur Zellsuspension gegeben. Die Kryokonservierungsröhrchen wurden in einem Gefrierbehälter kontrolliert um 1 °C/Minute auf -80 °C abgekühlt. Die Proben wurden als Reserve bis zur Auswertung aller Daten gelagert.

2.3.3 Differentialblutbild

Zur Bestimmung absoluter Zellzahlen wurden Differentialblutbilder in der Abteilung für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München angefertigt.

2.3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, im Englischen *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) genannt, ist eine Methode um die Größe, Granularität sowie Expression verschiedener Antigene einzelner Zellen zu untersuchen. Hierzu werden die Zellen in eine Einzelzellsuspension gebracht und in dieser an Lasern vorbeigeführt. Die beim Kontakt der Laserstrahlen mit den Zellen entstehende Streustrahlung wird von Detektoren erfasst. Unterschiede in Größe und Granularität verschiedener Zellarten verursachen unterschiedliche Signale. Damit können die diversen Zellpopulationen des Blutes in einem Diagramm, in dem die Zellgröße – in der Terminologie der Durchflusszytometrie als „*Forward Scatter*“ (FSC) bezeichnet – gegen die Granularität – als „*Side Scatter*“ (SSC) bezeichnet – aufgetragen wird, voneinander abgegrenzt werden. Neben FSC und SSC können die Detektoren eines Durchflusszytometers auch die Emissionen von Fluoreszenzfarbstoffen erfassen. Durch Kopplung dieser Farbstoffe an Antikörper, welche wiederum an Antigene auf der Zelloberfläche oder Antigene im Zellinneren binden, können Zellen „gefärbt“ werden. Zellen, die ein bestimmtes Antigen exprimieren („gefärbte“ Zellen), können so mit Hilfe der Durchflusszytometrie von Zellen, die dieses Antigen nicht exprimieren („ungefärbten“ Zellen), unterschieden werden.

Für die im Anschluss an die Färbung der Zellen durchgeführte FACS-Analyse wurden in der vorliegenden Untersuchung ein *FACSCalibur* Durchflusszytometer (Becton, Dickinson and Company) und die Software *CellQuest* (Becton, Dickinson and Company) verwendet. Die Postakquisitionsanalyse erfolgte mit Hilfe der Software *FlowJo* (Tree Star).

2.3.5 Immunphänotypisierung

Zur Immunphänotypisierung wurden die Anteile verschiedener Subpopulationen an den vor und während der Erhaltungstherapie im peripheren Blut zirkulierenden PBMCs bestimmt. Hierfür wurden Zelloberflächenantigene und intrazelluläre Antigene mit an Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurden die PBMCs zunächst für mindestens 5 Minuten bei 4 °C in Anwesenheit eines Fc-Rezeptor-Antikörpers inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung während des folgenden Färbeprozesses zu verhindern. Nach einem Waschschrift wurden die PBMCs auf 4

Aliquots zu je 3×10^5 Zellen und ein Aliquot zu 5×10^5 Zellen aufgeteilt, letzteres für die T_{reg} -Färbung. Anschließend wurden die aliquotierten PBMCs für 10 Minuten in Anwesenheit von an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gegen folgende Oberflächenantigene bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert: CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD127 und CD335 (NKp46). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen, welche ausschließlich auf Oberflächenmarker analysiert wurden, für die FACS-Analyse fixiert und in FACS-Puffer aufgenommen. Das Aliquot, in welchem der Anteil regulatorischer T-Zellen bestimmt werden sollte, wurde entsprechend den Herstellerangaben mit Hilfe des *T_{reg} Detection Kits* der Firma Miltenyi Biotec weiterverarbeitet. Die Zellen wurden einem Permeabilisierungsprozess unterzogen, anschließend in Anwesenheit eines fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpers gegen das intrazelluläre Antigen FoxP3 für 10 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, dann fixiert und in FACS-Puffer aufgenommen. Je Ansatz wurde ein PBMC-Aliquot mit den verwendeten Antikörpern entsprechenden Isotypkontrollen (unspezifische, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antikörper desselben Isotyps) inkubiert, um als Referenz für die FACS-Analyse zu dienen.

2.3.6 T-Cell-Proliferation Assay

Die Proliferationskapazität von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wurde mit Hilfe eines *T-Cell-Proliferation Assay* ermittelt. Hierfür wurde nach den Herstellerangaben des *CFSE Cell Proliferation Kits* der Firma Invitrogen/Thermo Fisher Scientific verfahren. Es wurden 3×10^6 PBMCs nach der Dichtegradientenzentrifugation in PBS, versetzt mit 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA), resuspendiert und in Anwesenheit von 2,5 mM CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) zunächst für 10 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz eisgekühltes Medium hinzugefügt und die entstehende Lösung für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in der Folge dreimal mit eisgekühltem Medium gewaschen und in Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, versetzt mit 10 % FCS, 0,2 mM Glutamin und 0,01 mM Hepes, aufgenommen. Die mit CFSE gefärbten Zellen wurden in Anwesenheit von $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ Phytohämagglutinin (PHA) oder $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) für 7 Tage bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 5 % CO_2 -Atmosphäre in einer Rundboden-96-Lochplatte inkubiert. Mit CFSE gefärbte Zellen, welche ohne PHA oder SEB, ebenfalls für 7 Tage, unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Die geernteten

Zellen wurden, wie unter 2.3.5 beschrieben, einer Färbung mit gegen die Zelloberflächenantigene CD3, CD4 und CD8 gerichteten, fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern unterzogen.

2.3.7 Cytometric Bead Array

In den Überständen des *T-Cell-Proliferation Assay* mit PHA-Stimulation wurden mit einem *Cytometric Bead Array* (CBA) die Konzentrationen der Zytokine IL-2 (Interleukin-2), IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF α (Tumornekrosefaktor alpha) und IFN γ (Interferon gamma) bestimmt. Der Assay beruht auf folgendem Prinzip: Beads (mikroskopisch kleine Kugeln) unterschiedlicher Größe sind mit spezifischen Antikörpern gegen die oben genannten Zytokine beschichtet. Wird die Mischung aus Überständen und Beads zusammen mit Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Antikörpern, welche sich ebenfalls gegen die oben genannten Zytokine richten, inkubiert, formen sich sogenannte *Sandwich*-Komplexe, bestehend aus Bead, Zytokin und PE. Durchflusszytometrisch werden die Größe der Beads (Zuordnung zu einem der oben genannten Zytokine) und die Fluoreszenzintensität (Indikator für die Konzentration des Zytokins in der Probe) detektiert. Eichkurven, welche mit Verdünnungsreihen von Standard-Lösungen mit bekannter Zytokinkonzentration generiert werden, dienen als Bezugsgröße.

Während der 7-tägigen Kulturzeit des *T-Cell-Proliferation Assay* mit PHA-Stimulation wurden 48 Stunden nach Stimulationsbeginn die Überstände der Zellkulturen abgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Prozessierung kryokonserviert. Nach dem langsamen Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Überstände gemäß den Hersteller-Instruktionen des *Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kits* der Firma Becton, Dickinson and Company verfahren. Nach Rekonstitution des Standardzytokinlyophilisates wurden Verdünnungen der Lösung angefertigt. Die Capture Bead Suspensionen wurden gemischt. Sowohl die Verdünnungen der Standardlösung als auch die Überstände wurden nun für 3 Stunden in Anwesenheit der Capture Bead Suspension und der PE Detection Lösung inkubiert. Nach dem Setup der Geräteeinstellungen gemäß Herstellerangaben erfolgte die durchflusszytometrische Datenakquisition. Durch Korrelation mit den anhand der Standardlösungen ermittelten Eichkurven wurden die Zytokinkonzentrationen in den Überständen des *CFSE-Proliferation Assay* mit PHA-Stimulation ermittelt.

2.3.8 NK-Cell-Activation Assay

Die Aktivierbarkeit von NK-Zellen wurde mittels eines *NK-Cell-Activation Assay* ermittelt. Hierfür wurden 2×10^6 PBMCs nach der Dichtegradientenzentrifugation in Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, versetzt mit 10 % FBS, 0,2 mM Glutamin und 0,01 mM HEPES, aufgenommen. Die PBMCs wurden in Anwesenheit von 500 U/mL IL-2 für 24 Stunden in diesem Kulturmedium bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre in einer Rundboden-96-Lochplatte inkubiert. PBMCs, welche in Abwesenheit von IL-2 ebenfalls für 24 Stunden unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. 4 Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurde den Kulturen eine Golgi-Stopp-Lösung, bestehend aus Monensin 25 µmol/L und Brefeldin A 10 µg/mL, zugesetzt. Die geernteten Zellen wurden – wie unter 2.3.5 beschrieben – einer Färbung mit antikörpergekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen unterzogen; die Antikörper richteten sich gegen die Zelloberflächenantigene CD3, CD56 und CD69. Zudem wurde eine intrazelluläre IFN γ -Färbung durchgeführt. Hierfür wurde das *Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit* der Firma Becton, Dickinson and Company gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden einem Fixierungs- und Permeabilisierungsprozess unterzogen, anschließend in Anwesenheit eines fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpers gegen intrazelluläres IFN γ für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann in FACS-Puffer aufgenommen. Je Ansatz wurde ein PBMC-Aliquot mit den verwendeten Antikörpern entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert, um als Referenz für die FACS-Analyse zu dienen.

2.3.9 DNS-Isolierung und Methylation Assay

Als Vergleichsmethode für die Bestimmung der T_{reg}-Zellzahlen wurde ein *DNA-Methylation Assay* herangezogen. Der Assay beruht auf der Detektion eines spezifisch in T_{reg}-Zellen demethylierten Abschnittes des FoxP3-Gens (TSDR = *T_{reg} Specific Demethylated Region*). Aktivierte CD4⁺ T-Zellen, welche das FoxP3-Gen transient exprimieren, jedoch nicht das typische Demethylierungsmuster aufweisen, werden mit dieser Methode nicht erfasst [73].

Für diesen Assay wurde mit Hilfe des *QIAamp DNA Blood Mini Kits* der Firma Qiagen genomische DNS aus heparinisiertem, peripherem Vollblut isoliert. Das Blut wurde nach der Entnahme bei -20 °C kryokonserviert. Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurde nach den Hersteller-Instruktionen des Kits verfahren.

Zunächst wurden 200 µL Blut mit Proteinase K und einem Lyse-Puffer inkubiert um die DNS aus den kernhaltigen Blutzellen freizusetzen. Durch Ethanol 96 % wurde der pH-Wert der Lösung optimiert für die Bindung von DNS an die Siliciumdioxid-Membran der Spin-Säulen. Nach Beladen der Säulen wurden Zellfragmente und andere Rückstände durch zwei Waschschrirte entfernt. Die membrangebundene DNS wurde schließlich durch destilliertes Wasser eluiert.

Die DNS-Konzentration in den Proben wurde mittels *NanoDrop* Spectrophotometer der Firma NanoDrop Technologies bestimmt. Die weitere Analyse der Proben mittels *DNA-Methylation Assay* wurde von der Firma Epiontis durchgeführt.

2.3.10 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm *SPSS Statistics* 24 der Firma IBM. Die Angaben entsprechen arithmetischen Mittelwerten \pm Standardfehlern dieser Mittelwerte. Um die statistische Signifikanz von Unterschieden zu bestimmen, wurde bei verbundenen Stichproben der *Wilcoxon-Signed-Rank-Test*, bei unverbundenen Stichproben der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet. Bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurde ein Unterschied als statistisch signifikant gewertet (gekennzeichnet mit „*“), bei einem p-Wert von $< 0,01$ als statistisch hoch signifikant (gekennzeichnet mit „**“).

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Veränderungen, welche sich auf der Ebene der Zellzahl und Zellfunktion wichtiger Akteure des Immunsystems bei erwachsenen AML-Patienten während der Erhaltungstherapie abspielen, zu beleuchten. Zu diesem Zweck wurde peripher-venöses Blut von insgesamt 18 AML-Patienten und 18 gesunden Spendern (*Healthy Donors*, HD) untersucht. Die Ergebnisse bezüglich Zahl und Funktion der beobachteten Zellpopulationen von AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus werden im Folgenden den Ergebnissen der Untersuchung gesunder Spender gegenüber- sowie im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus dargestellt.

3.1 Die Zahlen verschiedener Lymphozytensubpopulationen unterscheiden sich zum Teil zwischen AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus und gesunden Spendern

Zur Quantifizierung verschiedener Lymphozytensubpopulationen wurde bei 13 AML-Patienten (# 1–13) vor Beginn eines oder mehrerer Erhaltungstherapiezyklen peripher-venöses Blut entnommen. Aus den Daten der untersuchten Erhaltungstherapiezyklen wurden Mittelwerte gebildet ohne zwischen verschiedenen Erhaltungstherapiezyklen zu unterscheiden. Außerdem wurden Blutproben 6 gesunder Spender untersucht. Mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden die PBMCs aus den Blutproben separiert. Nach Markierung der Zellen mit gegen T- und NK-Zell-Oberflächenmoleküle gerichteten Antikörpern erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Um die absoluten Zellzahlen der untersuchten Lymphozytensubpopulationen zu berechnen, wurden die relativen Zellzahlen mit den absoluten Lymphozytenzahlen aus dem maschinell angefertigten Differentialblutbild multipliziert. Die Ergebnisse sind in Form von Säulendiagrammen dargestellt; Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte. Unterschiede wurden als statistisch signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$, als statistisch hoch signifikant, wenn $p < 0,01$ war. Statistisch signifikante Unterschiede bzw. statistisch hoch signifikante Unterschiede sind mit „*“ bzw. „**“ gekennzeichnet.

3.1.1 Die Zahl der T-Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern

T-Zellen tragen definitionsgemäß den T-Zell-Rezeptorkomplex auf ihrer Oberfläche. Das Molekül CD3 wird als Teil dieses T-Zell-Rezeptorkomplexes von allen T-Zellen auf deren Zellmembran präsentiert [74]. Die absoluten Zahlen der CD3⁺ Zellen, d.h. der T-Zellen, waren in der vorliegenden Studie bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus im Vergleich zu gesunden Spendern statistisch signifikant reduziert (1,00 G/L gegenüber 1,40 G/L; $p = 0,046$; Abbildung 5).

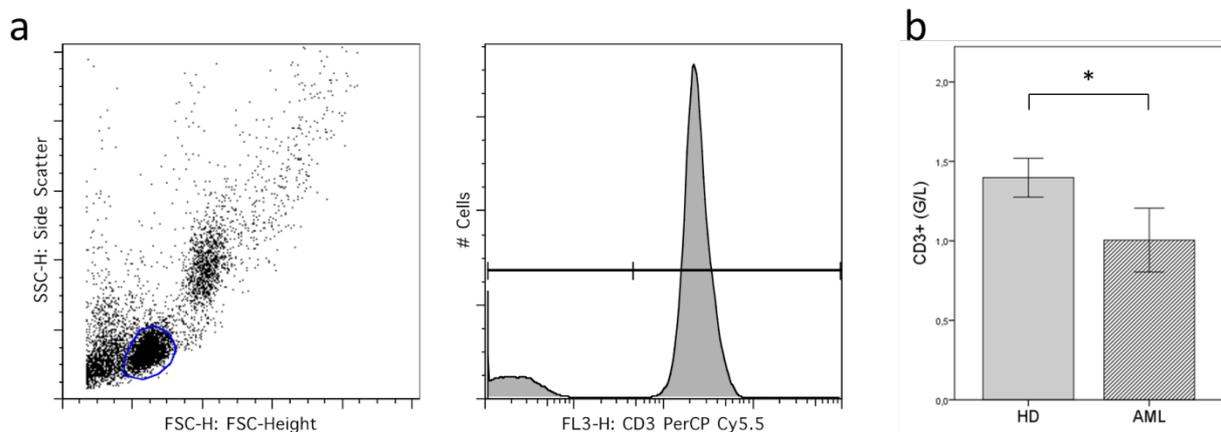
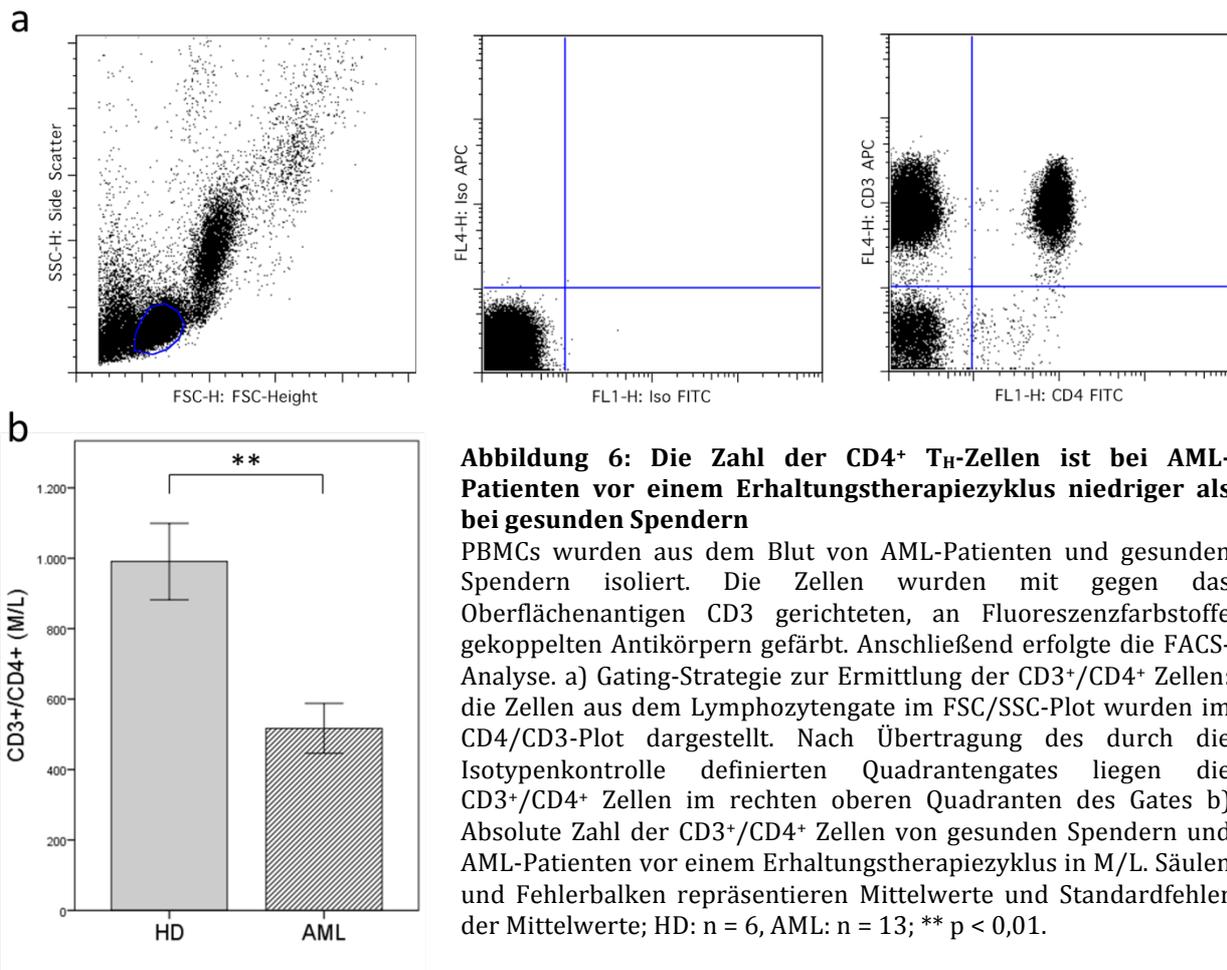


Abbildung 5: Die Zahl der T-Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen das Oberflächenantigen CD3 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. a) Gating-Strategie zur Ermittlung der CD3⁺ Zellen: die Zellen aus dem Lymphozytengate im FSC/SSC-Plot wurden im CD3-Histogramm dargestellt. Die CD3⁺ Zellen liegen im rechten Abschnitt des Gates. b) Absolute Zahl der CD3⁺ Zellen von gesunden Spendern und AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus in G/L. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren arithmetische Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte; HD: $n = 6$, AML: $n = 13$; * $p < 0,05$.

3.1.1.1 Die Zahl der CD4⁺ T_H-Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern

Die beiden größten Subpopulationen der peripheren T-Lymphozyten sind CD4⁺ T_H-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. T_H-Zellen machen etwa 28–58 % der Gesamtpopulation peripher zirkulierender T-Lymphozyten aus [75]. AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus wiesen in der vorliegenden Untersuchung im Vergleich zu gesunden Spendern eine hoch signifikant verminderte absolute Zahl an CD4⁺ T-Zellen auf (517 M/L gegenüber 991 M/L; $p = 0,001$; Abbildung 6).



3.1.1.2 Die Zahl der T_{reg}-Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern

Die Oberflächenproteine CD4, CD25 und CD127 sowie der intrazellulär lokalisierte Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) sind, neben anderen, etablierte Markermoleküle regulatorischer T-Zellen [76–78]. Allerdings existiert keine einheitliche Definition des Phänotyps regulatorischer T-Zellen. Berücksichtigt man nur diese vier Oberflächenmoleküle, führt die Kombination aller vier Marker zur spezifischsten Definition von T_{reg}-Zellen als CD4⁺/CD25^{high}/CD127^{low}/FoxP3⁺ Zellen. Bei gesunden Individuen können laut früheren Untersuchungen etwa 8–10 % der peripher zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe dieser Markerkombination als T_{reg}-Zellen identifiziert werden [77]. Abhängig davon, welche T_{reg}-Zellmarker für die Analyse verwendet wurden, ergaben sich in der vorliegenden Untersuchung mehr oder weniger große Unterschiede zwischen AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus und gesunden Spendern. Betrachtet man nur die Oberflächenmarker CD4 und CD25, d.h. CD4⁺/CD25^{high} Zellen, war der Unterschied statistisch nicht signifikant (36,5 M/L vs.

51,6 M/L, $p = 0,058$; Abbildung 7.1). Es ergaben sich auch dann keine statistisch signifikanten Unterschiede, wenn entweder der Oberflächenmarker CD127 oder der intrazelluläre Marker FoxP3 in die Analyse mit einbezogen wurde (42,4 M/L gegenüber 60,2 M/L, $p = 0,087$ bzw. 31,7 M/L gegenüber 43,1 M/L, $p = 0,106$; Abbildung 7.2). Bei gleichzeitiger Betrachtung aller vier Marker zeigten sich die T_{reg} -Zellzahlen bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern jedoch hoch signifikant vermindert (13,4 M/L gegenüber 26,1 M/L; $p = 0,009$; Abbildung 7.1).

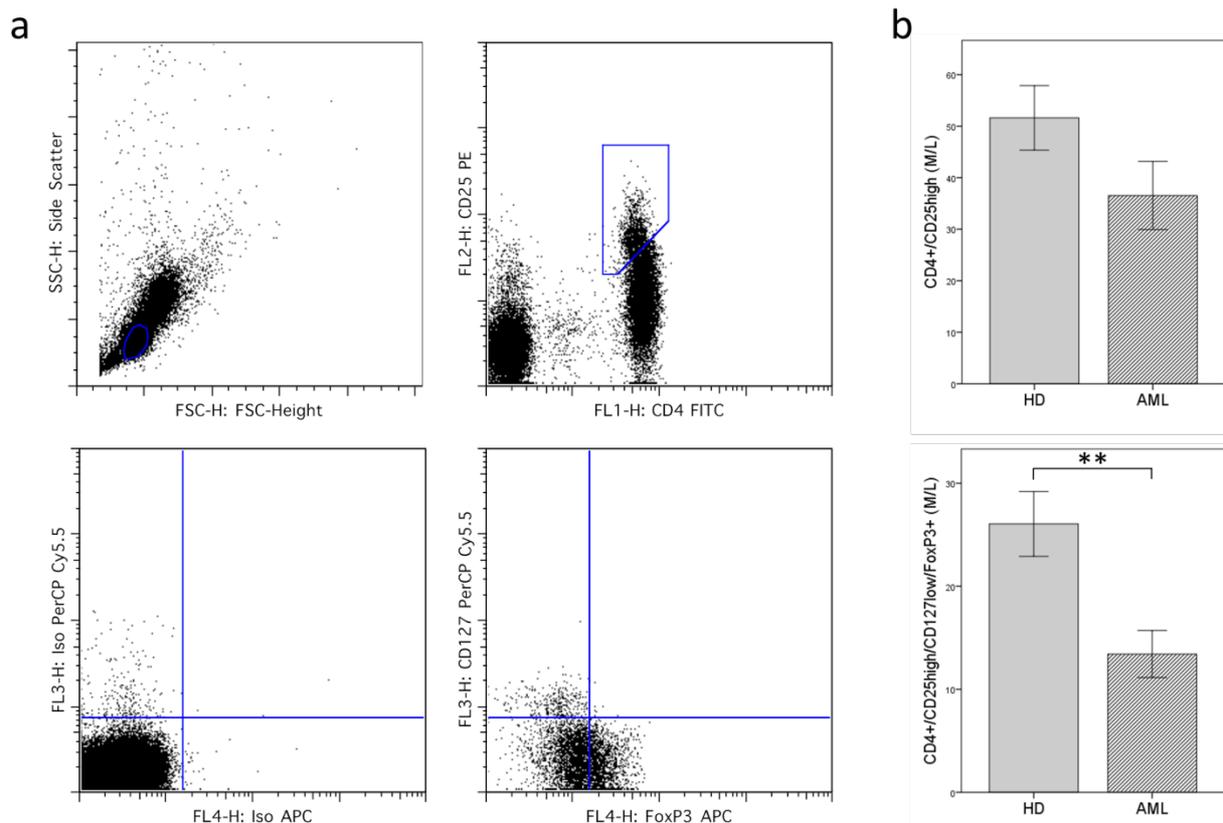


Abbildung 7.1 Die Zahl der $CD4^+/CD25^{high}$ und der $CD4^+/CD25^{high}/CD127^{low}/FoxP3^+$ Zellen sind bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen die Oberflächenantigene CD4, CD25 und CD127 sowie gegen das intrazelluläre Antigen FoxP3 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. a) Gating-Strategie zur Ermittlung der $CD4^+/CD25^{high}$ und der $CD4^+/CD25^{high}/CD127^{low}/FoxP3^+$ T_{reg} -Zellen: die Zellen aus dem Lymphozytengate im FSC/SSC-Plot wurden im CD4/CD25-Plot dargestellt. Um die $CD4^+/CD25^{high}$ Zellen wurde nach Augenmaß ein Gate gelegt, die Zellen innerhalb des Gates wurden im FoxP3/CD127-Plot dargestellt. Nach Übertragung des durch die Isotypenkontrolle definierten Quadrantengates liegen die $CD4^+/CD25^{high}/CD127^{low}/FoxP3^+$ Zellen im rechten unteren Quadranten des Gates. b) Absolute Zahl der $CD4^+/CD25^{high}$ Zellen und der $CD4^+/CD25^{high}/FoxP3^+$ Zellen von gesunden Spendern und AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus in M/L. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte; HD: $n = 6$, AML: $n = 13$; ** $p < 0,01$.

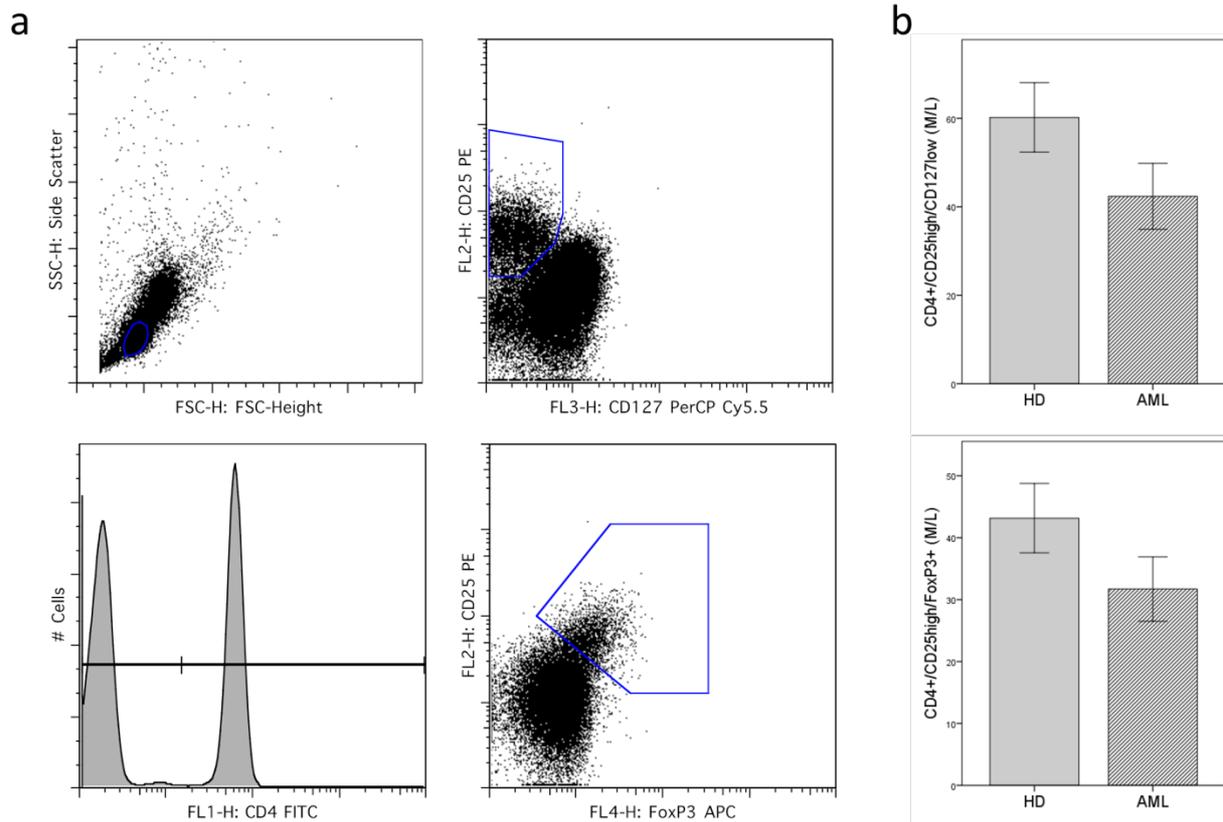


Abbildung 7.2: Die Zahl der CD4⁺/CD25^{high}/CD127^{low} und der CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen die Oberflächenantigene CD4, CD25 und CD127 sowie gegen das intrazelluläre Antigen FoxP3 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. a) Gating-Strategie zur Ermittlung der CD4⁺/CD25^{high}/CD127^{low} und der CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen: die Zellen aus dem Lymphozytengate im FCS/SSC-Plot wurden im CD4-Histogramm dargestellt. Die CD4⁺ Zellen wurden zum einen im CD127/CD25-Plot dargestellt. Nach Augenmaß wurde um die CD4⁺/CD25^{high}/CD127^{low} Zellen ein Gate gelegt. Die CD4⁺ Zellen wurden zum anderen im FoxP3/CD25-Plot dargestellt. Um die CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺ Zellen wurde wiederum nach Augenmaß ein Gate gelegt. b) Absolute Zahl der CD4⁺/CD25^{high}/CD127^{low} Zellen und der CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺ Zellen von gesunden Spendern und AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus in M/L. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte; HD: n = 6, AML: n = 13.

3.1.1.3 Die Zahl der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen unterscheidet sich nicht zwischen AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus und gesunden Spendern

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen machen etwa 19–48 % der Gesamtpopulation peripher zirkulierender T-Lymphozyten aus [75]. In der vorliegenden Untersuchung fanden sich bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus tendenziell höhere absolute Zellzahlen als bei gesunden Spendern, allerdings war der gemessene Unterschied statistisch nicht signifikant (373 M/L gegenüber 231 M/L; p = 0,579; Abbildung 8).

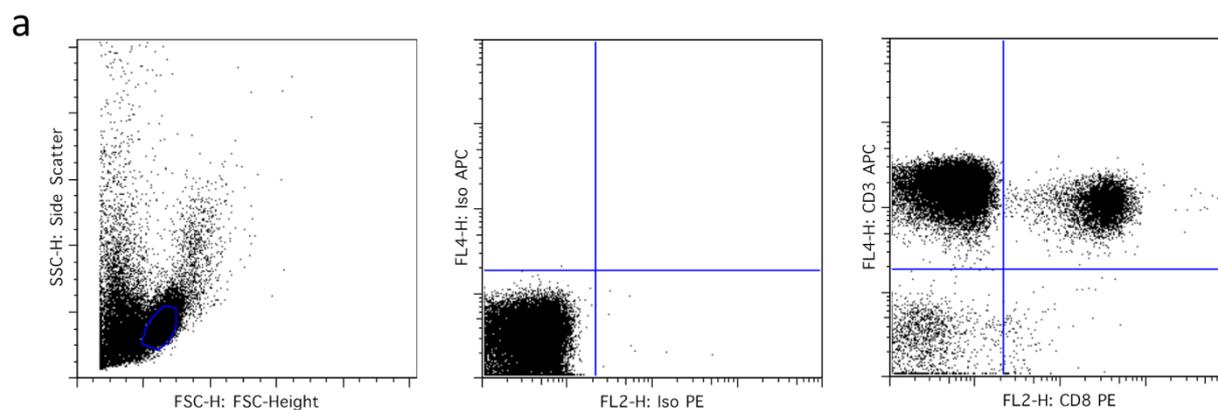


Abbildung 8: Die Zahl der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen unterscheidet sich nicht zwischen AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus und gesunden Spendern

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen das Oberflächenantigen CD3 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. a) Gating-Strategie zur Ermittlung der CD3⁺/CD8⁺ Zellen: die Zellen aus dem Lymphozytengate im FSC/SSC-Plot wurden im CD8/CD3-Plot dargestellt. Nach Übertragung des durch die Isotypenkontrolle definierten Quadrantengates liegen die CD3⁺/CD8⁺ Zellen im rechten oberen Quadranten des Gates b) Absolute Zahl der CD3⁺/CD8⁺ Zellen von gesunden Spendern und AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus in M/L. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte; HD: n = 6, AML: n = 13.

3.1.1.4 Die CD4/CD8-Ratio ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern

Entsprechend der verminderten Zahl der T_H-Zellen und der tendenziell höheren Zahl der zytotoxischen T-Zellen bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus im Vergleich zu gesunden Spendern war der CD4/CD8-Quotient in der vorliegenden Studie bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus statistisch signifikant niedriger als bei gesunden Spendern (2,33 gegenüber 3,51; p = 0,042; Abbildung 9).

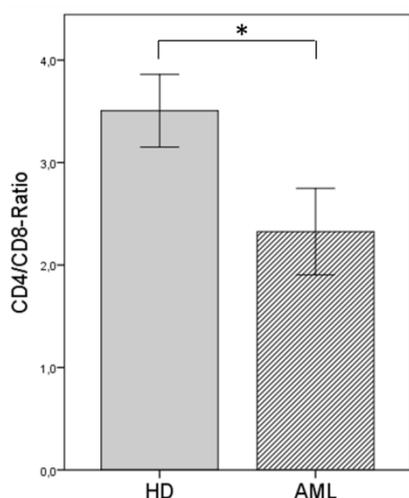


Abbildung 9: Die CD4/CD8-Ratio ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen die Oberflächenantigene CD3, CD4 und CD8 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Dargestellt ist die CD4/CD8-Ratio. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte; HD: n = 6, AML: n = 13; * p < 0,05.

3.1.2 Die Zahl der CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ NK-Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern

NK-Zellen sind charakterisiert als CD3⁻/CD56⁺ Zellen und machen etwa 15 % der peripheren Lymphozyten aus [79]. Die Fraktion der CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ NK-Zellen war in der vorliegenden Untersuchung bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus statistisch hoch signifikant niedriger als bei gesunden Spendern (112 M/L gegenüber 349 M/L; $p = 0,001$; Abbildung 10.1). Betrachtet man aktivierte NK-Zellen, welche CD335 auf ihrer Oberfläche präsentieren, d.h. CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺/CD335⁺ NK-Zellen, zeigt sich ein ähnlich stark ausgeprägter Unterschied (92,8 M/L gegenüber 290 M/L; $p < 0,001$; Abbildung 10.2) [80]. Bei der Betrachtung der kleineren Subpopulation der CD3⁻/CD56⁺/CD16⁻ NK-Zellen, die als weniger zytotoxisch gilt, sich jedoch durch eine stärkere Zytokinproduktion auszeichnet, fand sich kein Unterschied beim Vergleich von AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus mit gesunden Spendern (16,2 M/L gegenüber 15,5 M/L; $p = 0,898$; Abbildung 10.1) [81].

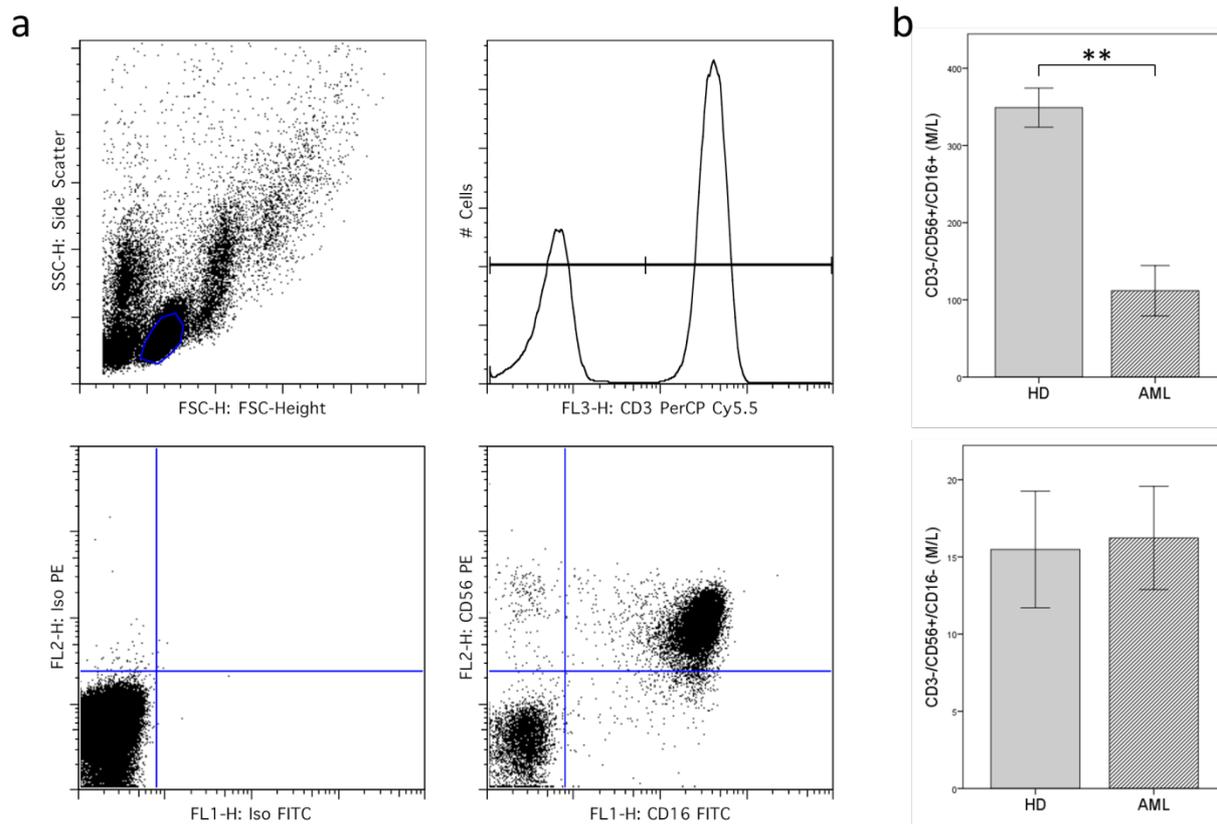


Abbildung 10.1: Die Zahl der CD3-/CD56+/CD16+ NK-Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern, die Zahl der CD3-/CD56+/CD16- NK-Zellen unterscheidet sich nicht zwischen AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus und gesunden Spendern

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen das Oberflächenantigen CD3 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. a) Gating-Strategie zur Ermittlung der NK-Zellen: die Zellen aus dem Lymphozytengate im FSC/SSC-Plot wurden im CD3 Histogramm dargestellt. Die CD3-Zellen wurden im CD16/CD56-Plot dargestellt. Nach Übertragung des durch die Isotypenkontrolle definierten Quadrantengates liegen die CD3-/CD56+/CD16+ Zellen im rechten oberen Quadranten des Gates, die CD3-/CD56+/CD16- Zellen im linken oberen Quadranten. b) Absolute Zahl der CD3-/CD56+/CD16+ Zellen und der CD3-/CD56+/CD16- Zellen von gesunden Spendern und AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus in M/L. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte; HD: n = 6, AML: n = 13; ** p < 0,01.

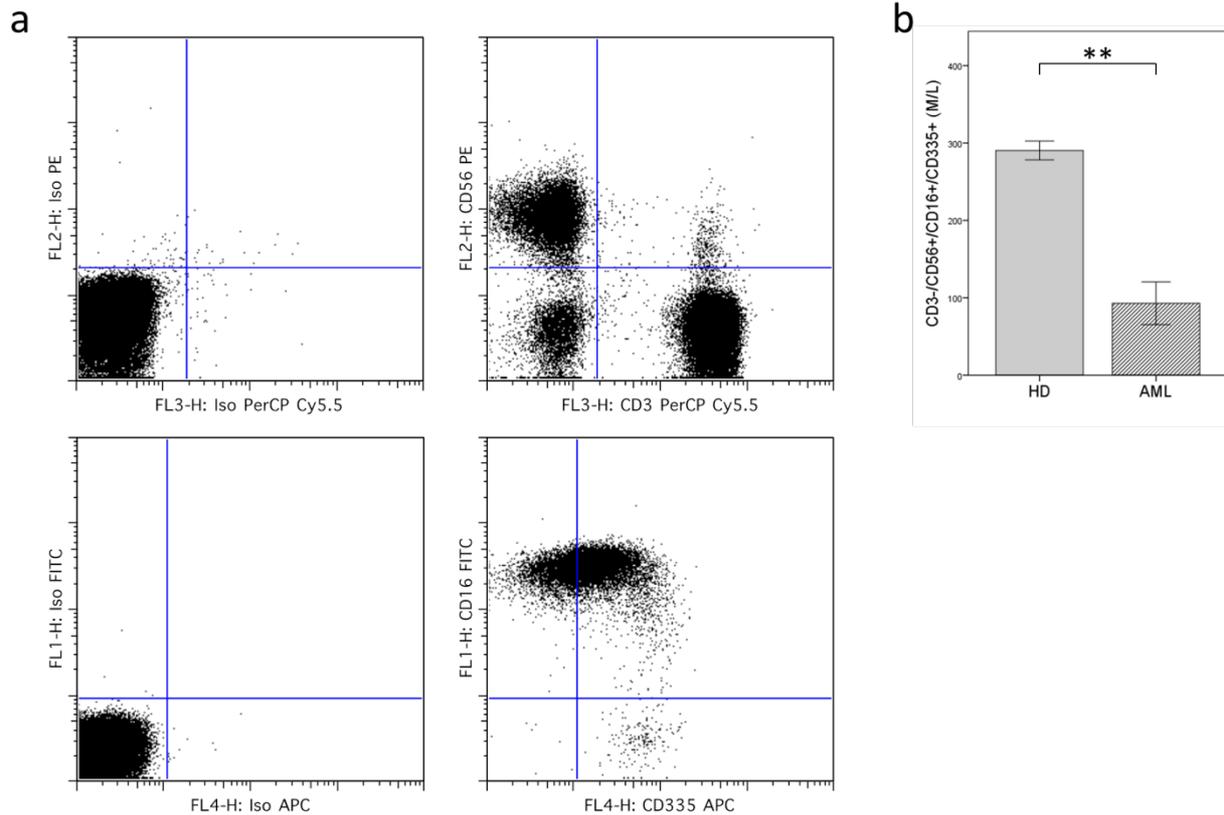


Abbildung 10.2 Die Zahl der CD3-/CD56+/CD16+/CD335+ Zellen ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus niedriger als bei gesunden Spendern

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen das Oberflächenantigen CD3 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. a) Gating-Strategie zur Ermittlung der NK-Zellen: die Zellen aus dem Lymphozytengate im FSC/SSC-Plot wurden im CD3/CD56-Plot dargestellt. Nach Übertragung des durch die Isotypenkontrolle definierten Quadrantengates liegen die CD3-/CD56+ Zellen im linken oberen Quadranten des Gates. Diese Zellen wurden im CD335/CD16-Plot dargestellt. Nach Übertragung des durch die Isotypenkontrolle definierten Quadrantengates liegen die CD3-/CD56+/CD16+/CD335+ Zellen im rechten oberen Quadranten des Gates. b) Absolute Zahl der CD3-/CD56+/CD16+/CD335+ Zellen von gesunden Spendern und AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus in M/L. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte; HD: n = 6, AML: n = 9; ** p < 0,01.

3.2 Die Leukozytenzahlen von AML-Patienten fallen während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab

Zur Bestimmung der absoluten Leukozytenzahlen wurde Blut von 18 AML-Patienten (# 1–18) vor Beginn eines oder mehrerer Erhaltungstherapiezyklen sowie – je nach Verfügbarkeit – an bis zu 5 Zeitpunkten (Tag 4 ± 2 , 9 ± 2 , 15 ± 2 , 21 ± 3 und 29 ± 3) im Verlauf eines oder mehrerer Erhaltungstherapiezyklen untersucht. Aus den Daten der untersuchten Erhaltungstherapiezyklen wurden Mittelwerte gebildet ohne zwischen verschiedenen Erhaltungstherapiezyklen zu unterscheiden. Zu den verschiedenen Testzeitpunkten liegen Werte von jeweils mindestens 13 Patienten vor. Die Anfertigung der Blutbilder erfolgte im Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der

Universität München. Der Mittelwert der absoluten Leukozytenzahlen vor einem Erhaltungstherapiezyklus lag in der vorliegenden Untersuchung mit 4,83 G/L nahe am unteren Grenzwert, aber noch innerhalb des für gesunde Individuen definierten Normbereichs (3,8–10,5 G/L) [5]. Erwartungsgemäß kam es im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus zu einem Abfall der absoluten Leukozytenzahlen im Vergleich zum ersten Zyklustag. Der Nadir der Mittelwerte der absoluten Leukozytenzahlen wurde am 21. Zyklustag erreicht und unterschied sich mit 1,35 G/L hoch signifikant vom Ausgangswert des ersten Zyklustages ($p = 0,001$). Am Zyklusende näherten sich die Leukozytenzahlen dem Ausgangsniveau von vor Zyklusbeginn wieder an (4,46 G/L an Tag 4, $p = 0,344$; 2,47 G/L an Tag 9, $p < 0,001$; 1,92 G/L an Tag 15, $p = 0,001$; 1,35 G/L an Tag 21, $p = 0,001$; 3,87 G/L an Tag 29, $p = 0,114$; Abbildung 11).

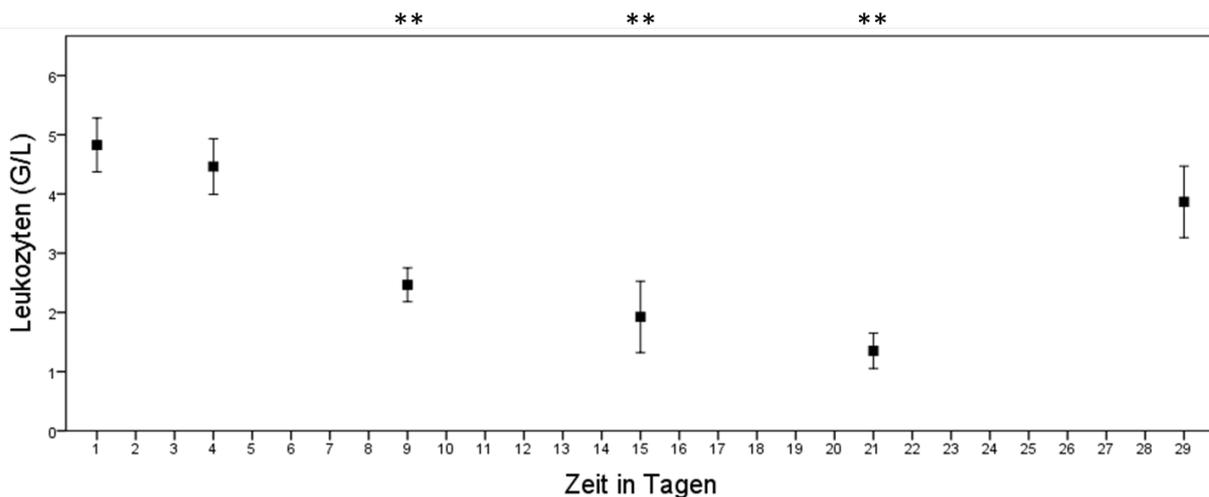


Abbildung 11: Die Leukozytenzahlen von AML-Patienten fallen während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab

Im Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München wurden Blutbilder von AML-Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während eines Erhaltungstherapiezyklus angefertigt. Dargestellt sind die Leukozytenzahlen in G/L. Schwarze Quadrate und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. Angegebene statistische Signifikanzen beziehen sich auf Unterschiede zu den am 1. Zyklustag gemessenen Werten; Tag 1: $n = 18$, Tag 4: $n = 18$, Tag 9: $n = 18$, Tag 15: $n = 17$, Tag 22: $n = 13$, Tag 29: $n = 13$; ** $p < 0,01$.

3.3 Die Lymphozytenzahlen von AML-Patienten fallen während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab

Zur Bestimmung der absoluten Lymphozytenzahlen wurde Blut von 18 AML-Patienten (# 1–18) vor Beginn eines oder mehrerer Erhaltungstherapiezyklen sowie – je nach Verfügbarkeit – an bis zu 5 Zeitpunkten (Tag 4 ± 2 , 9 ± 2 , 15 ± 2 , 21 ± 3 und 29 ± 3) im Verlauf eines oder mehrerer Erhaltungstherapiezyklen untersucht. Aus den Daten der untersuchten Erhaltungstherapiezyklen wurden Mittelwerte gebildet ohne zwischen

verschiedenen Erhaltungstherapiezyklen zu unterscheiden. Zu den verschiedenen Testzeitpunkten liegen Werte von jeweils mindestens 6 Patienten vor. Die Anfertigung der Differentialblutbilder erfolgte im Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München. Der Mittelwert der absoluten Lymphozytenzahlen vor einem Erhaltungstherapiezyklus lag in der vorliegenden Studie – ebenso wie der Mittelwert der absoluten Leukozytenzahlen – mit 1,05 G/L nahe am unteren Grenzwert, aber noch innerhalb des Normbereiches für gesunde Erwachsene (1,0–3,6 G/L) [82]. Bereits früh im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus kam es zu einem deutlichen Abfall der absoluten Lymphozytenzahlen. Der Lymphozytennadir wurde an Tag 4 gemessen; im weiteren Verlauf lagen die Lymphozytenwerte von Tag 9 bis Tag 21 auf einem relativ stabilen, erniedrigten Niveau, näherten sich jedoch an Tag 21 dem Ausgangswert von vor Zyklusbeginn wieder an (0,471 G/L an Tag 4, $p = 0,066$; 0,603 G/L an Tag 9, $p = 0,063$; 0,667 G/L an Tag 15, $p = 0,008$; 0,574 G/L an Tag 21, $p = 0,001$; 0,826 G/L an Tag 29, $p = 0,463$; Abbildung 12).

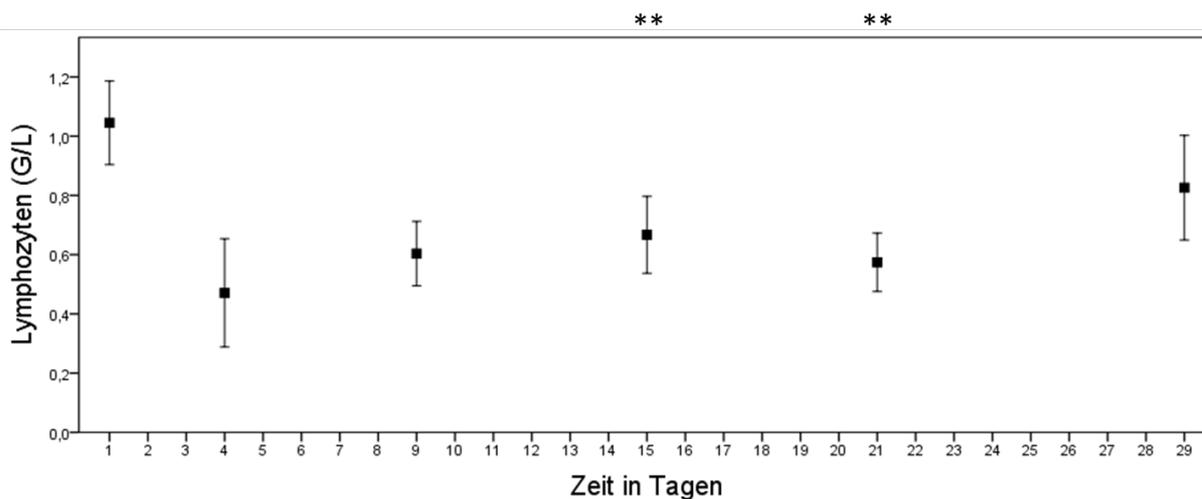


Abbildung 12: Die Lymphozytenzahlen von AML-Patienten fallen während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab

Im Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München wurden Blutbilder von AML-Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während eines Erhaltungstherapiezyklus angefertigt. Dargestellt sind die Lymphozytenzahlen in G/L. Punkte und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. Angegebene statistische Signifikanzen beziehen sich auf Unterschiede zu den am 1. Zyklustag gemessenen Werten; Tag 1: $n = 17$, Tag 4: $n = 9$, Tag 9: $n = 7$, Tag 15: $n = 12$, Tag 22: $n = 10$, Tag 29: $n = 6$; ** $p < 0,01$.

3.4 Die Zahlen der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen verhalten sich während eines Erhaltungstherapiezyklus unterschiedlich

Zur Bestimmung der relativen Zahlen der Lymphozytensubpopulationen wurde peripher-venöses Blut von 12 AML-Patienten (# 1-10, # 12 und # 13) während verschiedener Erhaltungstherapiezyklen untersucht. Aus den Daten der untersuchten Erhaltungstherapiezyklen wurden Mittelwerte gebildet ohne zwischen verschiedenen Erhaltungstherapiezyklen zu unterscheiden. Die Ergebnisse wurden den Werten 18 gesunder Spender gegenübergestellt. Mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden die PBMCs separiert. Nach Färbung der Zellen mit gegen T- und NK-Zell-Markermoleküle gerichteten, fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytensubpopulationen. Die Ergebnisse sind in Form von Punktdiagrammen dargestellt, die schwarzen Quadrate und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte der Patientendaten und Standardfehler der Mittelwerte. Die grauen Parallelen zur Abszisse repräsentieren die Mittelwerte der Zellzahlen gesunder Spender. Unterschiede wurden als statistisch signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$, als statistisch hoch signifikant, wenn $p < 0,01$ war. Statistisch signifikante Unterschiede bzw. statistisch hoch signifikante Unterschiede sind mit „*“ bzw. „**“ gekennzeichnet; markierte statistische Signifikanzen beziehen sich auf Unterschiede zum 1. Zyklustag.

3.4.1 Der Anteil der T-Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend zu

Die relativen Zellzahlen der CD3⁺ Lymphozyten, d.h. der T-Zellen, lagen in der vorliegenden Untersuchung bei AML-Patienten vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus auf einem ähnlichen Niveau wie die T-Zellzahl gesunder Spender (78,2 % gegenüber 74,4 %, $p = 0,183$). Im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus stiegen die Werte der AML-Patienten vorübergehend statistisch signifikant an, am Ende eines Zyklus lagen die Zahlen wieder im Bereich des Ausgangsniveaus von vor Zyklusbeginn (85,2 % an Tag 4, $p = 0,013$; 93,6 % an Tag 9, $p = 0,002$; 91,0 % an Tag 15, $p = 0,006$; 73,1 % an Tag 21, $p = 0,721$; 70,2 % an Tag 28, $p = 0,465$; Abbildung 13).

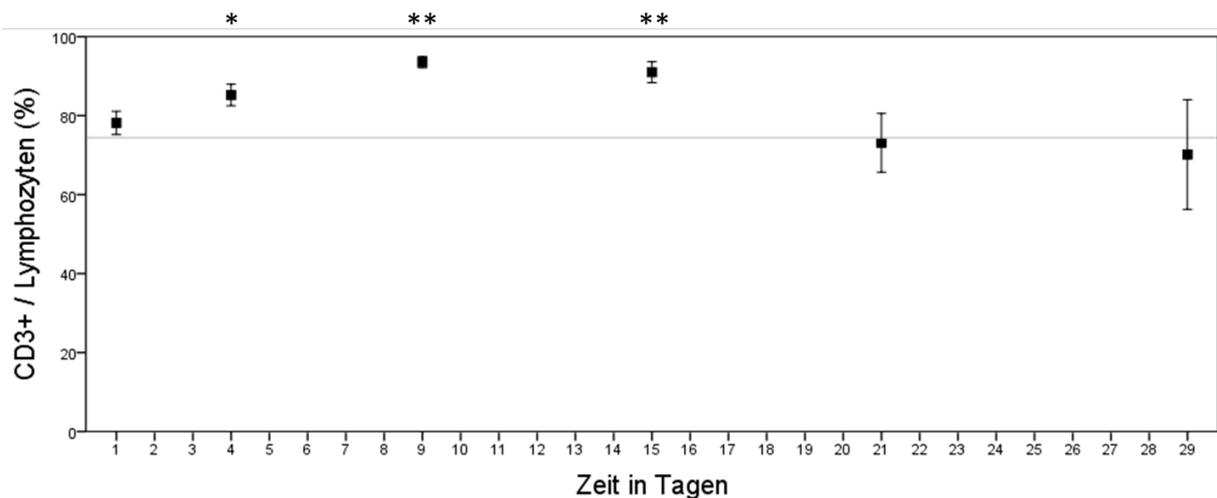


Abbildung 13: Der Anteil der T-Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend zu

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen das Oberflächenantigen CD3 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Dargestellt ist der Anteil der CD3⁺ Zellen an den Zellen aus dem Lymphozytengate. Quadrate und Fehlerbalken stellen Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte dar. Die graue horizontale Linie repräsentiert den Mittelwert der relativen T-Zellzahlen gesunder Spender. Angegebene statistische Signifikanzen beziehen sich auf Unterschiede zu dem am 1. Zyklustag erhobenen Mittelwert; HD: n = 18; AML: Tag 1: n = 12, Tag 4: n = 11, Tag 9: n = 11, Tag 15: n = 11, Tag 22: n = 9, Tag 29: n = 4; * p < 0,05; ** p < 0,01.

3.4.1.1 *Der Anteil der CD4⁺ T_H-Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend zu*

Die relativen Zahlen der CD4⁺ T-Zellen, d.h. der T_H-Zellen, lagen in der vorliegenden Studie vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus tendenziell unterhalb des Niveaus gesunder Spender, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (43,2 % gegenüber 48,1 %, p = 0,275). Im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus stiegen die Werte vorübergehend (zum Teil statistisch hoch signifikant) an, am Ende eines Zyklus wurde das Ausgangsniveau von vor Zyklusbeginn wieder erreicht (45,1 % an Tag 4, p = 0,328; 64,4 % an Tag 9, p = 0,002; 60,8 % an Tag 15, p = 0,003; 40,8 % an Tag 21, p = 0,721; 31,4 % an Tag 29, p = 0,068; Abbildung 14).

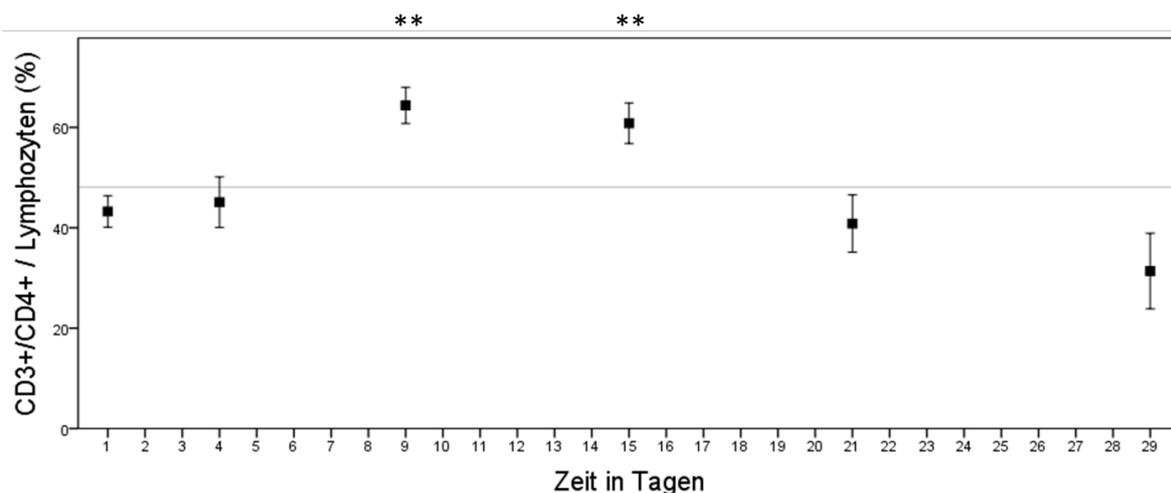


Abbildung 14: Der Anteil der CD4⁺ T_H-Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend zu

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen die Oberflächenantigene CD3 und CD4 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Dargestellt ist der Anteil der CD3⁺/CD4⁺ Zellen an den Zellen aus dem Lymphozytengate. Quadrate und Fehlerbalken stellen Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte dar. Die graue horizontale Linie repräsentiert den Mittelwert der relativen CD4⁺ T-Zellzahlen gesunder Spender. Angegebene statistische Signifikanzen beziehen sich auf Unterschiede zu dem am 1. Zyklustag erhobenen Mittelwert; HD: n = 18; AML: Tag 1: n = 12, Tag 4: n = 10, Tag 9: n = 11, Tag 15: n = 11, Tag 22: n = 9, Tag 29: n = 4; ** p < 0,01.

3.4.1.2 *Der Anteil der T_{reg}-Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend zu*

Wie bereits beim Vergleich der absoluten Zellzahlen zwischen AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus und gesunden Spendern wurden auch im Verlauf der Erhaltungstherapie vier verschieden definierte T_{reg}-Zellpopulationen untersucht. Im Wesentlichen zeigten die relativen Zahlen regulatorischer T-Zellen in der vorliegenden Studie, unabhängig von der T_{reg}-Zell-Definition über die vier verwendeten Marker, einen transienten Anstieg im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus.

Vor Zyklusbeginn war der Anteil der CD4⁺/CD25^{high} T_{reg}-Zellen an den Lymphozyten bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern statistisch signifikant erhöht (3,0 % gegenüber 2,1 %; p = 0,034). Im Zyklusverlauf kam es zu einer weiteren, statistisch hoch signifikanten Zunahme. Am Ende des Zyklus zeigte sich ihr Anteil regredient, in etwa auf das Niveau von vor Zyklusbeginn (3,0 % an Tag 4, p = 0,53; 5,3 % an Tag 9, p = 0,006; 6,9 % an Tag 15, p = 0,004; 4,8 % an Tag 21, p = 0,047; 2,5 % an Tag 28, p = 0,715; Abbildung 15 a).

Bezieht man den Oberflächenmarker CD127 mit in die Definition der T_{reg}-Zellen ein, betrachtet man also CD4⁺/CD25^{high}/CD127^{low} T_{reg}-Zellen, zeigt sich ein ähnlicher

Verlauf. Vor Zyklusbeginn bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen AML-Patienten und gesunden Spendern (3,5 % gegenüber 2,7 %; $p = 0,068$), im Zyklusverlauf war ein transienter, statistisch hoch signifikanter Anstieg der Zellzahlen zu beobachten (3,3 % an Tag 4, $p = 0,347$; 6,2 % an Tag 9, $p = 0,008$; 8,2 % an Tag 15, $p = 0,002$; 5,3 % an Tag 21, $p = 0,114$; 2,8 % an Tag 28, $p = 0,465$; Abbildung 15 b).

Auch die $CD4^+/CD25^{high}/FoxP3^+$ T_{reg} -Zellen folgten diesem Schema. Vor Zyklusbeginn war der Unterschied zwischen AML-Patienten und gesunden Spendern statistisch nicht signifikant (2,7 % gegenüber 1,9 %; $p = 0,082$). Im Zyklusverlauf zeichnete sich ein transienter, statistisch hoch signifikanter Anstieg der T_{reg} -Zellzahlen ab (2,9 % an Tag 4, $p = 0,875$; 5,5 % an Tag 9, $p = 0,002$; 6,9 % an Tag 15, $p = 0,003$; 4,3 % an Tag 21, $p = 0,059$; 2,2 % an Tag 28, $p = 0,273$; Abbildung 15 c).

Bei der Betrachtung der streng definierten relativen Zahlen regulatorischer T-Zellen von AML-Patienten ($CD4^+/CD25^{high}/CD127^{low}/FoxP3^+$ T_{reg} -Zellen), zeigte sich kein Unterschied zwischen AML-Patienten vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus und gesunden Spendern (1,1 % gegenüber 1,0 %, $p = 0,540$). Im Verlauf eines Therapiezyklus kam es jedoch wie bei den weniger streng definierten T_{reg} -Zellen zu einem vorübergehenden, statistisch hoch signifikanten Anstieg der Werte. Am Ende des Zyklus zeigten sich die Werte regredient in Richtung des Ausgangsniveaus von vor Zyklusbeginn (1,1 % an Tag 4, $p = 0,814$; 2,5 % an Tag 9, $p = 0,006$; 2,7 % an Tag 15, $p = 0,003$; 1,9 % an Tag 21, $p = 0,114$; 0,8 % an Tag 29, $p = 0,465$; Abbildung 15 d).

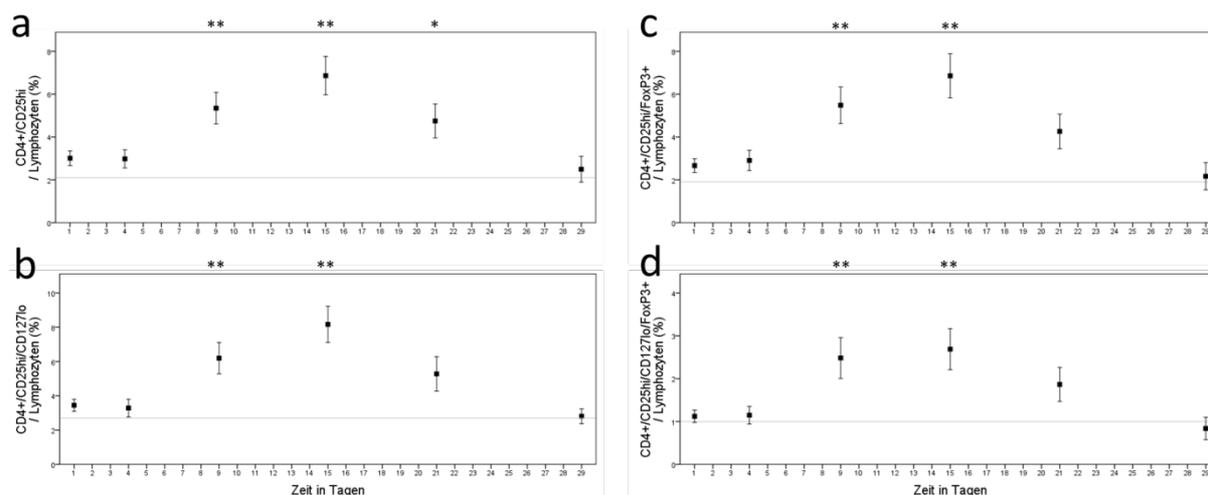


Abbildung 15: Der Anteil der T_{reg}-Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend zu

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen die Oberflächenantigene CD4, CD25 und CD127 sowie gegen das intrazelluläre Antigen FoxP3 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. a) Anteil der CD4⁺/CD25^{high} Zellen an den Zellen aus dem Lymphozytengate. b) Anteil der CD4⁺/CD25^{high}/CD127^{low} Zellen an den Zellen aus dem Lymphozytengate. c) Anteil der CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺ Zellen an den Zellen aus dem Lymphozytengate. d) Anteil der CD4⁺/CD25^{high}/CD127^{low}/FoxP3⁺ Zellen an den Zellen aus dem Lymphozytengate. Schwarze Quadrate und Fehlerbalken stellen Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte dar. Die grauen horizontalen Linien repräsentieren die Mittelwerte der relativen T_{reg}-Zellzahlen gesunder Spender. Angegebene statistische Signifikanzen beziehen sich auf Unterschiede zu den am 1. Zyklustag erhobenen Mittelwerten; HD: n = 18; AML: Tag 1: n = 12, Tag 4: n = 11, Tag 9: n = 11, Tag 15: n = 11, Tag 22: n = 9, Tag 29: n = 4; * p < 0,05; ** p < 0,01.

3.4.1.3 *Der Anteil der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen an den Lymphozyten bleibt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus konstant*

Die relativen Zahlen zytotoxischer T-Zellen von AML-Patienten lagen in der vorliegenden Untersuchung vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus über den Zellzahlen gesunder Spender (24,3 % gegenüber 16,4 %, p = 0,018). Im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus zeigten sich die Werte relativ konstant, weiterhin knapp über dem Niveau gesunder Spender, ohne signifikante Abweichung in die eine oder in die andere Richtung (28,2 % an Tag 4, p = 0,182; 23,3 % an Tag 9, p = 0,433; 24,1 % an Tag 15, p = 0,875; 24,6 % an Tag 21, p = 0,721; 28,3 % an Tag 29, p = 0,465; Abbildung 16).

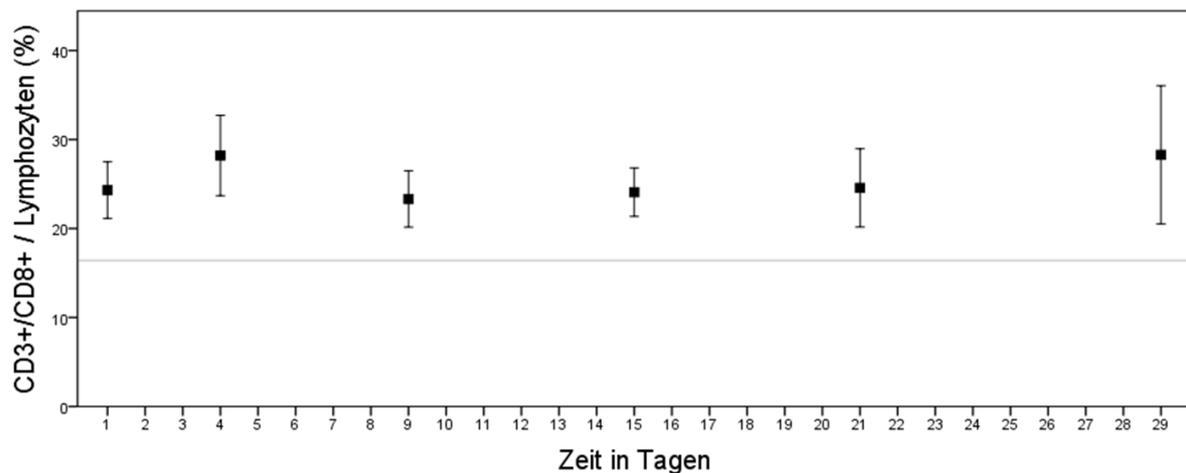


Abbildung 16: Der Anteil der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen an den Lymphozyten bleibt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus konstant

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen die Oberflächenantigene CD3 und CD8 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Dargestellt ist der Anteil der CD3⁺/CD8⁺ Zellen an den Zellen aus dem Lymphozytengate. Schwarze Quadrate und Fehlerbalken stellen Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte dar. Die graue horizontale Linie repräsentiert den Mittelwert der relativen CD8⁺ T-Zellzahlen gesunder Spender; HD: n = 18; AML: Tag 1: n = 12, Tag 4: n = 10, Tag 9: n = 11, Tag 15: n = 11, Tag 22: n = 9, Tag 29: n = 4.

3.4.1.4 *Die CD4/CD8-Ratio steigt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend an*

Die Ratio der relativen CD4⁺ T-Zellzahlen und CD8⁺ T-Zellzahlen (CD4/CD8-Ratio) war den relativen Werte der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen entsprechend in der vorliegenden Studie bei AML-Patienten vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus statistisch signifikant vermindert gegenüber der Ratio gesunder Spender (2,33 gegenüber 3,51, $p = 0,042$). Während eines Zyklus stieg die CD4/CD8-Ratio vorübergehend signifikant an und erreichte am Zyklusende wieder das Niveau von vor Zyklusbeginn (2,51 an Tag 4, $p = 0,722$; 3,77 an Tag 9, $p = 0,002$; 3,08 an Tag 15, $p = 0,071$; 2,02 an Tag 21, $p = 0,878$; 1,31 an Tag 29, $p = 0,273$; Abbildung 17).

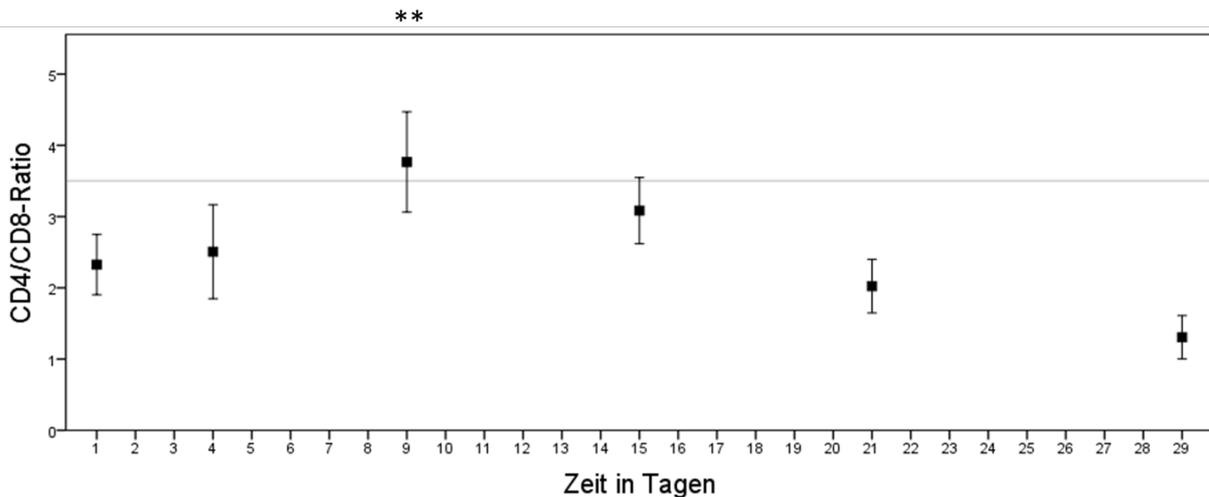


Abbildung 17: Die CD4/CD8-Ratio steigt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend an

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen die Oberflächenantigene CD3, CD4 und CD8 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Dargestellt ist die CD4/CD8-Ratio. Schwarze Quadrate und Fehlerbalken stellen Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte dar. Die graue horizontale Linie repräsentiert den Mittelwert der CD4/CD8-Ratio gesunder Spender. Die angegebene statistische Signifikanz bezieht sich auf den Unterschied zu dem am 1. Zyklustag erhobenen Mittelwert; HD: n = 18; AML: Tag 1: n = 12, Tag 4: n = 10, Tag 9: n = 11, Tag 15: n = 11, Tag 22: n = 9, Tag 29: n = 4; ** p < 0,01.

3.4.2 Sowohl der Anteil der CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ NK-Zellen als auch der Anteil der CD3⁻/CD56⁺/CD16⁻ NK-Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab

Die relativen Zahlen der CD16⁺ NK-Zellen von AML-Patienten lagen in der vorliegenden Untersuchung vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus unter dem Niveau gesunder Spender (8,4 % gegenüber 14,6 %, p = 0,006). Im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus fielen die Werte, zum Teil statistisch hoch signifikant, weiter ab im Vergleich zu vor Zyklusbeginn (5,9 % an Tag 4, p = 0,028; 2,9 % an Tag 9, p = 0,003; 3,2 % an Tag 15, p = 0,002; 3,7 % an Tag 21, p = 0,005; 5,0 % an Tag 29, p = 0,068; Abbildung 18 a).

Die CD335⁺ NK-Zellzahlen (d.h. aktivierte NK-Zellen) lagen vor Zyklusbeginn bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern tendenziell auf einem niedrigeren Niveau; der Unterschied ist statistisch jedoch nicht signifikant (7,8 % gegenüber 11,7 %, p = 0,067). Im Zyklusverlauf kam es zu einer deutlichen Abnahme des Anteils der CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺/CD335⁺ NK-Zellen, gegen Zyklusende stiegen die Werte wieder in Richtung des Ausgangsniveaus an (6,1 % an Tag 4, p = 0,161; 2,8 % an Tag 9, p = 0,028; 3,1 % an Tag 15, p = 0,012; 3,5 % an Tag 21, p = 0,012; 4,1 % an Tag 29, p = 0,144; Abbildung 18 b).

Die relativen Zahlen der CD16⁺ NK-Zellen von AML-Patienten lagen vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus über dem Niveau gesunder Spender (1,6 % gegenüber 0,6 %, $p = 0,011$). Im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus fielen die Werte statistisch hoch signifikant ab. Auch gegen Zyklusende blieben die relativen Zellzahlen deutlich erniedrigt im Vergleich zu vor Zyklusbeginn. (0,6 % an Tag 4, $p = 0,002$; 0,4 % an Tag 9, $p = 0,002$; 0,5 % an Tag 15, $p = 0,002$; 0,7 % an Tag 21, $p = 0,009$; 0,6 % an Tag 29, $p = 0,279$; Abbildung 18 c).

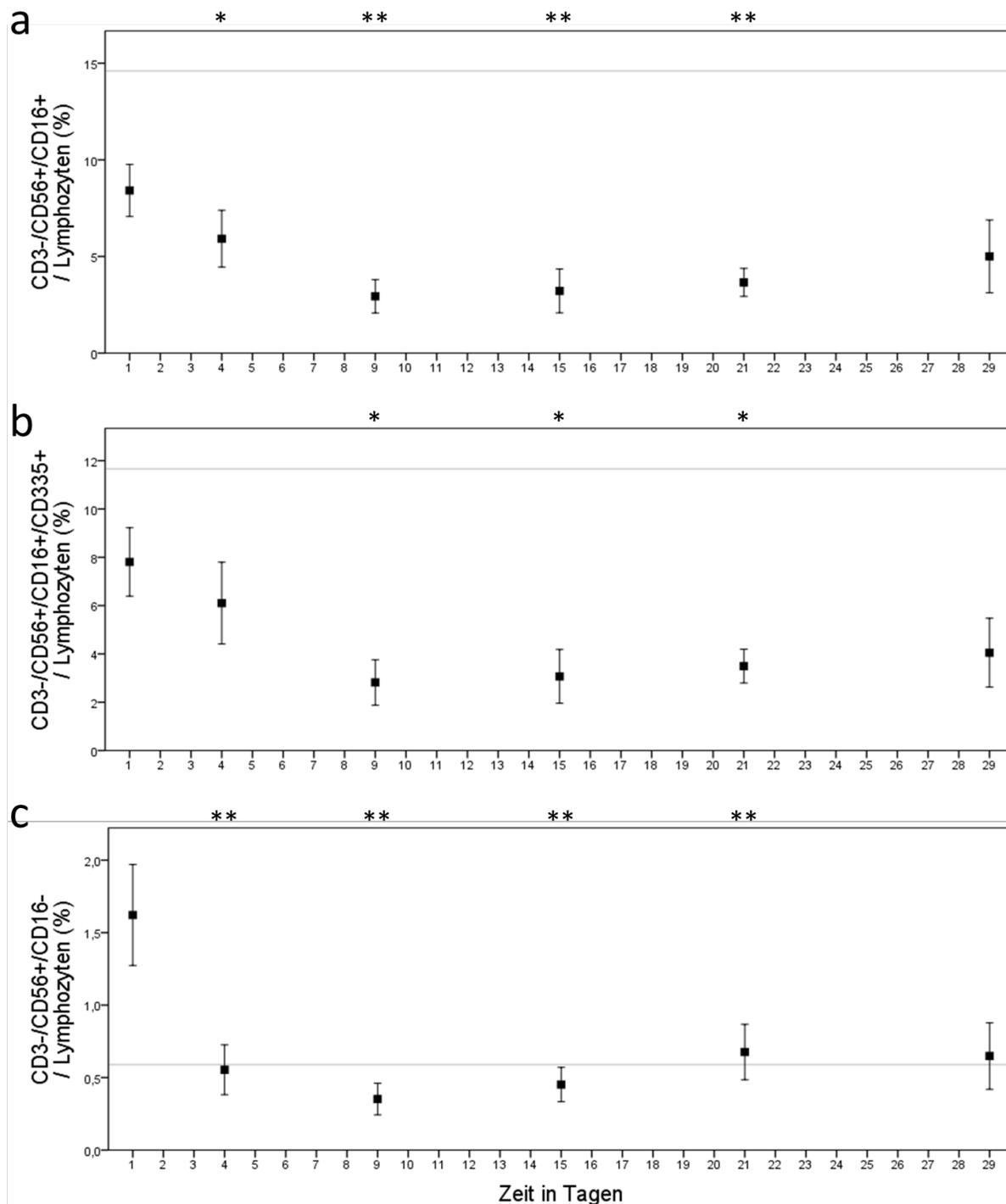


Abbildung 18: Sowohl der Anteil der CD3-/CD56+/CD16⁺NK-Zellen als auch der Anteil der CD3-/CD56+/CD16⁻ NK-Zellen an den Lymphozyten nimmt im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen die Oberflächenantigene CD3, CD16, CD56 und CD335 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. a) Anteil der CD3-/CD56+/CD16⁺ Zellen an den Zellen aus dem Lymphozytengate. b) Anteil der CD3-/CD56+/CD16⁺/CD335⁺ Zellen an den Zellen aus dem Lymphozytengate. c) Anteil der CD3-/CD56+/CD16⁻ Zellen an den Zellen aus dem Lymphozytengate. Schwarze Quadrate und Fehlerbalken stellen Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte dar. Die grauen horizontalen Linien repräsentieren die Mittelwerte der relativen NK-Zellzahlen gesunder Spender. Angegebene statistische Signifikanzen beziehen sich auf Unterschiede zu den am 1. Zyklustag erhobenen Mittelwerten; HD: n = 18; a) und c) AML: Tag 1: n = 12, Tag 4: n = 11, Tag 9: n = 11, Tag 15: n = 11, Tag 22: n = 9, Tag 29: n = 3; b) AML: Tag 1: n = 8, Tag 4: n = 8, Tag 9: n = 7, Tag 15: n = 8, Tag 22: n = 8, Tag 29: n = 4; * p < 0,05; ** p < 0,01.

3.5 Die Methylierungsanalyse liefert qualitativ ähnliche, quantitativ jedoch unterschiedliche Ergebnisse verglichen mit der FACS-Analyse bezüglich des Anteils der T_{reg} -Zellen an den Lymphozyten während eines Erhaltungstherapiezyklus

Um die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der Detektion regulatorischer T-Zellen zu validieren, wurde einem AML-Patienten (# 7) beispielhaft vor Beginn und zu 5 Zeitpunkten während eines Erhaltungstherapiezyklus Blut für eine DNS-Methylierungsanalyse entnommen. Nach Isolierung der PMBC wurde zusätzlich zur Färbung und anschließenden FACS-Analyse aus einem separaten Zellaliquot DNS extrahiert. Diese wurde durch die Firma Epiontis einer DNS-Methylierungsanalyse unterzogen. Die mit den beiden Verfahren FACS-Analyse und DNS-Methylierungsanalyse ermittelten relativen T_{reg} -Zellzahlen (T_{reg} /Leukozyten) divergierten zum Teil stark. Die Schwankungen im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus wurden jedoch von beiden Verfahren sehr ähnlich abgebildet (Abbildung 19).

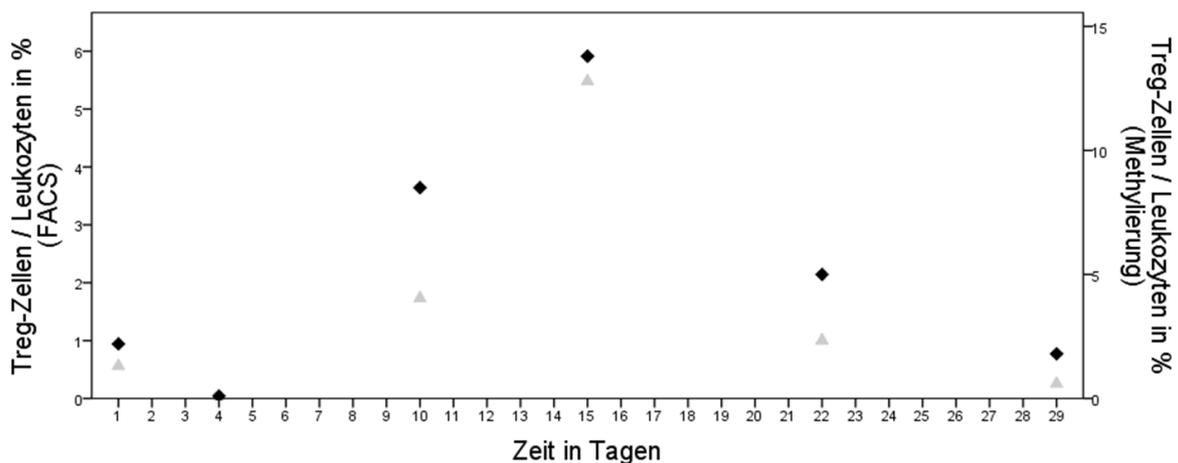


Abbildung 19: Die Methylierungsanalyse liefert qualitativ ähnliche, quantitativ jedoch unterschiedliche Ergebnisse verglichen mit der FACS-Analyse bezüglich des Anteils der T_{reg} -Zellen an den Lymphozyten während eines Erhaltungstherapiezyklus

PBMCs wurden aus dem Blut eines AML-Patienten isoliert. Die Zellen wurden zum einen mit gegen die Oberflächenantigene CD4, CD25 und CD127 sowie gegen das intrazelluläre Antigen FoxP3 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Zum anderen wurde die DNS aus den Zellen isoliert und durch die Firma Epiontis mit einem FoxP3-spezifischen *Methylation Assay* analysiert. Dargestellt sind die mit beiden Analysemethoden ermittelten relativen T_{reg} -Zellzahlen. Schwarze Rauten repräsentieren die durchflusszytometrisch ermittelten relativen Zahlen der $CD4^+/CD25^{high}/CD127^{low}/FoxP3^+$ Zellen an den Leukozyten, graue Dreiecke repräsentieren die im *Methylation Assay* ermittelten relativen Zahlen der Zellen mit aktiviertem FoxP3-Gen an den Leukozyten. n = 1.

3.6 Die Aktivierbarkeit von NK Zellen durch IL-2 ist bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus reduziert

Um die Aktivierbarkeit von NK-Zellen durch Zytokine zu bestimmen, wurde 4 AML-Patienten (# 2–4 und # 9) vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus und zweien davon (# 3 und # 4) zusätzlich an Tag 15 (± 1 Tag) eines Erhaltungstherapiezyklus sowie 15 gesunden Spendern Blut entnommen. Nach Isolierung der PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden diese für 24 Stunden kultiviert, entweder ohne Stimulans oder in Anwesenheit von IL-2, einem potenten NK-Zell-Aktivator [83]. Im Anschluss daran erfolgten die Färbung der geernteten Zellen mit gegen die Oberflächenantigene CD3, CD56 und CD69 sowie gegen intrazelluläres IFN γ gerichteten Antikörper-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugaten und die FACS-Analyse (Abbildung 20).

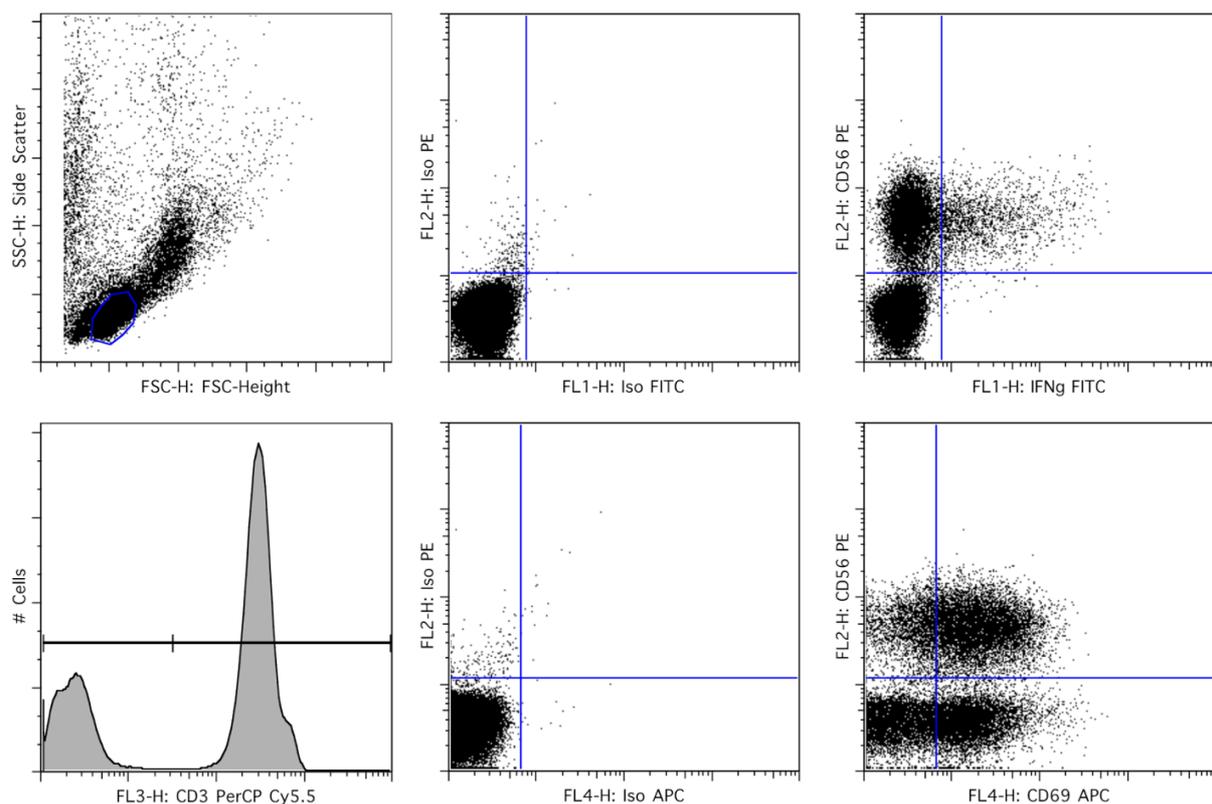


Abbildung 20: Gating-Strategie zur Ermittlung der IFN γ -Synthese und CD69-Präsentation

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit gegen die Oberflächenantigene CD3, CD56 und CD69 sowie gegen intrazelluläres IFN γ gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Die Zellen aus dem Lymphozytengate im FSC/SSC-Plot wurden im CD3-Histogramm dargestellt. Die CD3-Zellen wurden zum einen im IFN γ /CD56-Plot dargestellt. Nach Übertragung des durch die Isotypenkontrolle definierten Quadrantengates liegen die CD3-/CD56 $^+$ /IFN γ $^+$ Zellen im rechten oberen Quadranten des Gates. Zum anderen wurden die CD3 $^-$ Zellen im CD69/CD56-Plot dargestellt. Nach Übertragung des durch die Isotypenkontrolle definierten Quadrantengates liegen die CD3 $^-$ /CD56 $^+$ /CD69 $^+$ Zellen im rechten oberen Quadranten des Gates.

3.6.1 Nach Stimulation mit IL-2 präsentieren NK-Zellen von AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus weniger CD69 als NK-Zellen gesunder Spender

CD69 ist ein etablierter Surrogatparameter für den Aktivierungsgrad von NK-Zellen. Dieses Molekül wird kurz nach der Aktivierung von NK-Zellen vermehrt auf deren Zelloberfläche präsentiert und besitzt kostimulatorische Eigenschaften [84–87].

Die Präsentation von CD69 auf der Zelloberfläche ohne vorherige Stimulation unterschied sich in der vorliegenden Untersuchung kaum zwischen gesunden Spendern, AML-Patienten vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus und AML-Patienten während eines Erhaltungstherapiezyklus (HD 5,7 %, AML Tag 1 3,6 %, AML Tag 15 10,1 %, Abbildung 21). Der Unterschied der CD69-Präsentation auf der Zelloberfläche zwischen unstimulierten NK-Zellen und mit IL-2 stimulierten NK-Zellen war sowohl bei gesunden Spendern als auch bei AML-Patienten vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus statistisch signifikant (HD 5,7 % ohne Stimulation gegenüber 50,7 % nach Stimulation mit IL-2, $p < 0,001$; AML Tag 1 3,6 % ohne Stimulation gegenüber 20,4 % nach Stimulation mit IL-2, $p = 0,017$). Die CD69-Präsentation nach Stimulation mit IL-2 war bei AML-Patienten vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus im Vergleich zu gesunden Spendern statistisch signifikant reduziert (HD 50,7 %, AML Tag 1 20,4 %, $p = 0,027$, Abbildung 21). Die Aktivierbarkeit von NK-Zellen war somit bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus deutlich eingeschränkt. Im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus scheint die Aktivierbarkeit nicht weiter beeinträchtigt zu werden. Aussagen zur statistischen Signifikanz können jedoch zu diesem Vergleich in Anbetracht der geringen Fallzahl nicht getroffen werden.

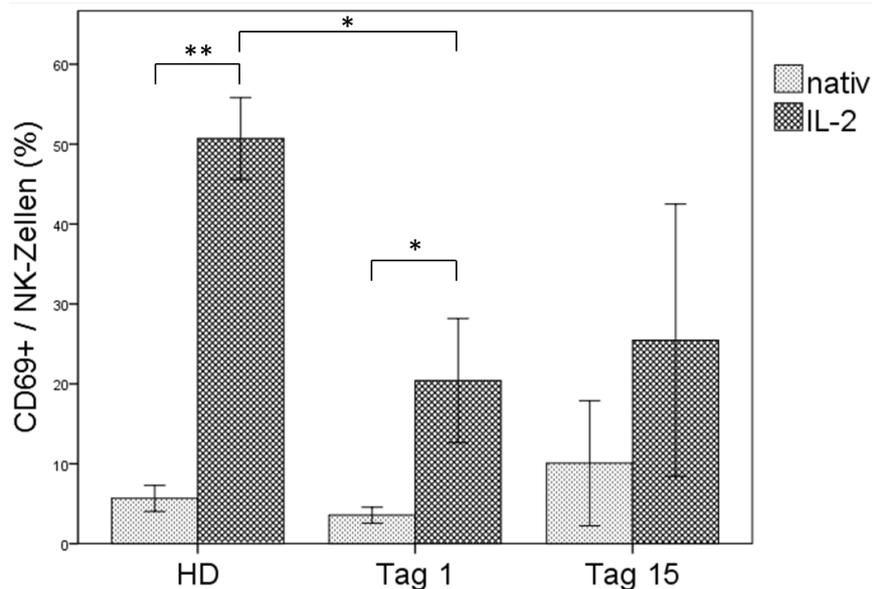


Abbildung 21: Nach Stimulation mit IL-2 präsentieren NK-Zellen von AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus weniger CD69 als NK-Zellen gesunder Spender

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Nach Kultur über 24 Stunden in Abwesenheit eines Stimulans (nativ) oder in Anwesenheit von IL-2 wurden die Zellen einer Färbung mit gegen die Oberflächenantigene CD3, CD56 und CD69 gerichteten, fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern unterzogen. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Dargestellt ist der Anteil der CD69⁺ Zellen an den CD3⁻/CD56⁺ NK-Zellen in %. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. HD = healthy donor; HD: n = 15; AML: Tag 1: n = 4, Tag 15: n = 2; * p < 0,05; ** p < 0,01.

3.6.2 Nach Stimulation mit IL-2 synthetisieren NK-Zellen von AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus weniger IFN γ als NK-Zellen gesunder Spender

NK-Zellen sind einer der Hauptproduzenten von IFN γ . Sezerniertes IFN γ wirkt, unter anderem, auch antineoplastisch. Diese Wirkung wird über die Bindung an den IFN γ -Rezeptor vermittelt. Der IFN γ -Rezeptor wird sowohl von verschiedenen Zellen des Immunsystems als auch von Tumorzellen exprimiert [88].

Die Produktion von intrazellulärem IFN γ ohne Stimulation unterschied sich in der vorliegenden Studie kaum zwischen gesunden Spendern, AML-Patienten vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus und AML-Patienten während eines Erhaltungstherapiezyklus (HD 1,2 %, AML Tag 1 0,8 %, AML Tag 15 1,5 %). Die Produktion von IFN γ in NK-Zellen, welche mit IL-2 stimuliert wurden, war sowohl bei gesunden Spendern als auch bei AML-Patienten vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus erhöht verglichen mit der Produktion von IFN γ in NK-Zellen, welche nicht mit IL-2 stimuliert wurden. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (HD 1,2 % ohne Stimulation gegenüber 4,8 % nach Stimulation mit IL-2, p = 0,241; AML Tag 1 0,8 % ohne Stimulation gegenüber 2,8 % nach Stimulation mit IL-2, p

= 0,674, Abbildung 22). Die Produktion von IFN γ nach Stimulation mit IL-2 schien bei AML-Patienten vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus niedriger zu sein als bei gesunden Spendern, allerdings war auch dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (HD 4,8 %, AML Tag 1 2,8 %, $p = 1,000$). Es deutete sich außerdem eine weitere Beeinträchtigung der NK-Zell-Aktivierbarkeit (im Sinne der Produktion von IFN γ) im späteren Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus an. Aufgrund der geringen Fallzahl kann jedoch keine Aussagen zur statistischen Signifikanz der Unterschiede getroffen werden (AML Tag 1 2,8 %, AML Tag 15 1,5 %).

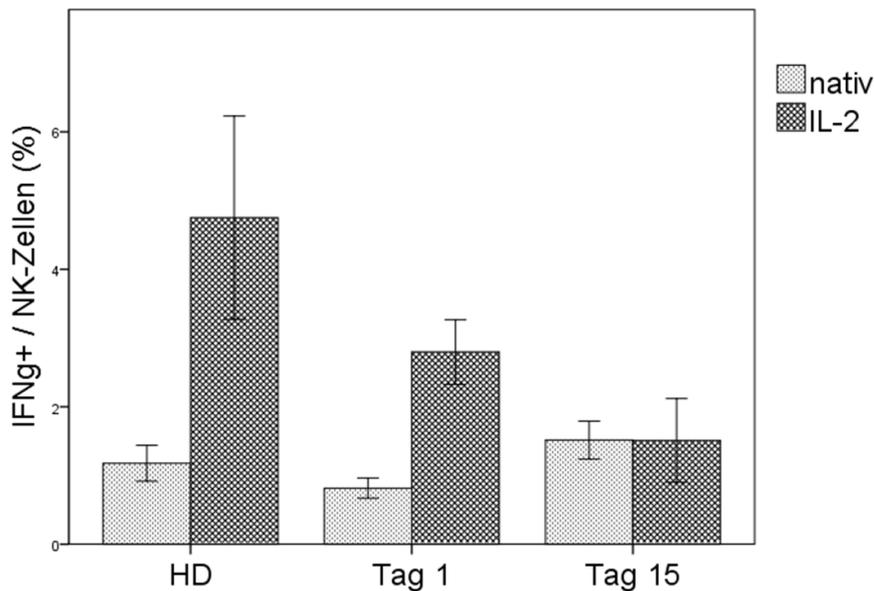


Abbildung 22: Nach Stimulation mit IL-2 zeigen NK-Zellen von AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus eine geringere IFN γ -Synthese als NK-Zellen gesunder Spender

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Nach Kultur über 24 Stunden in Abwesenheit eines Stimulans (nativ) oder in Anwesenheit von IL-2 wurden die Zellen einer Färbung mit gegen die Oberflächenantigene CD3 und CD56 sowie gegen intrazelluläres IFN γ gerichteten, fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern unterzogen. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Dargestellt ist der Anteil der IFN γ ⁺ Zellen an den CD3⁺/CD56⁺ NK-Zellen in %. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. HD = healthy donor; HD: n = 15; AML: Tag 1: n = 4, Tag 15: n = 2.

3.7 Die Proliferationsfähigkeit von T-Zellen fällt nach Stimulation mit PHA oder SEB während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab

Zur Testung der Proliferationskapazität von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurden periphere Blutproben von 5 AML-Patienten (# 1-4 und # 7) vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus sowie von dreien dieser AML-Patienten (# 2-4) zusätzlich zu 3 Zeitpunkten während eines Erhaltungstherapiezyklus untersucht (Tag 4 ± 2, Tag 13 ± 5 und Tag 24 ± 5). Außerdem wurden periphere Blutproben 12 gesunder Spender untersucht. Nach Isolierung der PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden diese mit CFSE gefärbt und 7 Tage lang in Anwesenheit von PHA bzw. SEB kultiviert. Anschließend erfolgten die Färbung der geernteten Zellen mit gegen die Oberflächenantigene CD4, CD8 und CD3 gerichteten Antikörper-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugaten und die FACS-Analyse. Abbildung 23 stellt exemplarisch die Gating-Strategie zur Ermittlung des Anteils der proliferierten CD4⁺ T_H-Zellen dar.

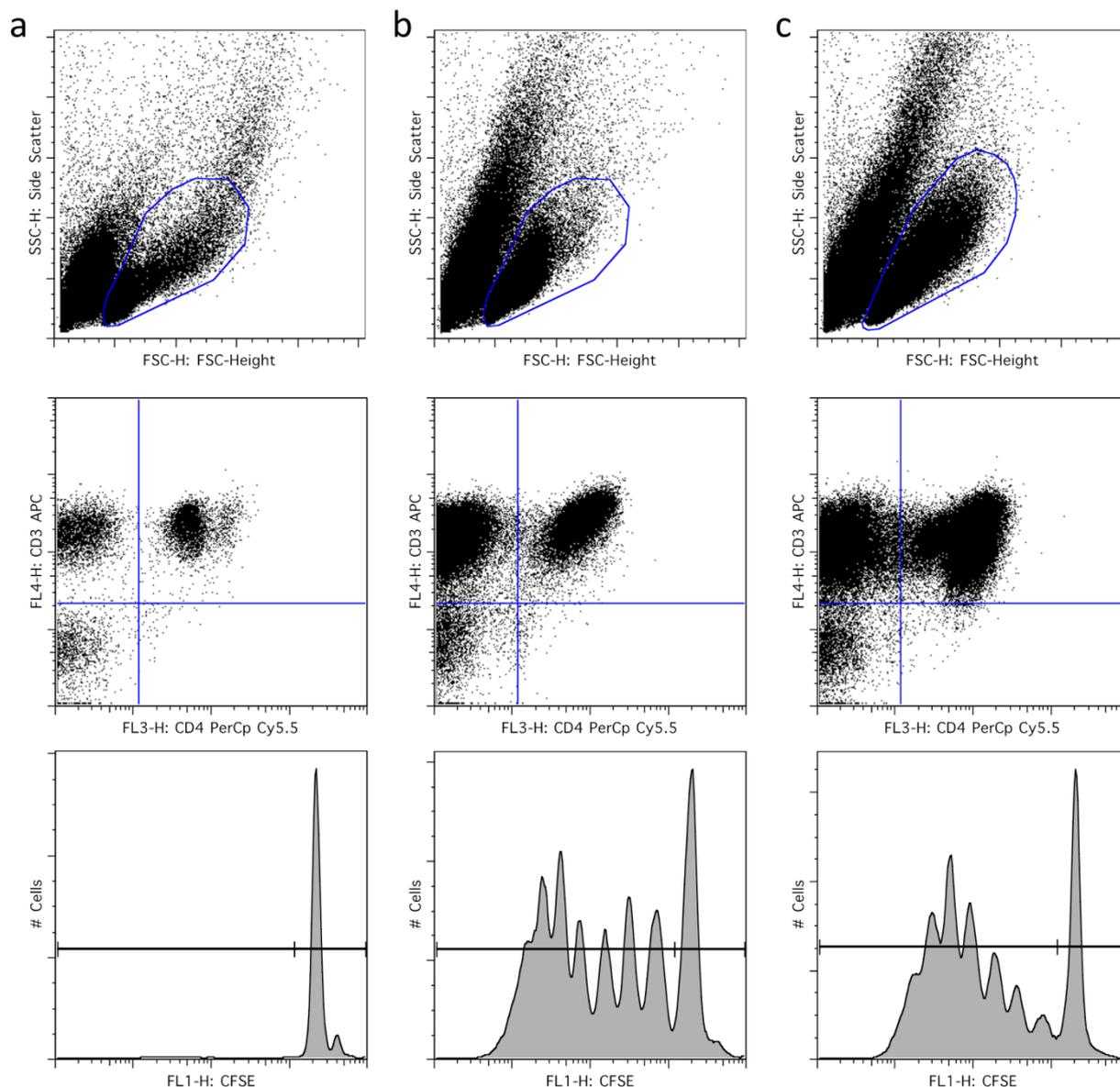


Abbildung 23: Gating-Strategie zur Ermittlung des Anteils der proliferierten CD4⁺ T_H-Zellen

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für 7 Tage ohne Stimulans (a), in Anwesenheit von PHA (b) oder in Anwesenheit von SEB (c) kultiviert. Die Zellen wurden dann mit gegen die Oberflächenantigene CD3 und CD4 gerichteten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde ein keulenförmiges Lymphozytengate um alle nicht proliferierten und proliferierten Lymphozyten gelegt. Die Zellen aus diesem Gate wurden im CD4/CD3-Plot dargestellt. Nach Übertragung des durch die Isotypenkontrolle (nicht abgebildet) definierten Quadrantengates liegen die CD3⁺/CD4⁺ Zellen im rechten oberen Quadranten des Gates. Die CD3⁺/CD4⁺ Zellen wurden im CFSE-Histogramm dargestellt. Rechts im Histogramm ist die Stammpopulation der nicht proliferierten Zellen zu sehen, links davon befinden sich kleinere Populationen proliferierter Zellen, welche um so weniger CFSE enthalten je öfter sie sich geteilt haben. Ein Gate teilt die proliferierten Zellen links von den Zellen der nicht proliferierten Stammpopulation rechts im Histogramm.

3.7.1 Die Proliferationsfähigkeit von CD4⁺ T_H-Zellen fällt nach Stimulation mit PHA oder SEB während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab

Die Anwesenheit eines der beiden verwendeten Stimulanzen, d.h. PHA oder SEB, führte in der vorliegenden Untersuchung, wie erwartet, zu einer deutlichen Steigerung der Proliferation der T_H-Zellen sowohl bei gesunden Spendern als auch bei AML-Patienten vor und während eines Erhaltungstherapiezyklus. Die Proliferationsrate von T_H-Zellen lag in Abwesenheit eines Stimulans bei gesunden Spendern bei 6,8 % und bei AML-Patienten bei 1,8 % an Tag 1, 1,1 % an Tag 4, 0,9 % an Tag 13 und 2,8 % an Tag 24 eines Erhaltungstherapiezyklus. Durch Stimulation mit PHA stieg die Proliferationsrate der T_H-Zellen gesunder Spender auf 44,0 % an, durch Stimulation mit SEB auf 74,2 %. Vor einem Erhaltungstherapiezyklus wurden bei AML-Patienten ähnliche Ergebnisse erzielt: durch Stimulation mit PHA stieg hier die Proliferationsrate der T_H-Zellen auf 39,5 %, durch Stimulation mit SEB auf 74,2 %. Während eines Erhaltungstherapiezyklus zeichnete sich eine Abnahme der Proliferationsfähigkeit der T_H-Zellen sowohl in Abwesenheit eines Stimulans als auch in Anwesenheit von PHA oder SEB ab. In Anwesenheit von PHA bzw. SEB wurden an Zyklustag 13 nur noch Proliferationsraten von 7,9 % bzw. 53,2 % erreicht. Aufgrund der niedrigen Fallzahl von n = 3 der an Tag 13 untersuchten Patienten kann keine Aussagen zur statistischen Signifikanz der Unterschiede zu den Werten gesunder Spender oder zu den Werten von AML-Patienten vor Zyklusbeginn getroffen werden. Am Ende eines Erhaltungstherapiezyklus schien die Proliferationsfähigkeit wiederhergestellt zu sein bzw. sogar auf einem höheren Niveau zu liegen als vor einem Erhaltungstherapiezyklus. In Anwesenheit von PHA bzw. SEB wurden an Tag 24 eines Erhaltungstherapiezyklus Proliferationsraten von 55,8 % bzw. 82,5 % gemessen (Abbildung 24).

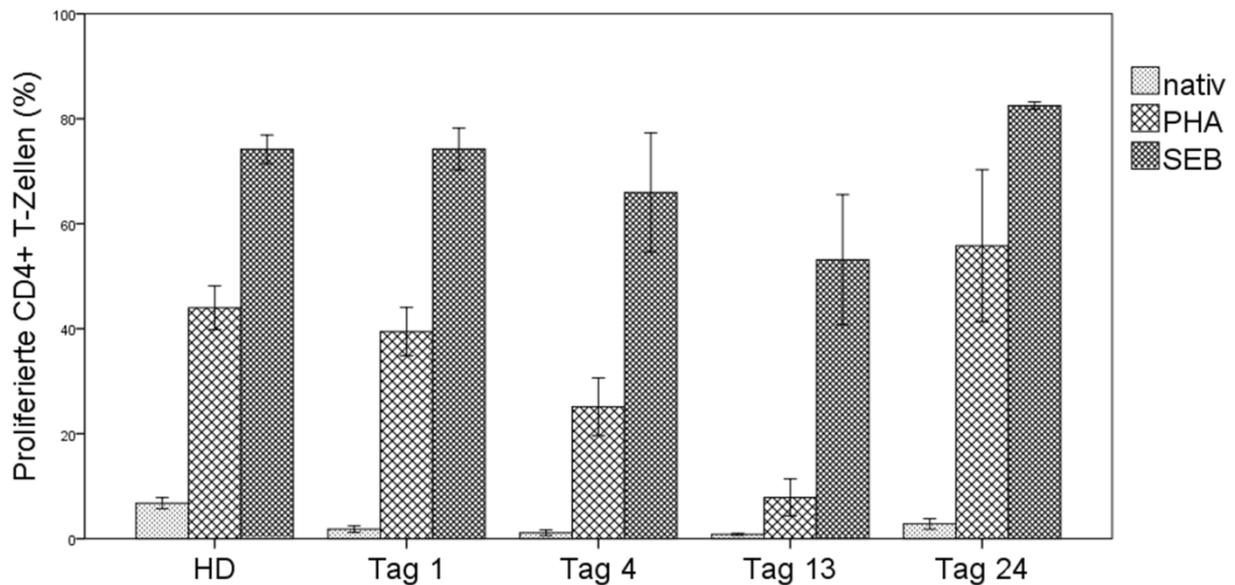


Abbildung 24: Die Proliferationsfähigkeit von CD4⁺ T_H-Zellen fällt nach Stimulation mit PHA oder SEB während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Nach intrazellulärer Färbung mit CFSE wurden die Zellen 7 Tage ohne Stimulans (nativ), in Anwesenheit von PHA oder in Anwesenheit von SEB kultiviert. Die geernteten Zellen wurden einer Färbung mit gegen die Oberflächenantigene CD3 und CD4 gerichteten, fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern unterzogen. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Dargestellt ist der Anteil der proliferierten T_H-Zellen an der Gesamtheit der T_H-Zellen in %. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. HD = healthy donor; HD: n = 12; AML: Tag 1: n = 5, Tag 4: n = 3, Tag 13: n = 3, Tag 24: n = 3.

3.7.2 Die Proliferationsfähigkeit von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen fällt nach Stimulation mit PHA oder SEB während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab

Die Anwesenheit eines der beiden verwendeten Stimulanzien, d.h. PHA oder SEB, führte in der vorliegenden Studie zu einer deutlichen Steigerung der Proliferation der zytotoxischen T-Zellen sowohl bei gesunden Spendern als auch bei AML-Patienten vor und während eines Erhaltungstherapiezyklus. Die Proliferationsrate zytotoxischer T-Zellen lag in Abwesenheit eines Stimulans bei gesunden Spendern bei 6,1 % und bei AML-Patienten bei 3,1 % an Tag 1, 1,8 % an Tag 4, 0,9 % an Tag 13 und 1,6 % an Tag 24 eines Erhaltungstherapiezyklus. Durch Stimulation mit PHA stieg die Proliferationsrate der zytotoxischen T-Zellen gesunder Spender auf 52,0 % an. Vor einem Erhaltungstherapiezyklus wurde bei AML-Patienten eine niedrigere Proliferationsrate (33,6 %) erreicht. Durch Stimulation mit SEB stieg die Proliferationsrate der zytotoxischen T-Zellen auf 66,8 %. Vor einem Erhaltungstherapiezyklus wurden bei AML-Patienten ähnliche Ergebnisse (67,0 %) erzielt. Während eines Erhaltungstherapiezyklus zeichnete sich eine Abnahme der Proliferationsfähigkeit der

zytotoxischen T-Zellen sowohl ohne Stimulans als auch in Anwesenheit von PHA oder SEB ab. In Anwesenheit von PHA bzw. SEB wurden an Zyklustag 13 nur noch Proliferationsraten von 8,2 % bzw. 50,6 % erreicht. Aufgrund der Fallzahl von $n = 3$ der an Tag 13 untersuchten Patienten kann keine Aussage zur statistischen Signifikanz der Unterschiede getroffen werden. Am Ende eines Erhaltungstherapiezyklus schien die Proliferationsfähigkeit wiederhergestellt zu sein bzw. sogar auf einem höheren Niveau zu liegen als vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus. In Anwesenheit von PHA bzw. SEB wurden an Tag 24 eines Erhaltungstherapiezyklus Proliferationsraten von 50,3 % bzw. 71,2 % gemessen (Abbildung 25).

Beim Vergleich der Proliferationsraten von T_H -Zellen und zytotoxischen T-Zellen bei AML-Patienten im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus zeichnete sich somit ein ähnliches Muster ab: Sowohl T_H -Zellen als auch zytotoxische T-Zellen proliferierten unter Stimulation mit PHA oder SEB zu Beginn sowie am Ende eines Erhaltungstherapiezyklus deutlich stärker als in der Zyklusmitte (Abbildungen 24 und 25).

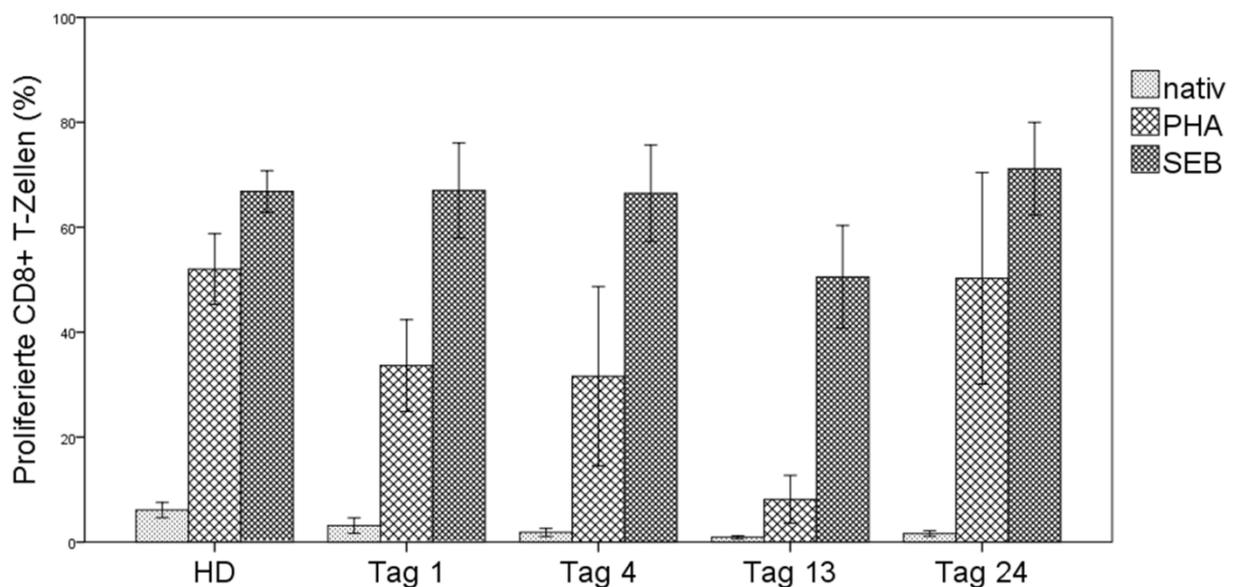


Abbildung 25: Die Proliferationsfähigkeit von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen fällt nach Stimulation mit PHA oder SEB während eines Erhaltungstherapiezyklus vorübergehend ab

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Nach intrazellulärer Färbung mit CFSE wurden die Zellen 7 Tage ohne Stimulans (nativ), in Anwesenheit von PHA oder in Anwesenheit von SEB kultiviert. Die geernteten Zellen wurden einer Färbung mit gegen die Oberflächenantigene CD3 und CD8 gerichteten, fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern unterzogen. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Dargestellt ist der Anteil der proliferierten zytotoxischen T-Zellen an der Gesamtheit der zytotoxischen T-Zellen in %. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. HD = healthy donor; HD: $n = 12$; AML: Tag 1: $n = 5$, Tag 4: $n = 3$, Tag 13: $n = 3$, Tag 24: $n = 3$.

3.8 Nach Stimulation mit PHA sezernieren die PBMCs von AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus weniger IL-17 im Vergleich zu den PBMCs gesunder Spender

Zur Bestimmung der Zytokinsekretion von PBMCs unter Erhaltungstherapie wurden die Überstände des *PHA-Proliferation Assay* untersucht. Es liegen Daten von 5 AML-Patienten vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus vor (# 1–4 und # 7), von dreien dieser 5 Patienten zusätzlich am 16. Zyklustag (± 2 Tage) (# 2–4) sowie von 12 gesunden Spendern. Die Überstände wurden nach 48 Stunden Kulturzeit in Anwesenheit von PHA untersucht. Nach Zugabe von gegen die Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF α und IFN γ gerichteten Antikörper-Bead-Konjugaten erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

Die Untersuchung lieferte nur für das Zytokin IL-17A konklusive Ergebnisse. Die IL-17A-Sekretion war bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus verglichen mit gesunden Spendern statistisch hoch signifikant erhöht; im Überstand des *PHA-Proliferation Assay* lag die IL-17A-Konzentration bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus bei 135 pg/mL, bei gesunden Spendern bei 95,2 pg/mL ($p = 0,006$). An Tag 16 eines Erhaltungstherapiezyklus betrug die IL-17A-Konzentration in den Überständen der AML-Patienten 89,5 pg/mL und unterschied sich damit nicht wesentlich von der IL-17A-Konzentration der gesunden Spender (Abbildung 26).

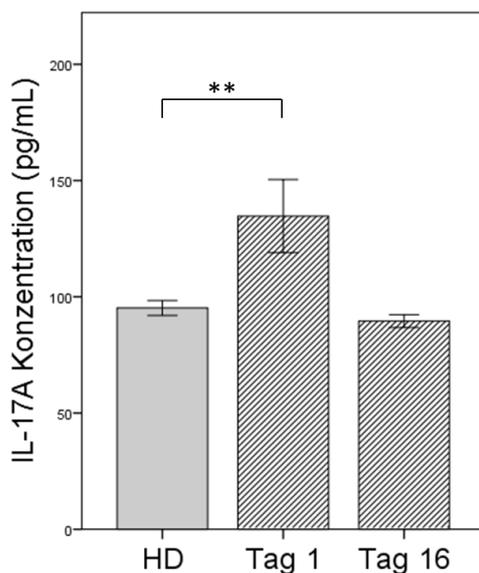


Abbildung 26: Nach Stimulation mit PHA zeigen PBMCs von AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus eine gesteigerte Sekretion von IL-17A im Vergleich zu PBMCs gesunder Spender

PBMCs wurden aus dem Blut von AML-Patienten und gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von PHA 48 Stunden kultiviert. Mit Antikörper-Bead-Konjugate und antikörpergekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen wurde das in den Überständen vorhandene IL-17A angefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Dargestellt sind die IL-17A Konzentrationen in den Überständen. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte; HD: $n = 12$; AML: Tag 1: $n = 5$, Tag 16: $n = 3$; ** $p < 0,01$.

4 Diskussion

Die Effektivität verschiedener zytotoxischer Substanzen in der Therapie der AML, insbesondere kombiniert verabreicht, wird durch zahlreiche Studien belegt [2]. Daher sind Kombinationen zytotoxischer Substanzen unter dem Begriff der „konventionellen Chemotherapie“ zurzeit das therapeutische Mittel der Wahl, um eine komplette Remission (CR) bei AML-Patienten zu erzielen.

In der Induktionstherapie kommen Cytarabin und Anthrazykline zum Einsatz. Da eine CR zwar eine massive Reduktion der Zahl maligner Zellen bedeutet, nicht jedoch deren vollständige Elimination, sind im Anschluss an die Induktionstherapie weitere therapeutische Maßnahmen nötig: die sogenannte Postremissionstherapie [2]. Bei jüngeren Patienten handelt es sich hierbei in der Regel um eine Stammzelltransplantation. Bei älteren Patienten wird mit einer Konsolidierungstherapie versucht, residuelle leukämische Zellen zu eliminieren [2]. Innerhalb der AML-CG 2008-Studie folgt auf die Konsolidierungstherapie eine Erhaltungstherapie, mit welcher versucht wird, trotz Konsolidierungstherapie verbliebene maligne Zellen, die sogenannte *Minimal Residual Disease*, zu kontrollieren [2]. Die im AML-CG 2008-Studienprotokoll vorgesehene Erhaltungstherapie kann das rezidivfreie Überleben möglicherweise verlängern, jedoch führt die Erkrankung bei der Mehrzahl der Patienten letztendlich zum Tod [31]. Immuntherapeutische Konzepte sind vielversprechende Alternativen oder Ergänzungen zu etablierten chemotherapeutischen Konzepten. Da auch konventionelle Chemotherapeutika einen Einfluss auf immunologische Prozesse ausüben, stellt sich die Frage, ob und wie immuntherapeutische mit chemotherapeutischen Konzepten in der Therapie der AML synergistisch kombiniert werden können [70, 71].

4.1 Kombination konventioneller Chemotherapie mit immuntherapeutischen Konzepten

Bei der Therapie solider Tumore haben sich Kombinationen von konventionellen und immuntherapeutischen Therapiestrategien bereits als erfolgversprechend erwiesen. Für das fortgeschrittene Ovarial-Karzinom etwa zeichnete sich in einer klinischen Phase-I/II-Studie ein positiver Effekt auf das Gesamtüberleben ab, und zwar durch Kombination einer DC-Vakzine mit einer niedrig dosierten intravenösen

Cyclophosphamid-Therapie verglichen mit der DC-Vakzine alleine [89]. In einer weiteren klinischen Phase-I/II-Studie deutete sich ein positiver Effekt an auf das Gesamtüberleben von Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom durch Kombination einer Multipeptid-Vakzine mit einer Cyclophosphamid-Einzelgabe [90].

4.2 Immunstatus vor einem Erhaltungstherapiezyklus

4.2.1 Zellzahlen

Die vorliegende Untersuchung ergab, dass AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus, verglichen mit gesunden Spendern, erniedrigte absolute Zahlen peripherer T-Zellen, T_H-Zellen, regulatorischer T-Zellen und CD16⁺ NK-Zellen aufweisen. In Bezug auf zytotoxische T-Zellen und CD16⁻ NK-Zellen fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Im Jahr 1987 konnten Pielken et al. zeigen, dass AML-Patienten in CR infolge Chemotherapie eine im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant geringere absolute Lymphozytenzahl im peripheren Blut aufweisen. Sowohl die Zahl peripherer T-Zellen insgesamt als auch die Zahl peripherer T_H-Zellen war bei AML-Patienten in CR erniedrigt [91]. Panoskaltzis et al. fanden im Jahr 2003 erniedrigte absolute NK-Zellzahlen und ähnliche Zahlen zytotoxischer T-Zellen bei AML-Patienten nach intensiver Chemotherapie im Vergleich zu gesunden Spendern, konnten jedoch in Bezug auf T_H-Zellen keinen statistisch signifikanten Unterschied feststellen [92]. Ersvaer et al. wiesen im Jahr 2010 bei AML-Patienten in Rekonstitution nach intensiver Chemotherapie einen erhöhten Anteil an T_{reg}-Zellen unter den CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Spendern nach. Die Anteile von CD4⁺ bzw. von CD8⁺ T-Zellen an den Lymphozyten unterschieden sich in der Untersuchung von Ersvaer et al. nicht zwischen AML-Patienten in Rekonstitution nach intensiver Chemotherapie und gesunden Spendern [93]. Szczepanski et al. konnten die Ergebnisse von Ersvaer et al. bezüglich regulatorischer T-Zellen bei AML-Patienten in CR bestätigen: Die T_{reg}-Zellzahlen waren in der 2009 veröffentlichten Studie bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern erhöht [94]. Auch Kanakry et al. kamen im Jahr 2011 zu demselben Ergebnis: AML-Patienten wiesen in der frühen Erholungsphase nach Chemotherapie höhere T_{reg}-Zellzahlen auf als gesunde Probanden [95].

Bezüglich der Zahlen zytotoxischer T-Zellen und der Zahlen natürlicher Killerzellen repliziert die vorliegende Studie also bereits in der Vergangenheit Beobachtetes. Die Unterschiede der Ergebnisse zwischen verschiedenen früheren Untersuchungen und der

vorliegenden bezüglich der T_H-Zellzahlen und der Zahlen regulatorischer T-Zellen sind möglicherweise unter anderem auf die Abweichungen der verwendeten Chemotherapieprotokolle zurückzuführen. Auch Unterschiede zwischen den zugrundeliegenden Patientenkollektiven könnten in Anbetracht der relativ geringen Fallzahlen, sowohl der vorliegenden, als auch der zitierten Untersuchungen, zu den Unterschieden der Ergebnisse beigetragen haben.

4.2.2 Zellfunktion

Neben einer verringerten Anzahl an NK-Zellen fand sich in der vorliegenden Untersuchung auch eine eingeschränkte Funktionalität – im Sinne einer geringeren CD69-Präsentation nach Aktivierung durch IL-2 – der vorhandenen NK-Zellen bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus im Vergleich zu gesunden Spendern. Frühere Arbeiten kommen in diesem Punkt zu ähnlichen Ergebnissen. So beobachteten Costello et al. im Jahr 2002 bei einem Großteil der AML-Patienten vor Chemotherapie verglichen mit gesunden Spendern eine verminderte zytolytische Aktivität von NK-Zellen [96]. Fauriat et al. bestätigten diese Ergebnisse im Jahr 2007 [97]. In beiden Studien wird die verminderte zytolytische Aktivität der NK-Zellen von AML-Patienten vor allem auf eine verminderte Präsentation sogenannter *Natural Cytotoxicity Receptors* (es handelt sich hierbei um die Oberflächenmoleküle NKp30, NKp44 und NKp46) zurückgeführt. Die verminderte Präsentation dieser Oberflächenmoleküle wird bereits während der Entstehung der AML erworben [96, 97].

Vor dem Hintergrund zahlreicher Bestrebungen, wirksame immuntherapeutische Ansätze auf der Grundlage einer antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität für die AML zu entwickeln, spielen diese Ergebnisse eine bedeutende Rolle. Obwohl zahlreiche sehr potente, Fc-optimierte, gegen AML-typische Oberflächenantigene gerichtete Antikörper existieren und bereits begonnen wurde, diese klinisch zu testen [NCT02789254], könnten die geringe Anzahl sowie die eingeschränkte Funktionalität autologer NK-Zellen bei AML-Patienten vor und nach intensiver Chemotherapie die Entstehung einer wirksamen Immunantwort verhindern oder zumindest erheblich beeinträchtigen [98–103]. Zur Lösung dieses Problems kommen verschiedene Ansätze in Betracht. Zum einen wäre eine Kombination immuntherapeutischer Strategien mit adoptiven NK-Zell-Therapien denkbar, d.h. die Verabreichung patienteneigener, in vitro veränderter NK-Zellen [104, 105]. Ebenso vorstellbar wäre die Anwendung

immuntherapeutischer Strategien im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation, d.h. dann, wenn hochpotente allogene NK-Zellen in hoher Zahl zur Verfügung stehen [106]. Daneben besteht die Möglichkeit, die Funktionalität von NK-Zellen durch Zytokine wie z.B. IL-2 oder Histamin-Dihydrochlorid zu verbessern [107]. Auch die Unterbindung des hemmenden Einflusses leukämischer Blasten auf NK-Zellen mit Hilfe von Antikörpern stellt eine mögliche Option dar. So konnten Schmiedel et al. im Jahr 2013 zeigen, dass GITR-Antikörper, insbesondere solche mit optimiertem Fc-Teil, zu einer signifikanten Steigerung der Lyse von AML-Zellen durch NK-Zellen führt [108].

4.3 Immunstatus während eines Erhaltungstherapiezyklus

4.3.1 Zelluläre Veränderungen

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich ein transienter Abfall der relativen Lymphozytenzahlen sowie der NK-Zellzahlen während eines Erhaltungstherapiezyklus. Die relativen Zahlen der T-Zellen insgesamt stiegen während eines Erhaltungstherapiezyklus transient an. Dies gilt auch für die relativen Zahlen von CD4⁺ T-Zellen und regulatorischen T-Zellen, während die relativen zytotoxischen T-Zellzahlen auf ihrem Ausgangsniveau stabil blieben. Somit ist der Anstieg der relativen T-Zellzahlen vor allem auf den Anstieg der relativen Zahlen von T_H-Zellen, aber auch auf den Anstieg der relativen Zahlen regulatorischer T-Zellen zurückzuführen.

Zudem zeigte sich, dass die Proliferationskapazität von T_H-Zellen vor einem Erhaltungstherapiezyklus vergleichbar ist mit der von T_H-Zellen gesunder Spender, im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus jedoch vorübergehend abfällt.

Über die Effekte der Chemotherapeutika, wie sie im Rahmen der Erhaltungstherapie gemäß AML-CG 2008-Studienprotokoll appliziert werden, auf den Immunstatus von AML-Patienten, ist bisher wenig bekannt. Für Cyclophosphamid liegen klinische Daten zur Einflussnahme auf die zellulären und humoralen Komponenten des Immunsystems von Patienten mit soliden Tumorerkrankungen vor. Ghiringhelli et al. untersuchten im Jahr 2007 Patienten mit diversen metastasierten, therapierefraktären soliden Tumoren. Die intermittierende Gabe von Cyclophosphamid in geringer Dosierung führte bei diesen Patienten zu einer deutlichen Reduktion der zuvor erhöhten absoluten und relativen T_{reg}-Zellzahlen, in etwa auf das Niveau gesunder Spender. Auch die Suppressor-Funktion der T_{reg}-Zellen auf zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen konnte durch intermittierende

niedrigdosierte Cyclophosphamid-Gabe reduziert werden [109]. Die kontinuierliche niedrigdosierte Cyclophosphamid-Gabe führte in einer Studie von Ge et al. aus dem Jahr 2012 bei Patienten mit metastasiertem therapierefraktärem Mamma-Karzinom zu einem transienten Abfall der absoluten und relativen T_{reg}-Zellzahlen gegenüber den Ausgangswerten, woraufhin die Reaktivität tumorspezifischer T-Zellen deutlich zunahm [110]. Greten et al. untersuchten im Jahr 2010 den Effekt einer niedrigdosierten Cyclophosphamidgabe auf Patienten mit fortgeschrittenem hepatozellulärem Karzinom. Die einmalige Applikation von Cyclophosphamid führte auch hier zu einem signifikanten Absinken der absoluten und relativen T_{reg}-Zellzahlen sowie zu einer Abnahme der Suppressor-Funktion von T_{reg}-Zellen [111]. Im Jahr 2013 bestätigten Heylmann et al. diese Ergebnisse im Wesentlichen *in vitro* und lieferten Hinweise für den zugrundeliegenden Wirkmechanismus. Niedrig konzentriertes Mafosfamid, ein aktiver Cyclophosphamidmetabolit, führte zu einer Reduktion der Zahl regulatorischer T-Zellen, nicht jedoch der Zahl zytotoxischer T-Zellen oder T_H-Zellen. Zudem war die Funktion der regulatorischen T-Zellen im Anschluss an die Mafosfamid-Exposition eingeschränkt. Die Wirkung auf Zahl und Funktion regulatorischer T-Zellen wird auf die Induktion von *Crosslinks* in der T_{reg}-DNS und eine Inhibition von DNS-Reparaturmechanismen zurückgeführt [112].

4.3.2 Humorale Veränderungen

Die Sekretion von IL-17A war in der vorliegenden Untersuchung bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus höher als bei gesunden Spendern. Während eines Erhaltungstherapiezyklus deutete sich eine Abnahme der IL-17A-Sekretion an, in etwa auf das Niveau gesunder Spender.

Im Jahr 2011 zeigten Viaud et al., dass die Gabe von niedrig dosiertem Cyclophosphamid bei Patienten mit diversen soliden Tumoren zu einer gesteigerten Produktion von IL-17A führt. Diese wird zurückgeführt auf eine vermehrte Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu IL-17A produzierenden T_H17-Zellen [113].

4.4 Konklusion und Ausblick

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich ein Abfall der Lymphozytenzahlen von AML-Patienten während eines Erhaltungstherapiezyklus. Außerdem konnten im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus ein transienter Anstieg der T_{reg}-Zellzahlen und ein

transienter Abfall der NK-Zellzahlen beobachtet werden. Während die Zahl der T_H-Zellen vorübergehend anstieg, war deren Proliferationskapazität im Vergleich zum Zeitpunkt vor einem Erhaltungstherapiezyklus vermindert. Diese Effekte der Erhaltungstherapie, wie sie im Rahmen der AML-CG 2008-Studie verabreicht wird, stehen den möglichen positiven Effekten der Lymphozytendepletion gegenüber; sie könnten die Wirksamkeit einer gleichzeitig oder zeitversetzt zur Erhaltungstherapie verabreichten Immuntherapie beeinträchtigen. Eine Kombination von Immuntherapien mit der Erhaltungstherapie, wie sie im AML-CG 2008-Studienprotokoll vorgesehen ist, erscheint daher wenig vielversprechend. An dieser Stelle sei jedoch auf die Einschränkung der Aussagekraft der vorliegenden Untersuchung hingewiesen, welche sich durch die begrenzte Anzahl der eingeschlossenen Patienten ergibt. Ob andere Zytostatikaregime eine bessere Alternative darstellen, muss im Einzelnen untersucht werden. Generell ist die immunmodulatorische Wirkung konventioneller Chemotherapeutika möglicherweise zu unspezifisch, sodass neben potentiell positiven stets auch negative Effekte auf eine kombinierte Immuntherapie zu erwarten wären. Substanzen mit differenzierterer Wirkung, wie z.B. Antikörper, welche deutlich punktueller Einfluss auf immunologische Prozesse nehmen können, stellen womöglich eine bessere Alternative dar [114].

5 Zusammenfassung

Die AML ist die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter [4]. In den vergangenen Jahrzehnten hat sich am Therapiekonzept lange nur wenig geändert und die Verbesserung der Prognose von AML-Patienten war vor allem auch auf effektivere supportive Maßnahmen zurückzuführen. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 29,4 % ist die Prognose immer noch unzufriedenstellend [1, 4]. Neue Therapieansätze, insbesondere Immuntherapien, befinden sich daher derzeit in der Entwicklung. Aktuelle Therapieregime bestehen aus unterschiedlichen Kombinationen verschiedener Chemotherapeutika [4]. Es hat sich gezeigt, dass Chemotherapeutika nicht nur direkte zytotoxische Effekte ausüben, sondern auch Einfluss auf die diversen Zellen des Immunsystems und deren Interaktionen untereinander sowie mit malignen Zellen haben können [70, 71]. Um neue immuntherapeutische Konzepte konstruktiv mit den aktuellen Therapieregimen kombinieren zu können, ist es daher notwendig, die Effekte von Chemotherapeutika auf das Immunsystem genauer zu kennen.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden Blutproben von AML-Patienten vor und während der Erhaltungstherapie untersucht. Die Therapie der Patienten erfolgte innerhalb der AML-CG 2008-Studie oder gemäß dem Therapieprotokoll dieser Studie. Es wurden die Zellzahlen der weißen Blutzellreihe und deren Subpopulationen sowie die Funktionalität von T_H -Zellen und NK-Zellen getestet. Zellzahlen und -funktionen gesunder Spender dienten als Vergleichsgrundlage.

Es zeigte sich, dass die Gesamtzahl der Leukozyten unter der Erhaltungstherapie deutlich abfällt und der Leukozytennadir an Tag 21 erreicht wird. Die absoluten Zahlen von Lymphozyten, T_H -Zellen, T_{reg} -Zellen und NK-Zellen waren vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus im Vergleich zu gesunden Spendern reduziert. Während eines Erhaltungstherapiezyklus fielen die relativen Zahlen von NK-Zellen vorübergehend weiter ab. Die relativen Anteile von T_H -Zellen und T_{reg} -Zellen stiegen transient an.

Die Aktivierbarkeit der NK-Zellen von AML-Patienten war vor Beginn eines Erhaltungstherapiezyklus im Vergleich zu gesunden Spendern deutlich reduziert.

Die Proliferationskapazität von T-Zellen, als Surrogat für deren Funktionalität, war bei AML-Patienten vor einem Erhaltungstherapiezyklus vergleichbar mit der bei gesunden

Spendern. Im Verlauf eines Erhaltungstherapiezyklus zeichnete sich ein vorübergehender Abfall der Proliferationskapazität von T-Zellen ab.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass im hier untersuchten Chemotherapiesetting einerseits eine verminderte Zahl und eine verminderte Funktionalität einiger Lymphozytensubpopulationen sowie andererseits eine erhöhte relative Zahl potentiell immuninhibitorisch wirksamer regulatorischer T-Zellen vorliegen. Immuntherapeutische Konzepte zielen jedoch häufig darauf ab, das patienteneigene Immunsystem zur Bekämpfung der malignen Erkrankung anzuregen. So sollen etwa bei einer Vakzinierung mit patienteneigenen, veränderten DCs vor allem T-Zellen auf maligne Zellen angesetzt werden, um einen antineoplastischen Effekt zu erzeugen. Eine Kombination des Erhaltungstherapiechemas nach dem AML-CG 2008-Studienprotokoll mit immuntherapeutischen Strategien – im Speziellen einer DC-Vakzinierung – erscheint daher nicht sinnvoll. Es stellt sich also die Frage nach alternativen Kombinationsmöglichkeiten für immuntherapeutische Regime. Ob und welche Chemotherapeutika einen synergistischen Nutzen haben könnten, muss im Einzelnen untersucht werden. Möglicherweise sind Chemotherapeutika in ihrer immunmodulatorischen Wirkung zu unspezifisch und für den Erfolg neuer Therapiestrategien eher hinderlich als nützlich. Als denkbare Alternative kommen *Checkpoint*-Inhibitoren oder auch hypomethylierende Substanzen, z.B. Azacitidin, in Betracht [46, 49, 115].

Abkürzungsverzeichnis

AC	<u>A</u> raC 100 mg/m ² zweimal täglich s.c. an den Tagen 1–5 + <u>C</u> yclophosphamid 1000 mg/m ² einmalig i.v. an Tag 3
AD	<u>A</u> raC 100 mg/m ² zweimal täglich s.c. an den Tagen 1–5 + <u>D</u> aunorubicin 45 mg/m ² i.v. an den Tagen 3 und 4
ALL	<u>A</u> kute <u>L</u> ymphatische <u>L</u> eukämie
AML	<u>A</u> kute <u>M</u> yeloische <u>L</u> eukämie
AML-CG	<u>A</u> cute <u>M</u> yeloid <u>L</u> eukemia <u>C</u> ooperative <u>G</u> roup
APC	<u>A</u> llophycocyanin
APL	<u>A</u> kute <u>P</u> romyelozytenleukämie
AT	<u>A</u> raC 100 mg/m ² zweimal täglich s.c. an den Tagen 1–5 + <u>T</u> hioguanin 100 mg/m ² zweimal täglich p.o. an den Tagen 1–5
ATRA	<u>A</u> ll- <u>T</u> rans- <u>R</u> etinoic <u>A</u> cid, all-trans-Retinsäure
BFA	<u>B</u> refeldin <u>A</u>
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin, bovines Serumalbumin, Rinderalbumin
CAR	<u>C</u> himeric <u>A</u> ntigen <u>R</u> eceptor
CBA	<u>C</u> ytometric <u>B</u> ead <u>A</u> rray
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
CEBPA-Gen	Gen, welches für das <u>C</u> CAAT/ <u>E</u> nhancer- <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>A</u> lpha kodiert
CFSE	<u>C</u> arboxyfluorescein <u>S</u> uccinimidyl <u>E</u> ster
CLL	<u>C</u> hronische <u>L</u> ymphatische <u>L</u> eukämie
CML	<u>C</u> hronische <u>M</u> yeloische <u>L</u> eukämie
CR	<u>C</u> omplete <u>R</u> emission, komplette Remission
CR _i	<u>C</u> R mit inkompletter Regeneration
CTLA4	<u>C</u> ytotoxic <u>T</u> - <u>L</u> ymphocyte- <u>A</u> ssociated Protein 4
DC	<u>D</u> endritic <u>C</u> ell, dendritische Zelle
DNA	<u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid
DNS	<u>D</u> esoxyribonukleinsäure
EDTA	<u>E</u> thylendiaminetetraacetic <u>A</u> cid, Ethylendiamintetraessigsäure
ELN	<u>E</u> uropean <u>L</u> eukemia <u>N</u> et

FACS	<u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting, Durchflusszytometrie
FAS	<u>F</u> irst <u>A</u> poptosis <u>S</u> ignal
FASL	<u>F</u> AS <u>L</u> igand, entspricht CD95L (CD95 Ligand)
FBS	<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum, fetales Rinderserum (Synonym: FCS)
FCS	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum, fetales Kälberserum (Synonym: FBS)
FDA	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dmistration, Behörde für Lebensmittel und Arzneimittel der Vereinigten Staaten von Amerika
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> s <u>o</u> thi <u>c</u> yanat
FLT3-Gen	Gen, welches für die <u>F</u> ms <u>L</u> ike <u>T</u> yrosine Kinase 3 kodiert, entspricht dem Oberflächenmolekül CD135
FoxP3	<u>F</u> orkhead- <u>B</u> ox-Protein <u>P</u> 3
FSC	<u>F</u> orward <u>S</u> catter, Vorwärtsstreulicht
G	<u>G</u> auge, Einheit für Außendurchmesser von Kanülen (21 G = 0,8 mm)
G/L	<u>G</u> iga pro <u>L</u> iter (10 ⁹ /Liter)
GO	<u>G</u> emtuzumab- <u>O</u> zogamizin
GVL-Effekt	<u>G</u> raft- <u>V</u> ersus- <u>L</u> eukemia-Effekt
HAM	<u>H</u> igh dose <u>A</u> raC 3 g/m ² (1 g/m ² für Patienten ≥ 60–70 Jahre) zweimal täglich i.v. an den Tagen 1–3 + <u>M</u> itoxantron 10 mg/m ² einmal täglich i.v. an den Tagen 3–5
HD	<u>H</u> ealthy <u>D</u> onor, gesunder Spender
HD-AraC	<u>H</u> igh <u>D</u> ose- <u>A</u> raC, hochdosiertes Cytarabin
HLA	<u>H</u> uman <u>L</u> eukocyte <u>A</u> ntigen, Humanes Leukozytenantigen
HSZT	<u>H</u> ämatopoetische <u>S</u> tamm <u>z</u> ell <u>t</u> ransplantation
IFN γ	<u>I</u> nter <u>f</u> eron- γ
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
ITD	<u>I</u> nternal <u>T</u> andem <u>D</u> uplication, interne Tandemduplikation
i.v.	<u>I</u> ntra <u>v</u> ena, intravenös
M	<u>M</u> ol/L
MHC	<u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex
MICA	<u>M</u> HC Class <u>I</u> <u>C</u> hain-related Protein <u>A</u>
MICB	<u>M</u> HC Class <u>I</u> <u>C</u> hain-related Protein <u>B</u>
M/L	<u>M</u> ega pro <u>L</u> iter (= 10 ⁶ /Liter)
MLL-Gen	<u>M</u> ixed- <u>L</u> ineage <u>L</u> eukemia-Gen

MRC	<u>M</u> edical <u>R</u> esearch <u>C</u> ouncil (des Vereinigten Königreichs von Großbritannien und Nordirland)
MRD	<u>M</u> inimal <u>R</u> esidual <u>D</u> isease
NKG2D	<u>N</u> atural- <u>K</u> iller <u>G</u> roup <u>2</u> , Member <u>D</u>
NKp46	Oberflächenmolekül auf NK-Zellen, entspricht CD335
NK-Zelle	<u>N</u> atürliche <u>K</u> illerzelle
NPM1-Gen	<u>N</u> ucleophosmin <u>1</u> -Gen
PBMCs	<u>P</u> eripheral <u>B</u> lood <u>M</u> ononuclear <u>C</u> ells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, Synonym: Buffy coat
PBS	<u>P</u> hosphate- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	<u>P</u> hycoerythrin
PerCP Cy5.5	<u>P</u> eridinin- <u>C</u> hlorophyll- <u>P</u> rotein- <u>C</u> yanin <u>5.5</u> -Tandemfarbstoff
PHA	<u>P</u> hyto <u>h</u> äm <u>a</u> gglutinin
p.o.	<u>P</u> er <u>o</u> s, peroral
PRAME-Gen	<u>P</u> referentially Expressed <u>A</u> ntigen of <u>M</u> elanoma-Gen
RPMI-1640	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute- <u>1640</u> , Zellkulturmedium
s.c.	<u>S</u> ub <u>c</u> utis, subkutan
SEB	<u>S</u> taphylococcal <u>E</u> nterotoxin <u>B</u> , Staphylokokken Enterotoxin B
S-HAM	<u>S</u> equential <u>H</u> AM; <u>H</u> igh dose <u>A</u> raC 3 g/m ² (1g/m ² für Patienten ≥ 60–70 Jahre) zweimal täglich i.v. an den Tagen 1, 2, 8 und 9 + <u>M</u> itoxantron 10 mg/m ² einmal täglich i.v. an den Tagen 3, 4, 10 und 11
SSC	<u>S</u> ide <u>S</u> catter, Seitwärtsstreulicht
SZT	<u>S</u> tammzell <u>t</u> ransplantation
TAD-HAM	<u>T</u> AD-9 + <u>H</u> AM, Beginn des zweiten Zyklus (d.h. HAM) an Tag 21
TAD-9 (TAD)	<u>T</u> hioguanin 100 mg/m ² zweimal täglich i.v. an den Tagen 3–9 + <u>A</u> raC 100 mg/m ² kontinuierlich i.v. an den Tagen 1 und 2 sowie 100 mg/m ² zweimal täglich i.v. an den Tagen 3–8 + <u>D</u> aunorubicin 60 mg/m ² einmal täglich i.v. an den Tagen 3–5
TGF-β	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor-β, transformierender Wachstumsfaktor-β
T _H -Zelle	<u>T</u> - <u>H</u> elfer Zelle, CD4 ⁺ T-Zelle
TKD	<u>T</u> yrosine <u>K</u> inase <u>D</u> omain, Tyrosinkinase-Domäne
TNF-α	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor- <u>α</u> , Tumornekrosefaktor- α
TP53	<u>T</u> umorprotein <u>p</u> 53

TRAIL	<u>T</u> umor Necrosis Factor- <u>R</u> elated <u>A</u> ppoptose- <u>I</u> nducing <u>L</u> igand, Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
TRAILR	<u>T</u> RAIL- <u>R</u> ezeptor
T _{reg} -Zelle	<u>R</u> egulatorische <u>T</u> -Zelle
TSDR	<u>T</u> _{reg} <u>S</u> pecific <u>D</u> emethylated <u>R</u> egion, T _{reg} -spezifische demethylierte Region
TCR	<u>T</u> <u>C</u> ell <u>R</u> eceptor, T-Zell-Rezeptor
USA	<u>U</u> nited <u>S</u> tates of <u>A</u> merica, Vereinigte Staaten von Amerika
WT1	<u>W</u> ilms- <u>T</u> umor- <u>P</u> rotein <u>1</u>
7+3-Schema	Cytarabin 100 mg/m ² kontinuierlich i.v. an den Tagen 1- <u>7</u> + Daunorubicin 45-90 mg/m ² einmal täglich i.v. an den Tagen 1- <u>3</u>

Literaturverzeichnis

1. Fialkow, P.J. et al. Clonal Remissions in Acute Nonlymphocytic Leukemia: Evidence for a Multistep Pathogenesis of the Malignancy. *Blood*, 1991. **77**(7): pp. 1415-7.
2. Hiddemann, W. et al. Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 3. Auflage. W. Zuckschwerdt Verlag, München, Deutschland, 2009. **2009**: pp. 19-70.
3. Weinberg, O.K. et al. Mixed phenotype acute leukemia: A study of 61 cases using World Health Organization and European Group for the Immunological Classification of Leukaemias criteria. *Am J Clin Pathol*, 2014. **142**(6): pp. 803-8.
4. Howlader, N. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/, based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2019.
5. Herold, G. et al. Innere Medizin. Köln, Deutschland, 2009. **2009**: pp. 82-8.
6. Ding, L. et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 2012. **481**(7382): pp. 506-10.
7. Vesely, M.D. et al. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: pp. 235-71.
8. Menendez, D. et al. Interactions between the tumor suppressor p53 and immune responses. *Curr Opin Oncol*, 2013. **25**(1): pp. 85-92.
9. Reilly, J.T. Pathogenesis of acute myeloid leukemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol*, 2005. **128**(1): pp.18-34.
10. Dunn, G.P. et al. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 2004. **21**(2): pp. 137-48.
11. Bennett, J.M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 1976. **33**(4): pp. 451-8.
12. Campo, E. et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 2011. **117**(19): pp. 5019-32.
13. Grimwade, D. et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*, 2010. **116**(3): pp. 354-65.

14. Döhner, H. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 2017. **129**(4): pp. 424-47.
15. Ferrara, F. et al. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*, 2013. **381**(9865): pp. 484-95.
16. Büchner, T. et al. Accumulation of S-phase cells in the bone marrow of patients with acute leukemia by cytosine arabinoside. *Blut*, 1974. **28**(4): pp. 299-300.
17. Nakamura, T. et al. DNA strand damage induced by anticancer agents and its repair in relation to their mode of action in leukemic cells. *Nihon Ketsueki Gakkai Sasshi*, 1977. **40**(6): pp. 1131-44.
18. Burke, P.J. et al. Timed sequential therapy of human leukemia based upon the response of leukemic cells to humoral growth factors. *Cancer Res*, 1977. **37**(7 Pt 1): pp. 2138-46.
19. Gale, R.P. et al. High remission-induction rate in acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 1977. **1**(8010): pp. 497-9.
20. Foon, K.A. et al. Intensive chemotherapy is the treatment of choice for elderly patients with acute myelogenous leukemia. *Blood*, 1981. **58**(3): pp. 467-70.
21. Büchner, T. et al. Multicentre study on intensified remission induction therapy for acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, 1982. **6**(6): pp. 827-31.
22. Büchner, T. et al. Improved cure rate by very early intensification combined with prolonged maintenance chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia: data from the AML Cooperative Group. *Semin Hematol*, 1991. **28**(3 Suppl 4): pp. 76-9.
23. Bishop, J.F. et al. A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood*, 1996. **87**(5): pp. 1710-7.
24. Weick, J.K. et al. A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*, 1996. **88**(8): pp. 2841-51.
25. Büchner, T. et al. Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood*, 1999. **93**(12): pp. 4116-24.
26. Hiddemann, W. (Chief Investigator) et al. A Randomized, Risk and Age Adapted

- Comparison of the Dose-Dense Regimen S-HAM (sequential high dose cytosine arabinoside and mitoxantrone) versus Standard Double Induction for Initial Chemotherapy of Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia, Study Protocol AML-CG 2008, EudraCT number 2007-003103-12, Final Version 3.0, 26.02.2009.
27. Kern, W. et al. High antileukemic activity of sequential high dose cytosine arabinoside and mitoxantrone in patients with refractory acute leukemias. Results of a clinical phase II study. *Cancer*, 1997. **79**(1): pp. 59-68.
 28. Kern, W. et al. Superiority of high-dose over intermediate-dose cytosine arabinoside in the treatment of patients with high-risk acute myeloid leukemia: results of an age-adjusted prospective randomized comparison. *Leukemia*, 1998. **12**(7): pp. 1049-55.
 29. Kern, W. et al. Granulocyte colony-stimulating factor shortens duration of critical neutropenia and prolongs disease-free survival after sequential high-dose cytosine arabinoside and mitoxantrone (S-HAM) salvage therapy for refractory and relapsed acute myeloid leukemia. German AML Cooperative Group. *Ann Hematol*, 1998. **77**(3): pp. 115-22.
 30. Büchner, T. et al. Double induction containing either two courses or one course of high-dose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by either autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(16): pp. 2480-9.
 31. Büchner, T. et al. Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML): two multicenter studies of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 1985. **3**(12): pp. 1583-9.
 32. Burnett, A.K. Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012. **2012**: pp. 1-6.
 33. Rashid, A. et al. Maintenance therapy in acute myeloid leukemia: an evidence-based review of randomized trials. *Blood*, 2016. **128**(6): pp. 763-73.
 34. Short, N.J. et al. Acute myeloid leukemia. *Lancet*, 2018. **S0140-6736**(18): pp. 31041-9.
 35. Fenau, P. et al. Effect of all-trans-retinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a multicenter randomized trial. European APL 91 Group. *Blood*, 1993. **82**(11): pp. 3241-9.

36. Adès, L. et al. Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: the European APL Group experience. *Blood*, 2010. **115**(9): pp. 1690-6.
37. Stone, R.M. et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*, 2017. **377**(5): pp. 454-65.
38. Levis, M. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. *Blood*, 2017. **129**(26); pp. 3403-06.
39. Fenaux, P. et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(4): pp. 562-9.
40. Koreth, J. et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*, 2009. **301**(22): pp. 2349-61.
41. Abdul Wahid, S.F. et al. Comparison of reduced-intensity and myeloablative conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Stem Cells Dev*, 2014. **23**(21): pp. 2535-52.
42. Champlin, R. et al. Harnessing graft-versus-malignancy: non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy. *Br J Haematol*, 2000. **111**(1): pp. 18-29.
43. Hemmati, P.G. et al. Reduced intensity conditioning prior to allogeneic stem cell transplantation in first complete remission is effective in patients with acute myeloid leukemia and an intermediate risk karyotype. *Int J Hematol*, 2010. **91**(3): p. 436-45.
44. Laport, G.G. et al. Reduced-intensity conditioning followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult patients with myelodysplastic syndrome and myeloproliferative disorders. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008. **14**(2): pp. 246-55.
45. Warren, E.H. et al. Dissecting Graft-versus-Leukemia from Graft-versus-Host-Disease using Novel Strategies. *Tissue antigens*, 2013. **81**(4): pp. 183-193.
46. Lichtenegger, F.S. et al. Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*, 2017. **10**(1):142.
47. Sievers, E.L. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukaemia in first relapse. *Expert Opin Biol Ther*, 2001.

- 1(5): pp. 893-901.
48. Takeshita, A. Efficacy and resistance of gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*, 2013. **97**(6): pp. 703-16.
 49. Lichtenegger, F.S. et al. Current strategies in immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Immunotherapy*, 2013. **5**(1): pp. 63-78.
 50. Topp, M.S. et al. Safety and activity of linatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(1): pp. 157-66.
 51. Phelan, K.W. et al. Novel Therapies in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*, 2018. **13**(4): pp. 289-99.
 52. Turtle, C.J. et al. CAR-T cells of defined CD4+: CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*, 2016. **126**(6): pp. 2123-38.
 53. Chen, L. et al. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(4): pp. 227-42.
 54. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): pp. 252-64.
 55. Queirolo, P. et al. Immune-checkpoint inhibitors for the treatment of metastatic melanoma: a model of cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol*, 2019. **59**: pp. 290-297.
 56. Bylicki, O. et al. New PDL1 inhibitors for non-small cell lung cancer: focus on pembrolizumab. *Onco Targets Ther*, 2008. **11**: pp. 4051-64.
 57. Alatrash, G. et al. Targeting Immune Checkpoints in Hematologic Malignancies. *Pharmacol Rev*, 2016. **68**(4): pp. 1014-25.
 58. Berger, R. et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(10): pp. 3044-51.
 59. Rosenblatt, J. et al. Individualized vaccination of AML patients in remission is associated with induction of antileukemia immunity and prolonged remissions. *Sci Transl Med*, 2016. **8**(368): 368ra171.
 60. Paietta, E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012. **2012**: pp. 35-42.
 61. Swann, J.B. et al. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*, 2007. **117**(5): pp. 1137-46.
 62. Wu, J. et al. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res*, 2003. **90**: pp. 127-56.

63. Smyth, M.J. et al. NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer. *J Exp Med*, 2004. **200**(10): pp. 1325-35.
64. Chia, J. et al. Temperature sensitivity of human perforin mutants unmasks subtotal loss of cytotoxicity, delayed FHL, and a predisposition to cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(24): pp. 9809-14.
65. Schmidt, A. et al. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 51.
66. Thornton, A.M. et al. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(2): pp. 366-76.
67. Song, Y. et al. Role of interleukin (IL)-17 and T-helper (Th)17 cells in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **493**(1): pp. 1-8.
68. Wróbel, T. et al. Interleukin-17 in acute myeloid leukemia. *J Cell Mol Med*, 2003. **7**(4): pp. 472-4.
69. Han, Y. et al. Th17 cells and interleukin-17 increase with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Sci*, 2014. **105**(8): pp. 933-42.
70. Zitvogel, L. et al. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(1): pp. 59-73.
71. Bracci, L. et al. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ*, 2014. **21**(1): pp. 15-25.
72. Arber, D.A. et al. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *Am J Clin Pathol*, 2003. **119**(5): pp. 672-80.
73. Wieczorek, G. et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res*, 2009. **69**(2): pp. 599-608.
74. Murphy, K. et al. *Janeway's Immunobiology*, 7th Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, USA, 2008. **2008**: pp. 228-9.
75. Reichert, T. et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol*, 1991. **60**(2): pp. 190-208.
76. Fontenot, J.D. et al. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): pp. 330-6.
77. Liu, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive

- function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): pp. 1701-11.
78. Baecher-Allan, C. et al. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Semin Immunol*, 2004. **16**(2): pp. 89-98.
79. Robertson, M.J. et al. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, 1990. **76**(12): pp. 2421-38.
80. Romero, A.I. et al. Nkp46 and NKG2D receptor expression in NK cells with CD56dim and CD56bright phenotype: regulation by histamine and reactive oxygen species. *Br J Haematol*, 2006. **132**(1): pp. 91-8.
81. Cooper, M.A. et al. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 2001. **22**(11): pp. 633-40.
82. Renz, H. et al. *Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin: Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 2003. **2003**: p. 190.
83. Henney, C. S. et al. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*, 1981. **291**(5813): pp. 335-8.
84. Borrego, F. et al. Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(5): pp. 1039-43.
85. Borrego, F. et al. CD69 expression and function on NK cells. In: Schlossman S. F., Boumsell L., Gilks W. et al., editors. *Leucocyte Typing V*. Oxford, New York, Tokio: Oxford University Press, 1995. **1995**: p. 1427.
86. Gerosa, F. et al. Differential effects of tyrosine kinase inhibition in CD69 antigen expression and lytic activity induced by rIL-2, rIL-12, and rIFN-alpha in human NK cells. *Cell Immunol*, 1993. **150**(2): pp. 382-90.
87. Moretta, A. et al. CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med*, 1991. **174**(6): pp. 1393-8.
88. Ikeda, H. et al. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002. **13**(2): pp. 95-109.
89. Chu, C.S. et al. Phase I/II randomized trial of dendritic cell vaccination with or without cyclophosphamide for consolidation therapy of advanced ovarian cancer in first or second remission. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(5): pp. 629-41.

90. Walter, S. et al. Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med*, 2012. **18**(8): pp. 1254-61.
91. Pielken, H.J. et al. Immunological monitoring in remission acute myeloid leukemia during maintenance therapy. *Haematol Blood Transfus*, 1987. **30**: pp. 385-6.
92. Panoskaltsis, N. et al. Quantification and cytokine production of circulating lymphoid and myeloid cells in acute myelogenous leukemia. *Leukemia*, 2003. **17**(4): pp. 716-30.
93. Ersvaer, E. et al. Intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia differently affects circulating TC1, TH1, TH17 and TREG cells. *BMC Immunol*, 2010. **11**: pp. 38 ff.
94. Szczepanski, M.J. et al. Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(10): pp. 3325-32.
95. Kanakry, C.G. et al. Early lymphocyte recovery after intensive timed sequential chemotherapy for acute myelogenous leukemia: peripheral oligoclonal expansion of regulatory T cells. *Blood*, 2011. **117**(2): pp. 608-17.
96. Costello, R.T. et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2002. **99**(10): pp. 3661-7.
97. Fauriat, C. et al. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood*, 2007. **109**(1): pp. 323-30.
98. Hofmann, M. et al. Generation, selection and preclinical characterization of an FC-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia*, 2012. **26**(6): pp. 1228-37.
99. Korver, W. et al. Monoclonal antibodies against IREM-1: potential for targeted therapy of AML. *Leukemia*, 2009. **23**(9): pp. 1587-97.
100. Mohseni Nodehi, S. et al. Enhanced ADCC activity of affinity matured and Fc-engineered mini-antibodies directed against the AML stem cell antigen CD96. *PLoS ONE*, 2012. **7**(8): e42426.
101. Askmyr, M. et al. Selective killing of candidate AML stem cells by antibody targeting of IL1RAP. *Blood*, 2013. **121**(18): pp. 3709-13.
102. Hoseini, S.S. et al. Acute myeloid leukemia targets for bispecific antibodies. *Blood*

- Cancer J., 2017. **7**(2): e522.
103. Lion, E. et al. Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2012. **26**(9): pp. 2019-26.
104. Davies, J.O.J. et al. Opportunities and limitations of NK cells as adoptive therapy for malignant disease. *Cytotherapy*, 2014. **16**(11): pp. 1453-66.
105. Suck, G. et al. Natural Killer Cells for Therapy of Leukemia. *Transfus Med Hemother*, 2016. **43**(2): pp. 89-95.
106. Ruggeri, L. et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 2002. **295**(5562): pp. 2097-100.
107. Romero, A. et al. Post-consolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in AML. *Scand J Immunol*, 2009. **70**(3): pp. 194-205.
108. Schmiedel, B.J. et al. Generation and preclinical characterization of a Fc-optimized GITR-Ig fusion protein for induction of NK cell reactivity against leukemia. *Mol Ther*, 2013. **21**(4): pp. 877-86.
109. Ghiringhelli, F. et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 2007. **56**(5): pp. 641-8.
110. Ge, Y. et al. Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(3): pp. 353-62.
111. Greten, T. F. et al. Low-dose cyclophosphamide treatment impairs regulatory T cells and unmasks AFP-specific CD4+ T-cell responses in patients with advanced HCC. *J Immunother*, 2010. **33**(2): pp. 211-8.
112. Heylmann, D. et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: implications for the immune response. *PLoS One*, 2013. **8**(12): e83384.
113. Viaud, S. et al. Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res*, 2011. **71**(3): pp. 661-5.
114. Houot, R. et al. Immunomodulating antibodies and drugs for the treatment of haematological malignancies. *Cancer Metastasis Rev*, 2011. **30**(1): pp. 97-109.
115. Lichtenegger, F.S. et al. Targeting LAG-3 and PD-1 to Enhance T Cell Activation by Antigen-Presenting Cells. *Front Immunol*, 2018. **9**: 385.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikums der Universität München unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Marion Subklewe.

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zur der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich meiner Doktormutter Prof. Dr. Marion Subklewe für die Überlassung des Dissertationsthemas und die exzellente fachliche Betreuung.

Bei Dr. Felix Lichtenegger bedanke ich mich für die hervorragende Einarbeitung in die praktische Laborarbeit, die regelmäßige Besprechung meiner Daten und die Anleitung bei deren Auswertung und Interpretation. Auch bei Dr. Barbara Beck möchte ich mich für die ausgezeichnete Unterstützung in allen diesen Punkten bedanken.

Meinen Mitdoktoranden, allen Mitarbeitern des Labors im Helmholtz-Zentrum und den Mitarbeitern der Stationen der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern danke ich für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt auch den Patienten und Blutspendern, die mir die für diese Untersuchung nötigen Blutproben so großzügig überlassen haben.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Für seine geduldige Unterstützung in allem danke ich Dr. Thomas Hertling. Für das kritische und konstruktive Korrekturlesen meiner Arbeit bedanke ich mich bei Dr. Regina Müller und Philip Fickel.

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Originalarbeit

Lichtenegger F.S., Lorenz R., Gellhaus K., Hiddemann W., Beck B., Subklewe M.

Impaired NK cells and increased regulatory T cell numbers during cytotoxic maintenance therapy in AML

Leukemia Research, 2014. **38**(8): pp. 964-9.

Poster

R. Lorenz, F. Lichtenegger, B. Beck, P. Palluch, M. Subklewe

Composition of PBMC population and functionality of T- and NK-cells in AML Patients receiving cytotoxic maintenance therapy: when to administer immunotherapy?

Dreizehntes wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Klinikum der Universität München, Campus Großhadern; Herrsching, Deutschland, Juli 2011.

R. Lorenz, F. Lichtenegger, P. Palluch, U. Hoffmueller, J. Braess, W. Hiddemann, B. Beck, M. Subklewe

Differential effect of cytotoxic maintenance therapy on T cells, T_{regs} and NK cells in AML patients

17th Congress of the European Hematology Association; Amsterdam, The Netherlands, June 2012.

Felix S. Lichtenegger, Robin Lorenz, Patrick Palluch, Ulrich Hoffmueller, Jan Braess, Wolfgang Hiddemann, Barbara Beck and Marion Subklewe

Composition of PBMC Population and Functionality of T and NK Cells in AML Patients Receiving Cytotoxic Maintenance Therapy

American Society of Hematology (ASH) 53rd Annual Meeting; San Diego, California, USA, December 2011.