

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
.Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer, FRCPE

**Immunfunktion unter ALL-Therapie ~ prospektive
Studie an 23 Kindern**
**Untersuchungen der Zytokinproduktion und der T-Zellregeneration
mittels Durchflußzytometrie, TRECS, Immunoscope und ELISA**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Verena Amrei Wiegering

aus Heidelberg

Würzburg, Juli 2009

Referent: Professor Dr. med. P. G. Schlegel

Koreferent: Professor Dr. med. H. Einsele

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Januar 2010

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Eltern

”Quasi nani super gigantium umeros longius quam ipsius speculamur”.

Bernard von Chartres

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Immunsystem	2
1.2 Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter	5
1.3 Zytokine	6
1.4 T-Zell-Neubildung und T-Zell-Rezeptoren	7
1.5 B-Zellen und Immunglobuline	9
1.6 Fragestellung	12
2. Patienten	14
3. Material	17
3.1 Geräte	17
3.2 Laborbedarf	19
3.3 Zellkulturmedien und Zusätze	20
3.4 Antikörper und Stimulanzen	21
3.5 Reagenzien molekularbiologischer und immunologische Arbeiten	23
3.5.1 Molekularbiologische und immunologische Kits	23
3.5.2 Enzyme	23
3.6 Primer	24
3.6.1 Primer für TRECs	24
3.6.2 Primersequenzen	24
3.6.3 Pufferlösungen	26
3.6.4 Elektrophoresegele	26
3.7 Chemikalien und sonstige Reagenzien	27
4. Methoden	29
4.1 Durchflußzytometrie	29
4.2 Immunstatus	31
4.3 Gating des Immunstatus	32
4.3.1 Der Immunstatus (FACS-Bilder)	34
4.4 Isolierungen mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	35

4.5 Zellkultur und Stimulation	36
4.5.1 Stimulation	36
4.5.2 Vorbereitung der Zellen zur intrazellulären Zytokin- bestimmung im FACS	37
4.5.3 Färbeprotokolle	38
4.6 Spezifität intrazellulärer Zytokinfärbungen	40
4.7 Anfertigungen von PCR-Produkten und Gelelektrophorese	41
4.7.1 Isolierung von RNA	41
4.7.2 Anfertigung von cDNA-Produkten	41
4.7.3 Spectratyping/Immunoscope	41
4.7.3.1 PCR	41
4.7.3.2 Gelelektrophorese	43
4.8 ELISA	47
4.9 TREC-Assays (T-cell rezeptor excision circles)	49
4.10 Statistik	51
5. Ergebnisse	52
5.1 Immunglobuline (ELISA) und Immunstatus (Phänotypisierung von Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie) bei pädiatrischen Leukämiepatienten	52
5.1.1 Leukämie-Patienten allgemein	52
5.1.2 B-Zellen und Immunglobuline	52
5.1.3 T-Zellen	55
5.1.4 NK-Zellen	59
5.2 Zytokinexpression bei Leukämiepatienten	60
5.2.1 Intrazellulärer Nachweis von Zytokinen mittels Durchflußzytometrie	60
5.2.2 Kontrollen zur Spezifität intrazellulärer Zytokinfärbungen	60
5.2.3 Kontrollen zur Intrazellularität der Zytokinmessung	61
5.2.4 Analogie der Expression von Oberflächenmarkern	61
5.2.5 Verschiedene Stimulanzen	62
5.2.6 Stimulationszeit / Kinetik der Zytokine	63
5.2.7 Zytokine im FACS und ELISA	64
5.2.8 Simultanfärbung von Zytokine in T-Zellen	64

Inhaltsverzeichnis

5.2.9 Zytokin-Gating	65
5.2.10 Zytokinproduktion und Simultanfärbung im stimulierten Blut bei gesunden Kindern	66
5.2.11 Intrazelluläre Zytokinproduktion im peripheren Blut von pädiatrischen Leukämie-Patienten	67
5.2.12 Zytokin-ELISA im unstimulierten Serum von Leukämie- Patienten	76
5.3 TRECs und Immunoscope bei Leukämiepatienten von Diagnose bis Protokoll M	80
5.3.1 TRECs	80
5.3.2 Immunoscope	81
6. Diskussion	84
6.1 Zytokine	85
6.2 Immunfunktion während ALL-Therapie	88
6.2.1 Ausgangswerte bei Diagnose vor Therapiebeginn	88
6.2.2 NK-Zellen und B-Zellen während Leukämietherapie	88
6.2.3 T-Zellen während Leukämietherapie	90
6.2.4 Zytokine im Therapieverlauf	92
7. Zusammenfassung	95
8. Literaturverzeichnis	97
Verzeichnis eigener Veröffentlichungen	
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
ALL-BFM	Behandlungsprotokoll der ALL
APC	Allophycocyanin
Bp	Basenpaare
CD	cluster of differentiation
CD3 ⁺	T-Zellen
CD3 ⁺ CD8 ⁻	T-Helferzellen
CD3 ⁺ CD4 ⁺	T-Helferzellen
CD3 ⁺ CD8 ⁺	cytotoxische T-Zellen
CD45RO ⁺ /CD45RA ⁻	Gedächtniszellen
CD45RA ⁺ /CD45RO ⁻	naive Zellen
CDR3-Region	complementarity determining region 3
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
Endoxan	Cyclophosphamid
Et al.	Et alii
FACS	fluorescent activated cell sorter
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter
GvHD	Graft versus Host Disease
HBSS	Hank's balanced salt solution
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IL	Interleukin
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
kDa	kilo Dalton
MRD	Minimal residual disease
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle

Abkürzungsverzeichnis

NO	Stickstoffoxid
NTC	no template control
PB	peripheres Blut
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PIB	Stimulation mit PMA, Ionomycin und Brefeldin (in der Regel für 20h)
PMA	phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RT-PCR	real time PCR
SSC	sideward scatter
SEB	staphylococcal enterotoxin B
SZT	Stammzell-Transplantation
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Polymerase aus thermophilus aquaticus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-cell receptor
TGF β 1	Transforming growth factor-b1
Th	T-Helferzellen
TI-Antigene	T-Zell unabhängige Antigene (independent)
TNF α	Tumornekrosefaktor
TRECs	T-cell rezeptor excision circles
ZNS	Zentrales Nervensystem

Anmerkung: Die Bezeichnungen Spectratyping und Immunoscope werden im Folgenden synonym verwendet.

1. EINLEITUNG

Jedes Jahr erkrankt in Deutschland etwa eines von 500 Kindern an einem malignen Tumor (Kaletsch et al.1996). Leukämien (33%) und ZNS-Tumoren (21%) stellen die größten Untergruppen dar (Abb. 1.1), die Erkrankungshäufigkeit unterscheidet sich jedoch in verschiedenen Altersabschnitten deutlich. In den ersten fünf Lebensjahren ist das Risiko für bösartige Erkrankungen etwa doppelt so hoch wie im späteren Kindesalter. Diese erhöhte Inzidenz weist darauf hin, dass ein großer Teil von Tumoren im Kindesalter bereits pränatal angelegt ist. Man bezeichnet diese Tumoren deshalb auch als embryonale Tumoren (Neuroblastom, Medulloblastom, Retinoblastom, Hepatoblastom). Bei Jugendlichen hingegen treten eher Knochentumore und Hodgkin-Lymphome auf. In den unterschiedlichen Industrieländern sind Verteilung und Häufigkeiten pädiatrisch onkologischer Erkrankungen vergleichbar.

Die Heilungsraten sind bei malignen Neoplasien im Kindesalter vergleichsweise sehr gut und konnten in den letzten vierzig Jahren kontinuierlich gesteigert werden. Seit 1976 werden für fast alle pädiatrischen Leukämie- und Tumorerkrankungen aufeinander aufbauende Therapiestudien durchgeführt, die dazu dienen, sowohl die Diagnostik als auch die Behandlung risikoadaptiert nach dem aktuellen Stand des Wissens und auf der Grundlage der Erkenntnisse der vorangegangenen Studien kontinuierlich zu verbessern. Durchschnittlich überleben zwei Drittel der erkrankten Kinder fünf Jahre rezidivfrei nach Diagnosestellung (Kinderkrebsregister Mainz, 2005), wobei die Prognose von der Art der Erkrankung abhängt. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für den Morbus Hodgkin beispielsweise über 90%, während die Prognose für die akute myeloische Leukämie mit ca. 50% immer noch sehr ungünstig ist. Die durch intensivierten Therapien erzielten höheren Überlebensraten führen bei einer Reihe von Überlebenden auch zu einer Reihe von Spätfolgen (zum Beispiel endokrinologische und kardiale Schäden, Entwicklung eines Zweittumors). Insbesondere durch konventionelle und hochdosierte Chemotherapie im Rahmen einer autologen oder allogenen Stammzell-Transplantation kommt es in der Folge zur Beeinträchtigung immunologischer Funktionen. Daraus resultiert in erster Linie eine erhöhte Infektanfälligkeit für den Patienten.

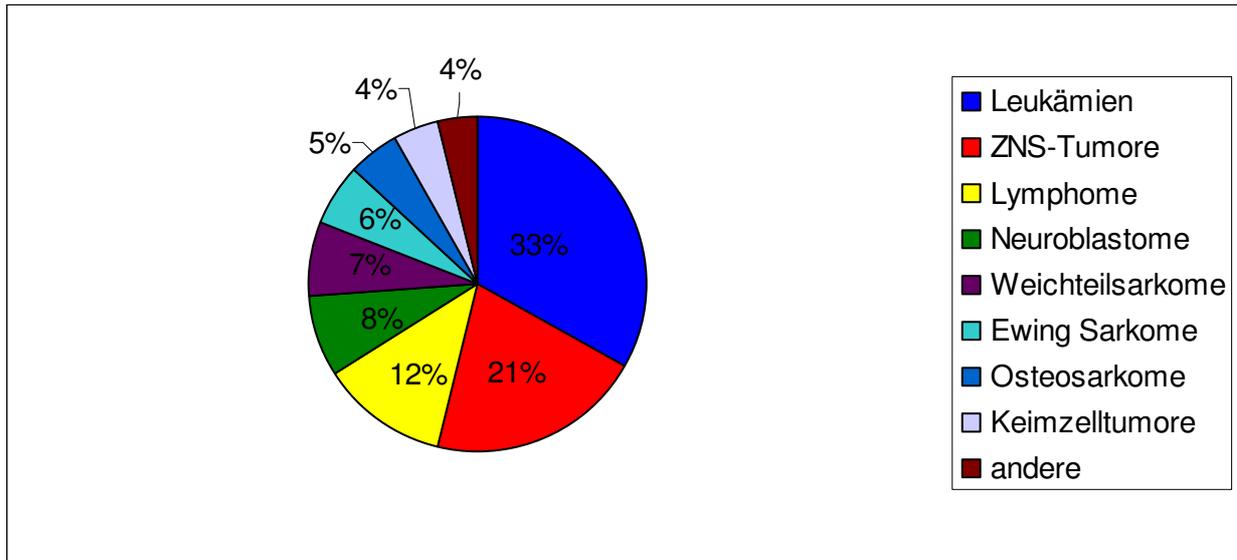


Abbildung 1.1: Relative Häufigkeit der malignen Neoplasien im Kindesalter (nach Kinderkrebsregister Mainz)

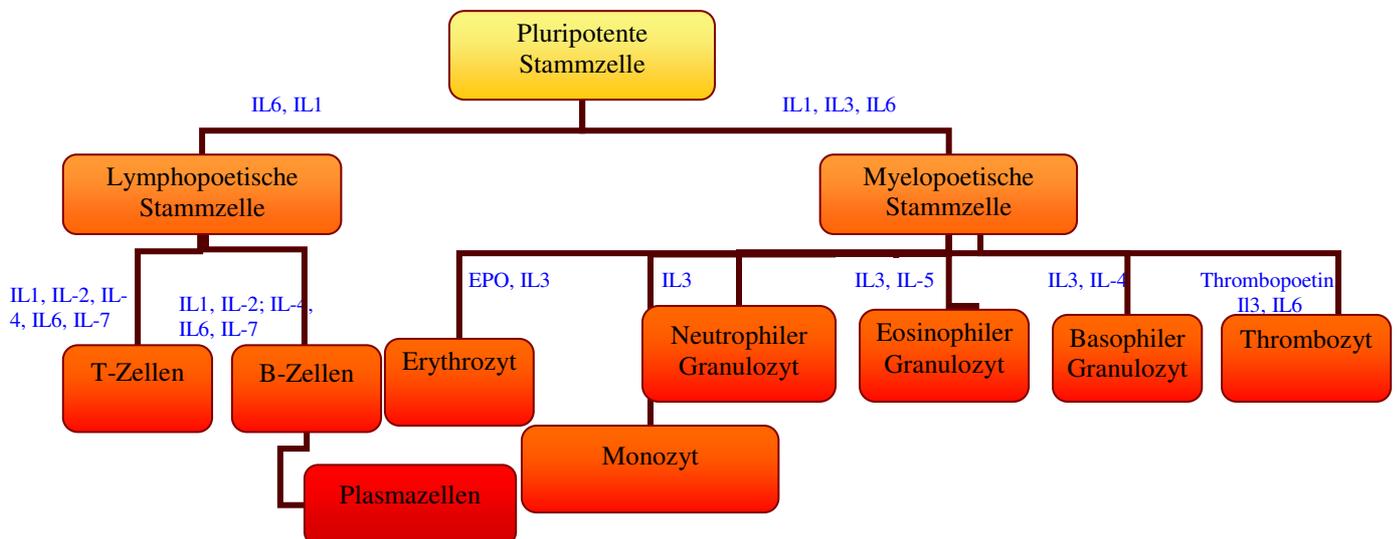
1.1 Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes System, das aus verschiedenen Arten beweglicher und unbeweglicher Zellen besteht, die sich im lymphatischen Gewebe, welches über den gesamten Körper verteilt ist, wechselseitig beeinflussen. Dieses System wird ständig durch den Eintritt fremder Substanzen (Antigene) in den Wirtsorganismus angeregt. Seine Funktion besteht in der Erkennung und gegebenenfalls Beseitigung dieser Substanzen. Das Immunsystem trägt somit wesentlich zum Schutz vor Infektionskrankheiten und Tumoren bei.

Tumorerkrankungen werden durch das progressive Wachstum der Nachkommen einer einzigen transformierten Zelle verursacht. Bei den akuten lymphoblastischen Leukämien weisen Studien daraufhin, dass die Entstehung der Leukämie zweizeitig verläuft (Greaves et al. 1993, Fasching et al. 2000/2001). Fasching et al. konnten retrospektiv demonstrieren, daß das für die Leukämiezellen klonspezifische Gen-Rearrangement im Antigenrezeptor bereits bei Geburt nachweisbar war. Es wird daher hypothesiert, daß das erste „leukämische“ Ereignis bereits während der pränatalen Periode stattfindet, gefolgt von einer zweiten Mutation postnatal, die zur klinischen Manifestation einer Leukämie führt.

Zur Heilung müssen sämtliche bösartige Zellen entfernt oder zerstört werden. Tierversuche haben gezeigt, dass bei Immunreaktionen auf Tumoren T-Zellen eine entscheidende Vermittlerrolle bei der Tumormunität spielen (Janeway et al. 2002a).

Alle zellulären Bestandteile des Blutes stammen aus einer pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarkes (Abb. 1.2), aus der sie ausdifferenzieren (Shofield, 1979). Diese pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen teilen sich und bilden zwei spezialisierte Typen von Stammzellen aus: Eine gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle, aus der sich T- und B-Zellen bilden, die für die spezifische Immunität verantwortlich sind, und eine gemeinsame myeloische Vorläuferzelle, aus der die Leukozyten (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen), die Erythrozyten und die Megakaryozyten (aus denen die Thrombozyten entstehen) hervorgehen. Granulozyten werden dem unspezifischen Immunsystem zugeordnet, erfüllen aber auch wichtige Funktionen bei der Auslösung



und Steuerung der spezifischen Abwehr.

Abbildung 1.2: Blutzellendifferenzierung: Zytokinbeeinflussung zur Differenzierung der einzelnen Zellreihen

Sowohl das unspezifische als auch das spezifische Immunsystem besteht aus zellulären und humoralen Anteilen. Zum humoralen Bestandteil werden gezählt: das unspezifisch wirkende Komplementsystem und die Immunglobuline mit einer direkten Effektorfunktion, die das Ziel der direkten Zerstörung infektiöser Partikel hat, sowie die Zytokine, denen man eine Botenstoff-Funktion zuschreibt. Zytokine werden vor allem von T-Zellen und Monozyten gebildet und beeinflussen auf parakrinen und autokrinen Weg viele Zell-Interaktionen.

T- und B-Zellen unterscheiden sich durch ihre Antigenrezeptoren und den Ort ihrer Ausdifferenzierung (T-Zellen im Thymus, B-Zellen im Knochenmark). Während dieser Differenzierung (positive und negative Selektion innerhalb des Thymus) lernen die T-Zellen zwischen Fremd und Selbst zu unterscheiden. Gereifte T- und B-Zellen zirkulieren zwischen den Blutgefäßen und den peripheren lymphatischen Organen. Nach Kontakt mit einem Antigen differenzieren sich B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen, während T-Zellen zu T-Effektorzellen werden. T-Zellen erfüllen eine Reihe unterschiedlicher Funktionen: Im Vordergrund steht die adaptive erworbene Immunreaktion. Zytotoxische $CD8^+$ -Zellen töten infizierte Zielzellen, $CD4^+$ -Th1-Zellen regen Makrophagen an, die wiederum intrazelluläre Parasiten abtöten können, während $CD4^+$ -Th2-Zellen essentiell für die Aktivierung von B-Zellen sind. Zytokinvermittelte Wechselwirkungen beeinflussen Proliferation, Funktion und Differenzierung (siehe 1.4.)

Eine dritte Linie lymphozytenähnlicher Zellen sind die natürlichen Killerzellen, die auch aus der lymphatischen Vorläuferzelle hervorgehen, aber keine Antigen-spezifität besitzen und deshalb zum unspezifischen Immunsystem gezählt werden. Sie zirkulieren als große Lymphozyten im Blut und können einige anormale Zellen erkennen und abtöten, beispielsweise bestimmte Tumorzellen und virusinfizierte Zellen. Sie haben außerdem Bedeutung bei der angeborenen Immunabwehr gegen intrazelluläre Krankheitserreger.

1.2 Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter

Akute Leukämien stellen den größten Anteil der Malignome im Kindesalter dar (siehe Abb. 1.1). Leukämien sind Erkrankungen des Knochenmarks, die die Vorläuferzellen der Leukozyten betreffen. Verschiedene, bis jetzt nicht exakt bekannte Ursachen können den Verlust der Wachstumskontrolle bei diesen Zellen bedingen. Studien zeigten, dass es sich dabei vermutlich um ein zweizeitiges Ereignis handelt (Fasching et al., 2000). Die ungehemmte Teilung kann dann zur Verdrängung der normalen, blutbildenden Zellen mit entsprechendem klinischem Erkrankungsbild führen. In Abhängigkeit der betroffenen Zelllinien werden myeloische und lymphatische Leukämien unterschieden.

Die heutigen Behandlungsschemata bestehen aus Induktions-, Konsolidierungs-, Reinduktions- und Dauertherapie mit Zytostatika. Das genaue therapeutische Vorgehen ist risikoadaptiert unter Berücksichtigung des Alters, des Ansprechen auf die Therapie und des Leukämiesubtyps. Ein wichtiger Bestandteil der Therapie ist die prophylaktische ZNS-Behandlung, da die dort befindlichen Leukämiezellen weitgehend durch die Bluthirnschranke vor der Wirkung der systemischen Chemotherapie geschützt sind. Alle in diese Studie eingeschlossenen Patienten wurden uniform nach dem pädiatrischen Therapieprotokoll ALL-BFM 2000 behandelt. Ein Teil der Leukämiezellen befindet sich immer in einer Ruhephase und teilt sich nicht. Daher können einige Leukämie-Zellen die intensive Therapie der Induktionsphase überleben, da die Zytostatika nur Zellen, die sich im aktiven Zellteilungsprozess befinden, angreifen. Ziel der Dauertherapie ist es, diese Zellen zu vernichten, wenn sie wieder in eine Teilungsphase eintreten.

Die Grenzen der Therapie werden durch die Toxizität der Behandlung erkennbar. Ziel ist es daher, neben möglichst hohen Heilungsraten eine Übertherapie zu vermeiden, um Spätfolgen und Todesfälle durch beispielsweise Infektionen zu verhindern.

1.3 Zytokine

Zytokine sind kleine Proteine (~25kDa), die im Körper als Reaktion auf einen Aktivierungsreiz freigesetzt werden und durch Bindung an spezifische Rezeptoren Reaktionen auslösen. Sie können sowohl autokrin als auch parakrin wirken (Janeway et al. 2002d).

Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Stimulierung und Regulation der Immunantwort. Die Produktion der meisten Zytokine lässt sich nicht einem Zelltyp zuordnen, das heißt ein Zytokin wird von verschiedenen Zelltypen produziert. Daher bietet der Nachweis intrazellulärer Zytokine mittels Durchflußzytometer die besondere Möglichkeit, die Verteilung der Zytokinproduktion auf unterschiedliche Zellsubpopulationen zu untersuchen (Jung et al.1993).

Naive, unreife $CD4^+$ -T-Zellen (Th0-Zellen) können sich nach ihrer Aktivierung entweder zu Th1- oder zu Th2-Zellen entwickeln. Th0-Zellen sezernieren vor allem IL-2, sowie IL-4 und IL-5. Sie haben möglicherweise eine eigenständige Effektorfunktion.

Th1- und Th2-Zellen sezernieren unterschiedliche Zytokinkombinationen und unterscheiden sich daher in ihrer Funktion. Th2-Zellen produzieren vorwiegend IL-4 und IL-5, die B-Zellen aktivieren, sowie IL-10, welches die Makrophagenaktivierung hemmt. Das wichtigste makrophagenaktivierende Zytokin, ein Inhibitor der B-Zellen sowie ein Lymphotoxin, ist das $IFN\gamma$. $IFN\gamma$ wird von Th1-Zellen sezerniert.

Naive $CD8^+$ -T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen Zellen. Erhalten sie eine starke Kostimulation (meist durch dendritische Zellen), werden sie zur direkten Synthese von IL-2 angeregt, allerdings in sehr geringen Mengen. IL-2 fördert die Differenzierung und Proliferation der $CD8^+$ -Zellen selbst. Neben IL-2 werden Th1-Zytokine in identischen Mengen wie bei $CD4^+$ -Zellen exprimiert (Street and Mosmann, 1991).

Alle drei Gruppen der T-Effektorzellen können Tumornekrosefaktoren exprimieren, nachdem sie auf der Zielzelle ihr spezifisches Antigen erkannt haben. Der $TNF\alpha$ hat eine aktivierende Wirkung auf Makrophagen und induziert die NO-Produktion (Janeway et al. 2002b).

$TGF\beta 1$ ist ein weiteres Zytokin, welches als Tumorsuppressormolekül bekannt geworden ist und unter anderen von $CD4^+$ -Zellen sezerniert wird. Es scheint zudem eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von regulatorischen T-Zellen zu haben und eines der stärksten immunsuppressiv/immunmodulierend wirkenden Zytokine zu

sein. Fehlt TGF β (z.B. bei knock-out Mäusen) sterben die Tiere an einer nicht beherrschbaren Entzündung (Gorham 2005; Thompson et al 2004).

Eine Imbalanz von Zytokinen trägt zu einer Veränderung der Immunabwehr bei. So nimmt man beispielsweise in der Pathogenese der GvHD an, dass ein Ungleichgewicht von Th1- und Th2-Zytokinen ein wichtiger Auslöser der GvHD sein könnte (Krenger et al. 1996; Guo et al. 2004). Ein anderes klassisches Beispiel für ein Th1/Th2-Ungleichgewicht mit Th1-Dominanz stellt der Morbus Crohn (Bouma und Strober 2003, Bamias et al. 2003) dar.

1.4 T-Zell-Neubildung und T-Zell-Rezeptor

Der Thymus, ein kleines, retrosternales Organ, ist der primäre Ort für die Ausdifferenzierung von T-Zellen. Bei Geburt ist der Thymus voll funktionstüchtig, unterliegt aber einer altersabhängigen Involution, wobei er allmählich durch Fettgewebe ersetzt wird. Inzwischen weisen aber einige Daten darauf hin, dass auch bei Erwachsenen eine Restfunktion erhalten bleibt, so dass eine De-novo-T-Zell-Synthese, wenn auch weniger ausgeprägt als bei Kindern, stattfinden kann (Douek et al. 1998, Al - Harthi et al. 2000). Die Rekonstitution der T-Zellen nach intensiver Chemotherapie oder nach einer Stammzell-Transplantation erfolgt entweder durch die Expansion von noch bestehenden Gedächtniszellen-T-Zellen oder durch die Generierung von neuen T-Zellen aus hämatopoetische Stammzellen. Sogenannte T-cell receptor excision circles (TRECs) können dabei als ein Indikator für die Thymopoese herangezogen werden. TRECs sind stabile extrachromosomale DNA-Ringe, die während des Prozesses des V-(D)-J-T-Zell-Rezeptorgen-Rearrangements entstehen. Jener Prozess ist verantwortlich für die Diversität des T-Zell-Rezeptorrepertoires. Die episomalen DNA-Fragmente werden während der Mitose nicht repliziert und verringern sich somit bei jeder T-Zellteilung. Eine starke Korrelation zwischen TRECs und der Expression des naiven Phänotypmarkers CD45RA⁺ wurde beschrieben (Steffens et al., 2000). Somit kann die Anzahl der TRECs als Maß für die T-Zell-Neubildung im Thymus herangezogen werden.

Die thymusabhängige T-Zell-Regeneration ist der wichtigste Bestandteil der Immunrekonstruktion nach Chemotherapie und Stammzell-Transplantation bei Kindern. Der Anteil und die Schnelligkeit von thymusabhängigen T-Zellregeneration ist im murinen Modell abhängig von der Thymusfunktion (TRECs-Anzahl) vor

Therapie (Chen et al., 2005). Bei Kindern und Jugendlichen konnte von unserer Arbeitsgruppe vor kurzem gezeigt werden, dass die Schnelligkeit der Regeneration von TRECs direkt mit dem Alter des Kindes korreliert (Eyrich 2005).

Der T-Zell-Rezeptor (T cell receptor, TCR) ist eine in der Plasmamembran von T-Zellen exprimierte heterodimere Molekülstruktur, die der spezifischen Bindung eines Antigens und der Weiterleitung des daraus resultierenden Signals an intrazelluläre Regulations- und Effektormechanismen dient. Bezüglich der enthaltenen Polypeptidketten unterscheidet man zwischen zwei Rezeptortypen, dem aus γ - und δ -Kette bestehenden TCR1 sowie dem aus α - und β -Kette aufgebauten TCR2, den 95% der peripheren T-Zellen bei gesunden Patienten tragen (Janeway et al., 2002c). Die Organisation der kodierenden TCR-Gensegmente gleicht derjenigen, die bei Immunglobulinen beobachtet wurde. V-, D-, J- und C-Gensegmente werden im Rahmen der somatischen Rekombination (rearrangement) ständig umgelagert. Der verfügbare Genpool für den menschlichen $\alpha\beta$ TCR besteht aus 42 variablen (V) und 61 joining (J) Segmenten in der α -Kette sowie aus 47 V, zwei diversen (diversity D) und 13 J Segmenten in der β -Kette. Hierdurch entsteht eine enorme theoretische Vielfalt an TCR (10^{15}). Diese wird zusätzlich noch durch zufälliges Einfügen von N- und P-Nucleotiden zwischen den V-, D- und J-Segmenten erhöht. Die von den D- und J-Segmenten kodierten Abschnitte in den Peptidketten des TCR bilden die CDR3-Region (complementarity determining region 3) des TCR, d.h. das Zentrum der spezifischen Antigenbindungsstelle (Goldsby et al., 2000). Die Sequenz der CDR3-Region ist folglich ein charakteristisches Erkennungsmerkmal spezifischer T-Zellklone.

1.5 B-Zellen und Immunglobuline

Die Immunrekonstitution umfasst neben der T-Zell-Regeneration noch verschiedene andere Komponenten: das Wiederauftreten von funktionstüchtigen B-Zellen, die Rekonstitution von Effektorzellen (zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen mit eingeschlossen) und die effiziente Antigenpräsentation zur Wiederherstellung des prätransplantaren Immunrepertoires.

B-Lymphozyten sind bei der spezifischen Immunantwort durch die Produktion von Antikörpern wichtig und stellen das „Gedächtnis des Immunsystem“ dar. Der Organismus kommt mit einer Vielzahl von Pathogenen in Kontakt, gegen die spezifische Antikörper gebildet werden. Jede B-Zelle exprimiert nur Antikörper einer Spezifität. Die Entwicklung der B-Zellen kann in zwei Abschnitte eingeteilt werden, in den antigen-unabhängigen und den antigen-abhängigen Teil, bis die B-Zellen zur reifen Plasmazelle (Effektorzelle) ausdifferenzieren und große Mengen an antikörper-sezernieren (siehe Abbildung). Naive und Gedächtnis B-Zellen sowie Plasmazellen lassen sich durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker, zum Beispiel CD19, CD20, CD27 und CD38 unterscheiden.

Antikörper-produzierende B-Zellen lassen sich weiter in B1- und B2-Zellen unterteilen. B1-Zellen findet man hauptsächlich in Körperhöhlen, wie dem Peritoneum. Sie tragen mehr als 50% zum Serum-IgM-Pool bei. B1-Zellen zeichnen sich durch geringe Switchaktivität aus, das heißt, dass an ihrer Oberfläche viel IgM gebildet wird, jedoch kaum IgD. Zusätzlich ist sie durch die Abwesenheit von Hypermutation gekennzeichnet und hat dadurch bedingt im Vergleich zu konventionellen B2-Zellen nur ein eingeschränktes Rezeptorrepertoire..

B2-Zellen repräsentieren die dominierende Population in der Zirkulation und den lymphoiden Organen. Sie besitzen die Fähigkeit zum Isotypwechsel ("Switchen", von IgM zu IgG), zur somatischen Hypermutation und können sich zu Gedächtniszellen (B3) entwickeln (Abb. 1.3).

Der B-Zellrezeptor ist der wichtigste Oberflächenmarker für die Funktion der B-Zellen. Er gehört zu den Immunglobulinen und ist die membrangebundene Form des Antikörpers, den die zu Plasmazellen ausdifferenzierten B-Zellen sezernieren. Der B-Zellrezeptor ist ein Heterodimer und besteht aus zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Aminoterminal enthalten beide Ketten variable Aminosäuresequenzen (V-Region), die die Antigenbindungsstelle bilden. Carboxyterminal von H- und L-Ketten ist die konstante Region. Nach der konstanten Region der H-Kette werden die Antikörper in Klassen eingeteilt (IgM, IgG, IgA, IgD und IgE). Die konstante Region ist bei einem Isotyp immer gleich unabhängig von der Spezifität des Antikörpers. Bei der L-Kette besteht diese Region entweder aus κ - oder λ -Isotyp.

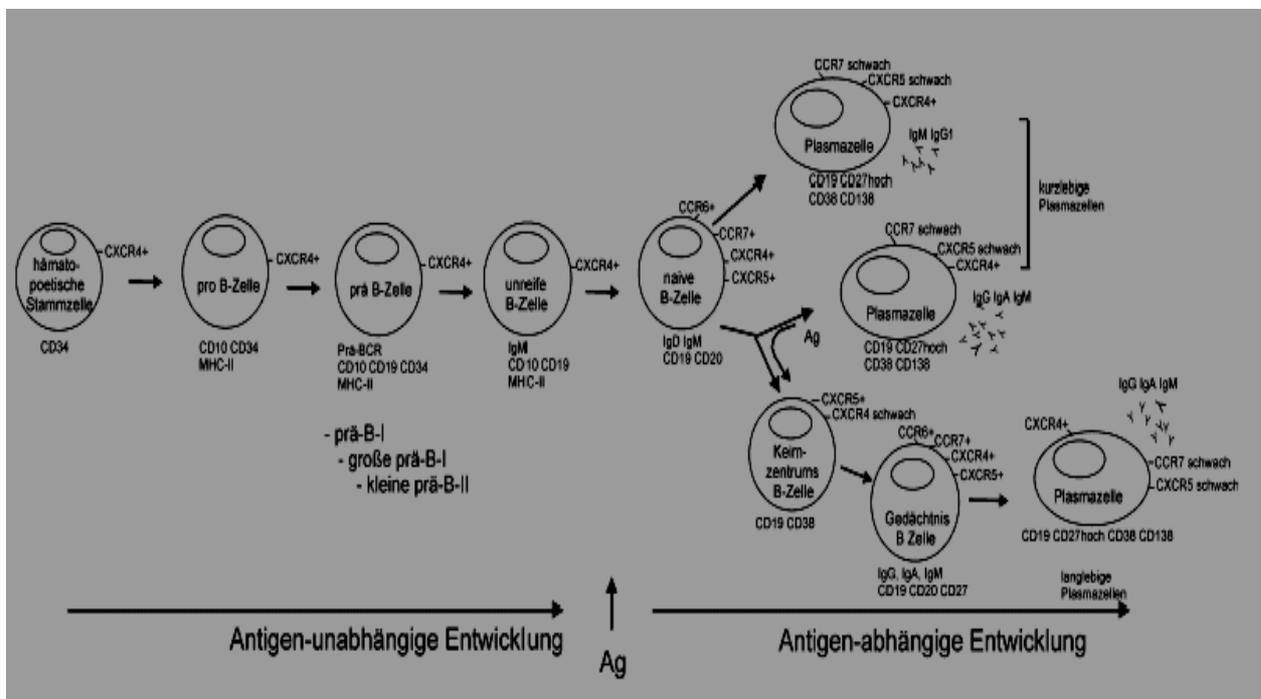


Abbildung 1.3: B-Zell-Entwicklung: Expression der Oberflächenmarker auf den B-Zellen der verschiedenen Differenzierungs-Stadien nach Krzysiek (Krzysiek et al. 2000)

Im Rahmen der humoralen Immunantwort auf eine Infektion bilden die von B-Lymphozyten abstammenden Plasma- und reaktivierte B-Zellen Antikörper, die an das Pathogen binden. Anschließend beseitigen akzessorische Zellen und Moleküle des humoralen Immunsystems den Erreger. Für die Bildung von Antikörper werden T-Helferzellen ($CD4^+$) benötigt, die spezifisch für ein Peptidfragment des Antigens sind, das von der B-Zelle erkannt wurde. Die Bindung des Antigens zusammen mit den Stimuli der T-Zell-Zytokine IL-2 und IL-4 (Th2-Zelle) vermittelt die Differenzierung

dieser B-Zellen zu einer aktivierten, antikörper-sezernierenden B-Zelle. Es erfolgt eine logarithmische Teilung. T-Zell-Zytokine steuern auch den Klassenwechsel, der zur Synthese von Antikörpern mit verschiedenen Isotypen führt, die sich auf verschiedene Gewebe des Körpers verteilen. Das in einer frühen Phase der Immunantwort gebildete IgM spielt beim Schutz vor Infektionen im Blut eine wesentliche Rolle. Getriggert durch IL-4 und IFN γ kommt es später zu einem Wechsel auf IgG, welches in die Gewebe diffundiert. TGF β beeinflusst maßgeblich den Klassenwechsel auf IgA, IL-4 auf IgE. Multimeres IgA wird in der Lamina propria gebildet und durch epitheliale Oberflächen geschleust, während das in kleinen Mengen synthetisierte IgE mit einer hohen Affinität durch den Fc-Teil an Mastzellen bindet und dadurch allergische Reaktionen hervorrufen kann. Es gibt Pathogene mit repetitiven Antigen determinanten, die zudem Mitogene exprimieren. Solche Pathogene stimulieren B-Zellen, so dass auch ohne Hilfe von T-Helferzellen die Bildung von IgM und geringer Mengen IgG ausgelöst wird. Diese Antigene werden als TI-Antigene (T-cell independent) bezeichnet und sorgen für einen frühen Immunschutz vor Bakterien (Janeway et al 2002, e). Beim Fehlen von funktionsfähigen B-Zellen kommt es gehäuft zu Infektionen mit pyogenen Bakterien, vor allem Staphylokokken, Meningokokken und Haemophilus influenzae.

1.6 Fragestellung

Aufgabe der hier vorgelegten Promotionsarbeit war es, die Veränderung des Immunsystems unter intensiver Therapie bei Kindern und Jugendlichen mit B-Vorläufer-Akuter-Lymphatischer-Leukämie prospektiv zu untersuchen. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war gezeigt worden, dass eine inadäquate Rekonstitution des Immunsystems ein relevantes klinisches Problem darstellt, das Chemotherapie und Knochenmarkstransplantation komplikationsreich gestaltet. Obwohl es viele Studien gibt, die den T-Zellstatus *nach* Beendigung der Leukämietherapie untersucht haben (Allanko et al 1992, Mackall et al 1994, Mackall et al 1995), gibt es bis jetzt kaum aktuelle Studien, die die T-Zell-Homöostase *prospektiv während* der ALL-Therapie bei Kindern beschreiben. Haining et al. konnte zeigen, dass bei Diagnosestellung und während Therapie T-Zelldefekte existieren, ebenso wie verringerte B- und NK-Zellwerte, jedoch wurde das Immunsystem nicht weitergehend in dieser Arbeit untersucht.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir deshalb an einer pädiatrischen Kohorte von 23 prospektiven ALL-Patienten Zytokinprofile sowie T-, B- und NK-Zellen während der Induktionstherapie bis zur Beendigung der Dauertherapie. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der ersten Phase der Therapie, die den intensivsten Teil der Therapie darstellt. Durch die Reduktion der Blasten und die Therapie-Intensität findet in dieser Phase die stärkste Beeinflussung auf das Immunsystem statt, während in den späteren Therapieabschnitten sich dieser Effekt konsolidiert. Immunrekonstitution und Veränderungen des Immunsystems unter Therapie waren der Fokus dieser Dissertation.

Alle immunologischen Parameter wurden im peripheren Blut untersucht. Um ein möglichst detailliertes Immunmonitoring zu erreichen, verwendeten wir hierfür folgende Methoden:

- Phänotypisierung (Oberflächenmarkierung von Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie)
- Intrazelluläre Zytokinmessung (mittels FACS bei gleichzeitiger Markierung von Oberflächenmarkern um Zytokinexpressionen bestimmten Zellen zuordnen zu können)
- Zytokin-ELISA im unstimulierten Serum
- Immunglobulinkonzentrationen im Serum
- Immunoscope-Analyse (zur Bestimmung der Diversität des T-Zellrezeptor-Repertoires)
- TRECs-Analyse (Real-Time-PCR zum Nachweis frischer Thymusemigration)

Um Referenzwerte bei gesunden Kindern ohne Therapie zu erhalten, wurde eine Kontrollgruppe gesunder Kinder (n ~111) ebenfalls untersucht.

Im Mittelpunkt des Interesses stand hierbei die Frage, ob aus den gemessenen Parametern, durch Immunmonitoring, genauere, kritische Prädiktoren für die sehr herausfordernde klinische Betreuung dieser anspruchsvollen Patienten herausgearbeitet werden könnten, an Hand derer die antimikrobielle Supportiv-Therapie zielgerichteter gesteuert werden kann und damit eine weitere Optimierung der Therapie erzielt werden kann.

2. PATIENTEN

Das Immunmonitoring im peripheren Blut wurde an 23 Kindern, die an akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) erkrankten, prospektiv zwischen 08/2003 und 06/2007 durchgeführt.

Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Würzburg (Studie Nr. 133/04 vom 13.12.2004 mit Amendment vom 25.11.2005 bzw. 28.09.2007) liegt vor.

Unter den untersuchten Patienten waren 8 Jungen und 15 Mädchen mit B-Vorläufer-ALL. Das mittlere Alter betrug 5,4 Jahre (zwei Monate bis 14 Jahre). 8 Patienten (ein Junge und 7 Mädchen, mittleres Alter 1,8 Jahre) wurden im Dexamethasonzweig der Induktion (I_1-D^+) behandelt, die anderen 15 Patienten (mittleres Alter 7,5 Jahre) im Prednisonzweig (I_1-P^+) (Abb. 2.1). 1 Patient wurde nach dem Infant-Protokoll behandelt, 8 Patienten wurden dem mittleren Risikozweig zugeordnet, 14 Patienten den Standardrisikozweig (Tabelle 2.1). 22 Patienten wurden nach dem ALL-BFM 2000-Protokoll behandelt, 1 Patientin nach Interfant-99-Protokoll. Das mediane Follow-up betrug 1207 Tage.

Die erste Phase der Initial-Therapie (I_1-D^+ bzw. I_1-P^+) besteht aus den fünf Chemotherapeutika Dexamethason/Prednison, Vincristin, Daunurubicin, E-Asparaginase und Methotrexat. Die zweite Phase (I_2) enthält Cyclophosphamid, Cytarabin, Purinethol und Methotrexat. Protokoll M besteht aus Methotrexat und Purinethol.

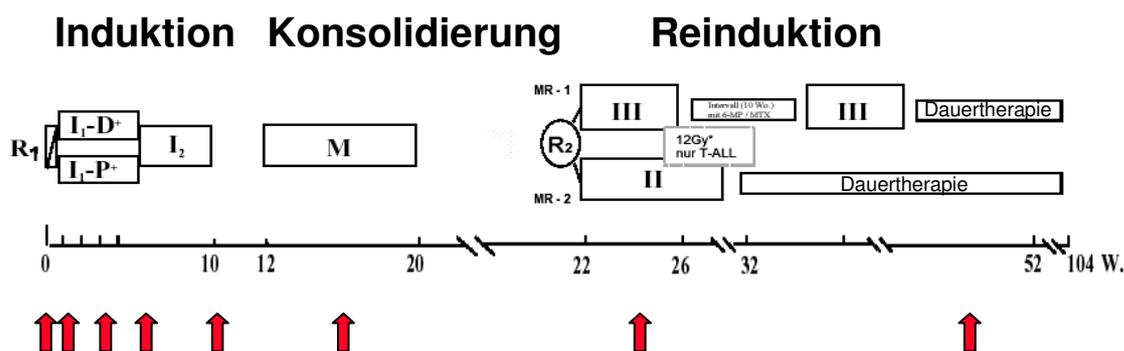


Abbildung 2.1: Vereinfachte Therapie-Übersicht des Protokolls ALL-BFM-2000. Die roten Pfeile markieren die Zeitpunkte der Untersuchungen zur Immunrekonstitution.

Während der Initialtherapie benötigten alle Patienten bestrahlte Erythrozytenkonzentrate (EKs) und Thrombozytenkonzentrate (TKs). Im Durchschnitt bekam jeder Patient drei bis vier EKs und vier TKs während der Initialtherapie.

Zwei Patienten erkrankten ernsthaft an einer Infektion während der ersten 33 Therapietage: Ein Mädchen (2 Jahre, Patient Nr. 13) hatte eine Candida-Pneumonie

Patienten

mit Absiedlungen in Leber und Nieren. Bei einem 8 jährigen Jungen (Patient Nr.22) wurde ein großer, intraabdominaler Abszess diagnostiziert. Vier andere Patienten benötigten Flebogamma oder Humanalbumin während der Induktionstherapie. Ein Erreger/Infektionslokus konnte bei diesen Patienten nicht nachgewiesen werden.

Im Therapieverlauf hatten zwei weitere Patienten eine schwere Infektion: Patient Nr. 10 musste wegen einer Pneumozystis carinii-Pneumonie nach Beginn des Protokoll M beatmet werden und bei Patient Nr. 5 wurde während der Behandlung im Protokoll III eine intracerebrale Aspergillose diagnostiziert.

Drei Patienten hatten ein Rezidiv und wurden allogene Stammzelltransplantiert (SZT); zwei dieser Patienten verstarben nach zunächst erfolgreicher Transplantation am Rezidiv (DOD). Alle anderen Patienten sind derzeit in Remission (CR) (Stand 01.07.2009).

Patienten

Tabelle 2.1 Patientencharakteristiken

Patient	♂/♀	Alter bei Diagnose	Leukämie	Therapie-Zweig	Schwere Infektionen	Zweig	Tage seit Diagnose
#1	m	10	c-ALL	SR		Pred	1321, CR
#2	m	4	c-ALL	MR		Pred	1705, CR
#3	w	6	c-ALL	MR		Pred	1395, CR
#4	m	13	c-ALL	MR		Pred	509, SZT, DOD
#5	w	2	c-ALL	SR	Intracerebrale Aspergillose	Dexa	1138, CR
#6	m	6	c-ALL	SR		Pred	1410, CR
#7	w	2m	Pro-B-All	Infant		Dexa	814, SZT, DOD
#8	w	12	c-ALL	SR		Pred	1195, CR
#9	w	2	c-ALL	SR		Dexa	1199, CR
#10	m	12	prä-B-ALL	MR	P. carinii-Pneumonie	Pred	1877, CR
#11	w	1	c-ALL	SR		Dexa	984, CR
#12	w	5	c-ALL	SR		Pred	1537, CR
#13	w	2	c-ALL	SR	Candida-Pneumonie	Dexa	1174, CR
#14	m	5	c-ALL	SR		Pred	1175, CR
#15	m	2	c-ALL	SR		Dexa	1188, CR
#16	w	10	c-ALL	MR		Pred	1403, CR
#17	w	10	c-ALL	MR		Pred	1269, CR
#18	w	5	pro-b-ALL	MR		Pred	1530, CR
#19	w	3	c-ALL	SR		Pred	927, CR
#20	w	1	c-ALL	SR		Dexa	907, SZT, CR
#21	w	4	c-ALL	MR		Pred	1066, CR
#22	m	8	c-ALL	SR	Op wegen intraabdominellen Abszess	Pred	1124, CR
#23	w	2	c-ALL	SR		Dexa	829, CR

(CR- Remission, DOD- verstorben an der Grunderkrankung, Pred- Prednisonzweig, Dexa- Dexamethasonzweig, SR- Standardrisiko, MR- mittleres Risiko)

3. MATERIAL

3.1 Geräte

Tabelle 3.1 – Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Brutschrank	Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Gefrierschränke	<ul style="list-style-type: none"> • -20 °C • -80 °C Hera freeze 	GFL, Burgwedel Heraeus, Hanau
Durchflußzytometer	FACS Calibur	BD, Heidelberg
DNA-Analysiergerät	Li-cor 4300 DNA-Analyzer Mit SAGA Version 3.2 Analysis-Software	LI-COR, Lincoln, USA
ELISA-Gerät	Tecan-Genios (Fluoreszenz Reader)	Tecan, Grödig, Österreich
Magnetrührer mit Wärmeplatte	RCT-Basis	KIKA-Werke
Meßküvette	Suprasil® Quarzglas No. 105.202.008-QS	Hellma®, Müllheim
Pipetten	Eppendorf Research/Reference 2,5µl, 10µl, 100µl, 200µl und 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-Jet®	Braun, Melsungen
Photometer	Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler epgradient S	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 3.1 – Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Real Time PCR-System	7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterile Werkbank	Hera Safe	Heraeus, Hanau
Vortexgerät	Vortex REAX control	Heidolph, Nürnberg
Waage	BP1200	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Mikro 22 R, Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen

3.2 Laborbedarf

Tabelle 3.2 – Laborzubehör

Artikel / Beschreibung	Hersteller
Glaswaren (Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Meßzylinder) Schott Duran®	Schott, Mainz
Pipettenspitzen 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	NUNC. Roskilde, Dänemark
Pipettenspitzen, Sterilfiltertips, gestopft, 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	NUNC. Roskilde, Dänemark
Stangenpipetten 5ml, 10ml, 25ml	NUNC. Roskilde, Dänemark
Reagenzgläser	NUNC. Roskilde, Dänemark
Tubes 1ml	NUNC. Roskilde, Dänemark
Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss, steril, 15ml und 50ml	NUNC. Roskilde, Dänemark
Gewebekulturplatten, steril, 24Loch und 96Loch	NUNC, Roskilde, Dänemark
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark, Zaventum, Belgien
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates/tubes/caps	Applied Biosystems, Lincoln, USA
Thermo-Fast® 96 PCR Plates/ tubes/ caps	peqLab, Erlangen, Deutschland
KIMWIPES® Lite	Kimberly-Clark, Zaventum, Belgien

3.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 3.3- Zellkulturmedien und Zusätze

Reagenzien	Hersteller
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
PBS(Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline)	Sigma, Taufkirchen
Ficoll (FicoLiteH 1.077g/ml 290mOs/kg/H ₂ O _± 10)	Linaris, Wertheim-Bettingen
Kulturmedium RPMI 1640 Medium mit 2g/l NaHCO ₃	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin 200mM	Biochrom AG, Berlin
Natriumpyruvat 100mM	Biochrom AG, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin
HEPES Buffer (1M)	Sigma, Taufkirchen
Penicillin 10000units/ml Streptomycin 10mg/ml	Sigma, Taufkirchen

3.4 Antikörper und Stimulanzien

Tabelle 3.4- Stimulantien

Stimulanz	Hersteller
Ionomycin (Calcium salt)	SIGMA, Taufkirchen
SEB (Staphylococcal Enterotoxin B)	SIGMA, Taufkirchen
Brefeldin A	SIGMA, Taufkirchen
PMA (Phorbol-12-Myristal-13-Acetat)	SIGMA, Taufkirchen

Tabelle 3.5 – Antikörper

Antigen	Clone	Isotyp	Fluorchrom	Konzentration/Volumen	Hersteller
CD3	UCHT1	Mouse IgG1,k	PerCP	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
mouselsoTypIlgG2a,k	G155-178	Mouse IgG2a,k	FITC	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
mouselsoTypIlgG1,k	MOPC-21	Mouse IgG1,k	PE	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD4	RPA-T4	Mouse IgG1,k	PE	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD8	RPA-T8	Mouse IgG1,k	PE	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD8	RPA-T8	Mouse IgG1,k	FITC	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD8	RPA-T8	Mouse IgG1,k	APC	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD16	3G8	Mouse IgG1,k	PE	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD19	HIB19	Mouse IgG1,k	FITC	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD20	L27	Mouse IgG1,k	PerCP	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD25	M-A251	Mouse IgG1,k	FITC	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD27	M-T271	Mouse IgG1,k	PE	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD4	RPA-T4	Mouse IgG1,k	PerCP	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD45RA	HI100	Mouse IgG2b,k	PE,APC	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD45RO	UCHL1	Mouse IgG2a,k	FITC.PE	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg

Material

Fortsetzung Tabelle 3.5

Antigen	Clone	Isotyp	Fluorchrom	Konzentration/Volumen	Hersteller
CD45	HI30	Mouse IgG2b,k	APC	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD56	B159	Mouse IgG1,k	PE	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
γδTCR	B1	Mouse IgG1,k	FITC	0.1mg	BD, Heidelberg
αβTCR	T10B9.1A-31	Mouse IgM,k	PE	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
HLA DR	G46-6	Mouse IgG2a,k	PE	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
Ki-67	B56	Mouse IgG1,k	PE	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
IgM	G20-127	Mouse IgG1,k	Biotin	0.5µg mAb/10x6Zellen	BD, Heidelberg
IgD	IA6-2	Mouse IgG2a,k	FITC	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CCR7	3D12	RatIgG2a,k	Biotin	0.5µg mAb/10x6Zellen	BD, Heidelberg
Streptavidin-Allophycocyanin			APC	0.5µg mAb/10x6Zellen	BD, Heidelberg
TGFβ1	TB21	Mouse IgG1,k	Mouse anti Human	0.5µg mAb/10x6Zellen	Biosource, Camarillo, USA
Mouse-anti-Human		Goat (Fab) ₂	FITC	0.5µg mAb/10x6Zellen	Biosource, Camarillo, USA
TNFα	Mab11	Mouse IgG1	FITC	0.5µg mAb/10x6Zellen	BD, Heidelberg
IFNγ	B27	Mouse IgG1	PE, APC	0.5µg mAb/10x6Zellen	BD, Heidelberg
IL2	MQ1-17H12	RatIgG2a	FITC	0.5µg mAb/10x6Zellen	BD, Heidelberg
IL4	MP4-25D2	Rat IgG1	FITC, APC	0.5µg mAb/10x6Zellen	BD, Heidelberg
IL5	JES1-39D10	RatIgG2a	PE	0.5µg mAb/10x6Zellen	BD, Heidelberg
IL10	JES3-19F1	Rat IgG2a,k	APC	0.5µg mAb/10x6Zellen	BD, Heidelberg

3.5 Reagenzien molekularbiologischer und immunologischer Arbeit

3.5.1. Molekularbiologische und immunologische Kits

Tabelle 3.6 – molekularbiologische Kits

Produkt	Produktangaben	Hersteller
ELISA-Kits für humanes IL4, IFN γ , IL15, TGF β	BD OptEIA-Set™	BD, Heidelberg
ELISA-Kits für humanes IL7 und IL 13		Biosource, Camarillo, USA
Kit zur RNA-Isolierung	<ul style="list-style-type: none"> • SIGMA-Gen Elute Mammalian Total RNA • Qiagen-RNeasy Midi Kit (10) • Trifast 	Sigma, Steinheim Qiagen, Hilden Peqlab, Erlangen
Kit zur DNA-Sequenzierung	Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.5.2 Enzyme

Tabelle 3.7 - Enzyme

Produkt	Produktangaben	Hersteller
dNTPs		Roche, Penzberg
Proteinase K	Recombinant PCR Grade	Roche, Penzberg
Taq-Polymerase	AmpliTaq®	Applied Biosystems, Lincoln, USA
Taq-Polymerase	Genaxxon Taq Polymerase E	Genaxxon, Martinsried
Reverse Transcriptase	M-MLV-RT (200u/ul)	USB, Swampscott, USA
RNase Inhibitor	Protector RNase Inhibitor 40U/ μ l	Roche, Penzberg
Mastermix	TaqMan®Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Lincoln, USA

3.6 Primer

3.6.1 Primer für TRECS

Tabelle 3.8- Primersequenzen für TRECS

Primer	Primersequenz
Primer forward	5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT
Primer reverse	5'-GCCAGCTGCAGGGTTTA-GG
Sonde	FAM-5'-ACACCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCACT-TAMRA

3.6.2 Primersequenzen

Alle verwendeten Primer wurden nach Vorgabe der Sequenz von MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert.

Die C β -reverse Primer für das CDR3-Spectratyping wurden am 5'-Ende mit einer IRD800/700-Markierung versehen und durch die Firma Biomers, Ulm, synthetisiert.

IRD700/800 ist ein im Infrarotbereich absorbierender und fluoreszierender Farbstoff, dessen Absorptionsmaximum bei 795 nm liegt. Aufgrund seiner hervorragenden Absorptionseigenschaften und guten Quantifizierbarkeit zeichnet er sich durch eine hohe Sensitivität aus. Als Detektor wird bei der Durchführung des CDR3-Spectratyping DNA-Analyser 4300 der Firma LI-COR eingesetzt.

Tabelle 3.9 - Primer

Primer	Primersequenz
Vβ1:	CCGCACAACAGTTCCTGACTTGC
Vβ2:	ACATACGAGCAAGGCGTCGA
Vβ3:	GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGCT
Vβ4:	CATCAGCCGCCCAAACCTAA
Vβ5:	GATCAAACGAGAGGACAGC
Vβ6A-1:	GATCCAATTCAGGTCATACTG
Vβ6B-1:	CAGGGGCCAGAGTTTCTGAC
Vβ6B-2:	CAGGGCTCAGAGGTTCTGAC
Vβ7:	CAAGTCGCTTCTCACCTGAATGC
Vβ8:	GGTACAGACAGACCATGATGC
Vβ9:	TTCCCTGGAGCTTGGTGACTCTGC
Vβ11:	GTCAACAGTCTCCAGAATAAGG
Vβ12A:	TCCCCCTCACTCTGGAGTC
Vβ12B:	TCCTCCTCACTCTGGAGTC
Vβ13A:	GGTATCGACAAGACCCAGGCA
Vβ13B:	AGGCTCATCCATTATTCAAATAC
Vβ14:	GGGCTGGGCTTAAGGCAGATCTAC
Vβ15:	CAGGCACAGGCTAAATTCTCCCTG
Vβ16:	GCCTGCAGAACTGGAGGATTCTGG
Vβ17:	TGTGACATCGGCCCAAAGAA
Vβ18:	CAAAGAGGGCCCCAGCATC
Vβ20:	TGCCCCAGAATCTCTCAGCCTCCA
Vβ21:	GGAGTAGACTCCACTCTCAAG

Tabelle 3.9 - Primer (Fortsetzung)

Primer	Primersequenz
Vβ22:	GATCCGGTCCACAAAGCTGG
Vβ23:	ATTCTGAACTGAACATGAGCTCCT
Vβ24:	GACATCCGCTCACCAGGCCTG
Cβ4-IC	5'-CTCTGCTTCTGATGGCTCAAACAC-3' (Reverse Primer für real time PCR)
Cβ-MBG:	5' – FAM - ACCTCGGGTGGGAAC – MBG – '3' (RealTime Sonde)
Cβ2-FAM2-IC:	5'-ACACAGCGACCTCGGGTGGG-3' (RunOff Primer)

3.6.3 Pufferlösungen

Für die Gelelektrophorese auf Agarose wurde der 6x Ladepuffer unverdünnt benutzt, bei Polyacrylamidgele kam ein Ladepuffer zum Einsatz, der 75% Formamid und 25% 1x Ladepuffer enthielt. Als Laufpuffer wurden 100ml TBE-Puffer pH 8,3 (10fach) auf 900ml aqua dest verwendet.

3.6.4 Elektrophoresegele

Für die Herstellung der Agarosegele wurde die dem gewünschten Prozentgehalt des Gels entsprechende Menge an Agarose in 1x TBE-Puffer pH 8,3 unter Erhitzung gelöst und nach anschließendem Abkühlen auf 60°C in die entsprechende Vorrichtung gegossen. Die Aushärtung erfolgte bei Raumtemperatur.

Für die im Rahmen des CDR3-Spectratyping und der Sequenzierung eingesetzten 6%igen Polyacrylamidgele wurden 40 ml SequaGel® XR Monomer Solution, 10 ml SequaGel® XR Buffer und 0,4 ml 10% APS (0,1 g Ammoniumperoxodisulfat in 1 ml sterilem Wasser) vermischt und mittels in die entsprechende Vorrichtung gegossen. Die Aushärtung erfolgte wiederum bei Raumtemperatur.

3.7 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Tabelle 3.10 – Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Sonstige Produktangaben	Hersteller
Paraformaldehyde		Sigma, Taufkirchen
FACS-Lysing Solution		BD, New Jersey, USA
FACS Flow		BD, New Jersey, USA
FACS Rinse		BD, New Jersey, USA
FACS Clean		BD, New Jersey, USA
Hydrogen Peroxide		BD, New Jersey, USA
Natriumhydrogencarbonat NaHCO ₃		Merck, Darmstadt
Agarose	Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat		Bio-Rad Laboratories
Desoxynucleosidtriphosphate		Roche, Mannheim
DNA-Längenstandard	Längenstandard III und VIII	Li-cor, Lincoln, USA
Ethanol absolut		Merck, Darmstadt
Fuchsin IR2 Stoppsolution	Stop-Solution Gel	Li-cor, Lincoln, USA
6x Ladepuffer	6x Loading Dye Solution	Li-cor, Lincoln, USA
LI-COR Längenstandard		Li-cor, Lincoln, USA
PCR-Puffer	GeneAmp® 10x PCR Buffer	Applied Biosystems, Lincoln, USA
Acrylamid (30%)	rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Monomer Solution and Buffer Sequenziergele	Substanzen für SequaGel® XR	National Diagnostics, Atlanta, USA
Na ₂ CO ₃		Merck, Darmstadt
2N Schwefelsäure 2N H ₂ SO ₄	Stopsolution ELISA	Apotheke Klinikum Würzburg
Saponin		Sigma, Taufkirchen
TBE-Puffer pH 8,3 (Tris, Borat, EDTA)	10xconcentrate 0,2µm filtered	Sigma, Taufkirchen

Material

Tabelle 3.10 – Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

Tetramethylbenzidine	Substrate Solution	BD Pharmingen, New Jersey, USA
Tris EDTA Buffer Solution	pH 8.0	Sigma, Taufkirchen
Tween-20-Wash-Puffer	Polysorbatum 20DAB 10/Ph. Eur	Apotheke Klinikum Würzburg
Wasser, steril	Ampuwa®	Fresenius, Bad Homburg

4. METHODEN

4.1 Durchflußzytometrie

Das Durchflußzytometer ist ein optisches Meßsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel multiparametrisch analysiert. Die Zellen werden in der Flow-Zelle, dem Analysepunkt, durch einen umgebenden Flüssigkeitsstrom fokussiert und von einem Laser beleuchtet. Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, streut sie aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaft Licht mit unterschiedlicher Quantität und Qualität. Die Lichtstreuung wird beeinflusst durch die Querschnittsfläche, den Refraktionsindex, der Struktur der Membran sowie intrazelluläre Bestandteile. Das Streulicht, das eine Zelle erzeugt ist umso größer, je unregelmäßiger die Textur des Partikels ist. Es wird von zwei Photodetektoren erkannt. Dabei erkennt der erste Photodetektor (Sideward-Scatter, im 90° Winkel zum Laser – Lichtbrechung und Reflexion) sämtliches auftreffendes Streulicht. Granulozyten zum Beispiel (irregulärer Kern, Granula) erzeugen mehr Streulicht als Lymphozyten, das heißt sie weisen einen höheren Sidewards-Scatter auf als Lymphozyten. Der zweite Photodetektor (Forward-Scatter FSC, 0-10° Lichtbeugung) wird entlang des einfallenden Lichtes gemessen und ist durch Blockerstreifen vor dem Laser geschützt. Licht trifft nur auf diesen Detektor, wenn es durch einem durchfließenden Partikel gebrochen wird. Der Grad der Brechung ist proportional zur Zelloberfläche, so haben Monozyten einen höheren Forward-Scatter als Lymphozyten.

Mittels des Forward- und Sideward-Scatters kann also die Morphologie des durchfließenden Partikels bestimmt werden. Leukozyten können nach den Scatter-Charakteristiken in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterteilt werden.

Während die ersten beiden Photodetektoren Licht der Wellenlänge, die der Laser aussendet, erkennen, ist das Durchflußzytometer mit vier weiteren Photodetektoren ausgerüstet, die Licht einer anderen Farbe detektieren, das heißt, dass hier Farben erkannt werden, die durch Fluoreszenzfarbstoffe entstehen. Die Fluoreszenzen werden im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen. In unseren Versuchen werden die Zellen mit Antikörpern inkubiert, die an Fluoreszenzfarbstoffe (FITC, PE, PerCP, APC) gekoppelt sind.

Diese Farbstoffe sind so konstruiert, dass alle das Licht einer Wellenlänge von 488nm (Argonglas- Emission bei 519nm (grün)) absorbieren, aber bei verschiedenen

Wellenlängen wieder abstrahlen (unterschiedlicher Stoke's Shift). Fluorescein (FITC) absorbiert bei 495nm und emittiert bei 525nm(grün), Phycoerithrin (PE) absorbiert bei 488nm sowie 565nm und emittiert bei 578nm (orange). Peridin-Chlorophyll-a-Proteinkomplex (PerCP) absorbiert bei 470nm und emittiert bei 680. Allophycocyanine (APC) schließlich hat eine Exzitation von 650nm und eine Fluoreszenz von 660nm und besitzt als Lichtquelle einen Zusatzlaser (HeNe-Laser 655nm Exzitation).

Die Photodetektoren wandeln die optischen Signale (Photonen) in elektrische Impulse (Spannungsimpulse) um, wozu verschiedene Verstärker benötigt werden. Ein logarithmischer Amplifikator sortiert die auftreffenden Fluoreszenzsignale nach ihrer Intensität (ca. 4 Dekaden). Diese werden von einem analogen Digital-Konverter in bestimmte Gruppen wieder nach Stärke des Fluoreszenzsignals eingeteilt. Hierbei entsteht ein Histogramm: nach rechts ist die Fluoreszenzintensität aufgetragen, nach oben die Anzahl der Ereignisse.

Des Weiteren kann die graphische Darstellung in Form von Zweiparameterpunkte-Diagramm (Dot-Plot) erfolgen. Jeder Punkt steht also für eine bestimmte Zelle mit ihren beiden Eigenschaften. Alle Parameter können miteinander korreliert werden (zum Beispiel FSC/SSC). Hierfür müssen die verschiedenen Fluoreszenzsignale gegeneinander auskompensiert werden. Das liegt daran, dass sich die verwendeten Farbstoffe, in den Bereichen des von ihnen emittierten Lichts zum Teil überschneiden: Ein Teil des FITC-Signals wird auch vom PE-Detektor erkannt und erscheint als falsches PE-Signal (spektrale Überstrahlung der Zytochrome). Beim Kompensieren wird der (konstante) Anteil des FITC-Signals, der in das PE-Signal hineinleuchtet, von diesem abgezogen. So werden alle vier Farben gegeneinander auskompensiert.

Mit dem Durchflußzytometer können Zellen gemessen werden, wobei von jeder Zelle sechs Parameter erhoben werden: FSC und SSC als morphologische Kriterien sowie vier Fluoreszenzsignale (PE; APC; FITC; PerCP), die antikörper-gebunden von uns dazugegeben wurden.

4.2 Immunstatus

Protokoll:

- 100µl EDTA/Heparin-Blut in ein Reagenzglaschen
- 4,5µl von den gewünschten Antikörper hinzufügen, vortexen
- Im Dunkeln bei Raumtemperatur 15 min inkubieren
- 1ml FACS Lyse hinzufügen , vortexen
- Im Dunkeln 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- 5 min bei 500g und 20 °C zentrifugieren, Überstand abkippen
- Zwei Mal mit 1ml PBS waschen und anschließend zentrifugieren, Überstand abkippen
- Zum Schluss mit 500µl PBS Zellsuspension auffüllen
- Messung im Durchflußcytometer

Tabelle 4.1 – Protokoll Immunstatus

Lyse/Wash	Konjugierte Antikörper			
	FITC	PE	PerCP	APC
Immunstatus	Iso. IgG 2ak	Iso. IgG1,κ	CD 3	CD 45
	CD 8	CD 4	CD 3	CD45
	CD 19	CD 16+ 56	CD 3	CD45
	CD 45R0	CD 45 RA	CD 4	CD45
	γδ TCR	αβ TCR	CD 3	CD45
	CD25	HLA DR	CD 3	CD45
	Ig D	CD27	CD 19	Ig M
	CD45RA	CD4	CD3	CCR7

4.3 Gating des Immunstatus

Das Auswählen von bestimmten Zellpopulationen erlaubt, dass nur diese in die folgende Analyse miteinbezogen werden (Gating).

Nachdem bei der Durchflußzytometrie beschriebenen Kriterien werden Lymphozyten nach ihren Scatter-Eigenschaften (geringer FSC, geringer SSC) dargestellt. Im folgenden Schritt wird der SSC gegen ein CD45-APC aufgetragen. Es können CD45-positive von CD45-negativen Zellen unterschieden werden. Alle Zellen haben einen geringen SSC (da so gegatet), sind also Lymphozyten. Die CD45 positiven Zellen werden gegatet (Gate1), so dass nur Lymphozyten in die weitere Analyse einbezogen werden (siehe Abbildung 4.1).

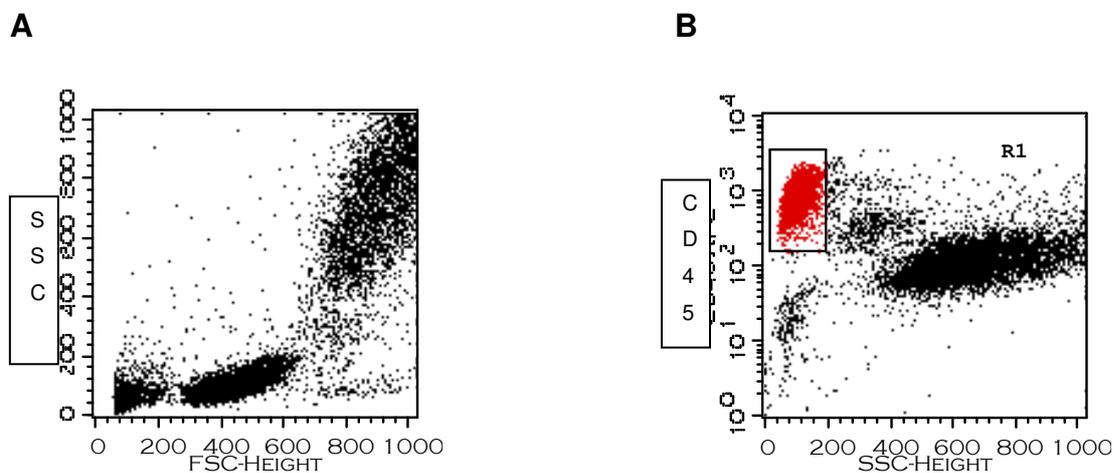


Abbildung 4.1: Gating des Immunstatus: A normale Verteilung der Leukozyten im FACS: Lymphozyten (geringer FSC, geringer SSC) und Monozyten/Granulozyten (höhere FSC, höherer SSC); B Um die CD45 hoch positiven Zellen wird die Region 1 gelegt.

Das ermöglicht uns, mittels CD19-FITC bzw. CD16, 56-PE gegen CD3-PerCP T-Zellen von B-Zellen bzw. NK-Zellen zu unterscheiden (s. Abb 4.4). Anschließend stellt man in einem Dot -Plot CD3-PerCP und CD45-APC gegenüber. Die doppelt positiven Zellen bilden Gate 2. Dem folgt die Darstellung CD3-PerCP gegen SSC. Hier wird das Gate 3 festgelegt, das die Zellen zusammenfasst, die sowohl CD45-positiv als auch CD3-positiv sind (d.h. geringer SSC und hohe CD3-Expression). Das entspricht den T-Zellen (siehe Abbildung 4.2). Bei CD3-positiven Zellen werden mittels CD8-FITC und CD4-PE CD8-positive-(zytotoxische) von CD8-negativen-(Helfer) T-Zellen (entspricht CD4-positiven Zellen) unterschieden.

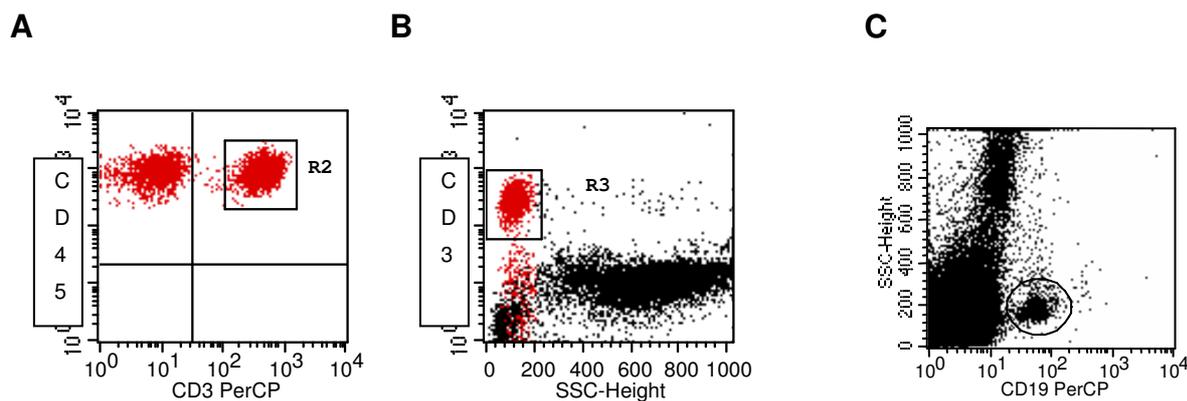


Abbildung 4.2: Gating des Immunstatus: A CD45 gegen CD3. Die doppelt positiven Zellen bilden die Region 2. B Hoch positive CD3-Zellen gegen SSC bilden die 3. Region. C CD19 positive Zellen entsprechen der 5.Region

Alternativ werden in einer Dot-Plot-Analyse CD45RA+PE/CD45R0-FITC Zellen aufgetragen. Hierzu verwenden wir ein Gate (Gate 4), das die Schnittmenge aus dem 3.Gate und dem 1.Gate beinhaltet. Das ermöglicht uns, zwischen memory (RO) und naiven (RA) Zellen zu unterscheiden.

Zur Spezifizierung der B-Zellen wird der SSC gegen CD20PerCP aufgetragen und die CD20-positiven Zellen (B-Zellen) als neue Region definiert (Gate 5). CD27 wird gegen IgM APC bzw. IgD FITC im Gate 5 aufgetragen und ausgewertet (Abb. 4.3).

Zur Bestimmung des Ki67 Antigen, eines Proliferationsmarkers, werden die CD45 positiven Lymphozyten gegatet und das Ki67 wird gegen CD4 und gegen CD8 aufgetragen. Dadurch kann die Sezernierung des Ki67 den verschiedenen T-Zell-Populationen zugeordnet werden.

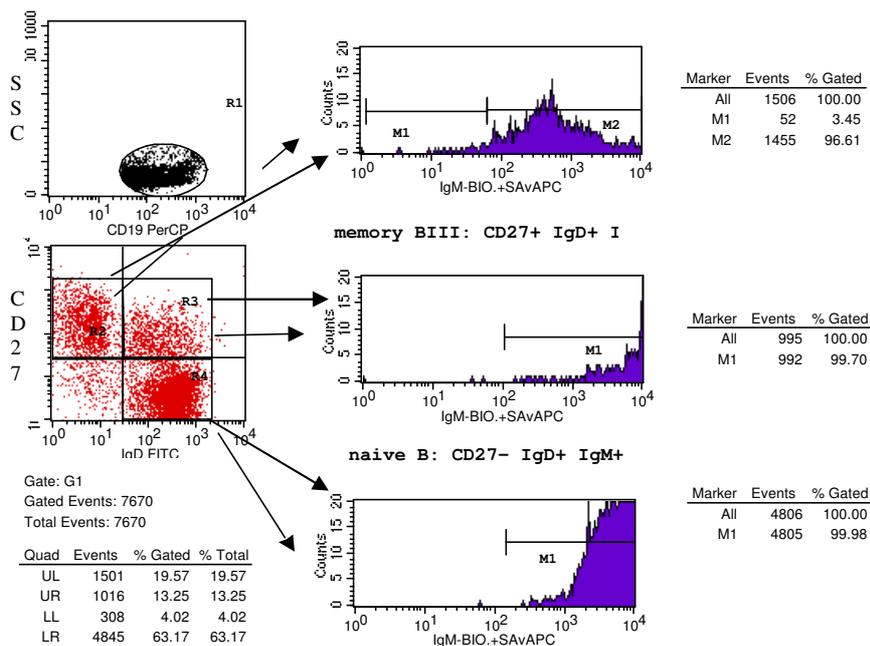
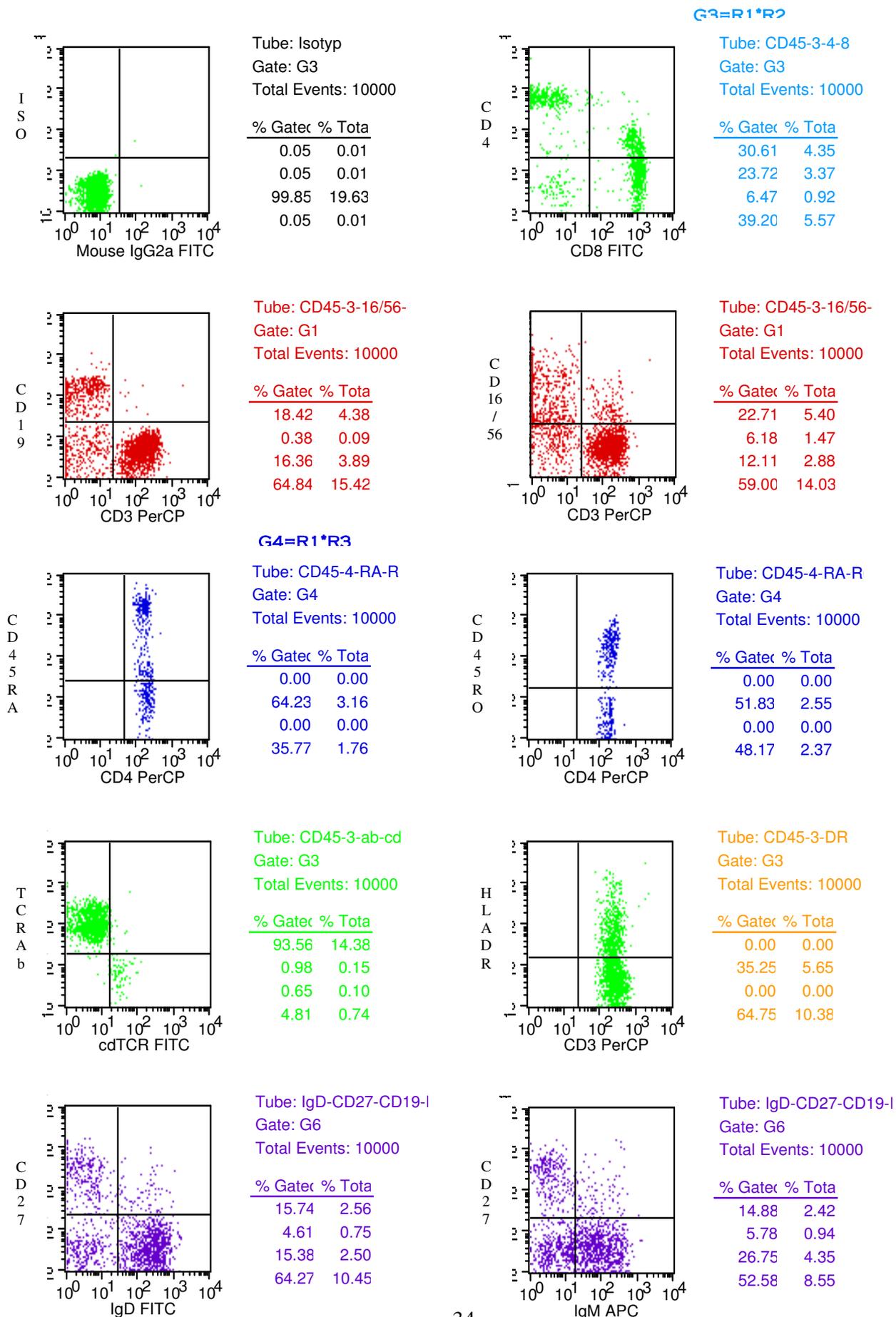


Abbildung 4.3: B-Zellsubklassifizierung

4.3.1 DER IMMUNSTATUS

Abbildung 4.4: Typischer Immunstatus zum Immunmonitoring der T-, B- und NK-Zellen



4.4 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Bei mononukleären Zellen des peripheren Blutes handelt es sich um Lymphozyten und Monozyten. Das Prinzip der Zellisolation besteht in einer Dichtezentrifugation, gefolgt von einem zweimaligen Waschgang, um Rückstände der zytotoxischen Trennlösung zu entfernen.

Protokoll:

- 2ml Blut werden mit 2ml PBS verdünnt und langsam auf 4ml Ficoll geschichtet
- 20 min bei 800g und 20°C zentrifugieren (3 \square R3)
- Zellfraktion aus der Interphase zwischen Serum und Ficoll mittels Pipette absaugen (Serum evtl. ebenfalls für spätere Bearbeitung in ein Extragefäß abfüllen)
- Zweimal in PBS für 5min bei 300g und 20°C (9 \square R9) waschen
- Bestimmung der Zellkonzentration

4.5 Zellkultur und Stimulation

4.5.1 Stimulation

Je 100µl Heparinblut werden mit 900µl Medium (1:10 Verdünnung) in ein Loch einer sterilen pyrogenfreien Kulturplatte gegeben.

Die eine Hälfte wird mit PMA, Ionomycin und Brefeldin stimuliert, die andere Hälfte mit SEB. In einem dritten Ansatz wird nur PMA und Ionomycin hinzugegeben.

Die Inkubation erfolgt bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit für 20h.

Von allen Stimulanzen wurden Verdünnungen angelegt, die bei -20°C gelagert wurden. Von diesen Verdünnungen wurden direkt vor Gebrauch Arbeitsverdünnungen in RPMI 1640 ohne andere Zusätze angesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen.

Tabelle 4.2 - Stimulationszusätze

Stimulans	Vorverdünnung	Arbeitsverdünnung (well)
PMA	1mg/ml in DMSO 100µg/ml	1:10 in RPMI 10µl/1x10 ⁶ Zellen (10ng/ml)
Ionomycin	1mg in 253µl DMSO 5mM	1:50 in RPMI 10µl/1x10 ⁶ Zellen (1µM)
Brefeldin	5mg in 500µl Ethanol abs. 10mg/ml	1:10 in RPMI 10µl/1x10 ⁶ Zellen (10 µg/ml)
SEB	1mg in 10ml PBS 100µg/ml	Keine Verdünnung 10µl /1x10 ⁶ Zellen (1µg/ml)
Kulturmedium	43ml RPMI 1640, mit 2,0g/l NaCO ₃ +5ml 10%FCS +500µl 1%Penicillin/Streptomycin +500µl 1% L-Glutamin +500µl 1%Na-Pyruvat +500µl 1%nicht-essentielle Aminosäuren	

4.5.2 Vorbereitung der Zellen zur intrazellulären Zytokinbestimmung im FACS

Ziel der Methode ist es, Zytokine intrazellulär mittels Durchflußzytometrie nachweisen zu können. Gleichzeitig können ein oder mehrere Oberflächenepitope markiert werden, so dass ein Zytokin genau dem Phänotyp der produzierenden Zelle zugeordnet werden kann. Dadurch ist es möglich, dass die Zytokinproduktion in bestimmten Zellpopulationen ermittelt werden kann, ohne dass vorherige Zellseparation notwendig wird.

Das Prinzip der Methode besteht darin, die Zellen zunächst in Paraformaldehyde zu fixieren und dann die Zellwand mittels Saponin zu permeabilisieren, um den Zytokin-Antikörper-Zugang zu dem im Golgi-Apparat gespeicherten Zytokin zu verschaffen. Zytokin-Antikörper und Antikörper gegen Oberflächenepitope (CD) können gleichzeitig oder nacheinander hinzugegeben werden. Alle verwendeten Antikörper sind direkt an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, so dass die Bindung des Antikörpers schließlich im Durchflußzytometer erkannt werden kann.

Protokoll

- Nach der Kultur werden die Zellen geerntet (aus der 24-Lochplatte in 15ml Sarstedt-Röhrchen überführt), sämtliche Folgeschritte erfolgen unsteril
- Mit HBSS auffüllen für 5min bei 500g und 20°C zentrifugieren
- ± die folgenden Schritte werden auch für die Nachweise von anderen intrazellulären Antikörpern durchgeführt (z.B. Ki67)
- Fixation: Resuspendieren der Zellen mit 1ml 4°C kaltem PFA (4%) für genau 10 min bei Raumtemperatur, zwischendurch Vortexen
- Mit HBSS auffüllen, für 5min bei 500g und 20°C zentrifugieren
Waschvorgang wiederholen
- Permeabilisation: Resuspendieren der Zellen in 0,1% Saponin-Puffer, das Volumen der Anzahl der Färbungen berechnen (pro Färbung 100µl Zellsuspension)
- Antikörper-Zugabe:
Inkubation für 20min bei 4°C im Dunkeln
- Die Zellen werden in je 1ml 0,1% Saponin-Puffer für 5min bei 500g und 20°C gewaschen
Resuspension mit 500µl HBSS
- Messung im Durchflußzytometer

Methoden

Tabelle 4.3 – Chemikalien und Konzentrationen für intrazelluläre Färbung

Waschpuffer	HBSS(Hank´s balanced Salt Solution): PBS +350mg/l NaCO ₃
Fixativ	4% Paraformaldehyd (3Tage haltbar bei 4 °C)
Permeabilisierungspuffer	100ml HBSS +1ml 10%Saponin (2-3Wochen haltbar) +1ml 1M HEPES-Puffer
Anti-Zytokin-Antikörper	1µl je Antikörper auf 100µl Zellsuspension unverdünnt
Antikörper gegen Oberflächenepitope	4,5µl je Antikörper auf 100µl Zellsuspension unverdünnt

4.5.3 Färbeprotokolle

Tabelle 4.4 Färbeprotokolle

	FITC	PE	PerCP	APC
1	0	0	0	0
2	TNF α	IFN γ	CD3	IL2
3	IL4	IL5	CD3	IL10
4	IL4	IFN γ	CD3	IL2
5	CD8	IFN γ	CD3	IL2
6	CD8	IL5	CD3	IL10
7	TNF α	CD8	CD3	IL4
8	TNF α	CD45R0	CD3	CD45RA
9	IL4	CD45R0	CD3	CD45RA
10	CD45R0	IFN γ	CD3	CD45RA
11	CD45R0	IL5	CD3	CD45RA
12	CD45R0	CD45RA	CD3	IL2
13	CD45R0	CD45RA	CD3	IL10
14	CD45RO	CD45RA	CD4	IL10
15	CD45RO	CD45RA	CD4	IL2

Methoden

Tabelle 4.4 Färbeprotokolle (Fortsetzung)

16	CD45RO	IL5	CD4	CD45RA
17	CD45RO	IFN γ	CD4	CD45RA
18	IL4	CD45RO	CD4	CD45RA
19	TNF α	CD45RO	CD4	CD45RA
20	IL2	IFN γ	CD3	IL10
H1	0	0	0	0
H2	TNF α	HLA DR	CD3	IL2
H3	IL4	HLA DR	CD3	IL10
H4	TNF α	HLA DR	CD3	IFN γ
S1	0	0	0	0
S2	TNF α	IFN γ	CD3	IL2
S3	IL4	IL5	CD3	IL10

Alternativ:

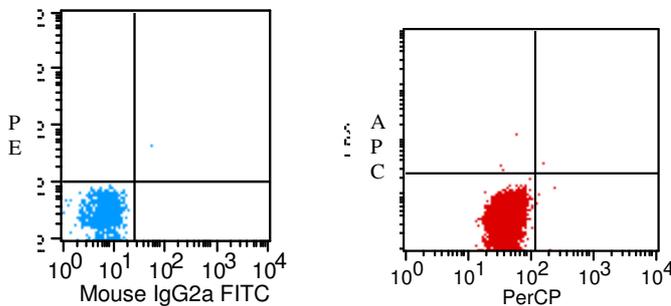
Tabelle 4.4 Färbeprotokolle (Fortsetzung)

	FITC	PE	PerCP	APC
1	0	0	0	0
2	IL4	IFN γ	CD3	IL2
3	IL4	CD45RO	CD8	CD45RA
4	IL2	CD45RO	CD8	CD45RA
5	CD45RO	IFN γ	CD8	CD45RA
6	IL4	CD45RO	CD4	CD45RA
7	IL2	CD45RO	CD4	CD45RA
8	CD45RO	IFN γ	CD4	CD45RA
9	TGF β	Ki 67	CD8	CD4
10	TGF β	CD16/56	CD3	CD19
11	TNF α	CD45RO	CD8	CD45RA

4.6 Spezifität intrazellulärer Zytokinfärbungen

Ein Antikörper bindet sein spezifisches Antigen über seinen Fab-Rezeptoren. Theoretisch können die verwendeten Antikörper aber auch unspezifisch über ihren Fc-Teil an Fc-Rezeptoren der untersuchten Zellen binden. Um das Maß dieser unspezifischen Bindungen einzuschätzen, werden Isotyp-Kontrollen verwendet. Isotyp-Antikörper haben den gleichen Fc-Teil wie der zu untersuchende Antikörper, aber einen unspezifischen Fab-Teil, der nicht an Epitope der zu untersuchenden Zellen binden sollte. Isotyp-Antikörper werden im FACS in den gleichen Konzentrationen und an den gleichen Farbstoff gekoppelt verwendet. Nach den Isotyp-Kontrollen werden die Grenzen für ein positives Signal so gesetzt, dass die Isotypkontrolle weniger als 1% positive Zellen aufweist. So wird eine unspezifische Bindung der Antikörper über ihren Fc-Teil subtrahiert und damit für ein positives Signal ausgeschlossen.

Alternativ wurden die Zellen ungefärbt gemessen und daraus auf die unspezifischen Bindungen geschlossen und die Grenzen für ein positives Signal gesetzt.



Abbildungen 4.5: A) Isotyp-Färbung mit Antikörpern B) Isotyp-Färbung ungefärbte Kontrolle

4.7 Anfertigung von PCR-Produkten und Gelelektrophorese

4.7.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte mittels des SIGMA-Gen Elute Mammalian Total RNA-Kit bzw. mit Trifast, nachdem die Leukozyten mittels Ficoll separiert worden sind.

4.7.2 Anfertigung von cDNA-Produkten

Zu 23 μl RNA wurden 5 μl Primers (Stocklösungen jeweils 20 μM), 31,7 μl DEPC-Wasser, 10 μl Puffer, 4 μl der Desoxynucleosidtriphosphatmischung (10 mM) sowie 2,5 μl reverse Transkriptase (U/ μl) sowie 1 μl Protector RNase Inhibitor (40U/ μl) hinzugegeben, wodurch das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes 50 μl betrug. Nach einem Denaturierungsschritt von 15min bei 63°C wurde eine Synthesephase von 60min bei 30°C durchgeführt, worauf eine abschließende Denaturierung von 3min bei 99°C folgte.

4.7.3 Spectratyping/Immunoscope

v 4.7.3.1 PCR

Realtime-PCR-Protokoll:

- 5 μl V β -Primer (2 μM) pro well
0,5 μl cDNA (1-10ng/ μl) ->Biophotometer
0,25 μl Sonde (20 μM)
0,1 μl Primer C β 4 (100 μM)
12,5 μl Mix (2fach)
6,7 μl Aqua dest
- 2min bei 94°C
40 Zyklen von 15sec bei 94°C, 60sec bei 60°C

Alternativ einfaches PCR-Protokoll:

- 4µl dNTPs
- 5µl Primer
- 20µl(2µM) Primer forward (nach Schemata siehe Tabelle)
- 4µl(10µM) Primer reverse (Cβ3)
- 0,25µl Taq Polymerase
- 1µl cDNA
- 15,75µl Aqua dest

50µl

- 3min bei 95 °C
- 3 Zyklen von 30sec bei 95 °C, 30sec bei 60 °C, 30 sec bei 72 °C
- 5min bei 72 °C

Tabelle 4.5: Primeranordnung

SPUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A TCRVβ	9	23	16	3	22	21	24	15	17	7	12	1
B TCRVβ	18	6b	4	13a	11	8	20	2	13b	6a	14	5

Die Primer sind so in den beiden Reihen angeordnet, daß ein optimales Profil während der Gelelektrophorese entsteht (siehe Tabelle 4.5). Die zwölf proximal gelegenen Primer befinden sich in der ersten Reihe, während die zwölf distal gelegenen Primer in Zeile B zu finden sind. Dadurch können die Elongationsprodukte der ersten Reihe zusammen mit denen der zweiten Reihe auf das Gel aufgetragen werden, ohne dass Interferenzen entstehen. Durch unterschiedlich gefärbte Runoff-Primer (BC 3 IRD 700/ 800) lassen sich zudem 2 Proben in eine Lane auftragen, da durch die unterschiedliche Fluoreszenz die Proben auf unterschiedlichen Kanälen detektiert werden.

v 4.7.3.2 Gelelektrophorese

Von den so gewonnenen PCR-Produkten wurden jeweils 5 µl entnommen und mit 5µl Ladepuffer vermischt. Nach einem Denaturierungsschritt von 3min bei 95°C wurde von jeder Probe 0,6 µl auf ein vorgewärmtes 6%iges Polyacrylamidgel (Pre-run) aufgetragen und bei 1500 V und 40 mA elektrophoretisch aufgetrennt(ca.2h).

Das Auftragungsschema war wie folgt:

Lane 1/14/27/40:Size Marker:700

Lane 1/14/27/40: Size Marker 800

Lane 2-13/15-26/28-39: Probe

Es wurde ein 48er Rechteckkamm benutzt.

Die Detektion der Banden erfolgte unter Verwendung des LI-COR-Sequenziergerätes (Lincoln, USA), und der zugehörigen Software Base Saga TM Version 3.2 (Lincoln, USA) sowie der Software Gel Pro Analyzer (media Cybernetics, Bethesda, USA).

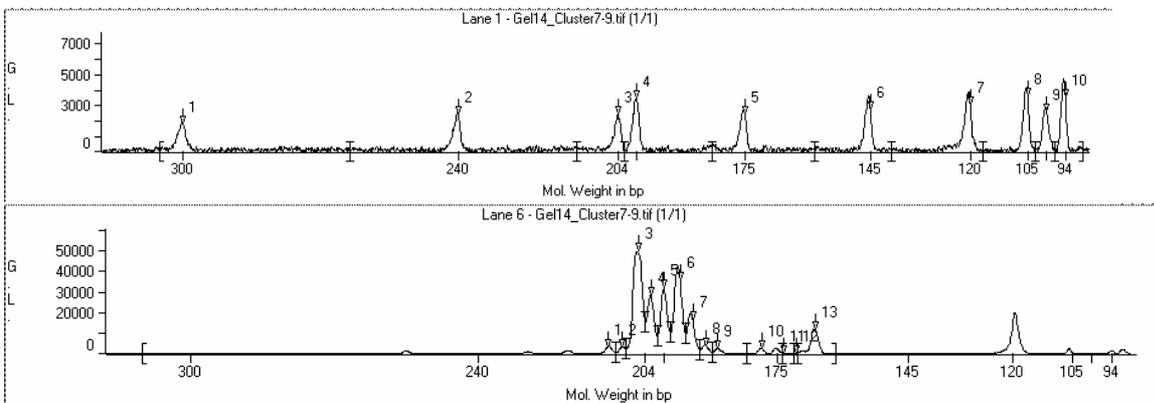
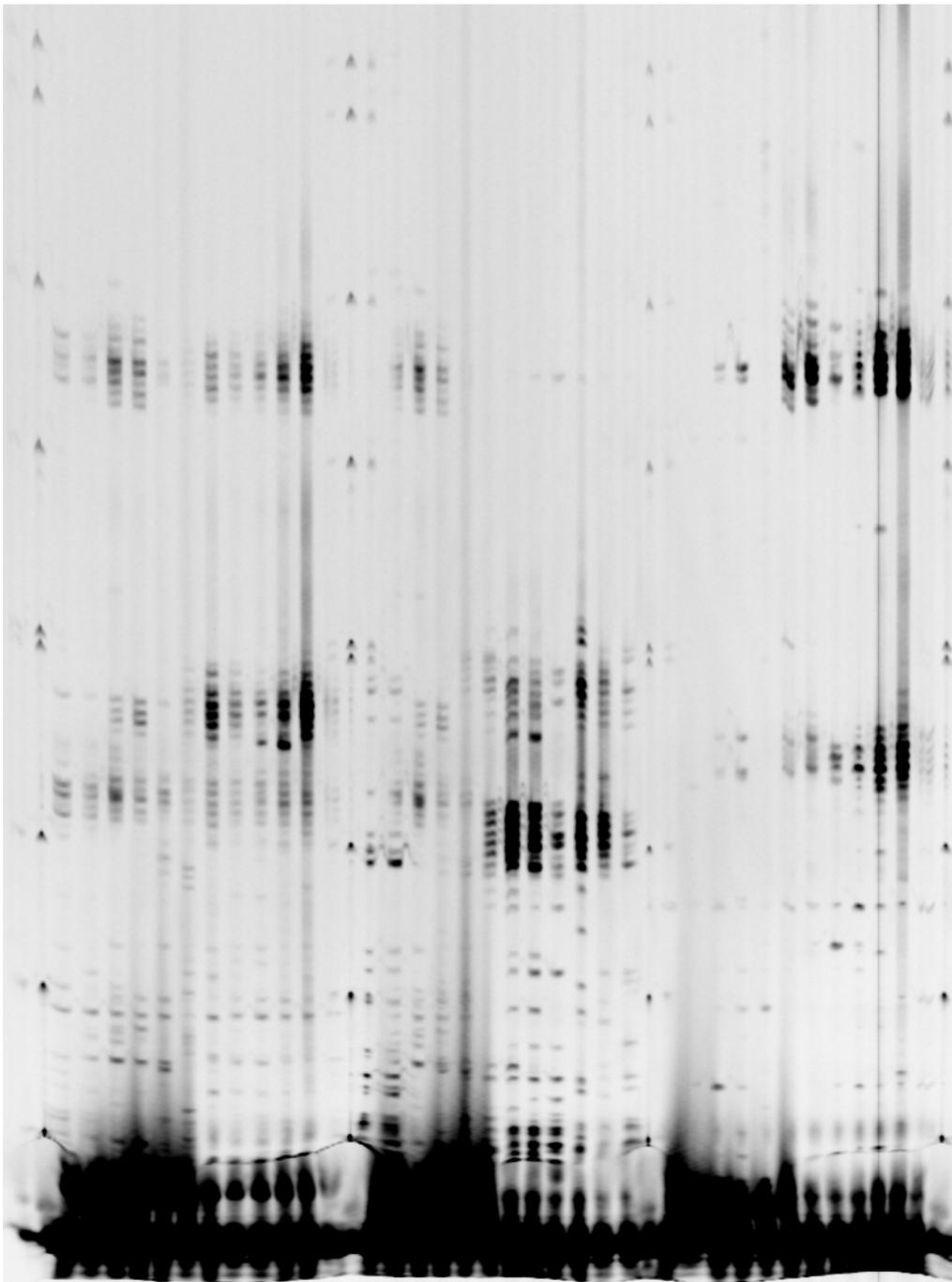
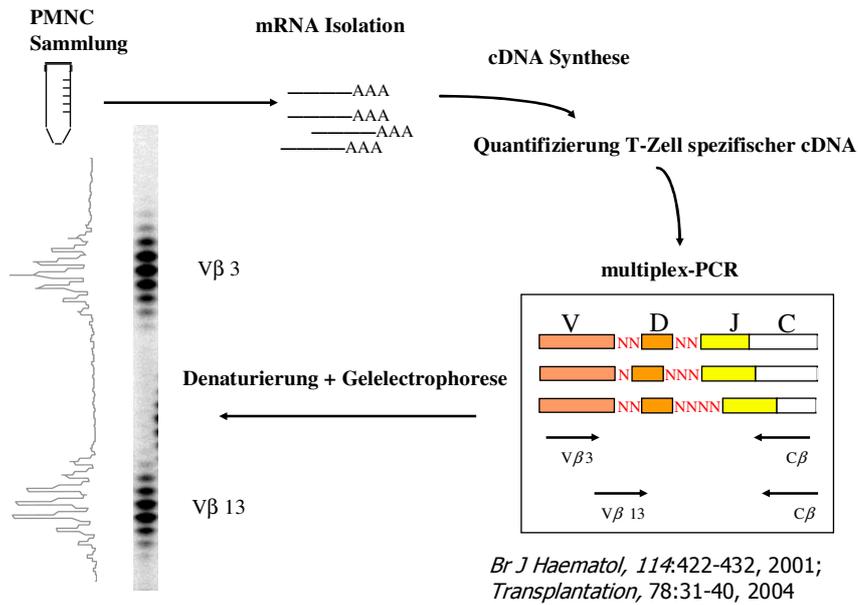


Abbildung 4.6 Gelelektrophorese in zwei unterschiedlichen Darstellungsweisen als Gelbild (oben) und im Histogramm (unten).

Zur molekularen Analyse des T-Zell-Repertoires wird üblicherweise die als CDR3-Längen-Fragmentlängenanalyse bezeichnete Methode angewendet, wobei die α - und β -Kette des TCR als Identifikationsstruktur betrachtet werden (Gorski et al., 1994, Maslanska et al. 1995). Diese Methode wurde 1993 von zwei Arbeitsgruppen parallel entwickelt und wird abhängig von den verwendeten Primersequenzen Spectratyping (Gorski et al., 1994) oder Immunoscope (Pannetier et al., 1993) genannt. Das Problem bei der Feststellung der Variabilität besteht darin, dass es beim Menschen 24 funktionelle Genfamilien von V β -Genabschnitten gibt. Das heißt für jede Familie muss ein spezifischer Primer erzeugt werden, der in der Polymerasekettenreaktion (PCR) zusammen mit einem spezifischen Primer für die C β -Region eingesetzt werden kann. Durch Amplifizierung aller CDR3-Sequenzen einer V β -Familie mittels PCR entsteht ein Pool von CDR3-Fragmenten, die sich in ihrer Länge unterscheiden. Bei gesunden Personen ergibt sich bezüglich der Fragmentlänge eine Gauß-Normal-Verteilung (siehe Abbildung 4.8). Die aufeinanderfolgenden PCR-Fragmente differieren jeweils in einer Länge von drei Basen. Ein Abweichen von dieser Längenverteilung – dies stellt sich in der verstärkten Intensität einer Einzelbande oder durch eine Abweichung von der Normalverteilung dar – spricht für die ausgeprägte Expression einer bestimmten CDR3-Region. Das heißt, dass eine Expansion eines einzelnen oder einiger weniger T-Zellklone statt findet. Expansionen (zum Beispiel GvHD-assoziierte T-Zellklone) oder Lücken im T-Zellrepertoire zeigen sich klinisch zum Beispiel durch rezidivierende Infektionen des Patienten. Das TCR-Immunoscope bietet deshalb eine gute Möglichkeit die T-Zell-Repertoire-Rekonstitution zu analysieren.

TCR-Analyse: CDR3-size Spectratyping



Abbildungen 4.7: vereinfachtes Schema des Prinzips der Spectratype-Analyse

4.8 ELISA

Aus dem Serum unstimulierter Zellen bestimmten wir die Zytokinproduktion mittels ELISA (IFN γ , TGF β , IL4, IL7, IL13, IL15).

Prinzip der Methode: Auf eine Mikrotiterplatte, die mit Antikörper gegen das zu untersuchende Antigen (in unserem Fall ein Zytokin) beschichtet ist, werden die vom Hersteller vorgelieferte Standards in absteigender Verdünnung und die Proben aufgetragen. Das Zytokin bindet an den Antikörper und somit an die Platte. Ein löslicher Antikörper gegen das Zytokin wird nun hinzugegeben. Dieser Antikörper ist biotinyliert und bindet den dazugegebenen Streptavidin-Peroxidase-Komplex. Die Peroxidase produziert pro umgesetztes Substrat eine bestimmte Menge an Farbe. Die Intensität der Farbe ist direkt proportional zu der Konzentration des Zytokins. Die Absorption wird bei 450nm gemessen mit einer Referenzwellenlänge von 620nm. Die Zytokinkonzentration wird über den Vergleich der bekannten Konzentrationen des Standards ermittelt.

IFN γ , TGF β , IL4 und IL15 wurden nach Anleitung der OptEIA-Sets (Fa. BD, Heidelberg) durchgeführt:

Tabelle 4.6 Reagenzienansätze für ELISA

Coating Buffer	8,4g NaHCO ₃ 3,56g Na ₂ CO ₃ aufgefüllt zu 1l aqua dest pH: 9,5	7 Tage haltbar bei 2-8 °C
Assay Diluent	PBS mit 10% FBS pH: 7	3 Tage haltbar bei 2-8 °C
Wash Buffer	PBS mit 0,05% Tween-20	3 Tage haltbar bei 2-8 °C
Substrate Solution	Tetramethylbenzidine Hydrogen Peroxide	
Stop Solution	2N H ₂ SO ₄	
Recombinant human Zytokine-Standard	lipophylisiert	
Capture Antibody	Anti-human Cytokine monoclonal antibody	
Detection Antibody	Biotinylated anti human Cytokine monoclonal antibody	

Methoden

Enzyme Reagent	Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (SAv-HRP)	
----------------	---	--

Protokoll:

- Mit 100µl pro Loch Capture Antibody verdünnt in Coating Buffer (1:250) werden die Platten beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert.
- 3x waschen mit 300µl Wash Buffer
- 250µl AssayDiluent pro Loch einfüllen und 1h bei Raumtemperatur inkubieren
- 3x waschen mit 300µl Wash Buffer
- Standard-Konzentrationen (250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/µl, 31,3pg/µl, 15,6pg/µl, 7,8pg/µl, 3,9pg/µl und Blank) und Proben. 2h bei Raumtemperatur inkubieren
- 5x waschen mit 300µl Wash Buffer
- 100µl Working detector (Detection Antibody 1:250 verdünnt in AssayDiluent; Enzyme Reagent 1:250 verdünnt in Detection-Antikörper-Verdünnung) pro Loch pipettieren. 1h bei Raumtemperatur inkubieren.
- 7x waschen mit Wash Buffer. Jeweils 1min den Wash Buffer einwirken lassen.
- 100µl Substrate Solution pro Loch dazugeben. Platte offen 30min bei Raumtemperatur inkubieren (Farbentwicklung blau)
- Enzymreaktion mit 50µl StopSolution pro well anhalten (Farbentwicklung gelb)
- Bei 450nm innerhalb von 30min photometrisch messen.

Der ELISA für die IL13- und IL7-Bestimmung wurden nach dem Protokoll von Biosource, Camarillo (USA) durchgeführt. Das Prinzip der Methode ist identisch.

4.9 TREC-Assay (T-cell receptor excision circles)

Die Quantifikation der TRECs in isolierten PMNCs wurde anhand einer quantitativen Real-Time-PCR am ABI 7300 durchgeführt. Die Zellen wurden eine Stunde bei 56 °C mit Proteinase K (100 µg/ml) lysiert. Das Verhältnis zwischen Proteinase K und T-Zellen entsprach 10 µl pro 10⁵ Zellen. Anschließend wurde das Produkt für 15 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Real-Time-PCR wurde schließlich mit 5 µl Zell-Lysat (äquivalent zu 50000 Zellen) mit den Primern

- 5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT und
- 5'-GCCAGCTGCAGGGTTTA-GG und der
- TaqMan-Sonde FAM-5'-ACACCTCTGGTTTTTGTAAGGTGCCCACT-TAMRA (MegaBase, Chicago, IL).

durchgeführt.

<u>PCR-Reaktion-Mix:</u> Primer forward (12,5 µM):	1,0 µl
Primer revers (12,5 µM):	1,0 µl
Sonde (5 µM):	1,0 µl
Aqua dest. :	4,5 µl
Master Mix (2fach)	12,5 µl
Zell-Lysate/Standards :	<u>5,0 µl</u>
	<u>25,0 µl</u>

PCR-Konditionen waren wie folgt:

- 95 °C für 10 Minuten
- 95 °C für 15 Sekunden und 60 °C für eine Minute für insgesamt 40 Zyklen.

Eine Standardkurve (NTC, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷) wurde erhoben und die TREC-Werte durch die ABI-7300-sequence-detector-software (Li-cor 4300 DNA-Analyzer mit SAGA Version 3.2 Analysis-Software, LI-COR, Lincoln, USA) errechnet. Alle Proben wurden dreifach bestimmt.

TREC-Assay

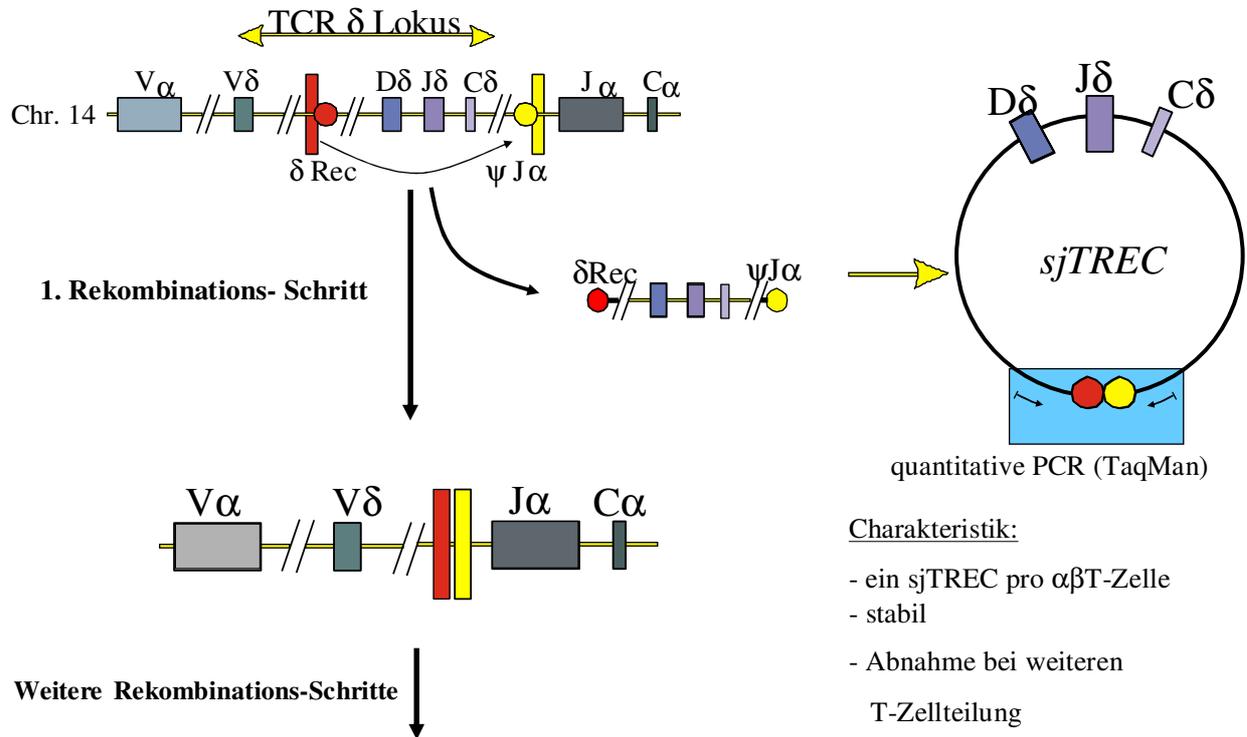


Abbildung 4.8 : Schemata des Prinzips von TREC-Analysen

4.10 Statistik

Die ELISA-Daten wurden doppelt bestimmt. Daraus wurde der Mittelwert errechnet. Die FACS-Daten wurden innerhalb der vorher definierten Patientengruppen ausgewertet. Die Ergebnisse sind im Median angegeben mit dem dazugehörigen Streubereich in Klammern. Statistische Signifikanzen zwischen den Patientengruppen wurden mit Hilfe des nichtparametrischen U-Tests von Wilcoxon, Mann-Whitney durch das Programm „JMP“ (Version x 5.1.0.2; SAS Institute Inc., Cary, USA) errechnet. Die Nullhypothese postulierte die gleiche Grundgesamtheit der beiden zu testenden Stichproben und damit eine Gleichheit der Mediane. Sie wurde mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ abgelehnt oder bei $p \geq 0,05$ aufrechterhalten.

Zur bivariablen Analyse möglicher Beziehungen zwischen Zytokinproduktion und verschiedener T-Zell-Subpopulationen bedienten wir uns der Logitfunktion. Sie kann zur Linearisierung von sigmoiden Kurven verwendet werden und ermöglicht dadurch den Vergleich prozentualer Werte mit absoluten Ergebnissen. Ein Logitwert L ist der Logarithmus eines Odds (Wahrscheinlichkeit p durch Gegenwahrscheinlichkeit (1-p)).
 $L = \ln[p/(1-p)]$

5. ERGEBNISSE

5.1 Immunglobuline (ELISA) und Immunstatus (Phänotypisierung von Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie) bei pädiatrischen Leukämiepatienten

5.1.1 Leukämie-Patienten allgemein

Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse beziehen sich auf pädiatrische Patienten, die an einer akuten lymphoblastischen Leukämie erkrankt sind und nach dem Therapie-Protokoll ALL-BFM 2000 behandelt wurden. Es wurden nur Patienten mit B-Vorläufer-Leukämien, die im Standard- oder mittleren Risikozweig stratifiziert worden waren, in die Studie eingeschlossen. Immunstatus, Zytokinmessungen, TRECs und Immunoscope sowie Serum-Immunglobuline wurden bei Diagnose (vor Therapiebeginn), an Tag 8 (d8), Tag 15 (d15), Tag 33 (d33), Tag 64 (d64; nach zweitem Cyclophosphamid) und vor Protokoll M (Prot M) sowie vor Protokoll 2, Protokoll 3 und unter Dauertherapie durchgeführt.

5.1.2 B-Zellen und Immunglobuline

B-Zellen wurden hier als CD19⁺-Zellen definiert. Viele Patienten zeigten bereits bei Diagnosestellung schon subnormale Werte. Da die meisten Patienten an Leukämien des B-Vorläufer-Typs erkrankten, ließen sich im *klassischen* Immunstatus bei Diagnosestellung zum Teil die Blasten von den tatsächlichen Zellen nicht sicher trennen, so dass Zusatzfärbungen notwendig wurden mit den blastenspezifischen Markern zur Differenzierung zwischen B-Zellen und B-Vorläufer-Blasten. Nach Beginn der Therapie zeigte sich ein rascher Abfall der absoluten und prozentualen B-Zell-Zahl zu kaum mehr nachweisbaren Werten im peripheren Blut. Der Abfall der B-Zellanzahl (Tabelle 5.2, Abbildungen 5.1 und 5.5A) vollzog sich rasch und bis zur Beendigung der Dauertherapie zeigte sich keine Regeneration der B-Zellen (Mediane: Diagnose: 320/ μ l, d33: 41 \pm 62/ μ l, vor Protokoll M: 13 \pm 31/ μ l, Beginn der Dauertherapie 35 \pm 11/ μ l). Nach Beendigung (im Mittel 1,2 Jahre nach Therapieende) der Dauertherapie zeigte sich eine Rekonstitution der B-Zellen auf subnormale Werte (Median 562 \pm 144).

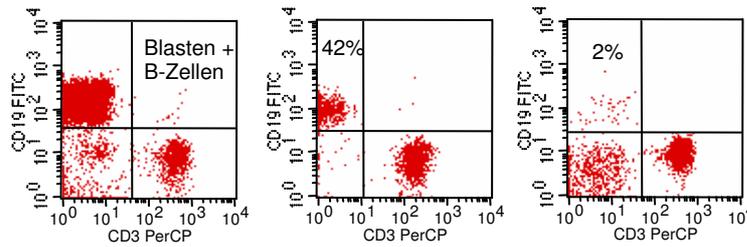


Abbildung 5.1 - B-Zellen in der FACS-Analyse bei Diagnosestellung, an Tag 33 und vor Protokoll M exemplarisch an einem Patienten.

Um die Rekonstitution im B-Zell-Kompartiment besser zu differenzieren, führten wir simultane FACS-Färbungen mit CD19, CD27, IgD und IgM durch, um dadurch die Zellen in naive B-Zellen (CD27⁻/IgD⁺/IgM⁺) und memory B-Zellen (B1: CD27⁺/IgD⁻/IgM⁻, B2: CD27⁺/IgD⁻/IgM⁺, B3: CD27⁺/IgD⁺/IgM⁺) unterteilen zu können (Tabelle 5.1, zu B-Zell-Subpopulationen siehe auch 1.5).

Tabelle 5.1 – B-Zellreihen während und nach Beendigung der Dauertherapie

<i>Mediane</i>	<i>B-Zellen absolut(μl)</i>	<i>Naive B-Zellen (B1) in %</i>	<i>Gedächtnis-B-Zellen in %</i>		
			<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B3</i>
Dauertherapie (526 Tage nach Diagnose)	35±11	82±11	54±16	44±17	67±18
Nach Dauertherapie (912 Tage nach Diagnose)	562±144	97±2,5	68±12	26±10	93±5,5

Eine deutliche Rekonstitution der B-Zellanzahl zeigte sich erst nach Beendigung der Dauertherapie. Nicht nur die B-Zellzahl war im Mittel 1,2 Jahre nach Therapieende verglichen mit Daten unter Dauertherapie signifikant gestiegen ($p < 0,0008$), sondern auch bei den naiven B-Zellen ($p < 0,03$) und den Gedächtnis-B3-Zellen war eine deutliche Zunahme ($p < 0,008$) zu detektieren, so dass von einer Neubildung der Zellreihe einerseits, und einer Expansion der Gedächtnis-B-Zellen andererseits zu diesem Zeitpunkt auszugehen ist.

Aufgrund der geringen B-Zellzahl während der Therapie, führten wir Immunglobulinanalysen durch, um festzustellen, ob parallel zu den niedrigen B-Zellzahlen die Anzahl der Immunglobuline sinkt.

Insgesamt ist eine stetiger Immunglobulinabfall in allen Immunglobulinsubklassen (IgG, IgA, IgM) zu verzeichnen. Jedoch ist der Abfall nicht so gravierend, wie zu erwarten wäre (IgG bei Diagnose versus Protokoll M: 253±57mg/dl versus 121±42

Ergebnisse

mg/dl, IgA: 24 ± 9 mg/dl bei Diagnose versus 15 ± 4 mg/dl vor Protokoll M). Eine Erklärungsmöglichkeit für diesen Effekt ist, dass alle Patienten während der Induktionsphase Thrombozytenkonzentrate (TK) erhielten. Thrombozytenkonzentrate enthalten eine hohe Konzentration von Immunglobulinen. Das könnte die relativ hohen Immunglobulinkonzentrationen im Serum im Verhältnis zu den absoluten B-Zellzahlen erklären (Abbildung 5.2).

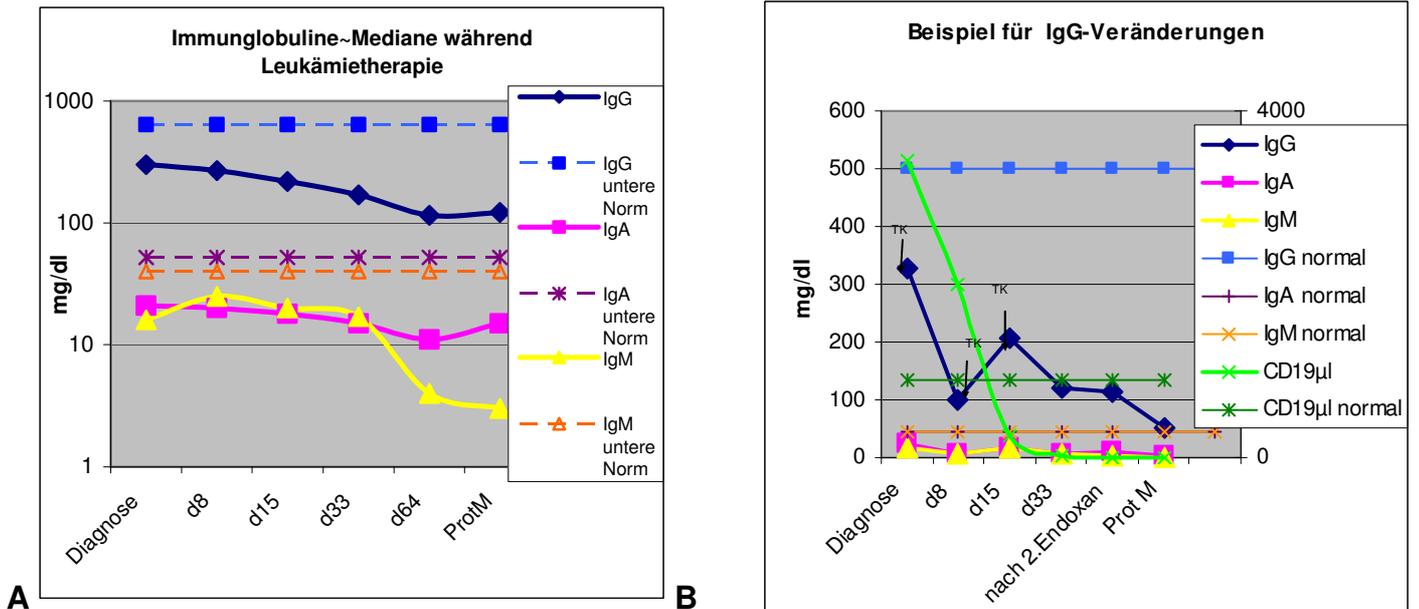


Abbildung 5.2 – A- Immunglobuline sind bereits bei Diagnose und während der gesamten Therapie unter dem Normalwert. Gestrichelte Linien zeigen den unteren Normalwert eines gesunden, altersgematchten Kontrollkollektiv

B- Beispiel für Immunglobulinkonzentrations-Änderungen bei einer 4jährigen Patientin (Patient Nr. 13) im Therapieverlauf und die Beeinflussung der Ig-Werte durch Thrombozytenkonzentratgabe (TK).

5.1.3 T-Zellen

Wie bei der B-Zellanzahl findet man auch bei den T-Zellen reduzierte absolute CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozytenzahlen. Während der relative Lymphozytenanteil im Blut bei 8 von 23 Patienten bei Diagnosestellung reduziert war, konnten wir bei 10 von 23 Patienten eine Neutropenie (<1000/μl Neutrophile), bei 7 davon in schwerer Ausprägung (<500 /μl Neutrophile) nachweisen. 5 von 23 Patienten hatten eine Leukozytose bei Diagnose (Median: 122150/μl; 20500-733500/μl); bei diesen 5 Patienten waren über 60% Blasten im peripheren Blut (Median: 81%). Bei 10 von 23 Patienten lagen die Leukozyten im Normalbereich (Median: 9650/μl; 4100-11400/μl) und 22% Blasten waren im Median im peripheren Blut nachweisbar. Des Weiteren konnten wir bei 8 Patienten eine Leukozytopenie bei Diagnose (Median: 1650/μ; 1140-2600/μ) feststellen; diese Patienten schwemmen auch nur sehr wenige Blasten in die Peripherie aus (Median: 12%).

Im Verlauf der Chemotherapie nahm die T-Zell-Anzahl (CD3⁺-Zellen) nur mäßig ab, wobei die T-Zellzahl parallel zur Intensität der Therapie verlief. So konnte nach anfänglicher Verminderung der T-Zellen nach Therapiebeginn bis Tag+15 (396±103 Zellen/μl) eine Erholung der T-Zellen vor Protokoll M festgestellt werden (Tag+64 861±212/μl vor Prot M 990±255/μl). Der T-Zell-Anstieg vollzog sich parallel zur geringeren Therapieintensität. Etwa ein Jahr nach Dauertherapie-Ende detektierten wir T-Zellwerte im niedrig normalen Bereich (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2 - Absolute [μl] (prozentuale [%]) Anzahl an B-Zellen, T-Zellen (4⁺/8⁺-Ratio) und NK-Zellen vor und während der Chemotherapie.

Zelltyp	Diagnose	Tag 33	Protokoll M	Dauertherapie	Nach Dauertherapie	Normalwerte
<i>B-Zellen</i>	360(18)	41±62(3)	13±31(1)	35±11(2)	562±144 (9)	900(24)
<i>CD3⁺</i>	1144±523(66)	1389±380(87)	990±255 (91)	905±221(80)	1165±337 (82)	2500(64)
<i>CD3⁺CD4⁺</i>	648±305(58)	633±255(56)	457±124(49)	319±130(49)	355±177 (53)	1600(37)
<i>CD3⁺CD8⁺</i>	329±178(32)	458±178(38)	438±182(44)	419±97(43)	454±146 (41)	900(29)
<i>CD3⁻ CD16/56⁺</i>	205±203(6)	134±64(4)	81±37(6)	111±67(13)	97±69 (7)	400(37)
<i>IgG</i>	253±57	119±41	121±42	109±23	110±12	500
<i>CD4-8-Ratio</i>	2,1	1,5	1,1	1	1,3	1,6

Ergebnisse

Insgesamt war unter Therapie eine relative Zunahme von CD8⁺ Zellen (Diagnose: 30%, Tag+8: 35%, Tag+33: 38,5% , Prot M; 44%, Dauertherapie: 43%) und eine Abnahme von CD4⁺ Zellen (Diagnose 57%, Tag+8: 54%, Tag+33: 53%, Prot M: 48%, Dauertherapie: 48%) zu verzeichnen, wobei sich die CD4-CD8-Ratio (Diagnose: 2,1, Prot M: 1,5 , Dauertherapie: 1,0) signifikant ($p= 0,0007$) verminderte, das heißt der Anteil von CD8⁺Zellen nahm im Therapieverlauf stärker zu als die CD4⁺Zellanzahl. Nach Beendigung der Dauertherapie verschiebt sich die CD4-CD8-Ratio wieder zu normalen Werten.

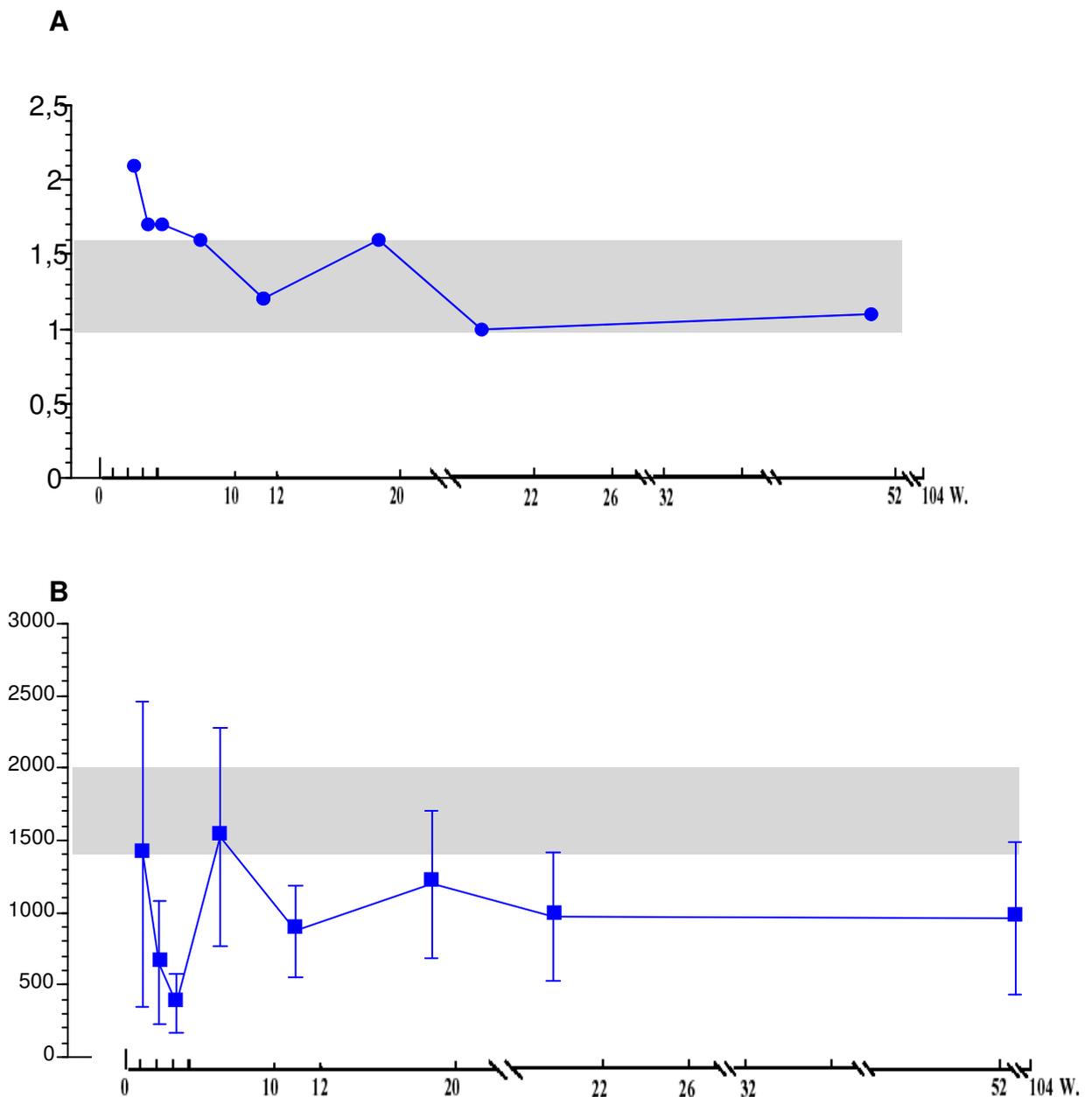


Abbildung 5.3 – T-Zellen mit CD4-CD8-Ratio (A) im Verlauf der Leukämie Therapie: T-Zellen sind proportional zur Therapieintensität nur mäßig erniedrigt. Der Anteil von CD8⁺-Zellen nimmt zu, während CD4⁺ Zellen im Verhältnis abnehmen.

Während der gesamten Therapie konnten wir keine komplette Rekonstitution der CD4⁺-T-Zellen hin zu altersentsprechender T-Helferzell-Anzahl im peripheren Blut detektieren. Keiner der Patienten hatte unter der Therapie zu irgendeinem der untersuchten Zeitpunkte eine CD3⁺ bzw. CD4⁺-Zellzahl, die einem gesunden Kontrollkollektiv entsprechen würde. Auch der CD8⁺Zellanteil lag bei den meisten Patienten unter der Norm, jedoch gab es zwei Patienten die an Tag+33 und zwei andere Patienten, die vor Protokoll M den Normbereich erreichten. Nach Beendigung der Dauertherapie waren die T-Zellzahlen auf 1165 ± 337 angestiegen, das entspricht 82% und liegen damit immer noch im subnormalen Bereich.

Der Aktivierungsmarker CD3⁺HLA-DR⁺ zeigt unter der Therapie keine klare Tendenz, zwar sinkt rechnerisch sowohl im Median als auch im Mittelwert der prozentuale Anteil aktivierter T-Zellen von Diagnose ($11\% \pm 6,7\%$) bis Tag+64 ($2\% \pm 4,8\%$), um dann vor Protokoll M wieder anzusteigen ($19\% \pm 19\%$), jedoch variiert der Aktivierungsmarker HLA-DR bei den einzelnen Patienten enorm. Der Verlauf ist stark abhängig von Infektionen. Patienten ohne Fieber während der Induktionsphase zeigen auch vor Protokoll M kaum eine Aktivierung, während andere Patienten mit Fieber in der Neutropenie mit steigender Aktivierung reagieren. Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen HLA-DR und Gesamt-CD3-Zellzahl/ml gefunden werden ($p=0,001$, $r^2=0,3$).

Zum Zeitpunkt der Diagnose hatten die Leukämiepatienten ein gemischtes Verhältnis von CD45RA⁺(naive)- und CD45RO⁺(Gedächtnis)-CD4⁺T-Zellen in der altersentsprechende Verteilung (der Median von CD4⁺CD45RA⁺ Zellen bei Diagnose beträgt 66%, von CD45RO 23%). Es sind überwiegend naive T-Zellen und ein geringer Gedächtnis-Zellanteil. CD45 ist ein allgemeiner Lymphozytenmarker und wird somit auf allen CD3⁺Zellen exprimiert. Zu Beginn der Leukämieherapie kommt es zu einer leichten Abnahme der CD4/CD45RA positiven Zellen und einer relativen Zunahme der Gedächtnis-T-Zellen. Dies macht sich vor allem im prozentualen Anteil der CD45⁺ Zellen bemerkbar, da die absolute Anzahl der T-Zellen mit der Therapieintensität schwankt. Trotzdem lässt sich auch in absoluten Zahlen eine Abnahme der naiven T-Zellen finden (naive T-Zellen CD45RA⁺: Diagnose:

Ergebnisse

423±169/μl (66%), Tag+15: 167±225/μl (63%), vor Prot M: 213±11/μl (55%)). Die Gedächtnis-T-Zellen (CD4⁺/CD45RO⁺: Diagnose: 25%, Tag+15: 29%, Prot M: 36%) hingegen nehmen zu (Abbildung 5.4). Diese Verhältnisverschiebung ist während der gesamten Therapie zu beobachten (Ratio CD45RA⁺/CD45RO⁺ bei Diagnose: 2,9, Tag+15: 2,17, vor Protokoll M: 1,5 und während Dauertherapie 1,6) und normalisiert sich erst nach Beendigung der Dauertherapie.

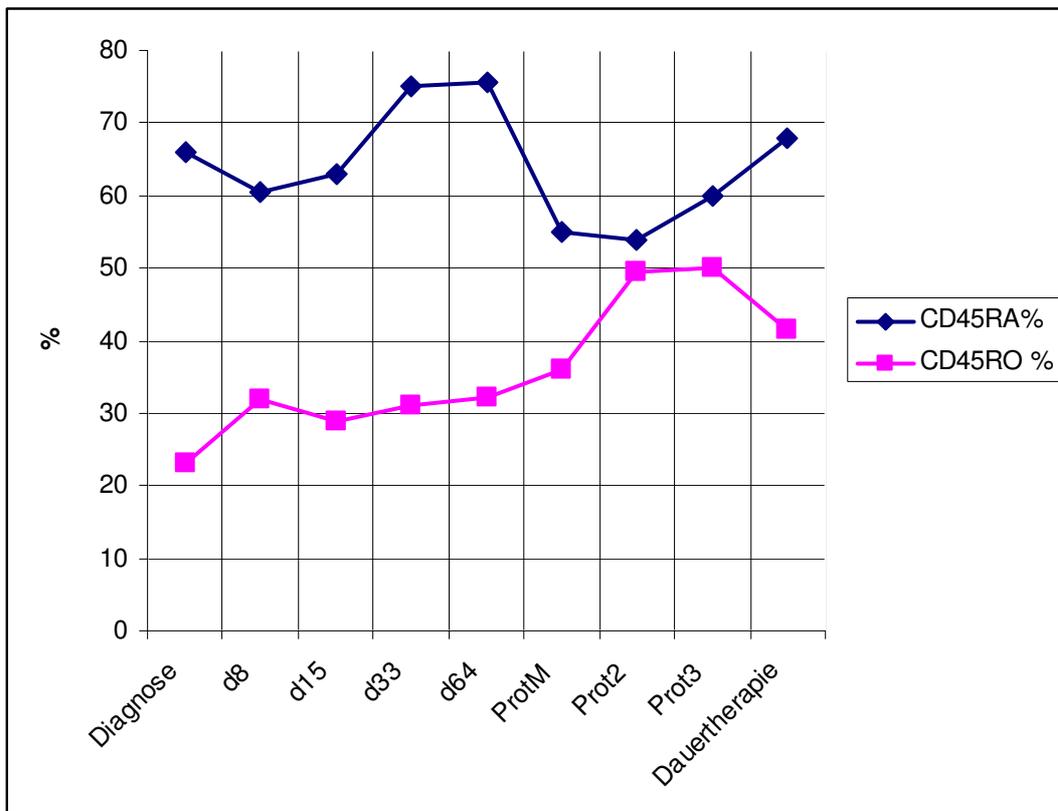
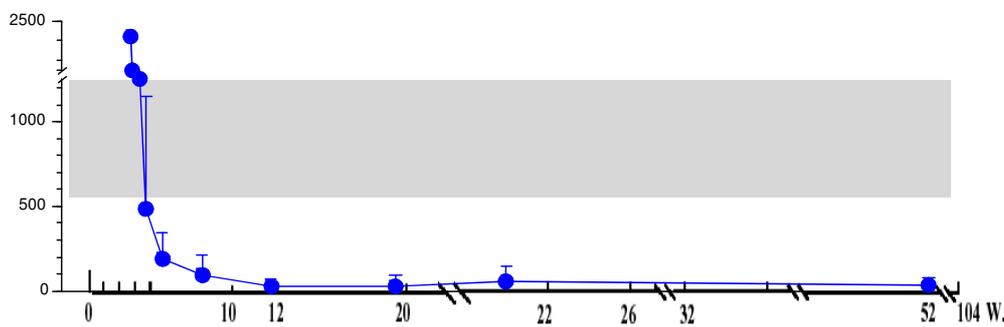


Abbildung 5.4 –
CD45 im Verlauf der Therapie: CD45RA⁺-Zellen nehmen leicht ab, während CD45RO⁺-Zellen ansteigen.

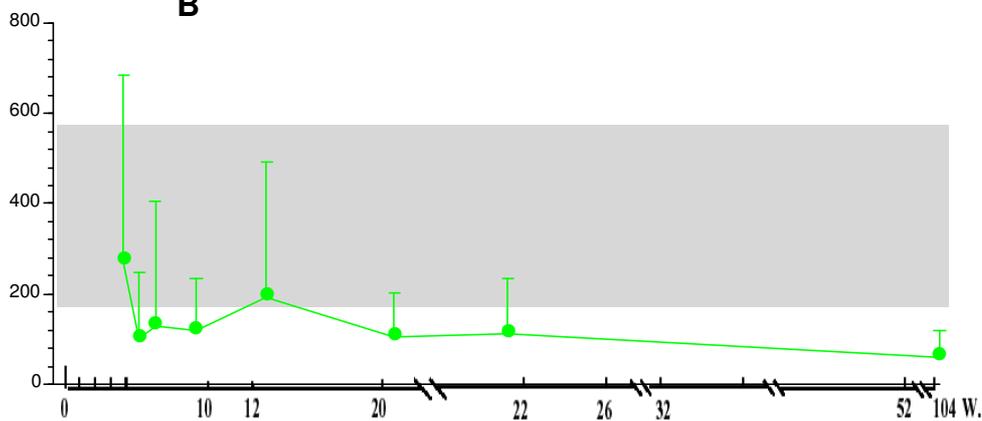
5.1.4 NK-Zellen

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) wurden als CD3⁻CD16/56⁺-Zellen definiert. Der Verlauf unter der Therapie war interindividuell sehr variabel. Einige Patienten zeigten einen Anstieg, andere eine Verminderung der NK-Zellzahl. Geringe T- und B-Zell-Zahlen scheinen hier eine große Rolle zu spielen, da die Patienten mit hohen NK-Anzahl zur selben Zeit meistens stark verminderte T- und B-Zellen aufweisen. Insgesamt waren NK-Zellen während der gesamten Therapie nur mäßig reduziert (Abbildung 5.5B)

A



B



Zeit in Wochen

Abbildung 5.5 - B-Zellen(A) und NK-Zellen(B) im Verlauf der ALL-Therapie. Ausgeprägte und andauernde B-Zelldepletion, parallel dazu niedrige Plasma-Immunglobulinspiegel, nur mäßige NK-Zell-Reduktion.

5.2 Die Expression von Zytokinen bei Leukämiepatienten

5.2.1 Intrazellulärer Nachweis von Zytokinen mittels Durchflußzytometrie

PMA und Ionomycin sind unspezifisch wirkende Stimulanzen, die ohne Rezeptorvermittlung T-Zellen aktivieren können. Dabei ist PMA ein Strukturanalogon zu DAG, das die Proteinkinase C dauerhaft aktiviert; Ionomycin hingegen ist ein Kalziumionophor, das einen Kalzium-Influx aus dem Extrazellular-Raum bewirkt. Im Gegensatz zum Zytokin-ELISA wurden mittels FACS Zytokine in der produzierenden Zelle und nicht im Überstand gemessen werden. Dabei wird Brefeldin A, ein fungaler Metabolit aus *Penicillium brefeldianum*, eingesetzt, um die Proteinsekretion durch Hemmung des Transportes vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat zu unterbinden. In fixierten und permeabilisierten Zellen wurde nach entsprechender Zugabe des Zytokinantikörpers ein Zytokinspiegel in stimulierten Zellen detektiert. Da unstimulierte Zellen keine oder nur sehr geringe Mengen von Zytokinen produzieren, sollte das Zytokinsignal in unstimulierten Zellen sehr gering sein (Abbildung 5.6).

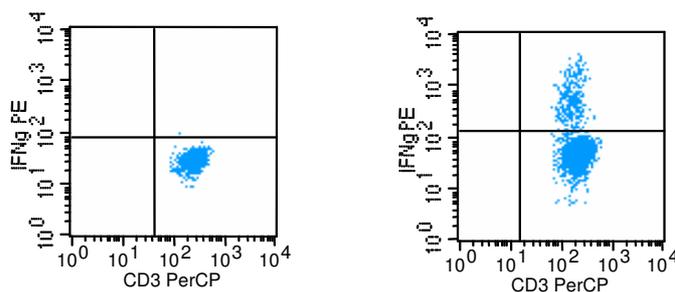


Abbildung 5.6 –
Unstimuliert: 0,1%IFN γ positiv
(links)
Stimuliert mit PIB über 24h: 11%
IFN γ positiv (rechts)

5.2.2 Kontrollen zur Spezifität intrazellulärer Zytokinfärbungen

Ein Antikörper bindet sein spezifisches Antigen über seine Fab-Bindungsstelle. Theoretisch können die verwendeten Antikörper aber auch unspezifisch über ihren Fc-Teil an Fc-Rezeptoren der untersuchten Zellen binden. Um das Maß der unspezifischen Bindungen einzuschätzen, werden ungefärbte, stimulierte Zellen gemessen, die das gleiche Protokoll durchlaufen wie die gefärbten Zellen, und nach deren Fluoreszenz die Grenzen für ein positives Signal gesetzt (Abbildung 5.7).

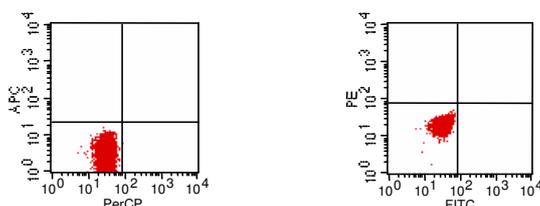


Abbildung 5.7 –
Kontrollen zur Spezifität
intrazellulärer Zytokinfärbungen,
der positive Anteil lag dabei unter
1%.

5.2.3 Kontrollen zur Intrazellularität der Zytokinmessung

Nachdem die Spezifität der Zytokinfärbungen im FACS belegt worden war, war als nächstes zu beweisen, ob Anti-Zytokin-Antikörper ihr Antigen auch wirklich intrazellulär binden. Es wurde an stimulierten Zellen gearbeitet. Wir resuspendierten die Zellen in HBSS (Hank's balanced salt solution) statt in Saponin-Puffer vor der Antikörper-Inkubation. Der Anti-Zytokin-Antikörper hatte so ausschließlich Zugang zu Zytokinen, die auf der Zelloberfläche gebunden sind. Es war nur ein sehr geringes Zytokinsignal auf der Zelloberfläche zu detektieren (Abbildung 5.8).

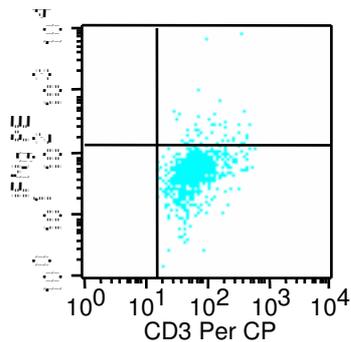
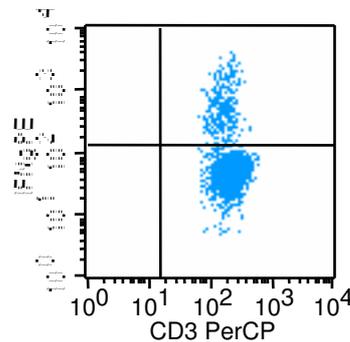


Abbildung 5.8- 2%IFNgamma Produktion extrazellulär



12% IFNgamma Produktion intrazellulär, Permeabilisierung durch Saponin

5.2.4 Analogie der Expression von Oberflächenmarkern

Um die verschiedenen Oberflächenmarker beim Immunstatus und bei Zytokinmessungen miteinander vergleichen zu können, musste gewährleistet werden, dass die Expression und Bindungsaffinität der Antikörper dieselbe ist. Dazu wurde beispielweise CD3 gegen SSC aufgetragen, nachdem das periphere Blut nach dem Protokoll des Immunstatus (siehe Kapitel 4.2) beziehungsweise nach dem Protokoll der intrazellulären Zytokinbestimmung (siehe Kapitel 4.5) gefärbt wurde. Die detektierte Expression war nahezu identisch (Abbildung 5.9).

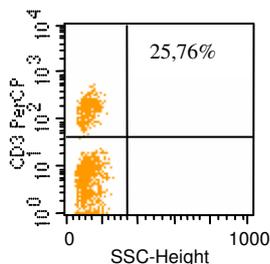
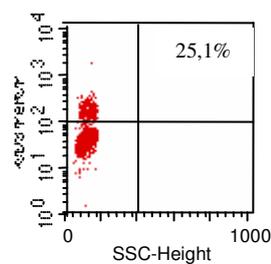


Abbildung 5.9 - CD3 beim Immunstatus



CD3 nach Zytokinfärbung

Ergebnisse

Eine Ausnahme hingegen stellte hier das Oberflächenepitop CD4 dar. Die Oberfläche des Epitops wurde nach der Zytokinfärbung so verändert, dass eine Bindung des Antikörpers nicht mehr möglich war, daher musste ein zusätzlicher Färbeschritt eingefügt werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten: Nach dem Ernten der Zellen färbten wir das Oberflächenepitop CD4 für 15 min und schlossen den Fixierungsschritt mit PFA nach einmaligen Waschen mit PBS an. Dadurch wurde ein identisches Ergebnisse ermöglicht (Abbildung 5.10).

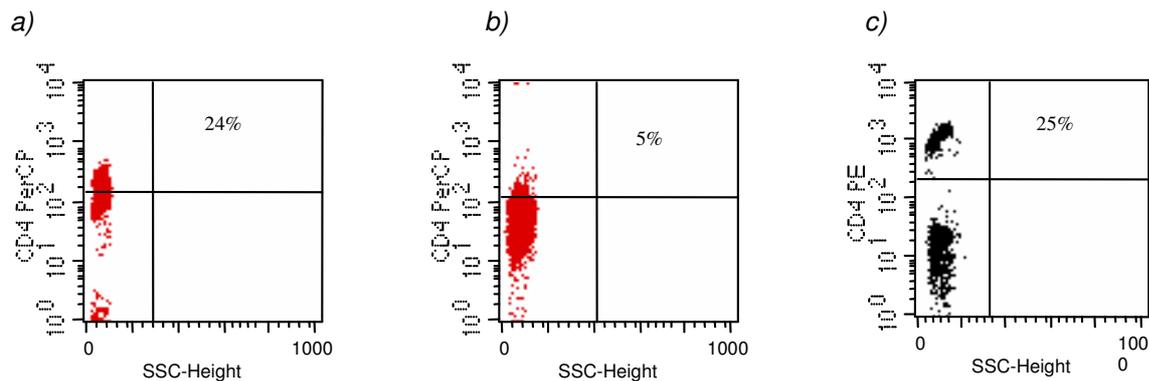


Abbildung 5.10 - CD4: a) beim Färben des Oberflächenepitopes vor Fixierung b) bei normaler Zytokinfärbung c) beim Immunstatus

Im nächsten Schritt verglichen wir Zytokinfärbungen im peripheren, heparinisierten Vollblut mit PBMC (Isolierung durch Ficoll). Dort erhielten wir ebenfalls vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 5.11).

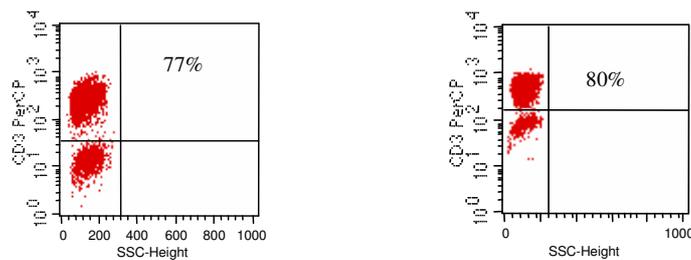


Abbildung 5.11 CD3 mit Heparinvollblut

CD3 mit PBMC

5.2.5 Verschiedene Stimulanzen

Nachdem gezeigt wurde, dass das Zytokinsignal, welches im FACS gemessen wird, spezifisch ist und intrazelluläres Zytokin nachweist, untersuchten wir zwei verschiedene Stimulanzen im Bezug auf ihre Induktion der intrazellulären Zytokinexpression in T-Zellen. Wir testeten das Superantigen SEB (staphylococcal enterotoxin B) und die Kombination aus PMA, Ionomycin und Brefeldin (PIB).

Superantigene verbinden ein HLA-Molekül der Klasse II und das CD4 Epitop auf T-Zellen außerhalb der Bindungsstelle für konventionell prozessierte Antigene und stimulieren T-Zellen polyklonal. Die Zytokinproduktion war generell niedriger bei SEB, zeigt aber ähnliche Tendenzen im Verlauf wie PIB (siehe Abbildung 5.13). Nach 24-stündiger Stimulation konnte im Mittel mit SEB 1% der T-Zellen zur $\text{IFN}\gamma$ -Produktion angeregt werden, während bei PIB 27% der T-Zellen $\text{IFN}\gamma$ sezernierten (Abbildung 5.14). Wir färbten SEB immer parallel zu PIB als Kontrolle mit, die folgenden Ergebnisse und Werte werden sich jedoch ausschließlich auf Stimulation mit PIB beziehen.

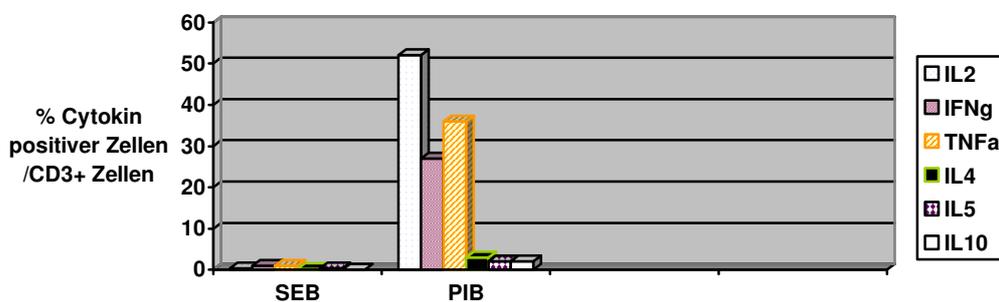


Abbildung 5.12 Darstellung der Zytokinexpression in T-Zellen (Mediane) unter verschiedenen Stimulationen. Während das Superantigen SEB kaum eine Zytokinproduktion induziert, waren nach PIB-Stimulation (PMA, Ionomycin, Brefeldin) bis zu 52% der T-Zellen positiv für IL2, 28% für $\text{IFN}\gamma$ und 36% für $\text{TNF}\alpha$ ($n=20$; Daten eines repräsentativen Experimentes). Alle Experimente zur Etablierung der intrazellulären Zytokinmessung wurden mit mindestens 10 verschiedenen gesunden Kontrollansätzen durchgeführt, wenn nicht anders dargestellt.

5.2.6 Stimulationszeit / Kinetik der Zytokine

Um eine möglichst günstige Zeitspanne der Stimulation in Zellkultur zu finden, führten wir eine Kinetik durch.

IL2 war in T-Zellen frühestens nach 2 Stunden nachweisbar, allerdings auf einem sehr geringen Level. Die Produktion stieg dann steil an auf im Mittel 51,3% nach 5h. Die Produktion war danach bis zu 24h konstant. Das Zytokin $\text{TNF}\alpha$ hatte bei 8stündiger Stimulation seinen Höhepunkt, die Produktion war danach auf leicht niedrigem Niveau ebenfalls bis zu 24h konstant. $\text{IFN}\gamma$ ließ sich erstmalig nach 2h nachweisen. Die Produktion stieg bis zu 5h an (ca. 33%). Nach 24 Stunden war der Abfall der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion zu vernachlässigen, während man nach zwei beziehungsweise dreitägiger Stimulation jeweils einen Abfall um 50% detektierte. Das Maximum von IL4 lag bei 5h (ca. 1%). Nach 20h Stimulation produzierten nur

noch etwa 0,7% der T-Zellen IL4. Diese Produktion war dann aber bis zu 48 Stunden konstant.

IL5 und IL10 schienen bis zu 24h Stimulation konstant exprimiert zu werden. Erst nach zwei Tagen war ein Abfall zu detektieren.

Wir entschieden uns für eine 20 h Stimulation, da in diesem Bereich die Zytokin-Expression in einem konstanten Bereich zu liegen scheint und wir somit vergleichbare Ergebnisse erzielen, ohne durch geringe Zeitverschiebungen in der Stimulationsdauer die „sensible Phase“ eines Zytokins zu detektieren (n=5, Daten nicht dargestellt).

5.2.7 Zytokine im FACS und ELISA

Die Zytokinproduktion wurde zusätzlich bei den Patienten im unstimulierten Serum mittels ELISA bestimmt. Da wir zur ELISA-Bestimmung unstimulierte Proben maßen, war keine strenge Korrelation zwischen den ELISA- und den stimulierten FACS-Daten zu erwarten. Hinzu kam, dass wir uns bei der Analyse der FACS-Daten auf die Zytokinproduktion durch T-Zellen beschränkten, daher keine Aussage zur Zytokinproduktion von Makrophagen, Monozyten usw. machen können. Diese Differenzierung war bei den durch ELISA erhobenen Daten nicht möglich, da beispielsweise IFN γ - und IL4-Produktion hauptsächlich in T-Zellen stattfindet, allerdings auch NK-Zellen IFN γ und Mastzellen IL4 produzieren. Die aus dem Überstand gemessenen Zytokindaten geben keine Auskunft über die produzierende Zellart. Aus gesunden Kontrollkollektiven (siehe 5.2.10) wissen wir jedoch, dass Th2-Zytokine in deutlich geringerem Maß in T-Zellen exprimiert werden als Th1-Zytokine.

5.2.8 Simultanfärbung von Zytokine in T-Zellen

In der Vierfarben-Durchflußzytometrie besteht beim Färben nur eines Oberflächenepitops die Möglichkeit, bis zu drei Zytokine in einer Zelle simultan darzustellen. Diese Methode ist besonders reizvoll, um die These zu überprüfen, ob typische Th1 und Th2 Zytokine in separaten Zellen produziert werden und um eventuelle typische Th1 und Th2-Zellen direkt über ihre intrazelluläre Zytokinproduktion darzustellen. Dies ist deshalb interessant, da das Th1/Th2-Modell ursprünglich mit Daten aus dem Mausmodell entwickelt wurde, bei menschlichen Zellen allerdings keine Einigkeit darüber besteht, ob es tatsächlich in vivo, wie bei T-Zell-Klonen gefunden, typische Th1 und Th2 Zellen gibt oder ob unterschiedliche

Zellen miteinander zu einer polarisierten Th1- bzw. Th2-Antwort führen. Nicht zuletzt kann ein klares Th1/Th2-Ungleichgewicht Rückschlüsse auf eine inadäquate Immunantwort zulassen.

5.2.9 Zytokin-Gating

Nach dem Setzen eines Lymphozytengates im FSC- gegen SSC-Diagramm wurde auf CD3⁺ Zellen gated, um T-Zellen zu identifizieren, CD4 und CD8 Marker wurden benutzt, um die Subgruppen der T-Zellen zu identifizieren. CD3⁺Zellen wurden 100% gleich gesetzt. Zusätzlich wurden Lymphozyten mit den Markern CD45RA und CD45RO gefärbt. Um die CD3⁺CD45RA⁺/RO⁺ bzw. CD4⁺CD45RA⁺/RO⁺ wurde eine Region gesetzt, so dass man die Expressionen von Zytokinen den Gedächtnis-beziehungsweise den naiven T-Zellen eindeutig zuordnen konnte.

5.2.10 Zytokinproduktion und Simultanfärbung im stimulierten Blut bei gesunden Kindern

Um die Zytokinwerte der Leukämiepatienten sinnvoll auswerten zu können, erstellten wir eine große Kontrollgruppe mit gesunden Kindern (n=111). Da davon auszugehen ist, dass die Immunfunktion im Laufe der Kindheit Veränderungen unterliegt, etablierten wir Normalwerte der Zytokinexpression nach PIB-Stimulation in unterschiedlichen Altersklassen. Hierfür untersuchten wir Nabelschnurblut von 22 gesunden Reifgeborenen (11 Mädchen, 11 Jungen), Blut von 20 gesunden Kindern, die jünger als zwei Jahre (Median 1,3 Jahre, 8 Mädchen, 12 Jungen) waren, 25 zwischen 2 und 6 Jahren (Median 4,1Jahre, 10 Mädchen, 15 Jungen), 21 Kinder zwischen 6 und 12 (Median 8,1 Jahre, 7 Mädchen, 14 Jungen) und 23 Kinder älter als 12 Jahre (Median 14 Jahre,11 Mädchen, 12 Jungen). Die Zytokinexpression von T-Zellen aufgeführt nach Alter können der Tabelle 5.2 entnommen werden.

IL2 wurde in allen Altersgruppen überwiegend von CD4⁺ Zellen exprimiert, während IFN γ hauptsächlich von CD8⁺ Gedächtniszellen gebildet wurde. Die Gesamtzahl an Gedächtniszellen stieg mit höherem Lebensalter. Die Parallelfärbung zweier Th1-Zytokine in einer Zelle nahm mit zunehmendem Alter zu (Nabelschnurblut: 1 \pm 1%, 2-6 Jahre: 4 \pm 3%, >12Jahre: 9 \pm 2%), während Th1/Th2-Simultanfärbung einer T-Zelle mit Werten um 0,3% in allen Altersgruppen konstant niedrig war. Insgesamt war besonders bei den Th1-Zellen eine starke Zunahme der Zytokin-Expression in T-Zellen mit steigendem Lebensalter zu verzeichnen (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3- Veränderung der Zytokinexpression von T-Zellen in unterschiedlichen Lebensaltern.

% positive Zytokinexpression in CD3⁺ Zellen	IL2	IFNγ	TNFα	IL4	Ki67	TGFβ
<i>Nabelschnurblut</i>	21 \pm 5	4 \pm 1	7 \pm 3	0,2 \pm 0,8	3 \pm 2	2 \pm 1
<i><2y/o</i>	24 \pm 8	14 \pm 10	15 \pm 6	0,6 \pm 1	2 \pm 2	3 \pm 4
<i>2-6y/o</i>	33 \pm 7	14 \pm 5	21 \pm 5	1 \pm 1	2 \pm 3	3 \pm 2
<i>6-12y/o</i>	40 \pm 8	22 \pm 7	27 \pm 9	1 \pm 0,6	1 \pm 1	1 \pm 1
<i>>12y/o</i>	44 \pm 7	24 \pm 6	32 \pm 6	1 \pm 1	3 \pm 1	1 \pm 5

5.2.11 Intrazelluläre Zytokinproduktion im peripheren Blut von pädiatrischen Leukämie-Patienten

5.2.11.1 Interleukin 2 (IL2):

Zum Zeitpunkt der Diagnose produzierten 36,5%±6% der T-Zellen IL2, wobei 33±7% der CD4⁺Zellen IL2 produzierten im Vergleich zu nur 4±2% CD8⁺Zellen. Bei einem CD4:CD8-Verhältnis von etwa 2:1 wird deutlich, dass fast das gesamte IL2 von T-Helferzellen produziert wurde. IL2 wurde etwa zu gleichen Teile von Gedächtnis- und naiven Zellen produziert. Der Anteil der IL2-Expression liegt im hochnormalen Bereich der Zytokinexpression dieser Altersgruppe.

Im Verlauf der Therapie bis Tag+15 nahm die Zytokinproduktion stark ab (d15: 24% der CD3⁺Zellen), mit Erholung des Blutbildes stieg jedoch der Anteil IL2-bildender T-Zellen wieder an und blieb über die gesamte weitere Therapie (Tabelle 5.4) konstant (Tag+33: 29%; Tag+64: 40%; ProtM: 33). Das Verhältnis CD4⁺ zu CD8⁺ IL2-produzierenden Zellen verschob sich leicht zu Gunsten der zytotoxischen T-Zellen (vor Prot M: CD4: 24±5% versus CD8: 5±3%). Während der Therapie zeigten weniger CD45RA⁺Zellen ein positives Signal als CD45RO⁺Zellen (Verhältnis 1:2). Die Anzahl der naiven T-Zellen korreliert signifikant mit dem Anteil der IL2-produzierenden T-Helferzellen (p<0,01).

Tabelle 5.4 – IL2-Expression unter ALL-Therapie. Abnahme der IL2-Produktion durch naive Zellen, während der Therapie. Die Höhe der IL2-Expression ist abhängig von der Anzahl der CD4⁺Zellen.

IL2⁺ in %	CD3⁺	CD3⁺CD45RA⁺	CD3⁺CD45RO⁺
<i>Diagnose</i>	37±6	41±11	50±13
<i>D15</i>	25±8	20±11	30±14
<i>D33</i>	29±5	28±7	66±8
<i>Vor Prot M</i>	33±6	22±6	51±7
<i>Dauertherapie</i>	16±8	12±5	30±9

5.2.11.2 Interferon Gamma (IFN γ):

Bei Diagnosestellung ist ein positives IFN γ -Signal in 13 \pm 9% der T-Zellen zu detektieren. Weniger T-Zellen produzieren also IFN γ als IL2. Dabei liegt die durchschnittliche IFN γ -Produktion im altersentsprechenden Referenzbereich (siehe Tabelle 5.4). IFN γ nimmt ebenfalls bis Tag+15 ab auf 8%, steigt im weiteren Therapieverlauf jedoch stark an: Tag+33:19%, vor Prot M: 21%, vor Prot 2 auf 37% und in der Dauertherapie liegt es bei 24% (Tabelle 5.5). Interessanterweise wird mehr IFN γ von CD4⁺ Zellen produziert als von CD8⁺Zellen, was im Gegensatz zu den Ergebnissen der gesunden Kontrollgruppe steht. Dennoch korreliert die IFN γ -Produktion der zytotoxischen Zellen positiv mit der CD8⁺-Gesamtanzahl ($p < 0,002$, $r = 0,72$). Das Verhältnis von CD4 zu CD8 liegt während der ganzen Therapie sowohl absolut als auch relativ etwa bei 2:1. Ergänzend hierzu ist zu sagen, dass IFN γ fast ausschließlich von T-Zellen produziert wird und eine Korrelation mit der Anzahl der T-Zellen/ μ l daher nahe liegt. Besonders eindrücklich war die Korrelation der IFN γ -Expression mit der Anzahl $\gamma\delta^+$ -T-Zellen: Die Expression von IFN γ in CD3, CD4, CD8, Gedächtnis- und naiven Zellen korrelierte hoch signifikant mit TCR $\gamma\delta$ ($p < 0,001$). Ähnliche Ergebnisse erzielten wir auch bei der TNF α -Bestimmung bezogen auf CD3, CD4 und CD8.

Bei den untersuchten Leukämiepatienten produzieren wie erwartet vor allem Gedächtnis-T-Zellen IFN γ . Von Diagnose bis zum Protokoll M ist der Anteil IFN γ produzierenden CD45RO⁺Zellen 6mal höher als der der CD45RA⁺Zellen. Es verwundert daher nicht, dass man eine signifikante Beziehung zwischen CD45RO/ μ l und IFN γ -Produktion findet ($p < 0,0001$, Abbildung 5.13).

Ergebnisse

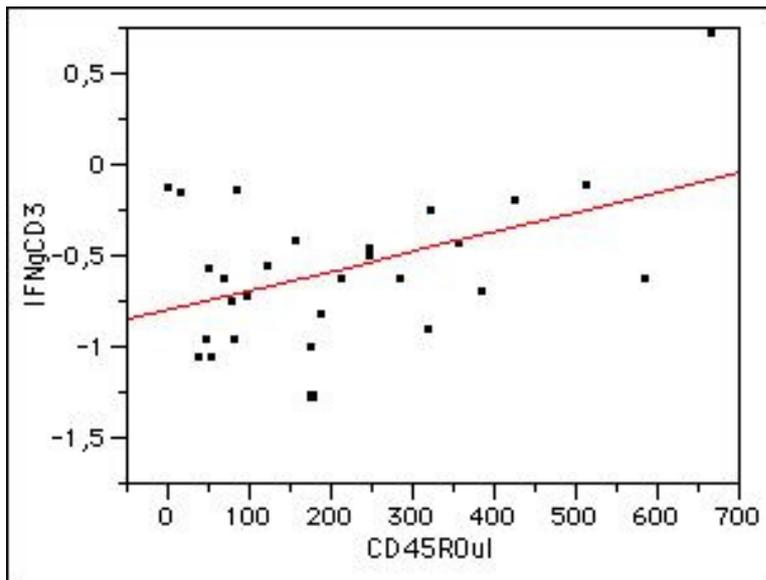


Abbildung 5.13 - CD45RO/ μ l versus CD3IFN γ : Je mehr Gedächtnis-Zellen vorhanden waren, desto mehr IFN γ ließ sich detektieren. Da IFN γ vor allem von Gedächtnis-Zellen exprimiert wird, ist diese Korrelation gut nachweisbar. Bei steigender CD45RO-Anzahl während der Therapie, steigt somit auch die Expression von IFN γ . $P < 0,0001$; $R^2 = 0,18$

Um die Ergebnisse besser verifizieren zu können, wurde bei jeder Probe neben der Maximalstimulation mit PIB auch ein Stimulationsansatz mit SEB durchgeführt. Hier zeigten sich die gleichen Tendenzen auf sehr viel niedrigeren Expressionsniveau (Abb. 5.14).

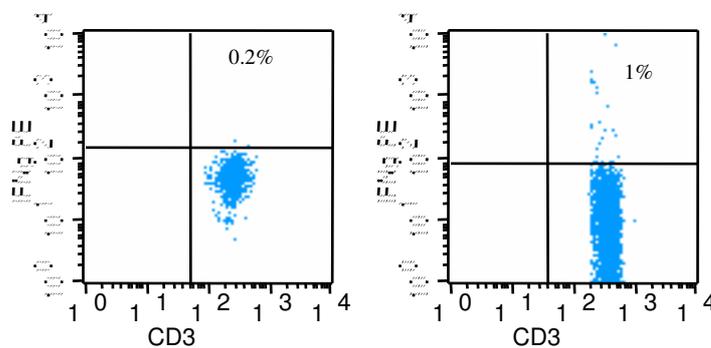


Abbildung 5.14 - Die Stimulierung der Zellen durch SEB zeigt die gleichen Tendenzen wie PIB, hier exemplarisch Diagnose(links) und vor Prot M(rechts)

Signifikante Unterschiede in der Zytokinexpression ließen sich zwischen den beiden initialen, randomisierten Therapiegruppen (Dexamethason versus Prednison) feststellen, die über die Initialtherapie hinaus nachweisbar waren. Insgesamt produzierten die Kinder mit Dexamethason weniger Zytokine, besonders ausgeprägt war dieser Befund bei der Expression von CD3⁺IFN γ -Zellen (Abbildung 5.15).

Eingrenzend hierzu ist zu sagen, dass das mediane Alter im Dexamethason-Zweig deutlich jünger war als im Prednisonzweig (siehe hierzu Kapitel 2). Während bei Diagnosestellung keine signifikanten Unterschiede zu detektieren sind, unterschreitet jedoch die Interferon-gamma-Produktion im Dexamethasonzweig im weiteren Therapieverlauf deutlich die alterstypische Norm.

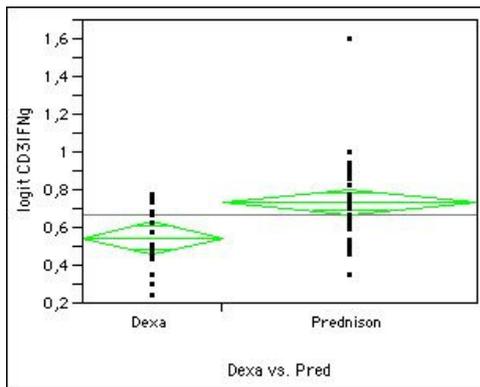


Abbildung 5.15 - t-Test: T-Zellen von behandelten Patienten im Prednisonzweig exprimieren signifikant mehr $IFN\gamma$ ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.16$)

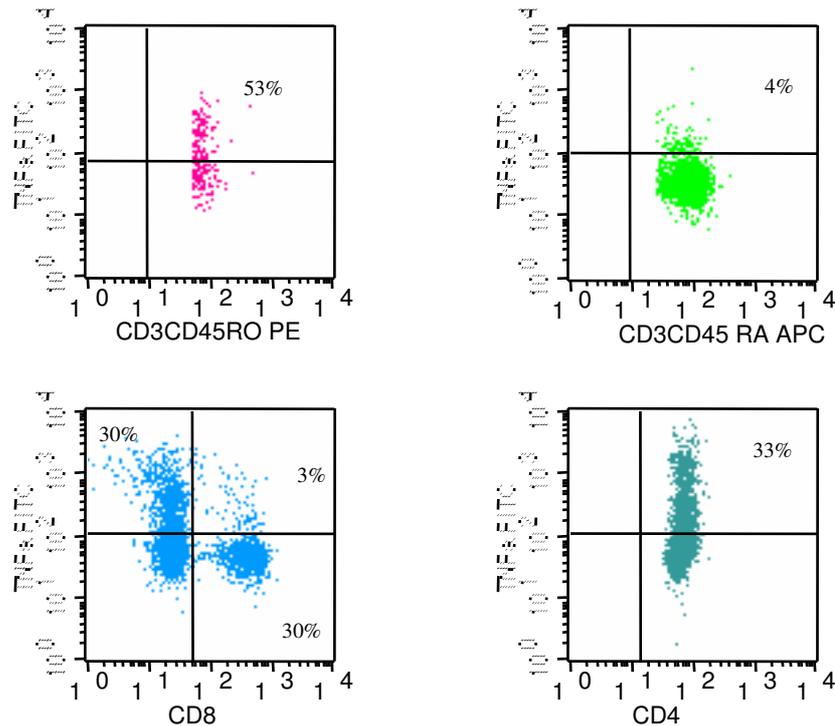
5.2.11.3 Tumornekrosefaktor Alpha ($TNF\alpha$):

Die $TNF\alpha$ -Produktion blieb während der gesamten Therapie relativ konstant. Bei Diagnose hatten im Median $34 \pm 10\%$ der $CD3^+$ -Zellen $TNF\alpha$ -Epitope. Bis Tag 15 war ein leichter Abfall auf durchschnittlich 18% zu verzeichnen. Im weiteren Therapieverlauf blieben die Werte konstant um 22% (Tabelle 5.5). Damit liegt die $TNF\alpha$ -Expression unter der altersentsprechenden Norm. $TNF\alpha$ wurde erwartungsgemäß vor allem von $CD4^+$ -Zellen gebildet. ($CD4$ versus $CD8$: Diagnose: $50 \pm 12\%$ vs. $6 \pm 6\%$; Tag+15: $8 \pm 1\%$ vs. $3 \pm 3\%$; Tag+33: $14 \pm 6\%$ vs. $4 \pm 2\%$; ProtM: $21 \pm 4\%$ vs. $5 \pm 4\%$; Dauertherapie: $21 \pm 11\%$ versus $4 \pm 3\%$)

Tabelle 5.5 - Mediane der Interferon gamma- und Tumornekrosefaktor alpha- Werte unter Leukämietherapie

% / <i>CD3⁺-Zellen</i>	Diagnose	d15	d33	ProtM	Dauertherapie	Norm-Bereich
<i>IFNγ</i>	13 ± 9	8 ± 7	19 ± 5	21 ± 5	24 ± 3	22 ± 7
<i>TNFα</i>	34 ± 10	18 ± 6	21 ± 6	22 ± 5	21 ± 10	27 ± 9

Bei $TNF\alpha$ -Expression zeigte sich noch ausgeprägter als bei $IFN\gamma$ eine Dominanz der Gedächtnis-Zellen. Bei Diagnose betrug der Anteil von $CD45RO^+$ -Zellen $64 \pm 15\%$ (vs. $7 \pm 11\%$ $CD45RA^+$), und zum Zeitpunkt Protokoll M $30 \pm 5\%$ (vs. $4 \pm 2\%$). Das entspricht etwa einem Verhältnis 8:1. Es lässt sich keine signifikante Korrelation von $TNF\alpha$ -Produktion und $CD45RO$ -Expimierung nachweisen (Abbildung 5.16).



5.2.11.4 Th2-Zytokine : IL4, IL5, IL10

TH2-Zytokine werden nur von sehr wenigen T-Zellen produziert, was eine exakte Auswertung besonders bei den Th2-Zytokin-Simultanfärbungen erschwert.

Bei Diagnose produzierten $1 \pm 0,5\%$ aller T-Zellen IL4, $0,6 \pm 0,5$ IL5 und nur $0,5 \pm 0,5\%$ IL10. Während der Therapie zeigten alle drei Th2-Zytokine die Tendenz zu sinken. Auch über Protokoll M hinaus werden nicht mehr die Ausgangswerte erreicht. Ähnlich wie bei den Th1-Zytokinen zeigen sich leichte Schwankungen parallel zur Therapie.

Tabelle 5.6 - Th2-Zytokine unter Therapie. Die Aussagekraft der Th2-Zytokinexpression ist aufgrund der geringen Produktion dieser Zytokine von T-Zellen limitiert

Th2-Zytokine(%) / CD3⁺-Zellen	Diagnose	Tag+15	Tag+33	ProtM	Dauertherapie
<i>IL4</i>	$1 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,3$
<i>IL5</i>	$0,6 \pm 0,5$	$0,7 \pm 1$	$0,5 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,5$
<i>IL10</i>	$0,5 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,7$	$0,1 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,8$

Alle Th2-Zytokine wurden hauptsächlich von T-Helferzellen gebildet. IL10 wurde bevorzugt von Gedächtniszellen (CD45RO⁺) produziert, zur IL5-Produktion trugen Gedächtnis- und naive Zellen gleichermaßen bei, IL4 schließlich wurde bevorzugt von naiven Zellen exprimiert.

5.2.11.5 Simultanfärbung von intrazellulären Zytokinen bei Leukämiepatienten

Durch die simultanen Färbungen der Zytokine hatten wir die Möglichkeiten, die Zytokine genauer zu klassifizieren. Insbesondere interessierte uns, ob sich die Zytokine den klassischen Th1- und Th2-Profilen zuordnen ließen (siehe Kapitel 1.4). Zwischen 4% und 8% der Zellen produzieren simultan $\text{IFN}\gamma$ und IL2. Das entspricht einem normalen Th1-Profil (Abbildung 5.17).

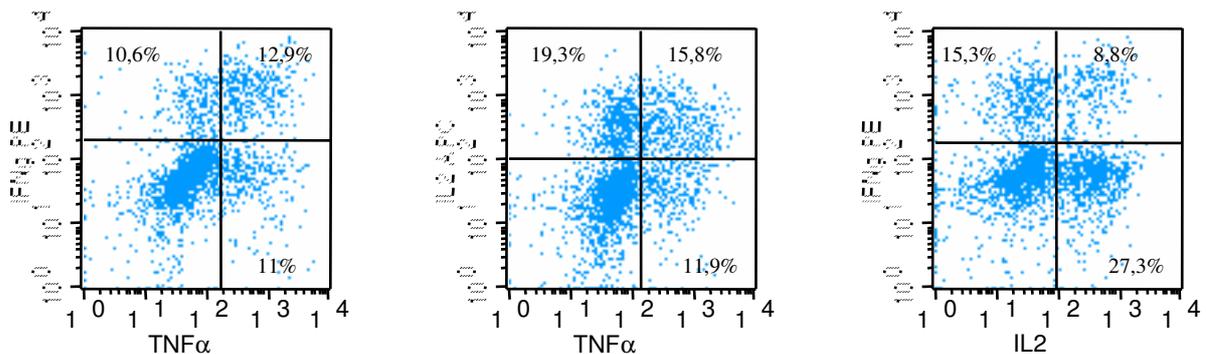


Abbildung 5.17 Simultanfärbungen von Th1-Zytokinen

Dieser Anteil steigt im Verlauf der Therapie. Einige T-Zellen produzierten ausschließlich $\text{IFN}\gamma$ (etwa 10%) wahrscheinlich CD8^+ Zellen, andere nur IL2, vermutlich CD4^+ Zellen (Th0).

Knapp die Hälfte der $\text{TNF}\alpha^+$ -Zellen exprimieren simultan $\text{IFN}\gamma$. Dieser Teil setzt sich wahrscheinlich sowohl aus zytotoxischen als auch aus Helferzellen zusammen. Da $\text{TNF}\alpha$ von mehr CD8^+ Zellen exprimiert wird als IL2, finden sich hier mehr doppelt positive Zellen als bei $\text{IFN}\gamma/\text{IL2}$ und ein leicht geringerer Anteil an einfach positiven $\text{IFN}\gamma$ produzierenden Zellen. Auch hier ist die Tendenz doppelt positiver $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ -Zellen im Therapieverlauf steigend.

Der doppelt positive Prozentsatz ist bei $\text{TNF}\alpha^+$ - und IL2^+ -Zellen etwas höher als bei $\text{IL2}^+/\text{IFN}\gamma^+$ -Zellen. IL2 einfach positive Zellen waren etwas häufiger als $\text{IL2}^+/\text{TNF}\alpha^+$ Zellen. Hauptsächlich Helferzellen (CD4) exprimieren gleichzeitig mehrere Zytokine, einfach positive Zellen für IL2^+ sind vor allem naive CD4^+ T-Zellen, während es sich bei $\text{TNF}\alpha$ hauptsächlich um CD8^+ Zellen handelt. Die Doppelsexpression dieser beiden Zytokine ist besonders bei CD4^+ Zellen nachweisbar. Im Verlauf der Therapie verschiebt sich das CD4-CD8 -Verhältnis in Richtung der zytotoxischen CD8^+ Zellen. Dadurch ist das Absinken dieser doppelt positiven Zytokine parallel zur CD4-CD8 -Ratio im Therapieverlauf zu erklären. Die einfach positive IL2^+ -Fraktion nimmt umgekehrt proportional zur Reduktion der Doppelsexpression besonders nach Tag+15 (siehe oben) zu.

Ferner wurden die Th1- und Th2-Zytokine simultan gefärbt. Bei einer klaren Th1/Th2 Dichotomie auf zellulärer Ebene würde man prinzipiell keine gleichzeitige Färbung dieser Zytokine in einer Zelle erwarten. Bei der Parallelfärbung fiel jedoch auf, dass bei IL4 jeweils eine geringe, doppelt positive Population (0,5 -1,5%) mit Th1-Zytokinen (IL2, IFN γ , TNF α) zu detektieren war (siehe Abb 5.18A) . Diese Population blieb während der gesamten Therapie konstant und spricht gegen eine stringente Th1&Th2-Dichotomie-These im humanen System.

Die einfach positive Th1-Expression auf T-Zellen überwog deutlich der doppelt positiven Population. Bei IL10+ und IL5+Zellen konnte bei den meisten Patienten keine Doppelexpression mit Th1-Zytokinen nachgewiesen werden (Abbildungen 5.18).

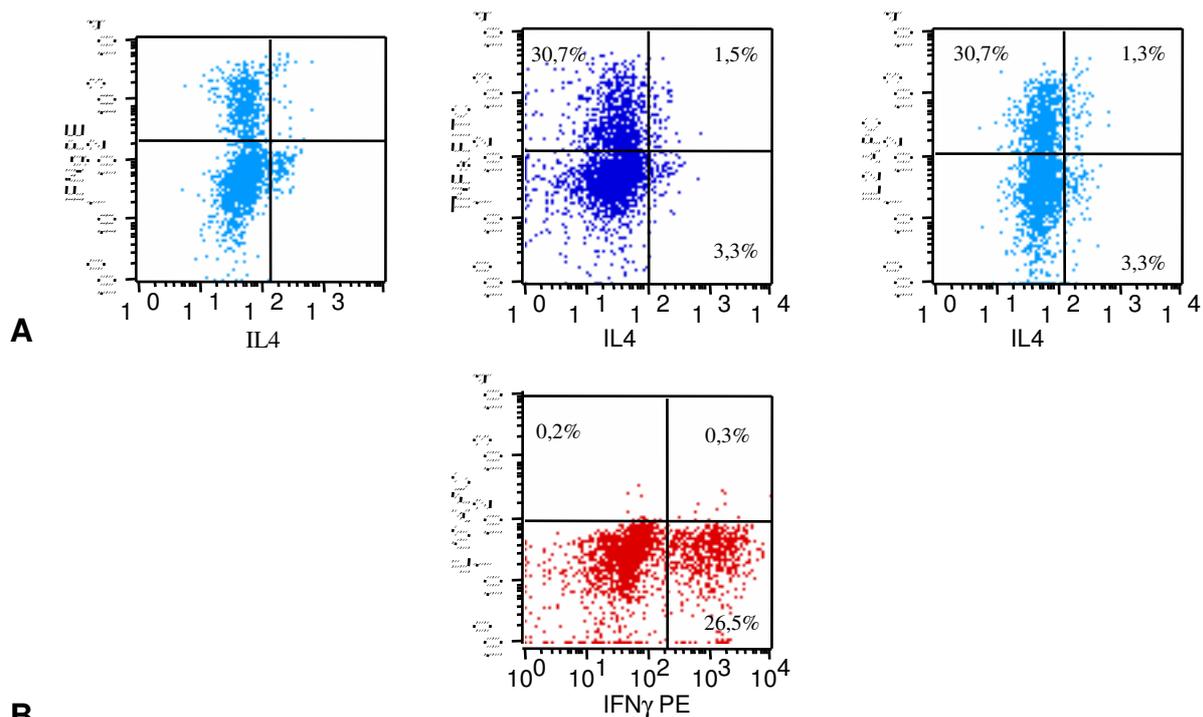


Abbildung 5.18 – Simultanfärbungen der Th1/Th2-Zytokine

A- Interleukin-4 gegen IFN γ , TNF α und IL2

B- Die doppelt positive Expression zwischen IL10 und IFN γ minimal ist.

Des Weiteren wurden Zellen für typische Th2-Zytokine auf ihre Doppelexpression überprüft. Die Parallelfärbung von IL4/IL5 ergab, dass etwa ein Drittel doppelt positiv war, während der übrige Anteil von unterschiedlichen Zellen produziert wurde. Die doppelt positive Population entspricht einem klassischen Th2-Profil (Abbildung 5.19).

Ergebnisse

Zusätzlich wurden IL5 und IL10 untersucht. Es gibt Zellen, die entweder nur IL5 oder nur IL10 produzierten. Doppelt positive Populationen kamen nur vereinzelt vor. Insgesamt zeigten alle Th2-Zytokine geringere Werte zum Zeitpunkt Protokoll M als bei Diagnosestellung.

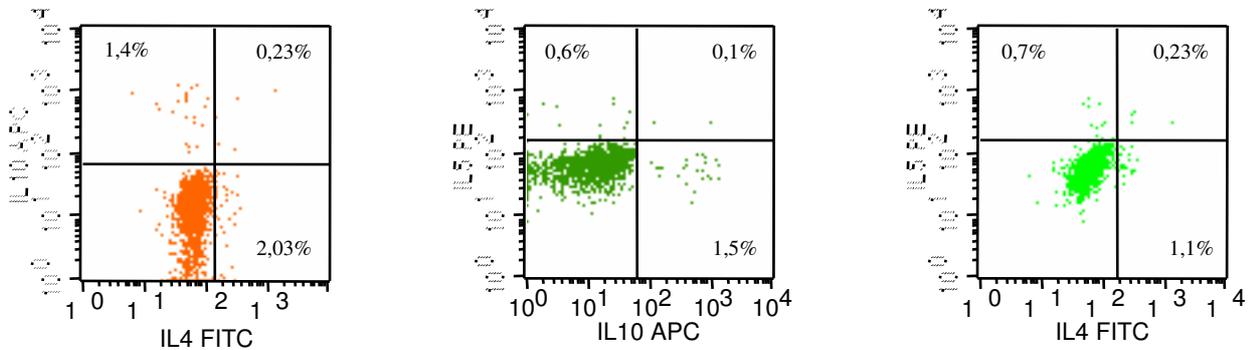


Abbildung 5.19 - Th2-Costaining eines Patienten unter Leukämietherapie an Tag+33

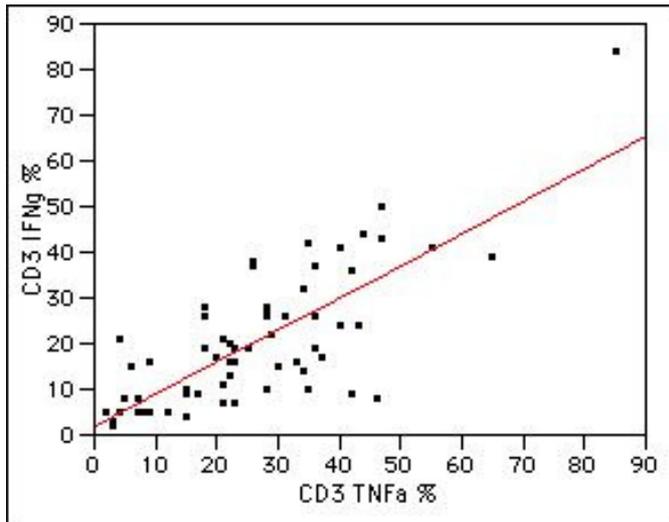
5.2.11.6 Verlauf der verschiedenen Zytokingruppen

Im Verlauf der Therapie konnten wir feststellen, dass IL2 und TNF α bis auf die therapieintensitätsbedingten Schwankungen in relativ konstanten Mengen produziert wurden, während sich die IFN γ -Produktion nach anfänglichem Abfall verdoppelte. Die Th2-Zytokine waren alle bis Protokoll M verglichen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erniedrigt. Insgesamt zeigte sich daher eine Verschiebung zugunsten der Th1-Zytokine.

Der größte Anteil der Zytokine wurde von CD4⁺T-Helferzellen produziert. Die Zytokin-Expression durch CD8⁺ Zellen war im Vergleich zu den CD4⁺T-Helferzellen bei allen sechs Zytokinen gering.

Im Kostaining wurde neben den klassischen Th1- und Th2-Profilen, auch naive Th0-Zellen detektiert. Ihr Anteil war während der Therapie konstant (Daten nicht dargestellt).

Alle Th1-Zytokine korrelierten untereinander; wurde beispielsweise IL2 sehr hoch exprimiert, so waren im Regelfall auch verhältnismäßig hohe Werte für IFN γ und TNF α zu detektieren (Abbildung 5.20).



5.2.11.7 Th1-Zytokinexpressionen steigen bei Infektionen

Bei Kindern, die während der Induktionstherapie Fieber in der Neutropenie entwickelten, ließen sich etwas zeitversetzt höhere Th1-Werte feststellen, als bei Kindern, die in dieser Zeit keine Infektion hatten ($p < 0,05$). Die Th2-Zytokine blieben konstant oder stiegen nur schwach an. Besonders IFN γ reagierte mit einem starken Anstieg.

5.2.12 Zytokin-ELISA im unstimulierten Serum von Leukämie-Patienten

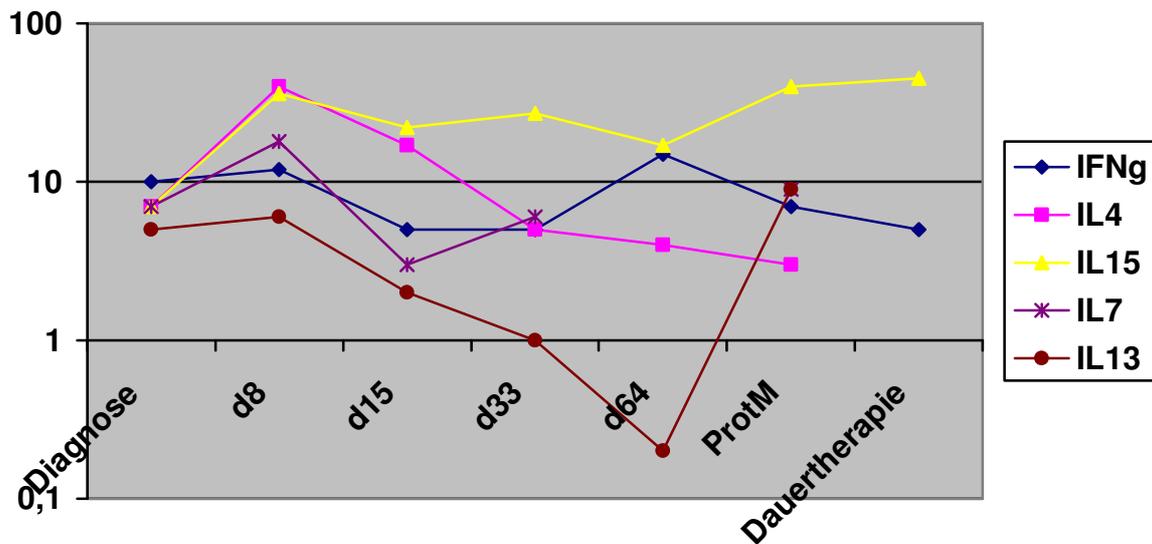


Abbildung 5.21 – Mediane der Zytokin-ELISA in pg/ml im Therapieverlauf (n=23 pro Zeitpunkt)

5.2.12.1 Interferon Gamma (IFN γ):

Die IFN γ -Produktion im FACS zeigte eine Korrelation zu den gemessenen Werten im ELISA ($p < 0,05$). IFN γ wird hauptsächlich von T-Zellen produziert und nur zu geringen Anteilen von NK-Zellen, so dass die Expressionsveränderungen im Therapieverlauf weitgehend übereinstimmen mit der T-Zell-Expression in der Durchflußzytometrie (Tabelle 5.7). Allerdings arbeiteten wir mit unstimuliertem Serum, so dass die nachzuweisende Menge an IFN γ sehr gering war. Außerdem korrelieren die IFN γ -Werte negativ mit IL7-Serumwerten ($p < 0,006$; siehe Abbildung 5.23).

5.2.12.2 Interleukin 4 (IL4):

Da die Produktion von IL4 in T-Zellen keine Korrelation mit der Konzentration von IL4 im unstimulierten Serum aufweist, kann man davon ausgehen, dass wahrscheinlich andere Zellen maßgeblich zur gemessenen IL4-Produktion beigetragen haben, zum Beispiel aus Mastzellen. Daraus lässt sich unter anderem ableiten, daß Th1-Zytokine in deutlich höherem Ausmaß von T-Zellen exprimiert werden als Th2-Zytokine. Dies ist deutlich den Konzentrationskurven abzulesen, bei denen IL4 um ein Vielfaches höher im Serum zu finden ist als bei der intrazellulären Detektion durch FACS-Analysen. Insgesamt zeigt sich ebenso wie bei den FACS-Daten eine Reduktion der Gesamtkonzentration im Verlauf der Therapie (Tabelle 5.7).

5.2.12.3 Interleukin 15 (IL15):

IL-15 wird sowohl von T-Zellen als auch von Monozyten, NK-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert. Es bewirkt eine IL2-ähnliche Immunantwort. IL15 zeigte initial einen Anstieg, gefolgt von einem wellenförmigen Verlauf mit drei Peaks am d8, d33 und vor Prot M. Eine Zunahme der Konzentration ist mit fortschreitender Therapie zu verzeichnen (Tabelle 5.7). Eine Korrelation zwischen IL15 und NK-Zellen/ μl ($p < 0,04$, $r^2 = 0,05$) konnte ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

5.2.12.4 Transforming Growth Factor Beta (TGF β):

TGF β wird von Chondrozyten, Monozyten und T-Zellen produziert. Es gilt als Tumorsuppressor-Molekül und als Immunregulator der Th1-Antwort. Es waren sehr hohe Werte während der gesamten Initial-Therapie, mit Ausnahme von d64, zu detektieren (Tabelle 5.7).

Tabelle 5.7 Zytokinwerte gemessen im unstimulierten Serum mittels ELISA zu definierten Therapiezeitpunkten

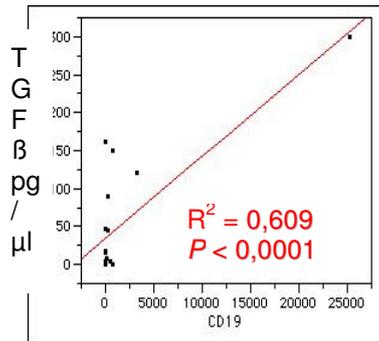
<i>pg/ml</i>	Diagnose	d8	d15	d33	d64	ProtM	Dauertherapie
<i>IFNγ</i>	10	12	5	5	15	7	5
<i>IL4</i>	7	40	17	5	4	3	0
<i>IL15</i>	7	36	22	27	17	39,5	45
<i>TGFβ</i>	180	120	101	116	20,9	43	50

TGF β korrelierte sowohl mit der Gesamtzahl der Leukozyten ($p < 0,008$) als auch mit der Zahl der normalen B-Zellen sowie der Zahl der Blasten ($p < 0,003$). Vor allem in den ersten Tagen nach und bei Diagnosestellung ist die Korrelation hoch signifikant ($p < 0,001$), so dass Blasten TGF β zu exprimieren scheinen. Intrazelluläre Bestimmungen und ein Nachweis von TGF β auf zellulärer Ebene zur Überprüfung dieser These sind als Folgeprojekte geplant. Exemplarisch konnten wir jedoch schon bei drei Patienten mittels FACS-Analyse zeigen, dass $>90\%$ der Blasten TGF β exprimierten (Abbildung 5.22).

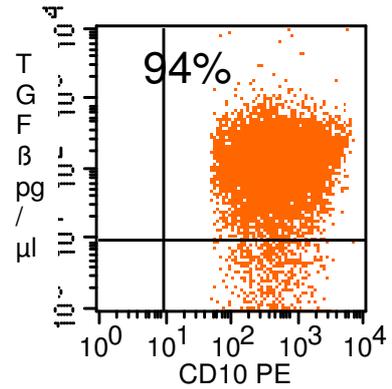
Abbildung 5.22 - TGFbeta-Expression:

A- ELISA-Daten korrelieren positiv mit der Anzahl der Blasten im peripheren Blut

B- FACS-Analyse 94% der Blasten produzieren TGFbeta



A CD19/CD10⁺ Blasten /μl



B CD19/CD10⁺ Blasten /μl

5.2.12.5 Interleukin 7 (IL7):

IL7 zeigt zwei kleine Peaks an Tag+8 und Tag+33, danach fallen die Serumspiegel auf kaum mehr detektierbare Werte (Abbildung 5.21). Eine positive Korrelation bestand zwischen CD4+45RA+T-Zellen und IL7-Serumleveln (Abbildung 5.23B).

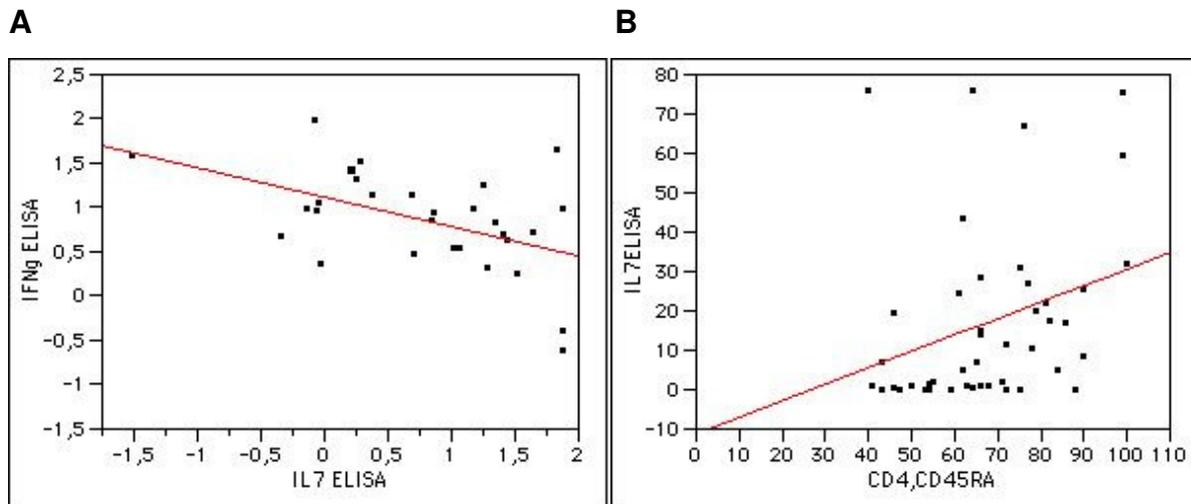


Abbildung 5.23 – **A:** IFN γ korreliert negativ mit IL7 $p < 0,0065$, $r^2 = 0,21$ (siehe 5.2.12.1)
B: IL7 korreliert positiv mit naiven T-Zellen ($p < 0,04$, $r^2 = 0,05$)

5.2.12.6 Interleukin 13 (IL13):

Leichter Anstieg des IL13-Spiegels bis Tag+8, danach fallende Werte und leichte Erholung unter Dauertherapie. Eine Korrelation zu TNF α produzierenden T-Zellen ($p < 0,01$, $r^2 = 0,19$) konnte gefunden werden (Abbildung 5.24).

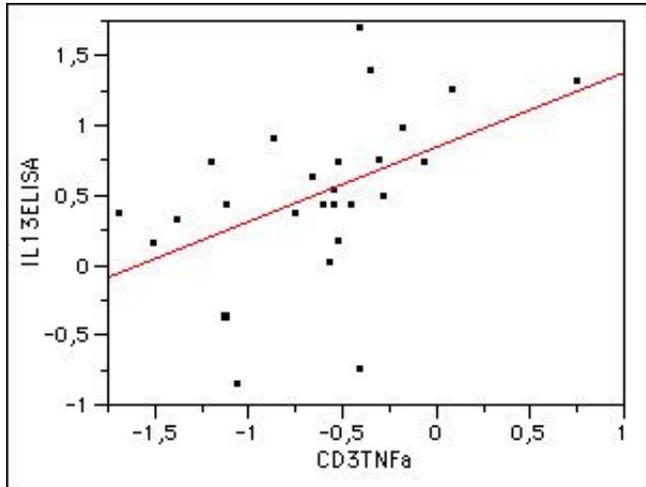


Abbildung 5.24- ELISA-Werte von IL13 korrelieren positiv mit CD3TNFa+-T-Zellen im FACS(logit)

5.3 TRECs und Immunoscope bei Leukämiepatienten von Diagnose bis Protokoll M

5.3.1 TRECs

Um die Thymusfunktion unter dem Einfluss der Therapie zu beurteilen, führten wir TREC-Analysen durch. Hierbei fiel auf, dass in den ersten Tagen nach Therapiebeginn die Thymusfunktion und dessen Zellneubildung signifikant um ein Vielfaches stiegen ($p < 0,05$). Im weiteren Verlauf fielen die TRECs wieder ab und blieben während der weiteren Therapie konstant (Abbildung 5.25).

Des Weiteren detektierten wir eine höhere Anzahl von TRECs/ μl , wenn die Patienten viele naive (CD45RA^+) T-Zellen im peripheren Blut hatten ($p < 0,01$).

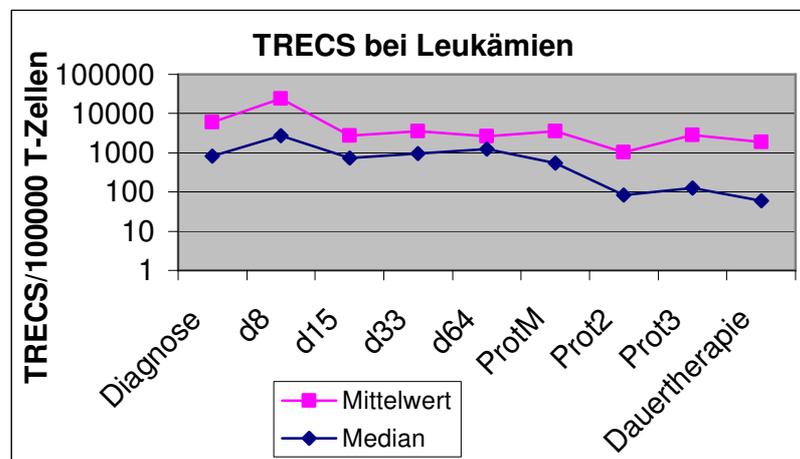
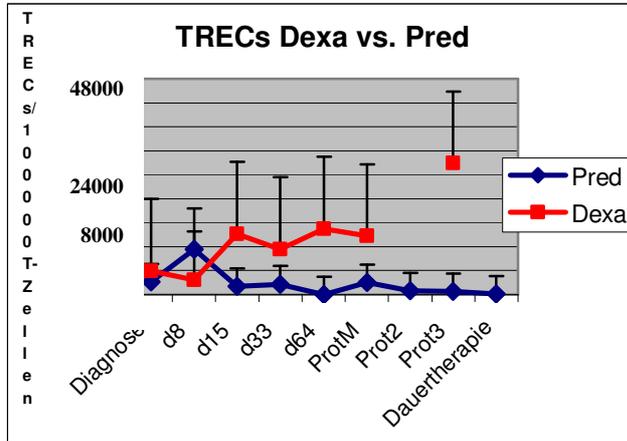


Abbildung 5.25 - TRECs im Verlauf . Initialer Peak, danach konstante Werte bis zur Beendigung der Therapie.

Vergleicht man nun die TRECs im Dexamethason- und im Prednisonzweig, so fällt auf, dass die Kinder im Dexamethasonzweig einen völlig anderen Verlauf zeigen als die Kinder im Prednisonzweig. Die Kinder im Dexamethasonzweig haben im Median eine kontinuierliche Steigerung ihres Thymusoutputs. Dies steht zunächst im Widerspruch zur stärkeren Therapieintensität des Dexamethasonzweig. Eine Erklärungsmöglichkeit ist das geringere Alter der Kinder, die in dieser Studie in den Dexamethasonzweig randomisiert worden sind (2 Jahre versus 7,5 Jahre im Prednisonzweig). Es ist aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bekannt, dass TRECs stark mit dem Alter korrelieren (Eyrich 2005). Vergleicht man die TREC-Daten unserer Patienten nach dem Alter (1=0-5Jahre versus 2=>5Jahre) findet man eine signifikante Altersabhängigkeit der TRECs unabhängig vom Therapiezweig ($p < 0,0004$, Abbildung 5.26).

Eingrenzend ist jedoch zu sagen, dass diese Tendenz sich an einem sehr kleinen Kollektiv zeigte, so dass es erforderlich sein wird, diese Beobachtungen in Rahmen einer größeren Untersuchung zu belegen.

A



B

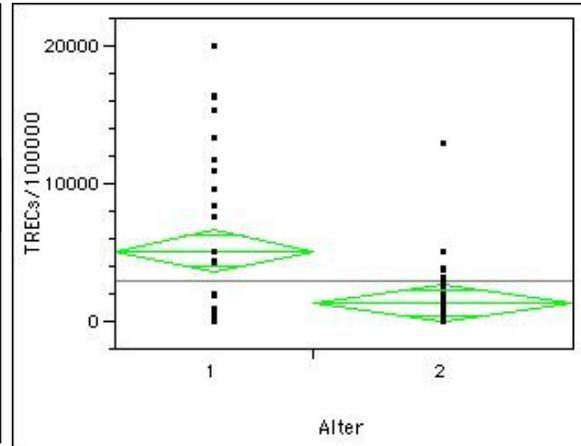


Abbildung 5.26 – **A**- TREC s-Verlauf aufgeteilt in die randomisierten Therapiearme Dexamethason versus Prednison

B- TREC s/100000 CD3⁺T-Zellen korrelieren negativ mit dem Alter,
 1 = < 5 Jahre, 2 = > 5 Jahre (n=23)

5.3.2 Immunoscope

Um die Diversität des T-Zellrepertoires unter der Leukämietherapie zu beurteilen, führten wir CDR3-Längenanalyse durch. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Therapiearmen finden. Auch gab es keine Abhängigkeit von der Anzahl der TREC s, jedoch fanden wir eine hoch signifikante Beziehung zu der Anzahl an naiven (CD4⁺CD45RA⁺) T-Zellen ($p < 0,0005$, Abbildung 5.27).

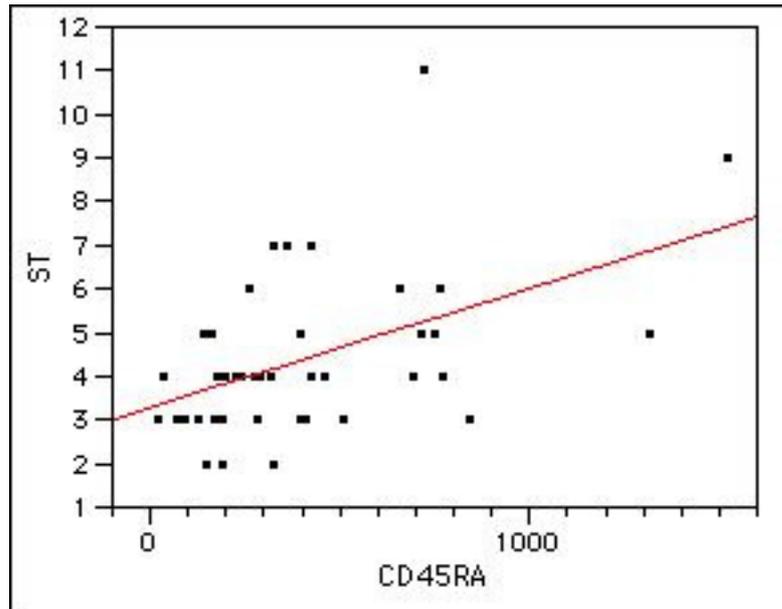


Abbildung 5.27 - Die Diversität des T-Zellrezeptors korreliert streng positiv mit der Anzahl der naiven T-Zellen im peripheren Blut ($p < 0,0005$, $r^2 = 0,21$).

Die Diversität zeigte außerdem eine Abhängigkeit von der Gesamtzahl der T-Zellen und der Therapieintensität (Abbildung 5.28). Die Diversität der T-Zellrezeptoren nahm bis Tag+15 kontinuierlich ab und erholte sich dann langsam bis Tag+64. Dort wurde ein Plateau erreicht, das eine etwas höhere Diversität als zum Zeitpunkt der Diagnose aufweist und für die restliche Zeit der Therapie und Dauertherapie konstant bleibt. Zwar konnten wir im Median einzelne BV-Familien erkennen, die zu bestimmten Zeitpunkten ein besonders stark oder schwach ausgeprägtes Repertoire aufwiesen, jedoch zeigte sich bei den einzelnen Patienten diesbezüglich keine einheitliche Tendenz, so dass dieses Ergebnis eher kritisch beurteilt werden muss und vielleicht auch als ein methoden-bedingter Effekt zu sehen ist.

Ergebnisse

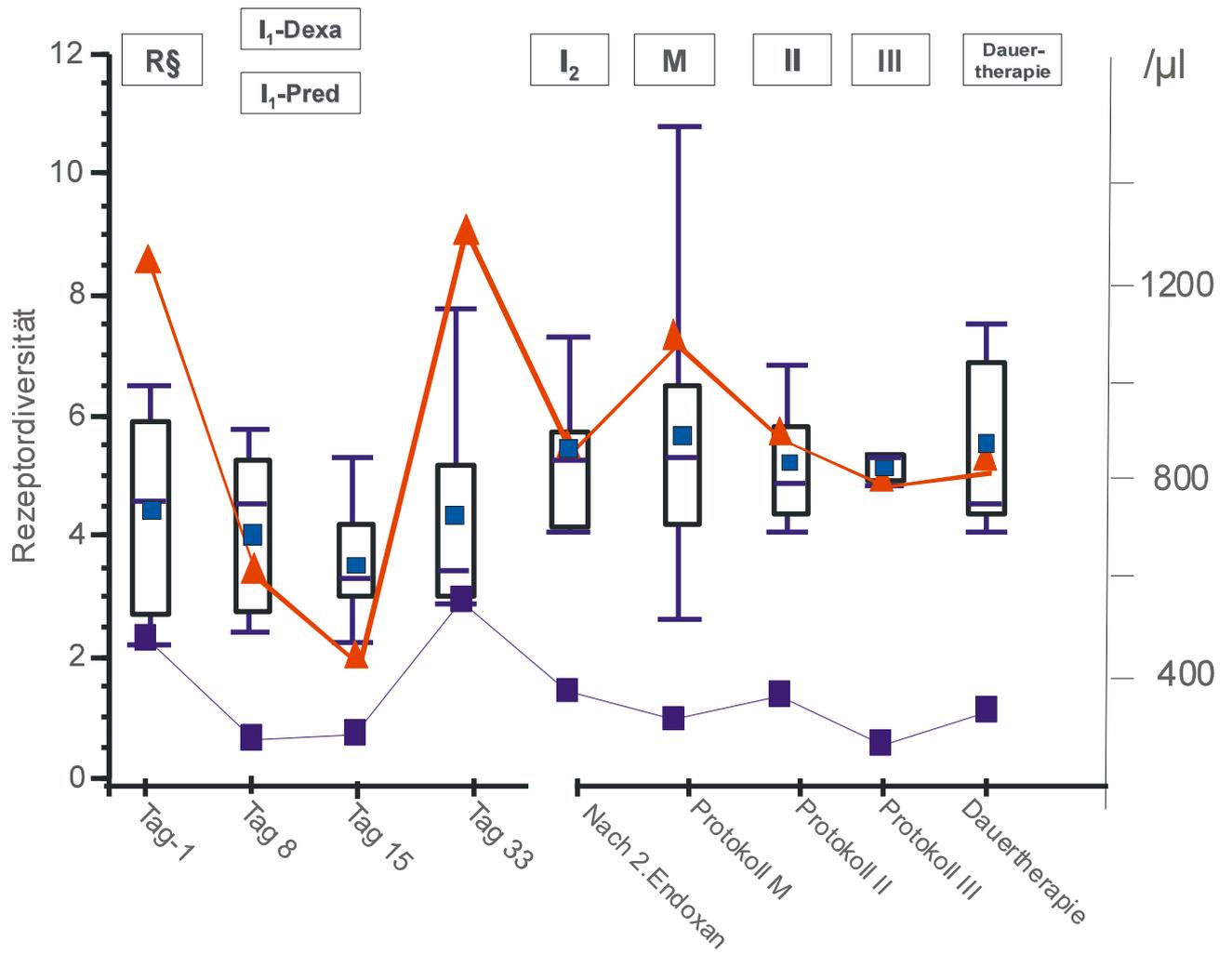


Abbildung 5.28 – Blaue Vierecke-CD45RA (Naive T-Zellen)/ μl (Mittelwert, rechte Achse), rote Dreiecke-CD3⁺-T-Zellen/ μl (Mittelwert, rechte Achse), Box-Plot-Immunoskope (linke Achse)

6. DISKUSSION

Jedes Jahr werden in Deutschland etwa 600 Kinder nach dem Protokoll der Studiengruppe ALL-BFM behandelt. Das Protokoll konnte in den letzten Jahren stetig optimiert werden (ALL-BFM 81, ALL-BFM 90, - 95 und zuletzt ALL-BFM 2000). Ständige Verbesserungen der Therapie gehen jedoch oft mit einer erhöhten Rate an Nebenwirkungen einher, wie die Toxizität der Zytostatika oder die Immundefizienz, die zu schweren Infektionen während der Therapie führen kann und somit den Behandlungserfolg limitieren können. Die Immunfunktion eines Patienten ist unter anderem abhängig von der Grunderkrankung, dem Alter sowie Art und Dosierung der Chemotherapeutika (Lehrnbecher et al. 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zahl der opportunistischen Infektionen dramatisch ansteigt, wenn die CD4+Zellanzahl unter $200/\text{mm}^3$ sinkt (Masur et al., 1989).

T-Zell-Rekonstitution kann unterteilt werden in die thymusunabhängige (Gedächtniszellen) und die thymusabhängige Rekonstitution (naive T-Zellen). Bereits 1994 beschrieben Mackall et al. schwere T-Zelldepletion während intensiver Chemotherapie. Sie konnten demonstrieren, dass bis mehrere Monate nach einer solchen Therapie insbesondere die naiven T-Zellen in Zahl und Funktion reduziert waren. Douek et al. konnten zusätzlich einen geringen Thymusoutput während Chemotherapien bestätigen.

Während es eine große Studienanzahl gibt zur Immunrekonstitution bei Patienten mit soliden Tumoren (Mackall et al. 1994, Mackall et al. 1994, Strender et al. 1996), beschäftigen sich nur wenige Studien mit der Immunfunktion unter modernen Leukämie-Therapieregime (Luczynski et al. 2005, Zhang et al. 2000, Caver et al. 1998, Kostaridou et al. 2004, Haining et al. 2005). Die meisten bisherigen Untersuchungen beschränkten sich auf Untersuchungen des Immunsystems *nach* Beendigung der Therapie (Alanko et al. 1992; Mackall et al. 1995, Moritz et al. 2001, Mazur et al. 2006)

Bei steigenden Heilungsraten kommt den Spätfolgen einer Therapie immer größere klinische Relevanz zu. Insbesondere kann eine Immundysfunktion zu starken Beeinträchtigungen führen. Im Rahmen neuer Behandlungsansätze, wie beispielsweise Tumorstimulation durch dendritische Zellen (Haining et al. 2005), ist auch die Funktion des Immunsystems *unter Therapie* von großem Interesse.

Ziel dieser Arbeit war es, das Ausmaß der Beeinträchtigung immunologischer Parameter unter Therapie sowie die Qualität und Geschwindigkeit der Immunrestitution nach Therapie zu analysieren. Dazu gibt es bei Kindern bislang keine systematischen Untersuchungen. Das Wissen über die Immunfunktion ermöglicht ein gezielteres Einsetzen prophylaktischer Maßnahmen sowie den möglichen Einsatz und Limitation immunmodulierender, neuer Therapieansätze.

6.1 Zytokine

Im peripheren Blut wurden, zunächst um die Zytokinmethode in unserem Labor zu etablieren, diverse Kontrollen zur intrazellulären Zytokinfärbung vorgenommen. Diese Voruntersuchungen konnten zum einen belegen, dass die Zytokinfärbung spezifisch ist, zum anderen nachweisen, dass die Anti-Zytokin-Antikörper intrazellulär und nicht an der Zelloberfläche gebunden werden. Wir stimulierten mit PMA und Ionomycin, da diese Kombination geeignet ist, polyklonale T-Zellen zur Stimulation anzuregen (Mascher et al 2000). Da sehr kleine positive Populationen im FACS kaum zu differenzieren sind, entschieden wir uns für diese Maximalstimulation, um Unterschiede im Therapieverlauf besser herausarbeiten zu können. PMA greift intrazellulär an und stimuliert als Strukturhomolog des Diacylglycerols (DAG) die Proteinkinase C dauerhaft (Berridge, 1984). Ionomycin ist ein Kalzium-Ionophor, das für einen Kalziuminflux in die Zelle aus dem Extrazellulärraum sorgt (Truneh et al., 1989; Donnadieu et al., 1995). Da das extrazelluläre Kalzium zur Stimulation benötigt wird, kann kein EDTA-Blut verwendet werden, sondern ausschließlich Heparin-Blut. Mit diesen beiden Stimulanzen wird die T-Zell-Aktivierung nach Antigen-Challenge unspezifisch über die second messenger nachgeahmt. Während der Stimulation wird den Zellen außerdem Brefeldin zugefügt, welches den Golgiapparat blockiert und damit eine Zytokinfreisetzung aus der Zelle verhindert (Misumi Y et al. 1989). Als Kontrolle stimulierten wir zusätzlich Zellen mit SEB, um eine einseitige, das heißt ungewollt spezifische Stimulation ausschließen zu können.

Zur Evaluierung der optimalen Stimulationszeitspanne führten wir eine kinetische Voruntersuchung durch (n= 5 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen). Dabei konnten wir die in der Literatur vorbeschriebenen Kinetikversuche bestätigen (Mascher et al. 1999), mit Ausnahme eines sehr viel späteren TNF α - Maximums (ca. nach 8h), das bei weiterer Stimulation bis zu 24h konstant blieb. Wir entschieden uns im Anschluss an die Vorversuche zur Kinetik für eine Stimulation von 20h, da hier die

Zytokinexpression in einem konstanten Expressionsbereich lag und somit vergleichbare Ergebnisse zu unterschiedlichen Meßzeitpunkten erzielt werden konnten.

Die Untersuchung umfasste die Th1-Zytokine IL2, TNF α und IFN γ , die Th2-Zytokine IL4, IL5 und IL10. Die genannten Zytokine wurden in T-Zellen(CD3⁺), T-Helfer-Zellen (CD4⁺), Zytotoxischen T-Zellen(CD8⁺), naiven (CD45RA⁺/CD45RO⁻) und memory (CD45RO⁺/CD45RA⁻) Lymphozyten gefärbt. Die Untersuchungen ergaben ein starkes Übergewicht in der Expression von Th1-Zytokinen und TNF α , während die Th2-Zytokinen stets nur von sehr wenig Lymphozyten exprimiert wurde. Die schwache Produktion von IL4 und IL5 war von Jung et al 1995 sowie von Mascher et al. 1999 schon beschrieben worden. Sie zeigten, dass wiederholte Stimulation nötig ist, um eine starke Expression von Th2-Zytokinen zu erreichen.

Die Methode der intrazellulären Zytokinfärbung mittels FACS hat den großen Vorteil der möglichen Simultanfärbungen. Zum einen können Oberflächemarker und Zytokinproduktion gleichzeitig bestimmt und damit die Zytokinproduktion eindeutig einer bestimmten Subpopulationen zugeordnet werden, zum anderen besteht die Möglichkeit, eines simultanen Anfärbens mehrerer Zytokine plus Oberflächenepitops in einer Zelle. Dies ist besonders wichtig für die Zuordnung und Identifizierung der Th1/Th2-Subklassen (Mosmann et al., 1996; Gajewski und Fitch, 1988; Romagnani, 1991; Street und Mosmann, 1991).

Die Untersuchung der Ko-Expression von Zytokinen in einem parallel untersuchten gesunden Kontrollkollektiv (n= 111) in T-Zellen (CD3⁺) erbrachte folgende Ergebnisse: IL2, TNF α und IFN γ wurden zum Teil koexprimiert, während die meisten T-Zellen nur jeweils ein Zytokin produzierten. Die doppelt positiven Zellen für IL2, TNF α und IFN γ entsprechen wahrscheinlich den typischen Th1-Zellen, während zumindest ein Teil der IFN γ ⁺/IL2⁻ den zytotoxischen T-Zellen entspricht. Naive Zellen, die noch nicht zu Effektorzellen ausgereift sind, können IL2 produzieren (Th0-Zellen). In den untersuchten T-Zellen wurde die Koexpression von IL4 mit IL2 und IFN γ (geringerer Prozentsatz als IL2) nachgewiesen sowohl bei dem Patientenkollektiv als auch bei der Kontrollgruppe. Während die gleichzeitige Koexpression von IL2 und IL4 möglicherweise in Th0-Zellen stattfindet, widerspricht die simultane Produktion von IL4 und IFN γ dem klassischen Th1/Th2-Paradigma, das in der Maus etabliert wurde.

Insgesamt wurde jedes Zytokin mit fast jedem anderen koexprimiert gefunden, so dass diese Ergebnisse auf eine höhere Komplexität als ein einfaches Th1/Th2-Schema auf zellulärer Ebene schließen lassen. Für das erleichterte Verständnis immunologischer Regelkreise scheint eine funktionelle Unterscheidung von Th1- und Th2-Effekten, insbesondere bei Verhältnisverschiebungen, jedoch weiterhin sinnvoll; zumal nur sehr niedrige Prozentsätze doppelt positiver Zellen detektiert werden konnten.

Bei der Durchführung der Kinetik konnten wir bestätigen, dass IFN γ , als typisches Th1-Zytokin, und IL4, als typischer Th2-Vertreter, zu ähnlichen Zeiten (5-8h) ihr Produktionsmaximum hatten, auch wenn sie von unterschiedlichen Lymphozyten-Subpopulationen produziert wurden. Das lässt vermuten, dass die Entwicklung einer Zytokinantwort nicht von der Geschwindigkeit des Anschaltens verschiedener Zytokingene abhängt, sondern von Faktoren, die eine Zytokinantwort induzieren und die Gegenspieler dabei supprimieren. Es handelt sich dabei um Faktoren, die vom Individuum selbst produziert werden, zum Beispiel IL12 aus Monozyten, das eine Th1-Antwort nach sich zieht (Trinchieri, 1994), oder aber zum Beispiel von einem infektiösen Agens stammen, wie es für bestimmte Würmer gezeigt werden konnte (Finkelmann, 1991; Locksley und Scott, 1991).

Insgesamt lassen sich die untersuchten Zytokine im gesunden pädiatrischen Kontrollkollektiv unterschiedlichen Zellpopulationen zuordnen, die für den Großteil der Zytokinsekretion verantwortlich sind. Das steht im Einklang mit den für sie postulierten Aufgaben im Immunsystem : IFN γ ist ein Effektorzytokin, das besonders von ausdifferenzierten T-Zellen gebildet wird; IL2, als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für T-Zellen, wird zu einem hohen Anteil in naiven Lymphozyten gebildet; TNF α mit proinflammatorischer Wirkung zeigte eine relativ frühe Expression. Gedächtnislymphozyten zeigen eine Zytokin kinetik (schneller Anstieg), die gut die Effektivität einer sekundären Immunantwort demonstriert (Vitetta et al., 1991; Gray et al., 1992).

6.2 Immunfunktion während ALL-Therapie

6.2.1 Ausgangswerte bei Diagnose vor Therapiebeginn

Bereits bei Diagnosestellung fiel verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe bei 8 der Patienten eine Leukopenie (Median $1650 \pm 261/\mu\text{l}$) auf. Ebenso war die absolute Neutrophilenzahl mit $2475 \pm 1731/\mu\text{l}$ weit unter der altersentsprechenden Norm (Haining et al., 2005). Auch für B-Zellen ($\text{CD}19^+$) und T-Zellen ($\text{CD}3^+$) konnten subnormale Absolutwerte detektiert werden (Mediane $\text{CD}19$: $360/\mu\text{l}$ und $\text{CD}3$: $1134 \pm 501/\mu\text{l}$). In vorangehenden Studien wurde die Kompromittierung des Immunsystems zum Zeitpunkt der Diagnose wiederholt für maligne Erkrankungen (Leukämien, solide Tumoren und Burkitt-Lymphome) beschrieben (Magrath et al., 1976; Mackall et al., 1994; Luczynski et al. 2002; Haining et al., 2005). Haining et al. 2005 detektierten bei Diagnose besonders für die T-Zellen ($\text{CD}4$, $\text{CD}8$) eine stärkere Depletion als in unserer und den übrigen beschriebenen Kohorten gemessen wurden (Moritz et al. 2001, Luczynski et al. 2002, Kostaridou et al. 2004). Als möglicher Grund für die T-Zellerniedrigung werden Immunmodulatoren wie TGF β und LIF diskutiert (Janeway et al. 2002d, Gorham 2005). Der prozentuale Anteil der einzelnen Subpopulationen entsprach jedoch der altersentsprechenden Verteilung unserer und anderer Kontrollgruppe (Erkeller-Yuksel et al. 1992). Die Serum-Immunglobulinkonzentration (IgG, IgA, IgM) waren bei Diagnosestellung erniedrigt.

6.2.2 NK-Zellen und B-Zellen während Leukämietherapie

NK-Zellen zeigten während der ganzen Therapie konstant nur mäßig reduzierte Absolutwerte mit mäßigen Reduktionen parallel zur Therapieintensität und unterschieden sich nach Beendigung der Therapie nicht signifikant von der Normalpopulation (Mazur B et al. 2006, Kostaridou et al. 2004).

B-Zellen hingegen zeigten ein andauernde Depletion zu kaum mehr nachweisbaren Werten, die sich zu keinem Zeitpunkt der Therapie erholte. Der stärkste B-Zell-Abfall erfolgte in den ersten 30 Tagen der Therapie. Hierbei spielt sicher die Reduktion der Blastenzahl eine wichtige Rolle. Zusätzlich wurde eine Steroid-induzierte-Apoptose der B-Zellen beschrieben (Lill-Elghanian et al., 2002; Voetberg et al., 1994). Da Steroide feste Elemente der Induktionstherapie im ALL-BFM-2000-Protokoll sind, trägt dieser Effekt sicher zusätzlich zur B-Zelldepletion bei.

Während der Induktionstherapie finden ab Tag 8 zwei unterschiedliche Steroide alternativ Anwendung: Dexamethason und Prednison. Die Kinder, die Dexamethason

erhielten, hatten signifikant ($p < 0,05$) höhere TREC-Werte, während die Kinder im Prednisonzweig eine höhere Expression von $IFN\gamma$ aufwiesen ($p < 0,0001$). Beides lässt sich zum einen mit dem unterschiedlichen medianen Alter der Patienten in beiden Gruppen erklären (2 Jahre im Dexamethason- versus 7,5 Jahre im Prednisonzweig), da bekannt ist, dass jüngere Kinder einen höheren Thymusoutput haben (Eyrich et al., 2005). Ebenfalls steigt die $IFN\gamma$ -Expression mit dem Alter (Kontrollgruppe, Chipeta et al., 1998). Es ist jedoch auch vorstellbar, dass das stärker immunsuppressiv wirkende Dexamethason Einfluß auf die Rekonstitution und Zytokinexpression nimmt. Dies kann nur in einem größeren Patientenkollektiv endgültig geklärt werden.

Bisher veröffentlichte Daten in der Literatur zur B-Zell-Rekonstitution sind widersprüchlich. Die meisten Autoren detektierten wie wir eine B-Zelldepletion auf weniger als $50\text{ CD}19^+$ Zellen/ μl in der Induktions- und Konsolidierungsphase (Haining et al 2004, Luczynski et al. 2004, Kostaridou et al. 2004). Frühere Immunsystem-Untersuchungen nach Leukämietherapie beschrieben zwar subnormale B-Zell-Werte direkt nach Therapieende, beschrieben jedoch eine vollständige Rekonstitution des B-Zellkompartiments sowie der Immunglobulinkonzentrationen innerhalb der folgenden sechs Monate nach Therapieende (Alanko et al 1992, Abrahamsson et al. 1995, Van Wering et al. 2000, Ek et al. 2005, Mazur et al. 2005). Im Gegensatz dazu zeigen unsere Daten zwar eine deutliche Regeneration in und nach Beendigung der Dauertherapie, trotzdem zeigen B-Zell-Anzahl und Immunglobulinkonzentration weiterhin deutlich subnormale Werte. Eingrenzend ist zu sagen, dass die vorliegenden Studien sich auf unterschiedliche Therapieprotokolle inklusive Hochrisikopatienten mit entsprechend intensivierter Therapie beziehen. Daraus lassen sich möglicherweise die beobachteten Unterschiede erklären.

Zusätzlich bestimmten wir die Immunglobuline im Serum. Wir stellten einen parallel mit dem B-Zell-Verlust verlaufenden Abfall der Immunglobuline (IgG, IgA, IgM) bis Tag+33 fest (Luczynski et al. 2004, Kostaridou et al. 2004). Eine Erklärungsmöglichkeit der nach Tag+33 niedrig konstanten IgG-Konzentration (ca. 120mg/dl) bei weiter abfallenden B-Zellen könnte die Substitution mit Thrombozytenkonzentraten (TK) sein, da in den TK etwa 80% der normalen IgG-Konzentration enthalten ist.

Bei der Untersuchung der B-Zellsubpopulation während und nach Ende der Dauertherapie zeigte sich eine signifikante Zunahme insbesondere der naiven B1-Subpopulation in der früheren Regenerationsphase und der memory B3-Subpopulation (Weller et al 2004). Eine Korrelation der Regenerationskinetik mit der Intensität der vorangegangenen Chemotherapie (Caver et al., 1998; Ek et al., 2005) wurde für die funktionell wichtige, T-Zell-abhängige Immunantwort der B2-Subpopulation (CD5-CD19+) beschrieben. Bis ein Jahr nach Beendigung der Dauertherapie konnten wir jedoch keine signifikante Steigerung der B2-Subpopulation detektieren. Die erhöhten IgG-Level nach Therapieende sind wahrscheinlich durch die neugebildeten B1-Zellen bedingt, welche eine T-Zell-unabhängige Immunantwort auslösen (Martin et al., 2001). Die Kenntnis über eine vollständige Rekonstitution der einzelnen B-Subpopulationen erscheint besonders im Hinblick auf prophylaktische antimikrobielle Therapie und erneuter Vakzination nach Therapie von klinischer Relevanz und sollte daher unter den aktuellen Therapieprotokollen weitergehend untersucht werden.

6.2.3 T-Zellen während Leukämitherapie

Im Therapieverlauf war neben einem mäßigen Abfall der T-Zellen eine Verschiebung der CD4-CD8-Ratio zugunsten der CD8-Subfraktion feststellbar, die sich erst unter Dauertherapie mit zunehmender CD4⁺-Zellzahl erholte (Mazur et al., 2005). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der schnelleren Expansion der CD8⁺ Zellen. Diese Hypothese lässt sich auch durch die höhere Expression von Ki67 in der CD8 Subfraktion unterstreichen. Obwohl sich die CD4⁺ und CD8⁺ Zellen den Weg der primären Entwicklung im Thymus während der Ontogenese teilen, regenerieren sie unterschiedlich nach T-Zell-Depletion. CD8⁺-Zellen können im Gegensatz zu CD4⁺ Zellen, über einen thymusabhängigen und thymusunabhängigen Weg regeneriert werden (Haynes et al. 2000). Der thymusunabhängige Weg scheint für die schnellere Expansion verantwortlich zu sein, jedoch muss auch ein Teil der CD8⁺Zellen für die Ausbildung einer naiven zytotoxischen T-Zell-Subpopulation den thymusabhängigen Weg gehen (Heitger et al., 1997). Unterstützt wird diese These der extrathymischen Neubildung durch die fehlende Korrelation zwischen CD8⁺Zellpopulation und Patientenalter (Mackall et al. 1997; Haining et al. 2005),

während CD4⁺-Zellen eine negative Korrelation mit dem Alter aufweisen, wie auch eindrücklich nach Stammzell-Transplantation beschrieben worden ist (Mackall et al., 1995, Alanko et al. 1994, Haining et al. 2005). Es wurde sogar eine schnellere Immunrekonstitution bei jüngeren Patienten unter ALL-Therapie beschrieben (Alanko et al. 1994). Unsere Daten zeigen eine ähnliche Tendenz, verfehlten aber das Signifikanzniveau.

Moritz et al. untersuchten das Immunsystem bei Diagnosestellung sowie während der ersten Remission und konnten eine komplette T-Zell-Rekonstitution im Bezug auf Repertoire und Funktion nachweisen (Moritz et al., 2001). Diese Daten unterstützen unsere Beobachtungen, dass die beschriebene Einschränkung im T-Zellsystem (Haining et al. 2004, Luczynski et al. 2004) in erster Linie der Therapie sowie zusätzlich der zugrunde liegenden Krankheit zugeschrieben werden müssen. Hinzugefügt werden muss allerdings, dass diese Beobachtung nicht gleichermaßen auf B-Zellen zutrifft. Während der Prozentsatz der T-Lymphozyten nach Remission sogar eine Zunahme aufwies, wurde eine schwerwiegende B-Zelldepletion beobachtet (Luczynski et al. 2002). Die Reduktion der absoluten Werte der ausgewerteten Subpopulation ist am ehesten Folge des suppressiven Effektes von antineoplastischen Medikamenten auf das Leukozytensystem. Dies würde auch die stärkere Immundepression, wie sie etwa bei Haining et al. beschrieben ist, erklären, der auch Patienten im Hochrisikozweig untersuchte. Die Patienten unserer Studie hingegen gehörten alle dem Standard- oder mittleren Risikozweig an.

Bei Diagnosestellung hatten die Patienten ein gemischtes Verhältnis von CD4⁺/CD45RA⁺ und CD4⁺/CD45RO⁺-Zellen mit altersentsprechender Verteilung (Erkeller-Yuksel et al., 1992). Im Verlauf der Therapie nahmen Gedächtniszellen stärker zu als naive Zellen. Andere Arbeitsgruppen beschrieben dieses Phänomen bei Chemotherapie für solide Tumoren (Mackall et al. 1994). Wie oben schon erwähnt, scheint die thymusunabhängige Regeneration schneller zu sein als die thymusabhängige. Dadurch lässt sich auch erklären, dass die thymusunabhängigen Gedächtniszellen (CD45RO⁺) einer schnelleren Erholung unterliegen als die naiven Zellen (CD45RA⁺).

Die Rekonstitution der T-Zellen nach intensiver Chemotherapie oder nach einer Stammzell-Transplantation erfolgt entweder durch die Expansion von noch bestehenden Gedächtniszellen-T-Zellen oder durch die Generierung von neuen T-

Zellen aus hämatopoetische Stammzellen. Sogenannte T-cell receptor excision circles (TRECs) können dabei als ein Indikator für die Thymopoese herangezogen werden. Um die Thymusfunktion unter dem Einfluss der Therapie zu beurteilen, führten wir TREC-Analysen durch. Nach Therapiebeginn konnten wir eine deutliche Zunahme der T-Zellneubildung nachweisen, im weiteren Verlauf zeigten sich konstante Werte zwischen 5000 und 7000 TRECs/100000 T-Zellen, was dem unteren altersentsprechenden Normbereich entspricht. Des Weiteren zeigte sich - wie zu erwarten - eine Korrelation mit der Anzahl der naiven T-Zellen und eine negative Korrelation mit dem Alter. Auch die Rezeptordiversität zeigte sich konstant mit im Mittel 4-6 Banden pro Rezeptorfamilie. Andere Untersuchungen hingegen zeigten eine erniedrigte TREC-Anzahl bereits zur Diagnosestellung ohne signifikante Erholung während der nächsten zwei Jahre (Haining et al. 2005). Dies würde bedeuten, dass die Leukämie an sich, die T-Zell-Neubildung inhibiert, was unseren Ergebnissen widersprechen würde.

6.2.4 Zytokine im Therapieverlauf

Insgesamt gibt es nur wenige Daten, die sich mit Zytokinexpressionen bei Leukämiepatienten beschäftigten (Mazur et al. 2004, Luczynski et al. 2005, Zhang et al. 2000).

In der Normalpopulation unterliegt die physiologische Zytokinexpression Veränderungen mit zunehmendem Alter. Einige Daten in relativ kleinen, pädiatrischen Kohorten beschrieben eine positive Korrelation zwischen Alter und intrazellulären Zytokinleveln von $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$, während IL4-Level in allen Altersgruppen ähnlich exprimiert wurden (Chipeta et al. 1998, Hoffmann et al. 2005). In unserer, bisher größten gesunden Kontrollgruppe zeigten sich ähnliche Tendenzen. Im höheren Erwachsenenalter ist zudem ein Shift von Th1- zurück zu Th2-Zytokinprädominanz beschrieben (Gardner et al. 2002).

Zur Diagnosestellung zeigten sich verglichen mit den normalen Werten die Th2-Zytokine leicht erniedrigt ebenso wie $TNF\alpha$, während $IFN\gamma$ im Normbereich und IL2 vermehrt exprimiert wurde. Die Verteilung der Expression auf die einzelnen Subpopulationen entsprach weitgehend der physiologischen Expression (Chipeta et al. 1998, Mascher et al. 1999), im Verlauf der Therapie nahm der Anteil der

CD8⁺CD45RO⁺ Zellen, die Zytokine produzierten, zu. Dies entspricht der dominierenden Zellart während der Therapie.

In den ELISA-Daten konnten wir einen frühen IFN γ -Peak an Tag+8 messen, welcher eine Immunaktivierung durch das proinflammatorische Milieu nach Therapiebeginn und Blastenzerfall reflektieren mag. Diese Konstellation ist gut bekannt aus dem Engraftment bei Stammzell-Transplantation (Eyrich et al. 2004). Im weiteren Verlauf bleiben IFN γ -Serumspiegel konstant, während Th2-Zytokine leicht abnehmen. Mazur et al., die Zytokin-Konzentrationen nach Therapieende bestimmte, konnte ebenfalls hohe Th1-Zytokine verglichen mit der Kontrollgruppe detektieren (IL2, TNF α), während Th2-Zytokine (IL10, IL8, IL4) im Normbereich oder niedriger exprimiert wurden.

Die im FACS gemessenen Daten waren ähnlich. Die Anzahl IFN γ ⁺-Zellen hatte sich vor Protokoll M sogar verdoppelt. Somit konnte eine Verschiebung des Th1-Th2-Gleichgewichts festgestellt werden mit einer Dominanz der Th1-Zytokine. Luczynski et al. (2004) berichtete ebenfalls von einer IFN γ -Produktionssteigerung während der Induktionstherapie und zusätzlich von einer vermehrten IL4-Produktion, so dass letztendlich eine Th2-Prädominanz (Zhang et al., 2000) vorlag. In unserer Studie zeigte sich auch intrazellulär ein Abfall der Th2-Expressionen (IL4, IL5 und IL10), einzige Ausnahme bildeten Infektionen während der Induktionstherapie. Drei Patienten zeigten hier neben einem starken IFN γ -Anstieg eine Mehrproduktion von IL4 während einer Infektion (Aspergillose, Appendizitis, systemische Candidiasis).

Zwischen den randomisierten Induktionstherapiegruppen Dexamethason versus Prednison zeigte sich eine deutliche erhöhte IFN γ -Produktion im Prednisonprotokoll. ($p < 0,0001$) Dieser Unterschied ist stärker ausgeprägt, als durch die Altersdifferenz zu erklären wäre, so dass Dexamethason eine stärkere immunsuppressive Wirkung zu haben scheint. Weiterhin korrelierte die IFN γ -Expression mit der Anzahl CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ und CD3⁺CD45RO⁺ Zellen hochsignifikant ($p < 0,001$). Der Anteil $\gamma\delta$ -positiver Zellen/ μ l stieg während der Therapie nach Tag15 kontinuierlich an (Mazur et al. 2006).

IL15 spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase der Lymphozytensubpopulationen (Fehninger et al., 2001a), besonders in der Steuerung und Differenzierung der NK-Zellen im Knochenmark. IL-15 wird durch IFN γ stimuliert (Dubois, S et al 2002). Dies ließ sich durch eine Korrelation zwischen IL15 und IFN γ -Expression der T-Zellen unterstreichen.

Interessanterweise fanden wir eine Korrelation zwischen TGF β und CD19⁺ Blasten. Bei fehlendem Blastennachweis im peripheren Blut während der Therapie konnte keine Korrelation zwischen CD19⁺Zellen und TGF β -Konzentration mehr nachgewiesen werden. Über simultane intrazelluläre Färbung konnten wir eine direkte TGF β -Expression in den Blasten detektieren. Der Mechanismus der ALL-Blasten, der natürlichen Immunantwort zu entkommen, ist bislang ungeklärt. Einige Daten weisen daraufhin, dass ALL-Zellen nur ineffizient Antigene präsentieren. Die Expression von Zytokinen und damit die fehlende T-Zellstimulation wäre eine mögliche Erklärung des „Immune escape“. Bis jetzt konnten zwar mRNA von einigen Zytokinen auf Blasten nachgewiesen werden, jedoch war die untersuchte Population relativ klein und zeigte keine einheitliche Expression von Zytokinen oder kostimulierenden Molekülen (Luczynski et al. 2006). Es werden weiterhin diverse Versuche unternommen, bessere prognoserelevante Marker zu finden (Troeger et al. 2007, Kerst et al. 2006), um die Therapie besser zu individualisieren und damit mögliche Übertherapien zu vermeiden.

Zusammengefasst zeigten unsere Patienten eine nur mäßige T-Zellabnahme bei proinflammatorischen Zytokinprofil sowie eine langandauernde, schwere B-Zellpletion, was insbesondere für erneute Impfungen nach Therapieende sowie Tumorstimulation während der Therapie von klinischer Relevanz ist und weiter verfolgt werden sollte. Für die Tumorstimulation scheinen bei guter T-Zellfunktion während der Therapie und eingeschränkten B-Zellkompartiments die dendritischen Zellen besonders erfolgsversprechend zu sein (Haining et al., 2005, Lil et al., 2007, Houtenbos et al. 2006). Um die Bedeutung des TGF β in der Pathophysiologie der Leukämieentstehung zu verstehen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Leukämien sind die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalter. Durch stetige Verbesserung der Therapieprotokolle konnten in den letzten Jahren steigende Heilungsraten erzielt werden. Eine eingeschränkte Immunfunktion stellt ein relevantes klinisches Problem der Leukämietherapie dar, das die Therapie durch schwere Infektionen äußerst stark beeinträchtigen kann. Obwohl es einige Studien gibt, die den T-Zellstatus *nach* Therapieende untersuchten, gibt es bis jetzt kaum aktuelle Daten, die das Immunsystem prospektiv während der Therapie analysierten. Im Rahmen neuer immunmodulatorischer Behandlungsansätze ist die Funktion des Immunsystems momentan auch unter Therapie von großem Interesse.

23 pädiatrische Patienten mit B-Vorläufer-ALL wurden daher prospektiv im Bezug auf ihre Immunrestitution untersucht. Dazu mussten verschiedene Methoden, insbesondere die Intrazelluläre Zytokinmessung mittels Durchflußzytometrie, neu in unserem Labor etabliert werden. Unter der Therapie zeigte sich eine ausgeprägte und andauernde B-Zelldepletion. Parallel dazu detektierten wir erniedrigte Immunglobulinspiegel. Nach Therapieende zeigte sich jedoch eine Zunahme der B-Zellzahl im peripheren Blut, die Werte blieben jedoch auch ein Jahr nach Dauertherapie im subnormalen, altersentsprechenden Bereich.

T- und NK-Zellen waren proportional zur Therapieintensität nur mäßig erniedrigt und zeigten eine vollständige Reconstitution der Immunfunktion nach Therapiebeendigung. Zur genaueren Untersuchung der Diversität des T-Zell-Rezeptors kam die Methode des CDR3-Fragmentlängenanalyse zur Anwendung, zur Untersuchung der T-Zellneubildung wurden TRECs bestimmt. Beide zeigten bereits nach der Induktionsphase eine Erholung zu normalen Werten und blieben im weiteren Therapieverlauf stabil im altersentsprechenden Referenzbereich.

Um eine Aussage über die funktionelle Regeneration zu treffen, wurde die Zytokinproduktion stimuliert (intrazellulär mittels FACS) und unstimuliert (im Serum mittels ELISA) im peripheren Blut gemessen. Bei Diagnosestellung lagen alle intrazellulären T-Zell-Zytokinexpressionen (IL2, IFN γ , IL4, IL5, IL10) im altersentsprechenden Normbereich. Eine Ausnahme bildete das erniedrigte TNF α . Im Verlauf der Therapie wurden eine Abnahme von Th2-Zytokinen und eine Zunahme von Th1-Zytokinen detektiert, so dass es zu einer Verschiebung in Richtung proinflammatorischer Th1-Zytokinexpression kam. Kinder, die in der Induktionstherapie

in den Dexamethasonzweig randomisiert wurden, exprimierten signifikant weniger IFN γ als Patienten des Prednisonzweig ($p < 0,0001$).

Interessanterweise korrelierte die im Serum gemessene TGF β -Konzentration positiv mit der Blastenzahl im peripheren Blut. Wir konnten exemplarisch an vier Patienten zeigen, dass über 94% der Blasten intrazellulär TGF β exprimierten. Dies könnte einen wichtigen „immune escape“-Mechanismus darstellen.

Die durch diese Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen, insbesondere durch eine gute T-Zell-Rekonstitution schon während der Therapie, neuere, komplementäre Behandlungsmethoden, wie beispielsweise Tumorstimulation durch Peptide oder dendritische Zellen, möglich erscheinen.

Eine Folgearbeit wird nun die Zytokinexpression der Blasten im Detail analysieren. Hierbei ist neben einem intrazellulären Nachweis eine detaillierte Analyse der TGF β -induzierten Mechanismen erfolgen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abrahamsson, J., I. Marky, and L. Mellander. "Immunoglobulin levels and lymphocyte response to mitogenic stimulation in children with malignant disease during treatment and follow-up." Acta Paediatr. 84.2 (1995): 177-82.
- Al Harthi, L. et al. "Detection of T cell receptor circles (TRECs) as biomarkers for de novo T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA)." J Immunol Methods 237.1-2 (2000): 187-97.
- Alanko, S., T. T. Pelliniemi, and T. T. Salmi. "Recovery of blood B-lymphocytes and serum immunoglobulins after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia." Cancer 69.6 (1992): 1481-86.
- Alanko, S., T. T. Pelliniemi, and T. T. Salmi. "Recovery of blood lymphocytes and serum immunoglobulins after treatment of solid tumors in children." Pediatr.Hematol Oncol. 11.1 (1994): 33-45.
- Alanko, S., T. T. Salmi, and T. T. Pelliniemi. "Recovery of blood T-cell subsets after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia." Pediatr.Hematol Oncol. 11.3 (1994): 281-92.
- Alpdogan, O. and M. R. van den Brink. "IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency." Trends Immunol 26.1 (2005): 56-64.
- Bamias, G. et al. "The Th1 immune pathway as a therapeutic target in Crohn's disease." Curr.Opin.Investig.Drugs 4.11 (2003): 1279-86.
- Berridge, M. J. "Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers." Biochem.J 220.2 (1984): 345-60.
- Bolotin, E. et al. "Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count." Bone Marrow Transplant 23.8 (1999): 783-88. Bouma, G. and W. Strober. "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." Nat.Rev.Immunol 3.7 (2003): 521-33.
- Boyman, O. et al. "Cytokines and T-cell homeostasis." Curr.Opin.Immunol 19.3 (2007): 320-26.
- Caver, T. E. et al. "Profound abnormality of the B/T lymphocyte ratio during chemotherapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia." Leukemia 12.4 (1998): 619-22.
- Chalmers, I. M. et al. "Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes." Blood 92.1 (1998): 11-18.
- Chipeta, J. et al. "CD4+ and CD8+ cell cytokine profiles in neonates, older children, and adults: increasing T helper type 1 and T cytotoxic type 1 cell populations with age." Cell Immunol 183.2 (1998): 149-56.

- Donnadieu, E., G. Bismuth, and A. Trautmann. "The intracellular Ca²⁺ concentration optimal for T cell activation is quite different after ionomycin or CD3 stimulation." Pflugers Arch. 429.4 (1995): 546-54.
- Douek, D. C. et al. "Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection." Nature 396.6712 (1998): 690-95.
- Dubois, S. et al. "IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells." Immunity. 17.5 (2002): 537-47.
- Ek, T. et al. "Immune reconstitution after childhood acute lymphoblastic leukemia is most severely affected in the high risk group." Pediatr.Blood Cancer 44.5 (2005): 461-68.
- Erkeller-Yuksel, F. M. et al. "Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations." J Pediatr. 120.2 Pt 1 (1992): 216-22.
- Eyrich, M. et al. "Impaired T-cell activation and cytokine productivity after transplantation of positively selected CD34+ allogeneic hematopoietic stem cells." Hematol J 5.4 (2004): 329-40.
- Eyrich, M. et al. "Onset of thymic recovery and plateau of thymic output are differentially regulated after stem cell transplantation in children." Biol.Blood Marrow Transplant 11.3 (2005): 194-205.
- Fasching, K. et al. "Presence of N regions in the clonotypic DJ rearrangements of the immunoglobulin heavy-chain genes indicates an exquisitely short latency in t(4;11)-positive infant acute lymphoblastic leukemia." Blood 98 (2001): 2272-2274
- Fasching, K. et al. "Presence of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an in utero origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukemia." Blood 95 (2000): 2722-2724
- Fehniger, T. A. and M. A. Caligiuri. "Interleukin 15: biology and relevance to human disease." Blood 97.1 (2001): 14-32.
- Fehniger, T. A. et al. "Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells." J Exp.Med. 193.2 (2001): 219-31.
- Finkelman, F. D. et al. "Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses." Immunol Today 12.3 (1991): A62-A66.
- Fry, T. J. et al. "IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates." Blood 101.6 (2003): 2294-99.
- Gajewski, T. F. and F. W. Fitch. "Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones." J Immunol 140.12 (1988): 4245-52.
- Gardner, E. M. and D. M. Murasko. "Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans." Biogerontology. 3.5 (2002): 271-90.
- Goldsby R.A., Kindt T. J. Osborne B. A. Kuby, Immunology. 4 ed. New York: W.H. Freeman and Company, 200.

- Gorham, J. D. "Transforming growth factor-beta1, Th1 responses, and autoimmune liver disease." Transfusion 45.2 Suppl (2005): 51S-9S.
- Gorski, J. et al. "Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status." J Immunol 152.10 (1994): 5109-19.
- Gray, D. "The dynamics of immunological memory." Semin.Immunol 4.1 (1992): 29-34.
- Greaves M. "A natural history of pediatric acute leukemias." Blood 82 (1993): 1043-1051
- Guo, H. et al. "Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation." Am.J Hematol 75.2 (2004): 78-83.
- Haining, W. N. et al. "Failure to define window of time for autologous tumor vaccination in patients with newly diagnosed or relapsed acute lymphoblastic leukemia." Exp.Hematol 33.3 (2005): 286-94.
- Haining, W. N. et al. "Antigen-specific T-cell memory is preserved in children treated for acute lymphoblastic leukemia." Blood 106.5 (2005): 1749-54.
- Hamilton, J. A. et al. "The critical role of the colony-stimulating factor-1 receptor in the differentiation of myeloblastic leukemia cells." Mol.Cancer Res. 6.3 (2008): 458-67.
- Haynes, B. F. et al. "The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection." Annu.Rev.Immunol 18 (2000): 529-60.
- Hoffmann, F. et al. "Intracellular T-cell cytokine levels are age-dependent in healthy children and adults." Eur.Cytokine Netw. 16.4 (2005): 283-88.
- Houtenbos, I. et al. "Leukemia-derived dendritic cells: towards clinical vaccination protocols in acute myeloid leukemia." Haematologica 91.3 (2006): 348-55.
- Janeway CA, Travers P Walport M Shlomchik M. Immunologie. 5. Auflage ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
- Jung, T. et al. "Detection of intracellular cytokines by flow cytometry." J Immunol Methods 159.1-2 (1993): 197-207.
- Jung, T. et al. "Interleukin-4 and interleukin-5 are rarely co-expressed by human T cells." Eur.J Immunol 25.8 (1995): 2413-16.
- Kerst, G. et al. "Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR." Br.J Haematol. 128.6 (2005): 774-82.
- Kostaridou, S. et al. "Decrease of CD4+ and B-lymphocyte populations is not associated with severe infectious complications in children with acute lymphoblastic leukemia during maintenance." Int.J Hematol 80.4 (2004): 354-60.

- Lehrnbecher, T. et al. "Therapy-induced alterations in host defense in children receiving therapy for cancer." J Pediatr.Hematol Oncol. 19.5 (1997): 399-417.
- Li, L. et al. "Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts." Int.J Oncol. 28.4 (2006): 855-61.
- Lill-Elghanian, D. et al. "Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow." Exp.Biol.Med.(Maywood.) 227.9 (2002): 763-70.
- Locksley, R. M. and P. Scott. "Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function." Immunol Today 12.3 (1991): A58-A61.
- Luczynski, W. et al. "Immunosuppression in childhood acute lymphoblastic leukemia after remission induction therapy concerns B not T lymphocytes." Med.Pediatr.Oncol. 39.2 (2002): 147-48.
- Luczynski, W. et al. "Low expression of costimulatory molecules and mRNA for cytokines are important mechanisms of immunosuppression in acute lymphoblastic leukemia in children?" Neoplasma 53.4 (2006): 301-04.
- Luczynski, W. et al. "[Th1/Th2 balance in acute lymphoblastic leukemia in children]." Przegl.Lek. 61.9 (2004): 919-23.
- Luczynski, W. et al. "[Immunologic monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia during maintenance treatment with regard to co-existing infections]." Wiad.Lek. 57.7-8 (2004): 337-42.
- Mackall, C. L. et al. "Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer." Blood 84.7 (1994): 2221-28.
- Mackall, C. L. et al. "Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy." N.Engl.J Med. 332.3 (1995): 143-49.
- Mackall, C. L. et al. "Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy." Blood 89.10 (1997): 3700-07.
- Magrath, I. T. and R. M. Simon. "Immunosuppression in Burkitt's lymphoma. II. Peripheral blood lymphocyte populations related to clinical status." Int.J Cancer 18.4 (1976): 399-408.
- Martin, F. and J. F. Kearney. "B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets." Curr.Opin.Immunol 13.2 (2001): 195-201.
- Mascher, B. "Intracelluläre Cytokinmessung Mittels Durchflußcytometrie-Untersuchung Der Cytokinproduktion an Lymphozyten Aus Dem Peripheren Blut Und Der Lamina Propria Des Colons Bei Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen." Diss. Medizinische Universität Lübeck , 2000.
- Mascher, B., P. Schlenke, and M. Seyfarth. "Expression and kinetics of cytokines determined by intracellular staining using flow cytometry." J Immunol Methods 223.1 (1999): 115-21.

- Maslanka, K. et al. "Molecular analysis of T cell repertoires. Spectratypes generated by multiplex polymerase chain reaction and evaluated by radioactivity or fluorescence." Hum.Immunol 44.1 (1995): 28-34.
- Masur, H. et al. "CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection." Ann.Intern.Med. 111.3 (1989): 223-31.
- Mazur, B. et al. "Concentration of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in children with acute lymphoblastic leukemia after cessation of chemotherapy." Hematol Oncol. 22.1 (2004): 27-34.
- Mazur, B. et al. "Decreased numbers of CD4+ T lymphocytes in peripheral blood after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia." Leuk.Res. 30.1 (2006): 33-36.
- Misumi Y. et al. "Novel blockade by Brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes." The Journal of Biological Chemistry 261.25 (1989): 11398-403.
- Moritz, B. et al. "Intact T-cell regenerative capacity in childhood acute lymphoblastic leukemia after remission induction therapy." Med.Pediatr.Oncol. 36.2 (2001): 283-89.
- Mosmann, T. R. et al. "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986." J Immunol 175.1 (2005): 5-14.
- Mosmann, T. R. and K. W. Moore. "The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses." Immunol Today 12.3 (1991): A49-A53.
- Prussin, C. and D. D. Metcalfe. "Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies." J Immunol Methods 188.1 (1995): 117-28.
- Romagnani, S. "Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more." Immunol Today 12.8 (1991): 256-57.
- Romagnani, S. "Th1 and Th2 in human diseases." Clin.Immunol Immunopathol. 80.3 Pt 1 (1996): 225-35.
- Rooney, J. W. et al. "A common factor regulates both Th1- and Th2-specific cytokine gene expression." EMBO J 13.3 (1994): 625-33.
- Schofield, R. "The pluripotent stem cell." Clin.Haematol. 8.2 (1979): 221-37.
- Small, T. N. et al. "B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny." Blood 76.8 (1990): 1647-56.
- Steffens, C. M. et al. "Evaluation of thymopoiesis using T cell receptor excision circles (TRECs): differential correlation between adult and pediatric TRECs and naive phenotypes." Clin.Immunol 97.2 (2000): 95-101.

- Street, N. E. and T. R. Mosmann. "Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns." FASEB J 5.2 (1991): 171-77.
- Strender, L. E. et al. "Immunologic monitoring in breast cancer patients receiving postoperative adjuvant chemotherapy." Cancer 48.9 (1981): 1996-2002.
- Thompson, C. and F. Powrie. "Regulatory T cells." Curr.Opin.Pharmacol. 4.4 (2004): 408-14.
- Trinchieri, G. "Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes." Blood 84.12 (1994): 4008-27.
- Troeger, A. et al. "Survivin and its prognostic significance in pediatric acute B-cell precursor lymphoblastic leukemia." Haematologica 92.8 (2007): 1043-50.
- Truneh, A. et al. "Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester." Nature 313.6000 (1985): 318-20.
- Van Wering, E. R. et al. "Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: implications for monitoring of minimal residual disease." Br.J Haematol. 110.1 (2000): 139-46.
- Vikingsson, A., K. Pederson, and D. Muller. "Enumeration of IFN-gamma producing lymphocytes by flow cytometry and correlation with quantitative measurement of IFN-gamma." J Immunol Methods 173.2 (1994): 219-28.
- Vitetta, E. S. et al. "Memory B and T cells." Annu.Rev.Immunol 9 (1991): 193-217.
- Voetberg, B. J. et al. "Apoptosis accompanies a change in the phenotypic distribution and functional capacity of murine bone marrow B-cells chronically exposed to prednisolone." Clin.Immunol Immunopathol. 71.2 (1994): 190-98.
- Waldmann, T. A. "IL-15 in the life and death of lymphocytes: immunotherapeutic implications." Trends Mol.Med. 9.12 (2003): 517-21.
- Weller, S. et al. "Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire." Blood 104.12 (2004): 3647-54.
- Wiegering, V, Eyrich M, Wunder C, Günther H, Schlegel PG, Winkler B. Age-related changes in intracellular cytokine expression in healthy children. Eur Cytokine Netw. 20(2) (2009):75-80.
- Zhang, X. L. et al. "Intracellular cytokine profile of T cells from children with acute lymphoblastic leukemia." Cancer Immunol Immunother. 49.3 (2000): 165-72.

Verzeichnis eigener Veröffentlichungen

9.1 Originalarbeiten

- Wiegering V, Kellenberger C, Bodmer N, Bergstraesser E, Niggli F, Grotzer M, Nadal D, Bourquin JP. Conservative management of acute appendicitis in children with hematologic malignancies during chemotherapy-induced neutropenia. J Pediatr Hematol Oncol 2008; 30 (6): 464-467.
- Wiegering V, Morbach H, Dick A, Girschick HJ. Crohn's disease during etanercept therapy in juvenile idiopathic arthritis: a case report and review of the literature. Rheumatol Int. 2009 Jun 9, ahead of print
- Wiegering V, Eyrich M, Wunder C, Günther H, Schlegel PG, Winkler B. Age-related changes in intracellular cytokine expression in healthy children. Eur Cytokine Netw. 2009 Jun;20(2):75-80.

9.2 Abstract

- Wiegering V, Winkler B, Eyrich M and Schlegel PG. Lymphocyte subsets, cytokines and immunoglobulins during ALL-induction therapy. Immunobiology 2005; 210: 423-424
- Wiegering V. Autologe Knochenmarkstransplantation: Immunmonitoring bei Kindern nach Stammzell-Transplantation. Promomed Würzburg 2005
- Wiegering V, Winkler B, Eyrich M and Schlegel PG. A prospective comparison of immune reconstitution after autologous haematopoietic stem cell transplantation in children. BMT 2006; 37:329
- Winkler B, Wiegering V, Eyrich M and Schlegel PG. Prospektive Untersuchung zur Immunreconstitution nach Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation. Klin. Pädiatr. 2006;
- Eyrich M, Wiegering V, Winkler B, Schlegel PG. Immunfunktion unter ALL-Therapie-prospektive Untersuchungen an 23 Kindern. Klin. Pädiatr. 2007; 219: 104
- Wiegering V, Schlegel PG, Eyrich M, Winkler B. Changes in the Immune Functions during ALL Induction Therapy - Prospective Immune Monitoring in 23 Children. Blood November 2006; 108:4519

Verzeichnis eigener Veröffentlichungen

- Wiegering V, Eyrich M, Schlegel PG, Winkler B. Differences in Immune Reconstitution and Cytokine Production in Children with Sibling Donor BMT Versus T-Cell Depleted PBSCT from Unrelated or Mismatched Family Donors. Blood November 2006; 108:2916
- Wiegering V, Balling G, Wirbelauer J, Sturm A, Steigerwald U, Girschick HJ. Postvaricella disseminated intravascular coagulation and transient protein S deficiency in an otherwise healthy 6-year-old boy: a case report. GKJR 2008, 42
- Wiegering V, Morbach H, Dick A, Girschick HJ. Development of crohn´s disease during etanercept therapy for juvenile idiopathic polyarthritis in an eleven year-old girl. GKJR 2008, 43
- Wiegering V, Hack A, Morbach H, Beer M, Girschick HJ. Pulmonale Raumforderung mit eosinophiler Entzündungsreaktion – Erstmanifestation eines M. Wegener bei einer 15jährigen Patientin. GKJR 2008, 43

Danksagung

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Stammzell-Labor der Kinderklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Professor Dr. P.-G. Schlegel angefertigt. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank für das interessante Thema dieser Doktorarbeit, für die Möglichkeit in einem gutem Labor mit einem netten Team zusammenarbeiten zu können, des weiteren für die Gelegenheit meine Arbeit auf Kongressen vorstellen und als Erstautorin zu veröffentlichen.

Für die Möglichkeit an der Universitätskinderklinik zu promovieren, möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. C. P. Speer, dem Direktor der Klinik, herzlich bedanken.

Die Arbeit wäre in dieser Form nicht möglich gewesen, wenn es nicht meine Betreuer Frau Dr. Beate Winkler und Herrn PD Dr. Matthias Eyrich gegeben hätte, die trotz fordernden Klinikalltag immer wieder Zeit für mich fanden, große Geduld mit mir hatten und stets offen für alle Fragen und Ideen waren. Danke!!!

Den Stationen Kinder-KMT, Regenbogen und der onkologischen Tagesklinik gilt mein Dank für das „daran Denken“ und Abnehmen zahlreicher Blutproben ohne die, die die Untersuchungen nicht möglich gewesen wären.

Zwei medizinisch-technische Assistentinnen haben mir bei der Erstellung meiner Ergebnisse sehr geholfen: Heidi Tscherner führte mich ganz am Anfang in die Geheimnisse der Laborarbeit ein, brachte mir immer sehr viel Geduld entgegen, auch in Zeiten, in denen manchmal nicht alles wie gewünscht klappte und erheiterte durch mütterliche und alltägliche Ratschläge unsere Zusammenarbeit. Birgit Vahsel hat zahlreiche Labortage mit mir verbracht und unzählige Immunstaten und Cytokinpanel für mich mit pipettiert – vielen Dank!

Der evangelischen Studienstiftung Villigst danke ich für die finanzielle und ideelle Unterstützung während des Studiums, welche mir ermöglichte eine zeitintensive Doktorarbeit anzunehmen.

Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei meinen Freunden, insbesondere bei Catharina Groß, die mir durch viele Vorlesungsmitschriften das parallele Studium ermöglichten und immer wieder viel Verständnis für meine Laborarbeit und –geschichten entgegenbrachten; außerdem bin ich meinem Freund Armin Strauß zu tiefen Dank verpflichtet, der oft unsere kostbare, gemeinsame Zeit mit dem Labor teilen musste und mich trotzdem stets in der Arbeit unterstützte – vielen Dank!

Zuletzt und ganz besonders herzlich danke ich meinen Eltern für die Möglichkeit, Medizin zu studieren und diese Doktorarbeit anzunehmen. Dass sie mich trotz elterlicher Sorge, meinen eigenen Weg gehen ließen. Es war sicher nicht immer einfach zu verstehen, dass in der medizinischen Forschung Vieles viel Zeit braucht und Gelingen und Misslingen oft unberechenbar sind.

Die vorliegende Arbeit zeigt nur ein Ausschnitt aus meiner Laborarbeit, manches ist offen geblieben. Gelernt habe ich: Es ist wichtig, dass man nicht aufhört zu fragen (Albert Einstein).