

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

**Prädiktive Relevanz regulatorischer T-Zellsubpopulationen nach Stimulation mit
dendritischen Zellen leukämischer Abstammung für die antileukämische
T-Zellantwort**

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

vorgelegt von
Julia Schick

aus
Böblingen

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Torsten Haferlach
Priv. Doz. Dr. Christian Ries

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

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2014

INHALTSVERZEICHNIS

1 Abstract	1
2 Zusammenfassung	2
3 Einleitung	3
3.1 Hämatologische Stammzellerkrankungen.....	3
3.1.1 Diagnostik und Klassifikation.....	3
3.1.2 Prognose	6
3.1.3 Therapie.....	6
3.2 GVHD und GVL.....	7
3.3 Regulatorische Immunmechanismen	8
3.3.1 Regulatorische T-Zellen (T _{reg})	9
3.3.2 T _{reg} Marker	10
3.3.3 T _{reg} Funktionsmechanismen.....	11
3.3.4 Subpopulationen.....	13
4 Zielsetzung dieser Arbeit	14
5 Material und Methodik	15
5.1 Probengewinnung.....	15
5.2 Patientencharakteristik und Diagnostik.....	15
5.3 DC-Generierung	17
5.4 Gemischte Lymphozytenkultur (MLC).....	20
5.5 Zellcharakterisierung mittels Durchflusszytometrie	21
5.6 Fluorolyse Zytotoxizitätsassay	24
5.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse	25
6 Ergebnisse	26
6.1 Die Profile der unstimulierten T-Zellen von AML-Patienten verglichen mit gesunden Probanden	26

6.1.1	AML-Patienten zeigen vor ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation signifikant niedrigere Werte an CD127 ⁺ CD4 ⁺ und CD127 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	26
6.1.2	AML-Patienten zeigen vor ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation signifikant höhere Werte bestimmter T _{reg} -Untergruppen	27
6.2	Vergleich der Profile der ‘MNC’- oder ‘DC’-stimulierten T-Zellen nach 7 Tagen Kultivierung in der MLC zwischen AML-Patienten und gesunden Probanden.....	30
6.2.1	AML-Patienten zeigen nach ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation signifikant niedrigere Werte an CD127 ⁺ CD4 ⁺ und CD127 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	30
6.2.2	AML-Patienten zeigen nach ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation signifikant höhere Werte an T _{cm reg} und T _{eff/em reg}	30
6.3	Die kinetischen Profile der Expression der T-Zell-Oberflächenmarker im Zeitverlauf nach ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation (Tag 0 bis Tag7).....	33
6.3.1	Die Expressionsprofile der Aktivierungs- und Proliferationsmarker sind bei AML-Patienten und gesunden Probanden vergleichbar	33
6.3.2	AML-Patienten und gesunde Probanden zeigen einen kontinuierlichen Anstieg der T _{reg} -Untergruppen.....	34
6.4	Korrelation der T-Zell-Expressionsprofile mit der antileukämischen Funktion von ‘MNC’-, ‘DC’- oder unstimulierten T-Zellen bei AML-Patienten	37
6.4.1	T-Zell-Profile vor ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation (Tag 0) bei AML-Patienten	38
6.4.2	T-Zell-Profile nach ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation bei AML-Patienten	39
6.5	Cut-off-Werte der T _{reg} -Subpopulationen sind prädiktiv für die antileukämische Reaktivität von unstimulierten sowie von ‘DC’-stimulierten T-Zellen.....	42
7	Diskussion	45
8	Ausblick.....	52
9	Danksagung.....	53
10	Publikationsverzeichnis.....	54

11 Literaturverzeichnis	56
--------------------------------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
CD	Cluster of differentiation
CMML	chronisch myelomonozytäre Leukämie
DC	dendritische Zellen
DCleu	dendritische Zellen leukämischer Abstammung
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
FAB-Klassifikation	French-American-British-Klassifikation
FACS	fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FasL	Fas Ligand= transembraner Todesrezeptor der zur Rezeptorfamilie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) gehört
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLT3	fms-like Tyrosinkinase 3
FOXP3	Forkhead-Box- Protein P3
GM-CSF	Granulozyten und Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GVHD	Graft-versus-Host Disease
GVL	Graft-versus-Leukemia Effekt
HLA	humane Leukozyten Antigen
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
IL-4	Interleukin 4
IL-10	Interleukin 10
KMT	Knochenmarkstransplantation
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MLC	gemischte Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte culture)

Abkürzungsverzeichnis

MNC	mononukleäre Zellen
Mo ABS	monoklonale Maus-Antikörper
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphat gepufferte Lösung
PBSZT	Stammzelltransplantation aus dem peripheren Blut
PC7	Phycoerythrin- Cyanine 7
PE	Phycoerythrin
PGE-2	Prostaglandin E2
sAML	sekundäre akute myeloische Leukämie
SZT	Stammzelltransplantation
TGF- β	transforming growth factor β
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Abstract

Regulatory T-cells (T_{reg}) are important regulators of immune responses. In AML patients before/after immunotherapy (stem-cell-transplantation (SZT) or donor-lymphocyte-infusion (DLI)) their suppressive role can contribute to suppress severe graft-versus-host-reactions (GVHD), but also to impair antileukemic reactions.

Aim: Since leukemia-derived dendritic-cells (DC_{leu}) are known to improve antileukemic functionality of T-cells we evaluated the composition and development of distinct T_{reg} -subtypes in AML-pts (n=12) compared to healthy probands (n=5) under unstimulated conditions and during stimulation with DC_{leu} -containing DC ('DC') or blast-containing mononuclear cells ('MNC') in 0-7 days mixed lymphocyte cultures (MLC) by flowcytometry. T-cell-subgroups in AML pts were correlated with antileukemic functionality before and after 'DC' or 'MNC' stimulation by functional fluorolysis-assays.

Results: **1.** AML-pts' T-cells presented with significantly higher frequencies of T_{reg} -subgroups in unstimulated T-cells compared to healthy probands. **2.** After 7 days of 'DC' or 'MNC'-stimulation all T_{reg} -subtypes generally increased; significantly higher frequencies of T_{reg} -subtypes were still found in AML-pts. **3.** Antileukemic cytotoxicity was achieved in 36% of T-cells after 'MNC'- compared to 64% after 'DC'-stimulation. Antileukemic activity after 'DC' *but not* after 'MNC'-stimulation correlated with significantly lower frequencies of T_{reg} -subtypes ($CD8^+ T_{reg}/T_{eff/em reg}$). Furthermore, cut-off-values for T_{reg} subpopulations could be defined allowing a prediction of antileukemic response.

Conclusion: We demonstrate a crucial role of special T_{reg} -subtypes in the mediation of antileukemic functionality. High $CD8^+ T_{reg}$, $T_{eff/em reg}$ and $CD39^+$ T-Zellen clearly correlated with reduced antileukemic activity of T-cells. 'DC' stimulation of T-cells contributes to overcome impaired antileukemic T-cell-reactivity. Refined analyses in the context of clinical responses to immunotherapy and GVHD reactions are required.

2 Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind wichtige Regulatoren von Immunantworten. Bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), welche vor oder nach einer Stammzelltransplantation (SZT) oder Erhalt von Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) stehen, können T_{reg} einerseits dazu beitragen schwere Graft-versus-Host- Reaktionen (GVHD) zu unterdrücken, andererseits können sie jedoch die gewünschte antileukämische Antwort mindern.

Dendritische Zellen sind als antigenpräsentierende Zellen in der Lage, T-Zellen und somit Immunantworten zu stimulieren. Es ist bekannt, dass dendritische Zellen aus leukämischen Blasten (DC_{leu}) generiert werden können und diese DC_{leu} die antileukämische T-Zellantwort verbessern [1]. Unklar in diesem Zusammenhang, und somit Ziel dieser Arbeit, ist die genaue Zusammensetzung und kinetische Entwicklung von verschiedenen T_{reg} Untergruppen bei AML Patienten unter Stimulation mit DC_{leu} . Hierzu wurden die T_{reg} Untergruppen von 12 AML Patienten mit 5 gesunden Probanden unter unstimulierten Bedingungen und während der siebentägigen Stimulation verglichen. Die T-Zell-Stimulation wurde einerseits mit dendritischen Zellen, welche DC_{leu} enthielten, andererseits mit mononukleären Zellen, welche bei den AML Patienten auch leukämischen Blasten enthielten, in einer gemischten Lymphozyten Kultur (MLC) durchgeführt. Die T-Zell-Analysen erfolgten mittels Durchflusszytometrie. Zuletzt wurde bei den AML Patienten die antileukämische T-Zell-Funktionalität mit unstimulierten sowie ‚DC‘- oder ‚MNC‘- stimulierten Bedingungen anhand eines funktionellen Fluorolyse Zytotoxizitätsassay korreliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass AML Patienten unter unstimulierten Bedingungen signifikant höhere Anteile von T_{reg} Untergruppen aufwiesen als die gesunden Probanden. Nach der siebentägigen Stimulation mit ‚DC‘ oder ‚MNC‘ konnte ein genereller Anstieg der verschiedenen T_{reg} Untergruppen nachgewiesen werden. AML Patienten zeigten auch nach

Stimulation weiterhin signifikant höhere Anteile an T_{reg} als die gesunden Probanden. Eine antileukämische, zytotoxische T-Zell-Antwort wurde bei 36% der Patienten nach ‚MNC‘ Stimulation sowie bei 64% nach ‚DC‘ Stimulation erreicht. Die antileukämische Aktivität korrelierte nach ‚DC‘ Stimulation, jedoch *nicht* nach ‚MNC‘ Stimulation mit signifikant niedrigeren Anteile an T_{reg} Untergruppen, insbesondere der $CD8^+$ T_{reg} und der $T_{eff/em\ reg}$. Des Weiteren konnten erstmalig Cut-off-Werte für die T_{reg} Untergruppen definiert werden, welche eine prädiktive Aussage über die antileukämische T-Zellantwort zulassen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit die wichtige Rolle einzelner T_{reg} Untergruppen bei der Vermittlung spezifischer antileukämischer T-Zell-Antworten. Hohe Anteile an $CD8^+$ T_{reg} oder $T_{eff/em\ reg}$ oder $CD39^+$ T-Zellen korrelieren mit einer verminderten antileukämischen T-Zell-Aktivität. Die T-Zell-Stimulation mit DC_{leu} kann bei AML Patienten dazu beitragen, die verminderte antileukämische T-Zell-Aktivität zu verbessern.

3 Einleitung

3.1 Hämatologische Stammzellenerkrankungen

3.1.1 Diagnostik und Klassifikation

Die akute myeloische Leukämie sowie das myelodysplastische Syndrom sind klonale Erkrankungen hämatopoetischer Stammzellen, welche durch einen Verlust der Zelldifferenzierung und konsekutiv ineffektiver Myelopoese gekennzeichnet sind [2]. Die Diagnose der AML oder des MDS wird anhand von Knochenmarksbiopsien und anschließend weitergehenden Untersuchungen wie die Zytomorphologie, Immunphänotypisierung und Zytogenetik mit Molekulargenetik gestellt. Ergänzend zum zytomorphologischen Ausstrich werden durch die Immunphänotypisierung Oberflächenmoleküle der Blasten nachgewiesen, wodurch Zellreihe und Zellreifungsstadium näher bestimmt werden. Durch zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen können zudem bestimmte Chromosomenaberrationen sowie Genmutationen nachgewiesen werden. Auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen beruhend, werden nach den Kriterien der French-American-British Cooperative Group (FAB) oder der Weltgesundheitsorganisation (WHO) die AML und das MDS näher klassifiziert.

Für das MDS wurde erstmals 1982 durch die FAB eine Klassifikation erstellt, welche fünf Kategorien enthielt und sich nach zellmorphologischen Charakteristika wie dem Nachweis von Auerstäbchen oder Ringsideroblasten, dem Blastenanteil im Knochenmark und peripheren Blut sowie dem absoluten Anteil an Monozyten richtete [3]. 2001 wurde durch die WHO eine neue, weiterentwickelte Klassifikation des MDS eingeführt, welche als Grenzwert zur Abgrenzung gegenüber der AML einen Blastenanteil im Knochenmark von maximal 20% definierte. Zudem wurde der Nachweis zytogenetischer Anomalien als eigenständiger prognostischer Faktor in die Klassifikation aufgenommen. Als wichtigste prädiktive Faktoren für die Entwicklung einer AML gelten der initiale Karyotyp, wobei hier vor allem ein

komplex veränderter Karyotyp oder Chromosom-7 Veränderungen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer sekundären AML aufweisen. Ebenso erhöht sich mit steigendem initialen medullären Blastenanteil das Risiko der Ausbildung einer AML und verschlechtert sich die Prognose [4]. In 20-30% der MDS-Fälle kommt es zur Entwicklung einer sekundären AML mit einem medullären Blastenanteil von >20%.

Die 1976 erstmals erstellte Einteilung der FAB unterteilte die AML in sechs verschiedene Untergruppen (M1-M6 [5]). Sie unterteilte anhand zellmorphologischer Charakteristika nach zugehöriger Zellreihe und Ausreifungsstadium der Blasten. Durch weiterführende Diagnostik wie die Immunphänotypisierung, wodurch M0 und M7 nachweisbar wurden, erfolgten mehrere Neuerungen der ursprünglichen Fassung von 1976. Doch erst die WHO Klassifikation 2001 berücksichtigt neben der Zytomorphologie auch Zytogenetik und Molekulargenetik.

FAB-Subtyp	Morphologie	Zytochemie	Zytogenetik
M0 AML mit minimaler Differenzierung	Myeloblasten ohne Granula	Esterase -	
M1 AML ohne Ausreifung	Myeloblasten ohne Granula	>3% POX, Esterase -	t(9;22)
M2 AML mit Ausreifung	Myeloblasten mit Granula, einzelne Myelozyten	POX++, Esterase -	t(8;21)
M3 akute Promyelozytenleukämie	Promyelozyten	POX+++, Esterase+/-	t(15;17)
M4 akute myelomonozytäre Leukämie	Myeloblasten und Promyelozyten>20%	POX++, Esterase ++	inv/del(16) bei M4eo
M5a akute Monoblastenleukämie ohne Ausreifung	Monoblasten	POX+, Esterase +++	t/del(11)
M5b akute Monoblastenleukämie mit Ausreifung	Monoblasten, Promonozyten, Monozytose im peripheren Blut		t(8;16)
M6 akute Erythroleukämie	megaloblastäre Erythroblasten >50%	POX+/-, Esterase -	
M7 akute Megakaryoblastenleukämie	Megakaryoblasten	POX- Esterase +/-	

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML mit den häufigen zytogenetischen Abberationen, definitionsgemäß Blasten $\geq 30\%$, POX= Peroxidase
(Quelle: http://www.med.uni-giessen.de/akkk/gtds./grafisch/doku/klein_klassifikationen.pdf
<http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52362/>, abgerufen 16.01.2014)

3.1.2 Prognose

Sowohl die AML als auch das MDS sind Erkrankungen, welche vor allem ältere Patienten betreffen. So liegt das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung für AML-Patienten bei > 65 Jahren [6, 7]. Die Prognose der Erkrankung verschlechtert sich mit Zunahme des Alters der Patienten: So kann durch intensive Chemotherapie bei circa 70-80% der Patienten <60 Jahren eine komplette Remission erzielt werden, wohingegen älteren Patienten nur in 40-60% eine komplette Remission erreichen. Selbst nach Erreichen einer kompletten Remission liegt das Langzeitüberleben für ältere Patienten (>60 Jahre) auf Grund höherer Rezidivraten oder der höheren Rate an therapiebedingter Mortalität nur bei etwa 10 % [7].

3.1.3 Therapie

Das Ziel der Chemotherapie ist das Erreichen einer kompletten Remission, welche definitionsgemäß bei einem medullären Blastenanteil von < 5% sowie 0% Blasten im peripheren Blut vorliegt. Nach Erreichen einer kompletten Remission durch die Induktionstherapie schließen sich Erhaltungstherapien zur Remissionserhalten an. Dies kann in Form von Konsolidierungs-Chemotherapien oder niedrig-dosierten, längerfristigen Erhaltung-Chemotherapien stattfinden. Vor allem bei Hochrisikopatienten, welche auf Grund bestimmter zytogenetischer Anomalien identifiziert werden und mit einer hohen Rezidivrate einhergehen, wird zusätzlich nach der Chemotherapie zur Remissionserhaltung die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) angewandt [8]. Darüber hinaus ist die HSZT bei Patienten mit Rezidiv nach klassischer Chemotherapie sowie im Falle von Therapierefraktion auf die Induktionschemotherapie indiziert [9]. Die hämatopoetischen Stammzelltransplantationen können durch Entnahme von Stammzellen aus dem Knochenmark (KMT) oder nach Mobilisierung aus dem peripheren Blut (PBSZT) erfolgen. Die Therapieoption der HSZT ist hauptsächlich auf jüngere Patienten beschränkt. Die Limitation der HSZT bei älteren Patienten liegt vor allem in dem höheren Morbiditäts- und

therapieassoziierten Mortalitätsrisikos auf Grund infektiöser Komplikationen im Rahmen der therapiebedingten Immunsuppression sowie der gefürchteten Transplantat-gegen-Wirt-Immunreaktionen (Graft-versus-Host disease, GVHD).

3.2 GVHD und GVL

Bei der GVHD kommt es zu einer Immunreaktion der Spender T-Zellen gegen die fremden Empfängerzellen. Das wichtigste Oberflächenprotein ist dabei das humane Leukozyten Antigen (HLA), welches einen großen Polymorphismus zwischen den Individuen aufweist. Das Risiko des Auftretens einer GVHD nach Stammzelltransplantation korreliert daher direkt mit dem Grad des Übereinstimmens der HLA Antigene zwischen Spender und Empfänger. Klinisch wird grob zwischen einer akuten und chronischen GVHD-Reaktion unterschieden, wobei es Überlappungssyndrome und auch die spät-einsetzende akute GVHD-Reaktion gibt, welche erst nach 100 Tagen ab Transplantation auftritt. Symptome der akuten GVHD betreffen vor allem die Haut, den Gastrointestinaltrakt sowie die Leber. Die Haut ist am häufigsten betroffen und zumeist auch das Organ welches zuerst beim Auftreten einer GVHD involviert ist. Die typischen Symptome reichen von makulopapulösen Exanthenen über Diarrhö bis hin zu akutem Leberversagen [10]. Die Schwere der akuten GVHD wird in vier Grade (I-IV) eingeteilt, wobei Grad IV mit einem Gesamtüberleben von 5% immer noch eine äußerst schlechte Prognose aufweist [11]. Die Inzidenz der akuten GVHD korreliert direkt mit dem Grad des Mismatches der HLA zwischen Spender und Empfänger [12, 13]. Eine GVHD entsteht jedoch trotz HLA-identischer Transplantation bei bis zu 40% der Empfänger, auf Grund genetischer Unterschiede, welche außerhalb des HLA Genlokus liegen und den sogenannten „minor histocompatibility antigens“ zugeordnet werden. Diese Oberflächenantigene werden auf allen Zelloberflächen exprimiert und sind Angriffspunkt sowohl für GVHD als auch für den Graft-versus-Leukemia Effekt (GVL) [14]. Beim GVL richten sich die übertragenen fremden Spenderzellen gegen die körpereigenen Tumorzellen.

Dieser gewünschte Effekt ist Grundlage für die Gabe von Lymphozyten des Stammzellspenders (DLI = Donor-Lymphozyten-Infusionen). Sie kommt entweder präventiv bei Hochrisikopatienten zur Rezidivprophylaxe, oder im Falle eines Rezidives nach SZT zur Anwendung. Mit der DLI-Gabe kann ein Rückfall erfolgreich bekämpft werden, jedoch immer verbunden mit dem Risiko der Entwicklung einer GVHD [15].

3.3 Regulatorische Immunmechanismen

Heutzutage sind verschiedene lösliche sowie zelluläre Faktoren bekannt, welche einer überschießenden Immunantwort im gesunden Organismus entgegenwirken. Bei Tumorpatienten kann es jedoch auf Grund unbalancierter regulierender Immunmechanismen trotz Vorhandensein von Tumorantigenen zu einer Immuntoleranz der Tumorzellen kommen, was als Immune-Escape bezeichnet wird [16]. So kann es beispielsweise leukämischen Blasten gelingen der Überwachung des Immunsystems zu entkommen und sich unkontrolliert zu vermehren. Grundlage dieses Phänomens sind sowohl zelluläre als auch über lösliche Faktoren vermittelte Mechanismen: Tumorzellen können über eine Downregulation der Oberflächenmolekülexpression von HLA Klasse I Molekülen auf der Zellmembran [17], oder durch deren defekte intrazelluläre Antigen-Prozessierung und somit konsekutiv fehlerhaften Oberflächenantigenexpression einer Eliminierung der Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen entkommen [18]. Die Downregulation von HLA Klasse I Molekülen als Grund für eine verminderte oder ineffiziente Immunantwort gegen Tumorzellen wurde erstmals in Tiermodellen und später auch bei verschiedenen menschlichen Tumorerkrankungen gezeigt [19].

Ein weiterer Escape-Mechanismus beruht auf einer Störung im System der Todesrezeptoren, dem sogenannten Fas/FasL-System. Zytotoxische T-Zellen exprimieren, wie alle anderen Zellen, auf ihrer Zelloberfläche das Molekül Fas. Bindet Fas an seinen passenden Rezeptor,

den Fas Liganden (FasL), welcher eigentlich nur von Immunzellen exprimiert wird um der Zellhomöostase zu dienen, kommt es zum programmierten Zelltod der Fas-exprimierenden Zellen. Tumorzellen nutzen diesen Mechanismus um sich dem Angriff zytotoxischer T-Zellen entziehen zu können, indem sie durch ihre Oberflächenexpression von FasL eine Apoptose der zytotoxischen T-Zellen induzieren.

Auch die lokale Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie Interleukin 10 (IL-10) oder transforming growth factor β (TGF- β), löslicher nicht oberflächengebundener FasL oder 4-1BBL durch dendritische Zellen (DC), T-Zellen oder Tumorzellen, führt auf Grund einer insuffizienten T-Zellstimulation in diesem inhibitorischen Mikromilieu zu einer Limitation einer effizienten Immunantwort [20].

Auf zellulärer Ebene existieren in Form von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) weitere immunmodellierende/regulierende Mechanismen. Bei verschiedenen Tumorerkrankungen konnte das Vorkommen eines erhöhten Anteils an T_{reg} nachgewiesen werden.

3.3.1 Regulatorische T-Zellen (T_{reg})

Klassischerweise unterteilt man die heterogene Gruppe der T_{reg} in die natürlich vorkommenden T_{reg} (nT_{reg}), welche im Thymus entstehen und klassischerweise die leichte Kette des IL-2 Rezeptor stark exprimieren ($CD25^{++}$) und positiv für den intrazellulären Transkriptionsfaktor Forkhead Box Protein 3 ($FOXP3^+$) sind und die induzierten T_{reg} (iT_{reg}), welche durch eine periphere Aktivierung im Rahmen einer Antigenstimulation erst im Laufe der erworbenen Immunität entstehen [21]. Die nT_{reg} sind streng auf die $CD4^+$ T-Zellen begrenzt und machen etwa 1-2% der gesamten peripher zirkulierenden Blutzellen aus, während die iT_{reg} sowohl bei den $CD4^+$ T-Zellen als auch bei den $CD8^+$ T-Zellen vorkommen können [22]. Aus klinischer Sicht sind die T_{reg} ein zweischneidiges Schwert: Einerseits erhalten T_{reg} physiologischerweise die periphere Immuntoleranz aufrecht und sind dadurch fähig den Organismus vor einer überschießenden Immunantwort in Form von Allergien oder

autoaggressiven Reaktionen wie Autoimmunerkrankungen oder Graft-versus-Host Erkrankung (GVHD) im Rahmen von Transplantationen zu schützen [23-26]. Beispielsweise konnte bei Menschen, welche unter dem IPEX-Syndrom (Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomal vererbt) leiden, eine Mutation im für FOXP3 kodierenden Gen nachgewiesen werden. Diese Genmutation führt zu einer insuffizienten Funktion der T_{reg} und äußert sich klinisch in einer schweren entzündlichen Autoimmunerkrankung [27, 28]. Andererseits können ein erhöhter Anteil an T_{reg} eine effektive antitumoröse T-Zellantwort bei Tumorerkrankungen abschwächen oder gar verhindern [29-31]. So ließen sich bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie erhöhte Anzahlen an T_{reg} im peripheren Blut nachweisen. Aber auch bei soliden Tumorerkrankungen wie z.B. dem Kolonkarzinom oder dem malignen Melanom konnte dies gezeigt werden.

3.3.2 T_{reg} Marker

In den letzten Jahren wurden unzählige Versuche unternommen, um T_{reg} spezifische Zellmarker zu identifizieren und somit auch den genauen Mechanismus der T_{reg} näher zu beleuchten. Ursprünglich entstand die Theorie des Vorkommens suppressiv wirkender T-Zellen schon früh, bereits in den 1970er Jahren. Damals wurde diese Zellpopulation den $CD8^+$ T-Zellen zugeordnet und als Suppressor T-Zellen deklariert. Auf Grund fehlender Nachweismöglichkeiten, wurde dieses Modell wieder verlassen. Anfang der 1990er erlebte diese Theorie mit dem Nachweis von $CD4^+CD25^{++}$ T-Zellen durch Sakaguchi ein Revival [32]. Mit der Entdeckung des Transkriptionsfaktors FOXP3 wurde ein spezifischerer Marker für T_{reg} entdeckt. Darüber hinaus konnte für diesen Transkriptionsfaktor eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Funktionsausübung für T_{reg} nachgewiesen werden [33, 34]. Im Laufe der Zeit wurden zusätzliche Oberflächenmarker wie CTLA-4 (CD152), LAG-3, CD39, CD73 und der niedrig exprimierte IL-7 Rezeptor ($CD127^{low}$) auf T_{reg} nachgewiesen und dienten somit dem verbesserten Nachweis dieser Zellpopulation. Nichtsdestotrotz ist allen T_{reg} Markern ein

Nachteil gemein. Alle aktuell existierenden T_{reg} Marker sind nicht zu 100% spezifisch für T_{reg} , da sie potentiell auch im Rahmen einer allgemeinen Aktivierung der humanen $CD4^+$ T-Zellen unspezifisch auf deren Zelloberfläche hochreguliert werden können [35].

3.3.3 T_{reg} Funktionsmechanismen

Bezüglich der genaueren Funktionsausübung der T_{reg} , bestehen aktuell vier verschiedene Funktionsmodelle, welche 2008 in dem Übersichtsartikel von Vignali et al zusammenfassend dargestellt wurden. T_{reg} können ihre suppressive Funktion über die Sekretion inhibitorischer Zytokine wie z.B. TGF- β , IL-35 und IL-10 ausüben [36-38] (**siehe Abb. 1a**). Für TGF- β , welches membrangebunden auch auf den T_{reg} vorkommt und für die Funktion von natürlich vorkommenden T_{reg} wichtig zu sein scheint, konnte nachgewiesen werden, dass dessen vollständig inhibitorische Funktion über einen direkten Zellkontakt stattfindet [39]. Ein weiterer Mechanismus besteht in der Fähigkeit zur Granzym-A oder -B abhängigen Zytolyse (**siehe Abb. 1b**). Die Granzyme, eine Art Serin-Proteasen, gelangen durch Kanäle in der Zellmembran, die sogenannten Perforine ins Zellinnere der Zielzellen und führen über Proteolysen wichtiger Zellstrukturen zur Apoptose der Zielzellen. Lange galt dieser Mechanismus des gesteuerten Zelluntergangs den NK-Zellen und den zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen vorbehalten [40]. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass auch $CD4^+$ T_{reg} über den Granzym-abhängigen Weg Suppression ausüben [41]. Der dritte Suppressionsmechanismus der T_{reg} wird unter dem Begriff des „metabolischen Entzugs“ zusammengefasst (**siehe Abb. 1c**). Dabei kommt es auf Grund des hohen Expressionslevels von $CD25^+$, dem membrangebunden IL-2 Rezeptor auf den T_{reg} zur lokalen Bindung und somit einem effektiven Entzug von freiem IL-2, welches zum Zellüberleben der Zielzellen notwendig ist. Folglich kommt es zum Zelluntergang der Zielzellen. Extrazelluläre Monoadenosine üben ihre suppressive Wirkung über die Bindung an den Adenosinrezeptor 2A der Effektor -T-Zellen aus. T_{reg} besitzen die Ektoenzyme ekto-ATP-Diphosphorylase $CD39^+$ und die ekto-5'-

Nukleotidase $CD73^+$, welche den Abbau von Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) in die suppressiv wirkenden Monoadenosine katalysieren und somit eine inhibitorische Umgebung schaffen [42, 43]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Monoadenosine nicht nur die Funktion der Effektor-T-Zellen inhibiert, sondern zudem zur Generierung induzierter T_{reg} , welche zur Sekretion von TGF β angeregt werden, führt [44]. T_{reg} können zudem direkt die Effektor -T-Zellen inhibieren, indem sie über direkten Zellkontakt via Gap junctions den stark inhibitorischen second messenger cAMP in die Zielzellen einbringen [45].

Ein weiterer Suppressionsmechanismus erfolgt über die Modulation von Reifung und Funktion dendritischer Zellen (**siehe Abb. 1d**). T_{reg} führen hierbei indirekt über die Inhibition von Reifung und Funktion der DC, welche für die Aktivierung der Effektor-T-Zellen unabdingbar sind, zur Immunsuppression. Über das von T_{reg} konstitutiv exprimierte Oberflächenmolekül „zytotoxisches T- Lymphozytenantigen 4“ (CTLA4=CD154+) üben T_{reg} ihre inhibitorische Wirkung auf DC aus [46, 47]. Über die Interaktion von CTLA4 mit CD80/CD86 können T_{reg} DC zur Bildung von Indolamin2, 3-Dioxygenase (IDO) anregen, welches als potentes inhibitorisches Molekül zur Bildung pro-apoptotischer Metaboliten führt [48, 49]. Darüber hinaus können T_{reg} die Expression von den kostimulatorischen Oberflächenmolekülen CD80 und CD86 auf dendritischen Zellen herunter regulieren, sodass diese ihre für die T-Zellaktivierung wichtigen Kostimuli verlieren [50].

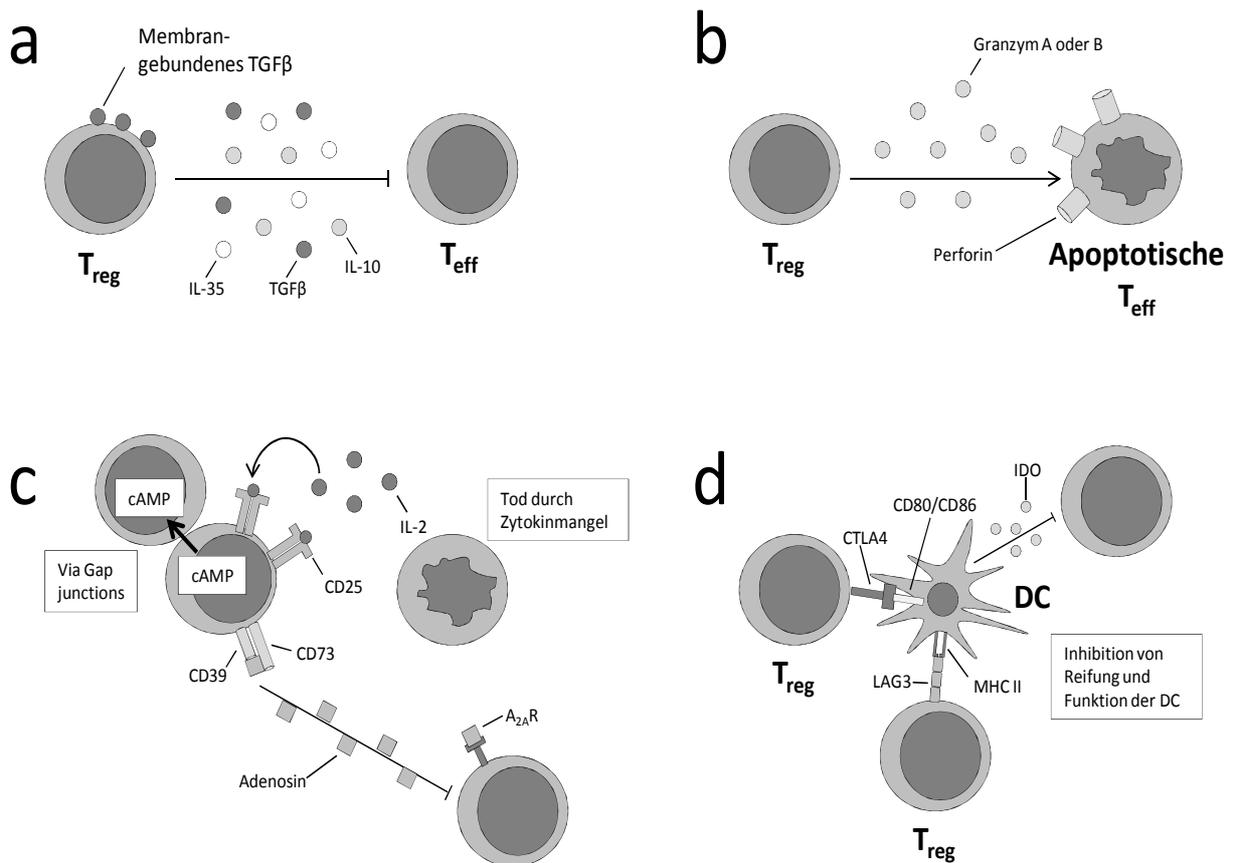


Abbildung 1: Die vier Modell-Mechanismen der T_{reg}, modifiziert nach Vignali et al in Nature Reviews 2008, a= Suppression durch Sekretion inhibitorischer Zytokine, b= Suppression durch Granzym-A oder -B abhängiger Zytolyse, c= Suppression durch „metabolischen Entzug“, d= Suppression durch Modulation der DC Funktion

3.3.4 Subpopulationen der T_{reg}

Natürlich vorkommende T_{reg} (nT_{reg}) werden im Thymus gebildet und sind als CD4⁺ CD25⁺⁺ FOXP3⁺ T_{reg} bekannt. Daneben können T_{reg} auch in der Peripherie durch Antigenstimulation z. B. im Rahmen inflammatorischer Prozesse entstehen. Diese induzierten oder adaptiven T_{reg} entstehen aus Effektor-T-Zellen und können sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ sein [22].

In verschiedenen Studien wurden darüber hinaus weitere Untergruppen der T_{reg} anhand phänotypisch und funktionell unterschiedlicher Merkmale beschrieben. Dabei werden T_{reg}, wie bereits für die verschiedenen Grade an Aktivierung und Zelldifferenzierung bei T-Zellen bekannt, als naive T_{reg} (T_{naive reg}), Effektor T_{reg} (T_{eff/em reg}) und Central Memory T_{reg} (T_{cm reg}) beschrieben [51-53].

4 Zielsetzung dieser Arbeit

Neuere Erkenntnisse vorangegangener Untersuchungen zeigen, dass das inhibitorische Mikromilieu, welches von den leukämischen Blasten aufrechterhalten wird, die effektive antileukämische T-Zellantwort verschlechtert. Über die Konversion der leukämischen Blasten zu dendritischen Zellen (DC_{leu}) kann jedoch die antileukämische Immunantwort verbessert werden [54]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass verschiedene lösliche Faktoren wie bestimmte freigesetzte Zytokine, oder auch verschiedene Zellen (wie z. B. DC_{leu} , reife DC) wichtige sowie prädiktive Schlüsselrollen in der Vermittlung einer suffizienten antileukämischen, zytotoxischen T-Zellantwort spielen. Jedoch gibt es weiterhin Fälle, in welchen trotz Stimulation mit DC und DC_{leu} keine antileukämische T-Zellfunktion erreicht werden kann [55, 56].

Daher waren die Ziele dieser Studie folgende:

- 1) Die quantitative und qualitative Analyse von T_{reg} und ihrer Subgruppen (z.B. $CD4^+$ T_{reg} , $CD8^+$ T_{reg}) in unkultivierten Blutproben mononukleärer Zellen von gesunden Probanden im Vergleich zu AML Patienten.
- 2) Die Untersuchung der Entwicklung der T_{reg} Unterguppen während der T-Zellstimulation mit DC_{leu} und DC (,DC‘) oder blastenhaltigen mononukleären Zellen (,MNC‘)
- 3) Die Korrelation der T-Zellexpressionsprofile mit der antileukämischen Funktion jeweils nach ,DC‘- oder ,MNC‘ Stimulation der T-Zellen bei AML Patienten
- 4) Die Evaluation möglicher prädiktiver Werte für die T_{reg} Unterguppen in Bezug auf eine potentielle antileukämische T- Zellantwort.

5 Material und Methodik

Ein Teil der experimentellen Arbeiten wurde in Kooperation mit cand. Dr. med. Valentin Vogt (Labor Prof. Schmetzer, Medizinische Klinik III; Klinikum Großhadern) sowie Frau T. Kroell (MTA im Labor Prof. Schmetzer, Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern) angefertigt.

5.1 Probengewinnung

Die untersuchten heparinisierten Blutprodukte wurden nach Aufklärung und Unterzeichnung der Einverständniserklärung der jeweiligen Patienten gewonnen. Anschließend wurde aus den Vollblutproben die MNC mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifuge (Ficoll-Hypaque, Biochrom, Berlin, Deutschland) isoliert, gewaschen und in Phosphat-gepufferter Lösung (PBS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Biochrom, Berlin, Deutschland) resuspendiert. Die gewonnene Zellmenge an MNC wurde mit einer Neubauer Zählkammer Methode gezählt. Anschließend wurden die MNC fraktioniert in fetalem Kälberserum (FCS, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 10% Dimethyl Sulfoxid (DSMO Sigma-Aldrich, Thum, Deutschland) Medium bei -80° eingefroren und nach wenigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

5.2 Patientencharakteristik und Diagnostik

Die Diagnosestellung der AML- sowie MDS-Fälle erfolgte auf Basis der French-American-British Klassifikation (FAB). Die Blutproben entstammten einer 12-köpfigen Patientengruppe mit einem durchschnittlichen Alter von 48 Jahren (5-70 Jahre). Die Geschlechterverteilung lag bei 1:1. Unter den 12 Blutproben, welche alle zum Zeitpunkt eines akuten Krankheitsstadium gewonnen wurden, fanden sich nach der FAB-Klassifikation drei Fälle mit undifferenzierter Leukämie (M0 n=2, M1 n=2) und ein Fall mit unreifer granulozytärer

Leukämie (M2 n=1). Bei 6 Patienten war eine monozytäre Leukämie diagnostiziert worden (M4 n=4, M5 n=1). Bei einem Patienten mit MDS war eine chronisch myelomonozytäre Leukämie (CMML n=1) nachgewiesen und ein Patient litt an einer sekundären AML (sAML n=1). Die MNC dieser 12 Patienten stellten das Ausgangsmaterial zur späteren Generierung der jeweiligen dendritischen Zellen (DC) dar. Die zur Stimulation benutzten T-Zellen entstammten in einem Fall einem gesunden Stammzellspender („Spender“ n=1) sowie Patienten vor einer Stammzelltransplantation (SZT) zum Zeitpunkt eines akuten Krankheitsstadiums („autolog“ n=6) oder Patienten nach einer SZT („nach SZT“ n=5), von welchen drei sich in Remission und zwei im Rezidiv nach SZT befanden (**siehe Tabelle 2**).

Als Kontrollgruppe dienten fünf gesunde Probanden mit einer Geschlechterverteilung männlich zu weiblich von 2:3.

Zur Bestimmung der Zellzusammensetzung der unkultivierten MNC-Fraktionen der 12 AML Patienten sowie der 5 gesunden Kontrollen wurden, vor Ansetzen der Zellkulturen, durchflusszytometrische Messungen am FACS CALIBUR (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die MNC-Fraktion der 12 AML Patienten setzte sich aus durchschnittlich $3\pm 2\%$ B-Zellen, $9\pm 6\%$ T-Zellen, $2\pm 2\%$ NK-Zellen, $5\pm 6\%$ Monozyten sowie $56\pm 25\%$ leukämischen Blasten zusammen. Im Falle einer aberranten Expression von $CD19^+$, $CD56^+$ oder $CD14^+$ durch die Blasten, konnte die Fraktion der B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten nicht quantifiziert werden.

Patientencharakteristik zum Zeitpunkt der 'DC'-Generierung					Patientencharakteristik zum Zeitpunkt der T-Zellpräparation			
Patient Nr.	FAB-Typ	Stadium	Blasten Phänotyp (CD)	IC Bla%	Quelle der T-Zellen und Stadium	Antileukämische Aktivität in (%) der unstimulierten (u), 'MNC' ('MNC')- oder 'DC'- stimulierten T-Zellen ('DC')**		
						'u'	'DC'	'MNC'
m569	M0	pers.	15,33,13,34,19	11	komplette Remission, nach SZT	-60	-76	-63
853	M0	rel. n. SZT	34,33,117	50	komplette Remission, nach SZT	+15	-75	+10
m761	M1	pers.	34,117,15,65,2,7,53	95	komplette Remission, nach SZT	-30	+150	+55
824	M1/M2	dgn.	7,13,34,117	68	Erstdiagnose, autolog	k.D.	-85	+100
748	M2	dgn.	34,33,117,13,38	50	Erstdiagnose, autolog	+120	+700	+800
610	M4	pers. rel.	34,4,33,117,13	80	Stammzellspender, allogene	+400	+220	+260
855	M4	dgn.	13,33,34,65,117	37	Erstdiagnose, autolog	k.D.	k.D.	k.D.
880	M4	rel. n. SZT	33,64,13,15,117,34,7	90	Rückfall nach SZT*	-93	-51	-9
938	M4	rel. n. SZT	34,117,33,4	74	Rückfall nach SZT*	-60	-77	-80
948	M5	dgn.	14,65,15,33	70	Erstdiagnose, autolog	+30	-55	+20
887	MDS/CMML	pers.	33,34,14,64,117	8	Persistierende Erkrankung, autolog*	-58	-12	-12
914	sAML	rel.	34,33,15,117	47	Rückfall, autolog	+800	+250	+350

Tabelle 2: Patienten- und Probencharakteristika (dgn. =Erstdiagnose; rel. =Rückfall; rel. n. SZT =Rückfall nach Stammzelltransplantation; pers. =persistierende Erkrankung, pers. rel. = persistierender Rückfall; * T-Zellen wurden an verschiedenen Zeitpunkten jeweils im Rückfall (pt 880, 938) oder während der persistierenden Erkrankung gesammelt (pt 887) und für die MLC gepoolt **negative Werte: prozentuale Anteile an lysierten Blasten, positive Werte: prozentuale Anteile an Zunahme der Blasten; k.D.= keine Daten)

5.3 DC-Generierung

Leukämische Blasten, welche als maligne transformierte, myeloische Vorläuferzellen zu sehen sind, können unter bestimmten Bedingungen die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung in DC leukämischer Abstammung erlangen. Diese DC_{leu} weisen neben den typischen DC-Fähigkeiten den Vorteil der gleichzeitigen Oberflächenexpression der leukämischen Antigene auf. Die Generierung der DC_{leu}-enthaltenden DC erfolgte bei den 12 AML-Patienten aus der MNC-Fraktion, welche wie oben beschrieben zum Zeitpunkt eines akuten Krankheitsstadiums

gewonnen wurde (Erstdiagnose, Persistenz; Rezidiv vor oder nach SZT) anhand drei etablierter FCS-freier Methoden. Die auf diese Weise generierten DC wurden anschließend in der gemischte Lymphozytenkultur als T-Zell Stimulatoren eingesetzt. In Tabelle 3 sind die genauen Mechanismen der drei verwendeten, FCS-freien DC-Generierungsmethoden aufgeführt [56-58]. Als Ausgangsmaterial dienten die jeweiligen MNC-Fraktionen der 12 Patienten im akuten Krankheitsstadium und der fünf gesunden Probanden. Die aufgetauten MNC wurden in 12-well Gewebekulturplatten in 1ml X-vivo 15 FCS-freiem Medium (Bio Whittaker Europa, Verviers, Belgien) unter Zugabe der entsprechenden Stimulanzien inkubiert.

MCM-mimic: Die DC-Generierung erfolgte aus $2-2,5 \times 10^6$ MNC/ml unter Zugabe von „MCM-mimic“-Medium, bestehend aus 800U/ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), 500U/ml Interleukin (IL) -4 und 40ng/ml FLT3-Ligand (FL). Nach 4-5 Tagen erfolgte die erneute Zugabe derselben Zytokine. Nach 7-8 Tagen erfolgte unter Zugabe von GM-CSF; IL-4, FLT-3 und zusätzlich 150ng/ml IL-6, 10ng/ml IL-1 β , 1 μ g/ml Prostaglandin E₂ (PGE₂) und 200U/ml Tumornekrosefaktor α (TNF α) der Austausch des halben Mediums. Nach 10-12 Tagen wurden die Zellen geerntet.

CA-Ionophore (A23187): CA-Ionophore ist ein Antibiotikum, welches Einfluss auf die Leitfähigkeit für divalente Ionen hat und einen Beitrag zur Zelldifferenzierung leistet. DC wurden aus 7×10^5 MNC/ml in CA-Ionophore-haltigem Medium generiert. Hierbei wurden unter Zugabe von 375ng/ml A23187 (Sigma-Aldrich, Thum, Deutschland) und 250 U/ml IL-4 die Zellen für 3-4 Tage inkubiert und anschließend geerntet.

Picibanil (OK-432): Hierbei wurden die DC mittels Picibanil, einem Lyseprodukt von Streptokokkus pyogenes, das unspezifische immunmodulatorische Effekte hat, aus $2-2,5 \times 10^6$ MNC/ml in Anwesenheit von 500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 generiert. Nach sieben- bis achttägiger Kultur wurden 5 μ l/ml OK-432 (Chugai Pharmaceuticals, Kamakura City,

Japan) sowie 5µg/ml PGE-2 hinzugegeben. Die Zellen wurden nach 9 bis 11 Tagen Kultur geerntet.

Alle der angegebenen Substanzen, die für die DC-Generierung verwendet wurden, sind für die Anwendung am Menschen zugelassen.

Zum Nachweis einer erfolgreichen DC-Generierung wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dabei wurden nach einem etablierten Modell patientenspezifische „blastenanfärbende“ Antikörper (CD33, CD13, CD15, CD65, CD34, CD117), entsprechend der Ergebnisse der immunphänotypischen Untersuchungen der Patientenblasten, mit „DC-anfärbenden“ Antikörpern (CD1a, CD1b, CD40, CD80, CD83, CD86, CD206) kombiniert [1]. Eine DC-Generierung wurde als erfolgreich definiert, wenn mindestens >10% DC sowie >5% DC_{leu} in der mononukleären Zellfraktion generiert werden konnten [57]. DC_{leu} wurden anhand der Oberflächenkoexpression von Blasten- sowie DC-Markern definiert. Es wurde jeweils die Methode, die die größte Anzahl an DC generieren konnte, für die quantitative DC-Generierung für die gemischte Lymphozytenkultur verwendet.

Es konnten mittels etablierter Methoden in jeder Probe der 17 Fälle (AML-Patienten und gesunde Probanden) erfolgreich DC generiert werden [55, 57]. Die Proben der AML-Patienten zeigten nach der Inkubation in dem individuell am besten geeigneten Medium durchschnittlich 20±14% DC (10-51%) und 6±2% DC_{leu} (5-10%). Für die DC-Generierung der AML- Patienten wurden zweimal Picibanil, dreimal CA-Ionophore und siebenmal MCM-mimic verwendet.

DC-Generierungsmethode/ Medium	DC-Differenzierung stimulierende Substanzen	Aktivierungs- mechanismus	Kultivierungs- zeit in Tagen	Referenzen	Individuelle DC-Methode der Proben
MCM-Mimic	GM-CSF, IL-4, TNF α , IL-1 β , IL-6, PGE2, FLT3-Ligand	Zytokin-basierte DC- Differenzierung, PGE2 stimuliert die CCR7- Expression und verbessert die Migration	10-14	Kremser et al (2010) Dreyssig et al (2011) Lee 2001	m569 (M0) 610 (M4) 748 (M2) m761 (M1) 853 (M0) 887 (MDS/CMM) 914 (sAML)
Picibanil	GM-CSF, TNF α , Lysat von Streptococcus pyogenes, PGE2	Bakterielles Lysat und PGE2 stimulieren die DC- Differenzierung	7-8	Kremser et al (2010) Dreyssig et al (2011) Sato 2003	824 (M1/M2) 855 (M4)
Ca-Ionophore	IL-4, A23187	Nebenweg der Zytokine- abhängigen DC- Differenzierung	2-3	Kremser et al (2010) Dreyssig et al (2011) Houtenbos 2003	880 (M4) 938 (M4) 948 (M5)

Tabelle 3: DC-Generierungsmethoden, welche für die individuellen AML Patienten ausgewählt wurden (entsprechend dem Vortest).

5.4 Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)

Die MNC, aus welchen die CD3⁺ T-Zellen gewonnen/isoliert wurden, stammten von Patienten („autolog“, n=6), von passenden Stammzellenspendern („Spender“, n=1) oder von Patienten im Rezidiv nach Stammzelltransplantation („nach SZT“, n=5). Die CD3⁺ T-Zellen, welche später in der MLC als Effektor-T-Zellen benutzt wurden, wurden anhand von magnetischen Mikrobeads positiv selektiert (Milteney Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland, 1×10^6 Zellen/Well). Im Anschluss wurden die CD3⁺ T-Zellen mit bestrahlten (20Gy) AML-Blasten enthaltenden MNC [2.5×10^4 MNC (T'MNC')] sowie parallel mit bestrahlten (20Gy) DC_{leu}-enthaltenden AML-DC [2.5×10^4 DC (T'DC')] in 1 ml RPMI-1640 Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland), welches 15% humanes Serum (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und IL-2 50U/ml (Proleukin R5, Chiron, München, Deutschland) enthielt, ko-kultiviert.

Bei der für die T-Zell-Stimulation verwendeten, bestrahlten DC_{leu}-enthaltenden DC Zellsuspension handelte es sich um eine Mischung aus DC_{leu}, DC nicht nachgewiesener leukämischer Abstammung, leukämischen Blasten, Monozyten und Lymphozyten. Die Zellmenge in der MLC wurde in einem Verhältnis von 2.5×10^4 DC-Zellen oder MNC-Zellen

auf 1×10^6 T-Zellen pro Well aufgeteilt. Nach zweimaliger Restimulierung mit 2.5×10^4 'DC' oder 'MNC', Hinzufügen von IL-2 (50U/ml) und dem Wechsel des halben Mediums an Tag 3 und 5, wurden die Zellen zwischen dem siebten und achten Tag geerntet um anschließend den Fluorolyse Zytotoxizitätsassay durchzuführen. Zudem wurde an den Tagen 0, 1, 3, 5, und 7 oder 8 durchflusszytometrische Untersuchungen der Zellzusammensetzung durchgeführt (siehe unten).

5.5 Zellcharakterisierung mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde mittels monoklonaler Maus-Anti-Human-Antikörper (moAbs), die mit fluorescein isothiocyanat (FITC), phycoerythrin (PE), tandem Cy7-PE Konjugate (PC7), oder allophycocyanin (APC) markiert wurden, durchgeführt. Die Antikörper wurden von Immunotech/Beckman Coulter (BC, Krefeld, Deutschland) Becton Dickinson (BD, Heidelberg, Deutschland), Caltag (C, Hamburg, Deutschland), Serotech (SER; Düsseldorf, Deutschland) und Invitrogen (IN, Karlsruhe, Deutschland) bereitgestellt (siehe Tabelle 4).

Fluorochrom	Hersteller	moAbs
FITC	BD	CD1b
FITC	BC	CD3
FITC	BC	CD25
FITC	SER	CD39
FITC	BC	CD45RO
FITC	BC, BD	CD80
FITC	BC	CD83
FITC	C	CD86
FITC	SER	CD122
PE	BC	CD4
PE	BD	CD8
PE	BD	CD73
PE	BC	CD80
PE	BC	CD83
PE	BD, C	CD86
PE	BC	CD127
PE	BC	CD152
PE	BC	CD206
PC7	BC	CD1a
PC7	BC	CD3
PC7	BC	CD4
PC7	C	CD40
PC7	BD	CCR7
PC7	BD	7AAD
APC	BC	CD1a
APC	BC	CD3
APC	BD	CD8
APC	IN	CD25
APC	BC	CD33
APC	BC, C	CD34
APC	C	CD40
APC	IN	CD45RO
APC	BD	CD69
APC	BD	CD71
APC	BC	CD117

Tabelle 4: Charakteristika der verwendeten monoklonalen Antikörper (BC = Immunotech/Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland; BD = Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland; C = Caltag Hamburg, Deutschland; SER = Serotech Düsseldorf, Deutschland; IN = Invitrogen Karlsruhe, Deutschland)

Die Zellsuspensionen wurden in PBS mit 10% FCS (Biochrome, Berlin, Deutschland) aufgenommen und gemäß Herstellerangaben mit den moAbs inkubiert. Isotypenkontrollen wurden durchgeführt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Die Zellanalysen wurden an einem FACS Calibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde Cell Quest data acquisition and analysis software (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Es wurden jeweils mindestens 3000 Events gemessen. Um Lymphozyten, Monozyten und leukämischen Blasten vor der Kultur analysieren und quantifizieren zu können, wurde die gesamte MNC-Fraktion gated. Die Quantifizierung und Charakterisierung der DC und DC_{leu} wurde durchflusszytometrisch anhand bereits etablierter Gating-Strategien durchgeführt. Um die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen quantifizieren und charakterisieren zu können, wurden „Lymphozyten-Gates“ definiert, die sowohl Lymphozyten als auch Monozyten einschlossen. Die T-Zell-Untergruppen wurden anhand der Koexpression von Antigenen vor und nach der ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation definiert (**siehe Tab. 5**). Die durchflusszytometrischen Zellanalysen der MLC wurden an Tag 0, 1, 3, 5 und 7 durchgeführt. Anschließend folgte als Funktionstest der Fluorolyse Zytoxizitätsassay an Tag 7 sowie Tag 8 (siehe unten).

Name der T-Zelluntergruppen	Abkürzung	Oberflächenmarkerkombination
CD3 ⁺ T-Zellen	CD3 ⁺ T-Zellen	CD3 ⁺
CD4 ⁺ exprimierende T-Zellen	CD4 ⁺ T-Zellen	CD4 ⁺ CD3 ⁺
CD8 ⁺ exprimierende T-Zellen	CD8 ⁺ T-Zellen	CD8 ⁺ CD3 ⁺
regulatorische T-Zellen	T _{reg}	
IL-2-R ⁺ IL-7-R ^{low} exprimierende CD8 ⁺ T-Zellen	CD8 ⁺ T _{reg}	CD8 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{low}
IL-2-R ⁺ IL-7-R ^{low} exprimierende CD4 ⁺ T-Zellen	CD4 ⁺ T _{reg}	CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{low}
IL-2-R ⁺ IL-7-R ^{low} CCR7 ⁺ CD45RO ⁻ T-Zellen	T _{naive reg}	CD25 ⁺⁺ CD127 ^{low} CD194 ⁻ CD45RO ⁻
IL-2-R ⁺ IL-7-R ^{low} CCR7 ⁺ CD45RO ⁺ T-Zellen	T _{eff/em reg}	CD25 ⁺⁺ CD127 ^{low} CCR7 ⁺ CD45RO ⁺
IL-2-R ⁺ IL-7-R ^{low} CCR7 ⁺ CD45RO ⁺ T-Zellen	T _{cm reg}	CD25 ⁺⁺ CD127 ^{low} CCR7 ⁺ CD45RO ⁺
IL-2-R ⁺ IL-7-R ^{low} Ecto-Apyrase, Ntpd-ase 1 exprimierende CD4 ⁺ T-Zellen	CD39 ⁺ T _{reg}	CD39 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{low} CD4 ⁺
IL7-R ^{low} Ecto-5'-Nucleotidase exprimierende T-Zellen	CD73 ⁺ T _{reg}	CD73 ⁺
CTLA-4 ⁺ T-Zellen	CD152 ⁺ T _{reg}	CD152 ⁺ CD3 ⁺
aktivierte T-Zellen		
IL-2-R ⁺ T-Zellen	CD122 ⁺ T-Zellen	CD122 ⁺ CD3 ⁺
CD40L ⁺ T-Zellen	CD152 ⁺ T-Zellen	CD152 ⁺ CD3 ⁺
IL-2-R ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	CD25 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	CD25 ⁺ CD4 ⁺
IL-2-R ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	CD25 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	CD25 ⁺ CD8 ⁺
IL-7-R ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	CD127 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	CD127 ⁺ CD4 ⁺
IL-7-R ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	CD127 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	CD127 ⁺ CD8 ⁺
proliferierende T-Zellen		
Type II C-type lectin ⁺ T-Zellen	CD69 ⁺ T-Zellen	CD69 ⁺ CD3 ⁺
Transferrin-R ⁺ T-Zellen	CD71 ⁺ T-Zellen	CD71 ⁺ CD3 ⁺

Tabelle 5: Charakterisierung der Subtypen der T-Zellen und T_{reg} anhand ihrer Oberflächenprofile durch durchflusszytometrische Messung

5.6 Fluorolyse Zytotoxizitätsassay

Die lytische Aktivität der stimulierten oder unstimulierten Effektor-T-Zellen wurde mittels eines Fluorolyse Zytotoxizitätsassays gemessen. Dabei wurden nach einem etablierten Modell die lebenden Zielzellen, in diesem Fall die lebenden leukämischen Blasten, welche mit spezifischen fluorochromen Antikörpern markiert wurden, vor und nach dem Effektor-T-Zell-Kontakt gezählt [55]. Die 'DC'- oder 'MNC'-stimulierten T-Zellen des gesunden HLA-kompatiblen Spenders ('Spender', n=1), der AML-Patienten ('autolog', n=5) oder AML-

Patienten nach SZT (,nach SZT', n=6) sowie unstimulierte T-Zellen als Kontrollgruppe wurden in 5ml FACS-Röhrchen mit den jeweilig korrespondierenden, aufgetauten leukämischen Blasten als Zielzellen (T) für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Verhältnis der Effektor-T-Zellen zu den Zielzellen (E:T-Verhältnis) wurde auf 1:1 eingestellt. Zuvor wurden die Zellen für 15 Minuten mit zwei FITC- und/oder PE-konjugierten, blastenspezifischen Antikörpern gefärbt und im Folgenden für 24 Stunden zusammen mit den Effektor-Zellen ko-kultiviert. Als Kontrolle wurden die Ziel- und Effektor-Zellen separat inkubiert und mit den T-Zellen erst kurz vor der FACS-Analyse vermischt. Um die Anzahl der funktionsfähigen (7AAD⁻) Zielzellen zu evaluieren und den Zellverlust nach 24 Stunden Inkubationszeit zu quantifizieren, wurden die Zellen geerntet, in PBS gewaschen und erneut in einer FACS-Flow-Lösung, die 7AAD (BD, Biosciences Pharmingen) sowie eine definierte Anzahl an Fluorosphere beads (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland) enthielt, gelöst. Die lebenden Zielzellen wurden in einem SSC/7AAD⁻ Gate gated und quantifiziert, indem die Koexpression des jeweiligen patientenspezifischen Blastenphänotyps mit der definierten Menge an Calibration Beads wie beschreiben verrechnet wurde. Die Zellen wurden in einem FACS Calibur Durchflusszytometer unter Verwendung von CELL-Quest-Software (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Der prozentuale Anteil lysierter Zellen wurde anhand der unterschiedlichen Anteile der funktionstüchtigen Zellen vor und nach Effektor-Zell-Kontakt definiert. Die Ergebnisse sind Tabelle 2 zu entnehmen.

5.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Mittelwerte, Standardabweichung und die Ergebnisse des two-tailed-T-Tests wurden an einem PC mittels Excel 2010 (Microsoft) berechnet. Das statistische Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

6 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie sollte die Entwicklung, Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen vor und insbesondere nach ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden untersucht werden. Ein besonderer Augenmerk wurde dabei auf regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und deren verschiedene T_{reg} -Untergruppen (**siehe Tab. 5**) sowie ihre Rolle in der Vermittlung antileukämischer Aktivität bei ‘MNC’-, ‘DC’- oder unstimulierten T-Zellen gerichtet.

‘DC’-Stimulation führt zu Veränderungen in den T-Zell-Profilen

In der vorliegenden Arbeit konnte, analog zu den Ergebnissen früherer Studien [55], ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der zytotoxischen Funktionalität von T-Zellen nach ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation gezeigt werden. Anhand der Expression von unterschiedlichen T-Zell-Markern (wie in Tab. 5 angegeben) in unstimulierten T-Zellen (Tag 0), während und nach Stimulation (Tag 7) in der MLC konnte die Veränderung der T-Zell-Profile verfolgt werden. Um etwaige ungewollte ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulationen der T-Zellen an Tag 0 zu verhindern, wurden die Messungen zu diesem Zeitpunkt “auf Eis” durchgeführt.

6.1 Die Profile der unstimulierten T-Zellen von AML-Patienten verglichen mit gesunden Probanden

6.1.1 AML-Patienten zeigen vor ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation signifikant niedrigere Werte an $CD127^+CD4^+$ und $CD127^+CD8^+$ T-Zellen

Es wurde zunächst die Expression von Aktivierungs- sowie Proliferationsmarkern in unstimulierten (Tag 0) T-Zellen von AML-Patienten sowie von gesunden Probanden

untersucht. Dabei konnten an Tag 0 in der MLC von AML-Patienten sowie von gesunden Probanden nur geringe Mengen an proliferierenden oder aktivierten T-Zellen beobachtet werden (**siehe Abb. 2a**). AML-Patienten wiesen bezogen auf CD3⁺ T-Zellen 2±3% CD69⁺-Zellen, 8±11% CD71⁺-Zellen und 4±3% CD122⁺-Zellen auf. Bezogen auf die CD4⁺ T-Zellen fanden sich 21±12% CD25⁺-Zellen und bezogen auf CD8⁺-Zellen 17±8% CD25⁺-Zellen. Vergleichbare Werte fanden sich bei den gesunden Probanden (**siehe Abb. 2a**).

Verglichen mit den AML-Patienten zeigten die gesunden Probanden jedoch signifikant höhere Werte an CD127⁺CD4⁺ und CD127⁺CD8⁺ (65±21% CD127⁺CD4⁺ T-Zellen und 52±17% CD127⁺CD8⁺ T-Zellen bei AML-Patienten versus 93±7% CD127⁺CD4⁺ T-Zellen und 86±10% CD127⁺CD8⁺ T-Zellen bei gesunden Probanden; p<0,05, **siehe Abb. 2a**).

Zusammenfassend bedeutet dies, dass nur geringe Mengen an proliferierenden T-Zellen in unstimulierten (Tag 0) T-Zellen sowohl bei gesunden Probanden, als auch bei AML-Patienten nachweisbar waren.

6.1.2 AML-Patienten zeigen vor 'MNC'- oder 'DC'-Stimulation signifikant höhere Werte bestimmter T_{reg}-Untergruppen

Es wurde die Expression gebräuchlicher T_{reg}-Marker auf unstimulierten (Tag 0) T-Zellen bei AML-Patienten sowie bei gesunden Probanden untersucht und verglichen.

Bezüglich der CD3⁺ T-Zellen, welche CD152⁺ koexprimierten und der CD4⁺ T-Zellen mit Expression von CD39⁺ (mit oder ohne zusätzliche Koexpression von CD25⁺⁺/CD127^{low}), fanden sich vergleichbare Werte zwischen AML-Patienten und gesunden Probanden (**siehe Abb. 2b, oberer Teil**).

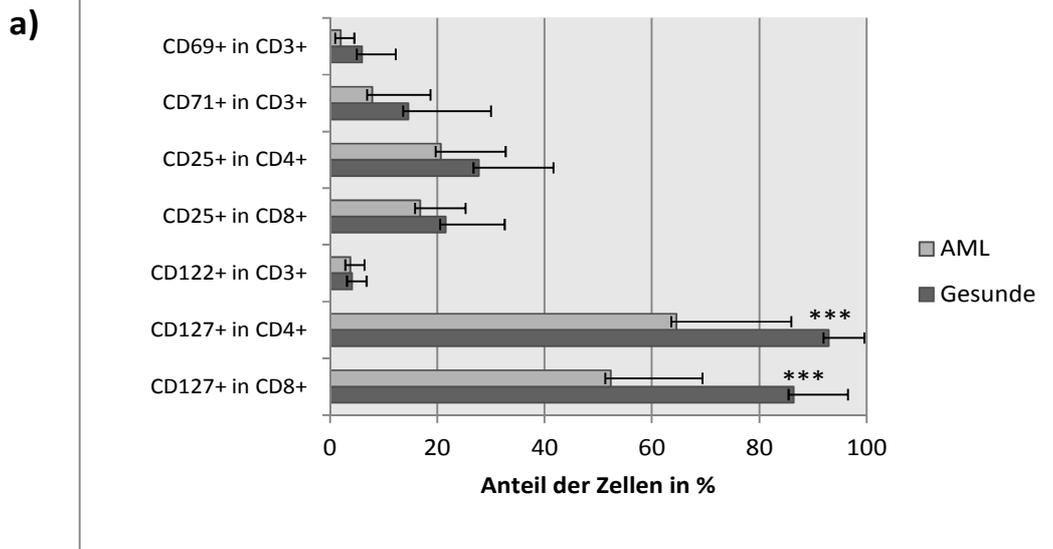
Die gesunden Probanden zeigten jedoch signifikant niedrigere Werte an CD4⁺ T_{reg} bezogen auf CD4⁺ T-Zellen (11±5% versus 29±11%, p<0.005) und CD8⁺ T_{reg} bezogen auf CD8⁺ T-Zellen (4±2% versus 14±9%, p<0.005) sowie CD39⁺-Zellen bezogen auf die MLC Fraktion

($10\pm 6\%$ versus $25\pm 6\%$ $p<0.005$) im Vergleich zu AML-Patienten (**siehe Abb. 2b**). Demgegenüber wurden in der MLC Fraktion der gesunden Probanden im Vergleich zu den AML-Patienten signifikant höhere Werte an CD73⁺-Zellen gefunden ($33\pm 5\%$ versus $19\pm 11\%$, $p<0.005$, **siehe Abb. 2b, oberer Teil**).

Darüber hinaus zeigten sich eine signifikant niedrigere Anzahl aller T_{reg} Untergruppen in der unstimulierten Zellfraktion gesunder Probanden verglichen mit AML-Patienten: T_{naive reg} bezogen auf die MLC Fraktion ($1\pm 1\%$ versus $4\pm 4\%$, $p<0.05$), T_{naive reg} bezogen auf T_{naive} ($12\pm 17\%$ versus $28\pm 17\%$, $p<0.05$), T_{eff/em reg} bezogen auf die MLC Fraktion ($5\pm 3\%$ versus $10\pm 7\%$, $p<0.05$), T_{eff/em reg} bezogen auf T_{eff/em} (9 ± 7 versus $19\pm 9\%$, $p<0.005$), T_{cm reg} bezogen auf die MLC Fraktion ($1\pm 1\%$ versus $4\pm 2\%$, $p<0.05$) und T_{cm reg} bezogen auf T_{cm} ($17\pm 14\%$ versus $31\pm 13\%$, $p<0.05$, **siehe Abb. 2b, unterer Teil**).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich in der unstimulierten Zellfraktion signifikant niedrigere Mengen an den verschiedenen T_{reg} Untergruppen bei den gesunden Probanden im Vergleich zu den AML-Patienten nachweisen ließen.

Aktivierung und Proliferation



Regulation

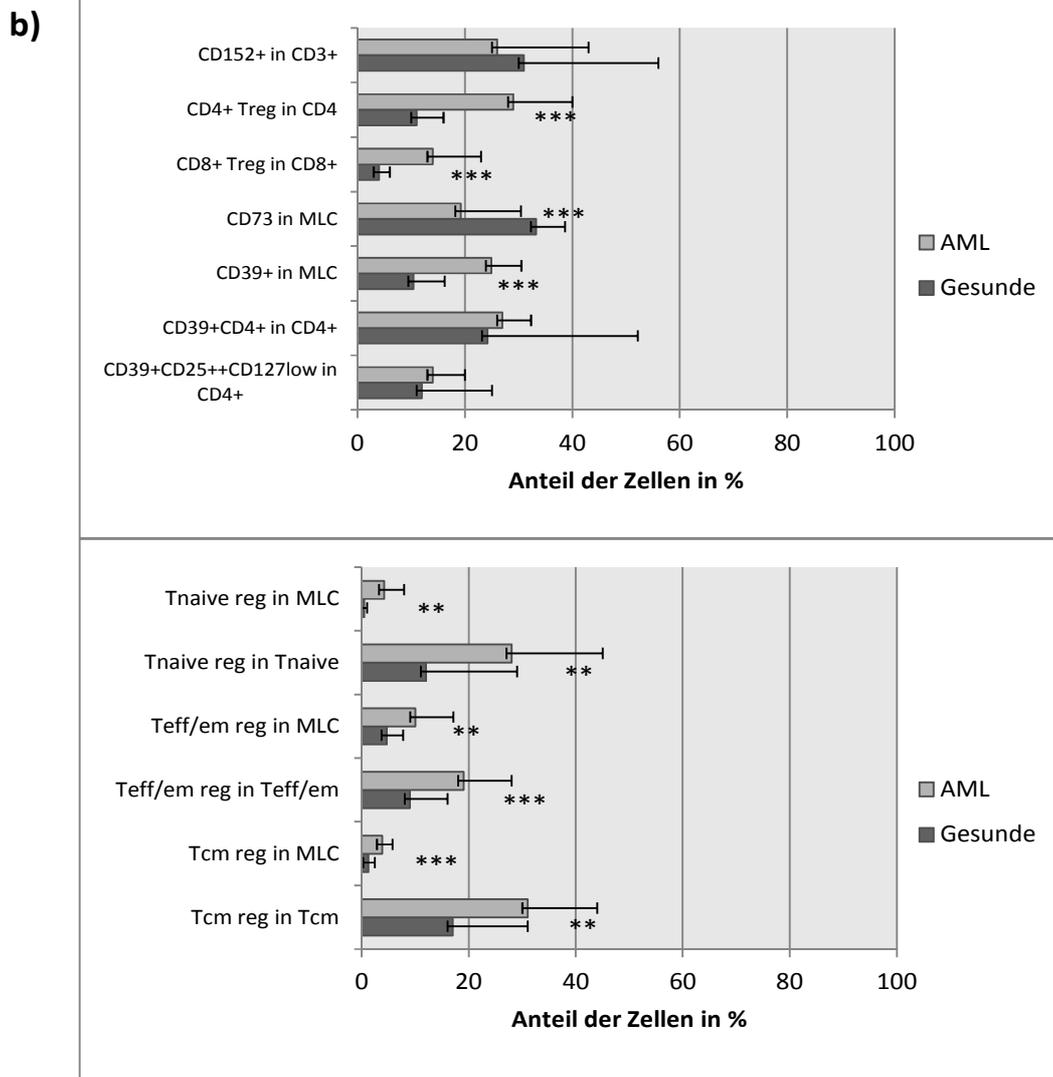


Abbildung 2: Profile der unstimulierten (Tag 0) T-Zellen von AML-Patienten (AML) und gesunden Probanden (Gesunde) an Tag 0 (*p=0.05-0.1, **=p <0.05, ***=p<0.005).

6.2 Vergleich der Profile der 'MNC'- oder 'DC'-stimulierten T-Zellen nach 7 Tagen Kultivierung in der MLC zwischen AML-Patienten und gesunden Probanden

6.2.1 AML-Patienten zeigen nach 'MNC'- oder 'DC'-Stimulation signifikant niedrigere Werte an $CD127^+CD4^+$ und $CD127^+CD8^+$ T-Zellen (Abb. 3a)

Es wurde die Oberflächenexpression von Aktivierungs- und Proliferationsmarkern auf T-Zellen von AML-Patienten und gesunden Spendern nach der Stimulation an Tag 7 mit ‚MNC‘ oder ‚DC‘ verglichen. Bei der Gruppe der AML-Patienten konnten nach der siebentägigen Stimulation mit ‚DC‘ vergleichbare, jedoch geringe Mengen als bei der Gruppe der gesunden Probanden an $CD3^+$ T-Zellen, welche entweder $CD69^+$, $CD71^+$ oder $CD122^+$ koexprimierten nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten sich ähnliche Mengen an $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen mit Koexpression von $CD25^+$ (siehe Abb. 3a). Im Vergleich zeigten die gesunden Probanden an Tag 7 signifikant höhere Werte an $CD127^+CD4^+$ - ($78\pm 20\%$ versus $26\pm 19\%$, $p < 0.05$) sowie $CD127^+CD8^+$ T-Zellen ($62\pm 27\%$ versus $17\pm 27\%$, $p < 0.05$, siehe Abb. 3a). An Tag 7 nach der ‚MNC‘-Stimulation konnte ein ähnliches Expressionsmuster beobachtet werden (nicht abgebildet).

6.2.2 AML-Patienten zeigen nach 'MNC'- oder 'DC'-Stimulation signifikant höhere Werte an $T_{cm\ reg}$ und $T_{eff/em\ reg}$ im Vergleich zu gesunden Probanden (Abb. 3b)

Es wurde die Oberflächenexpression bekannter regulatorischer Zellmarker auf T-Zellen von AML-Patienten und gesunden Spendern nach der Stimulation an Tag 7 mit ‚MNC‘ oder ‚DC‘ verglichen. Hinsichtlich der T-Zell Expression von $CD73^+$, $CD152^+$, $CD39^+CD4^+$ und $CD39^+CD25^{++}CD127^{low}$ konnte kein signifikanter Unterschied im Expressionsprofil von AML-Patienten und gesunden Probanden nach siebentägiger ‚DC‘- Stimulation nachgewiesen werden (siehe Abb. 3b). Die gesunden Probanden zeigten im Vergleich zu den AML-Patienten tendenziell, jedoch nicht signifikant, niedrigere Werte an $CD4^+$ T_{reg} bezogen auf

CD4⁺-Zellen und CD8⁺ T_{reg} bezogen auf CD8⁺-Zellen ($p < 0.1$, **siehe Abb. 3b oberer Teil**). Jedoch zeigten die gesunden Probanden demgegenüber signifikant erniedrigte Werte im Hinblick auf die verschiedenen Aktivierungsstadien der T_{reg}. So fanden sich erniedrigte Mengen an T_{em reg} ($26 \pm 8\%$ versus $58 \pm 21\%$, $p < 0.005$) und T_{eff/em reg} ($33 \pm 14\%$ versus $59 \pm 16\%$, $p < 0.05$) sowie tendenziell niedrigere Werte an T_{naive reg} ($53 \pm 31\%$ versus $78 \pm 22\%$, $p \leq 0.1$) nach 7 Tagen ,DC'-Stimulation (**siehe Abb. 3b, unterer Teil**). An Tag 7 nach der 'MNC'-Stimulation zeigten sich mit der ,DC'-Stimulation vergleichbare Expressionsbilder zwischen AML-Patienten sowie gesunden Probanden (nicht abgebildet).

Zusammenfassend konnten somit an Tag 7 bei den AML-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden immer noch erhöhte Werte der T_{reg} und deren Subtypen nachgewiesen werden.

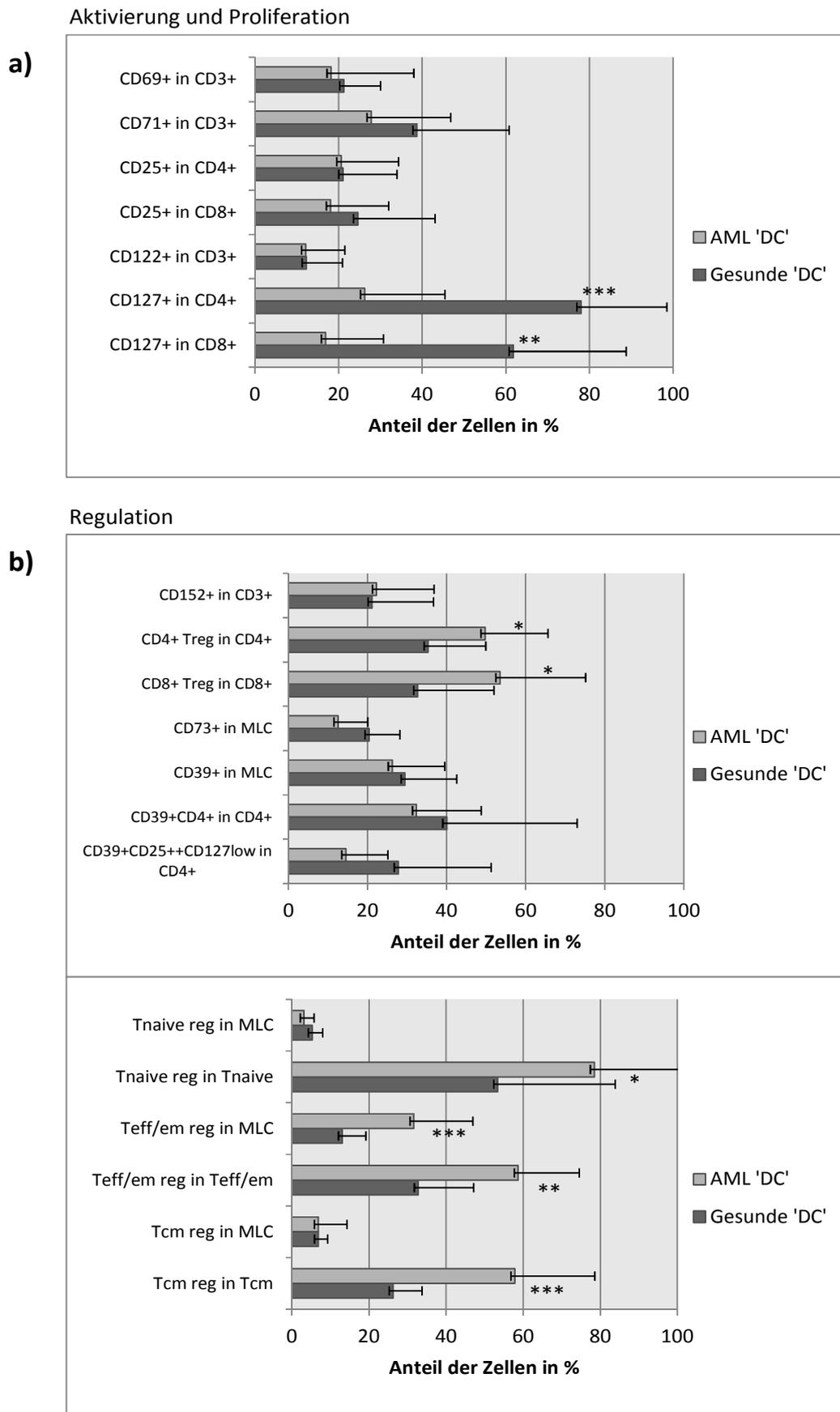


Abbildung 3: Profile der 'DC'-stimulierten T-Zellen von AML-Patienten (AML 'DC') und gesunden Probanden (Gesunde 'DC') an Tag 7 (* $p=0.05-0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.005$).

6.3 Die kinetischen Profile der Expression der T-Zell-Oberflächenmarker im Zeitverlauf nach ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation (Tag 0 bis Tag7, Abbildung 4a)

Zur Untersuchung der kinetischen Entwicklung der T-Zell-Oberflächenmarker wurden Messungen an Tag 0, 1, 3, 5 und 7 durchgeführt und die Profile an Tag 0 und Tag 7 statistisch verglichen.

6.3.1 Die Expressionsprofile der Aktivierungs- und Proliferationsmarker sind bei AML-Patienten und gesunden Probanden vergleichbar (Abb. 4a)

Wie in Abbildung 4a veranschaulicht, konnte in der vorliegenden Studie ein früher Anstieg der CD69⁺-Expression auf T-Zellen der AML-Patienten unter ‘DC’-Stimulation nachgewiesen werden (**siehe Abb. 4a**). Die CD69⁺ T-Zellen stiegen zwischen Tag 0 und 1 signifikant an ($p < 0.05$) und zeigten anschließend im weiteren Zeitverlauf einen konstanten Expressions-Level. Die CD71⁺ T-Zellen sowie die CD122⁺ T-Zellen zeigten einen kontinuierlichen Anstieg und erreichten ihren Höchstwert an Tag 5. Die CD25⁺ T-Zellen stiegen an Tag 1 leicht an und sanken im Folgenden wieder fast auf ihr Ausgangsniveau ab. Die CD127⁺ T-Zellen fielen im gesamten Zeitverlauf kontinuierlich ab und erreichten an Tag 7 signifikant erniedrigte Werte im Vergleich zum Ausgangswert. Nach ‘MNC’-Stimulation konnte eine analoge kinetische Entwicklung beobachtet werden (nicht abgebildet).

Die gesunden Probanden zeigten im Vergleich zu den AML-Patienten eine ähnliche kinetische Entwicklung der meisten Aktivierungs- und Proliferationsmarker bis auf die CD127⁺ T-Zellen. Wie in Abb. 3a dargestellt, konnte bei den gesunden Probanden kein signifikanter Abfall der CD127⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (**siehe Abb. 4a**). Das kinetische Profil der gesunden Probanden verhielt sich nach ‘MNC’-Stimulation analog (nicht abgebildet).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie somit nachgewiesen werden, dass eine siebentägige 'DC'- oder 'MNC'-Stimulation in allen 17 MLC zu einem Anstieg der immunologischen Aktivierungsmarker führte. Im Vergleich zu Tag 0 zeigten die T-Zellen der AML-Patienten nach 'DC'- und 'MNC'-Stimulation eine signifikante Hochregulation von CD69⁺-, CD71⁺- und CD122⁺-Zellen sowie eine signifikante Herunterregulation von CD127⁺-Zellen ($p < 0.05$, **siehe Abb. 4a**). Die T-Zellen der gesunden Probanden zeigten nach 'DC'- und 'MNC'-Stimulation ebenso eine signifikante Hochregulation von CD69⁺-, CD71⁺- und CD122⁺-Zellen, jedoch keine Herunterregulation von CD127⁺-Zellen ($p < 0.05$, **siehe Abb. 4a**).

6.3.2 AML-Patienten und gesunde Probanden zeigen einen kontinuierlichen Anstieg der T_{reg}-Untergruppen

In der vorliegenden Studie konnte nach 'DC'-Stimulation ein kontinuierlicher, starker Anstieg der T_{naive reg} in den T_{naive}-Zellen der AML-Patienten beobachtet werden, der an Tag 7 Maximalwerte erreichte (**siehe Abb. 4b**). Eine ähnliche kinetische Entwicklung zeigte sich bei T_{cm reg} in den T_{cm}, T_{eff/em reg} in den T_{eff/em}, CD8⁺ T_{reg} in den CD8⁺-Zellen und CD4⁺ T_{reg} in den CD4⁺-Zellen. In Bezug auf die regulatorischen Ektoenzyme CD39⁺ und CD73⁺ konnte ein kontinuierlicher Abfall der CD73⁺-Zellen, jedoch kein signifikanter Anstieg der CD39⁺-Zellen und CD39⁺-T_{reg} nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte im gesamten Zeitverlauf kein signifikanter Anstieg der CD152⁺ T-Zellen beobachtet werden.

Bei den gesunden Probanden konnte, wie in Abb. 4b zu sehen, nach 'DC'-Stimulation eine analoge kinetische Entwicklung der T_{reg}-Untergruppen erfasst werden. Interessanterweise konnte zusätzlich ein Anstieg der CD39⁺CD25⁺CD4⁺- Zellen in den CD4⁺-Zellen und der CD39⁺CD127^{low}CD25⁺CD4⁺-Zellen in den CD4⁺-Zellen über den gesamten Zeitverlauf erfasst werden (**siehe Abb. 4b**).

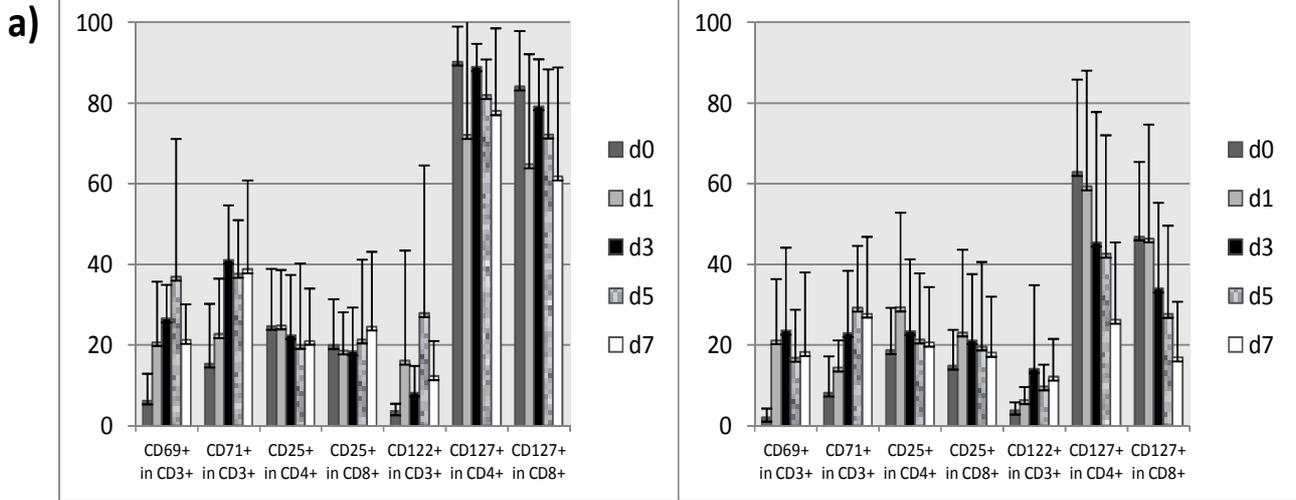
Nach 'MNC'-Stimulation zeigte sich eine analoge Kinetik sowohl bei den AML-Patienten als auch bei den gesunden Probanden (nicht abgebildet).

Zusammenfassend stiegen bei AML-Patienten sowie bei gesunden Probanden alle T_{reg} -Subpopulationen nach 'DC'- oder 'MNC'-Stimulation signifikant an. Bei AML-Patienten zeigten die $CD39^+$ - T_{reg} nach siebentägiger 'DC'- oder 'MNC'-Stimulation keinen signifikanten Anstieg. Demgegenüber konnte bei den gesunden Probanden ein signifikanter Anstieg der $CD39^+$ - T_{reg} nach 'DC'-Stimulation beobachtet werden ($p < 0.05$). Das Profil der regulatorischen T-Zellen der AML-Patienten sowie der gesunden Probanden unterschied sich nach 'MNC'-Stimulation nicht von dem Profil der regulatorischen T-Zellen nach 'DC'-Stimulation.

Gesunde Probanden

AML-Patienten

Aktivierung und Proliferation



Regulation

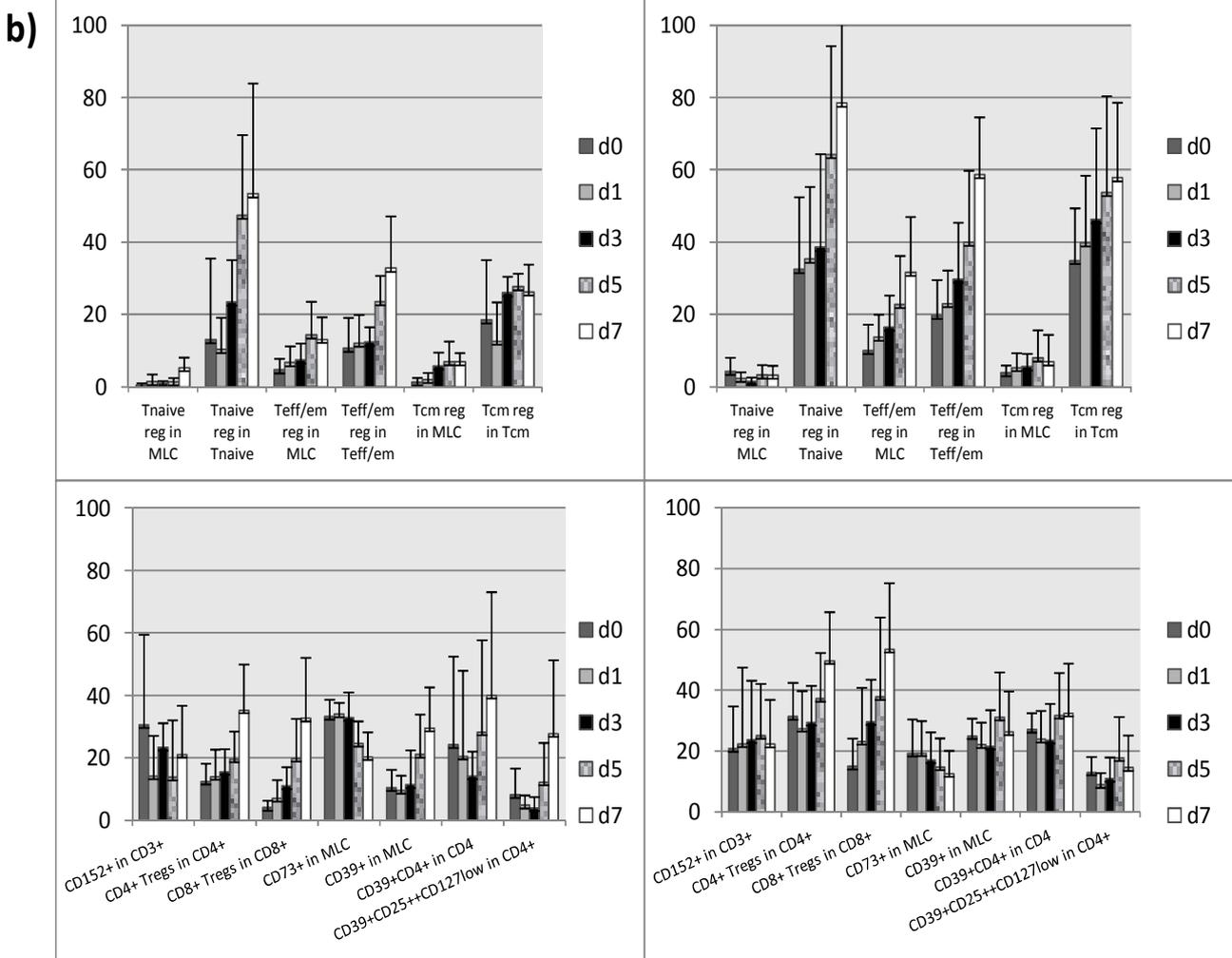


Abbildung 4: Kinetische Profile der T-Zell-Oberflächenmarker im Zeitverlauf der ‘DC’-Stimulation.

6.4 Korrelation der T-Zell-Expressionsprofile mit der antileukämischen Funktion von ‘MNC’-, ‘DC’- oder unstimulierten T-Zellen bei AML-Patienten

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Stimulation mit DC_{leu} die antileukämische Funktion der T-Zellen verbessert [55]. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Studie mögliche Unterschiede der Oberflächenmarker-Expression der T-Zell Aktivierung sowie Regulation im Hinblick auf die antileukämische Funktion nach ‘DC’- oder ‘MNC’-Stimulation untersucht werden.

Zunächst wurden die Fälle diesbezüglich in zwei Gruppen aufgeteilt: Die erste Gruppe umfasste die Fälle, die nach ‘MNC’- oder ‘DC’-Stimulation lytische T-Zellaktivität vorzeigen konnten (‘Lysierer’). Die zweite Gruppe waren die Fälle, welche nach Stimulation keine Blasten lysieren konnten (‘Nicht-Lysierer’). Anschließend wurden die Profile der Oberflächenmarker der ‘MNC’-, ‘DC’- oder unstimulierten T-Zellen hinsichtlich der Expression von Aktivierungs-, Proliferations- und Regulationsmarkern untersucht und mit der lytischen Aktivität korreliert.

Der funktionelle Fluorolyse Test zeigte, dass die ‘MNC’-Stimulation in 4 von 11 Fällen (36%) eine antileukämische Zytotoxizität induzierte. Demgegenüber induzierte die ‘DC’-Stimulation in 7 von 11 Fällen (64%) eine antileukämische T-Zellantwort. Die als Kontrolle untersuchten unstimulierten T-Zellen zeigten in 5 von 10 Fällen (50%) eine lytische Aktivität. Die Blasten-lytische Effizienz der unstimulierten T-Zellen betrug dabei durchschnittlich 60% (30-93%). Die ‘MNC’-stimulierten T-Zellen waren in der Lage durchschnittlich 41% (9-80%) der Blasten zu lysieren und die ‘DC’-stimulierten T-Zellen zeigten durchschnittliche 62% (12-85%) Blasten-lytische Effizienz. Die Gruppe der Lysierer nach ‘DC’-Stimulation setzte sich aus T-Zellen nach SZT (n=4) und autologen T-Zellen (n=3) zusammen. Die Lysierer nach ‘MNC’-Stimulation waren in drei Fällen T-Zellen nach SZT und in einem Fall autologe T-Zellen. Die T-Zellquelle der Lysierer der unstimulierten T-Zellen waren T-Zellen nach SZT

(n=4) und in einem Fall autologe T-Zellen. Die Ergebnisse der antileukämischen Aktivität für die individuellen Fälle sind in Tabelle 2 (rechte Seite) abgebildet.

6.4.1 T-Zell-Profile vor 'MNC'- oder 'DC'-Stimulation (Tag 0) bei AML-Patienten

6.4.1.1 *Die Expressionsprofile der Aktivierungs- und Proliferationsmarker auf T-Zellen vor ,DC'- oder ,MNC'-Stimulation unterscheiden sich in der Gruppe der ,Lysierer' und der ,Nicht-Lysierer' nicht*

An Tag 0 konnte kein signifikanter Unterschied der Expressionsprofile der Aktivierungs- und Proliferationsmarker zwischen den Gruppen der 'Lysierern' und 'Nicht-Lysierern' beobachtet werden (siehe Abb. 5a, linke Seite).

6.4.1.2 *Tendenziell niedrigere Werte an CD8⁺ T-zellen in der Gruppe der ,Lysierer' vor der ,DC'- nicht aber der ,MNC'-Stimulation*

Vor der ,DC'-Stimulation an Tag 0 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den späteren Lysieren und Nicht-Lysierer in den Expressionsprofilen der CD152⁺, CD4⁺ T_{reg}, CD39⁺, CD73⁺, CD39⁺CD4⁺, CD39⁺CD25⁺⁺, CD127^{low}, T_{naive reg}, T_{eff/em reg} und T_{cm reg} nachgewiesen werden (siehe Abb. 5b, linke Seite). Jedoch konnten vor der 'DC'-Stimulation in der Gruppe der späteren Lysierer tendenziell niedrigere Anteile an CD8⁺ T_{reg} (bezogen auf CD8⁺-Zellen im Vergleich zur Gruppe der späteren Nicht-Lysierer nachgewiesen werden (10%±3% versus 23%±12% p≤0.1, siehe Abb. 5b, linke Seite).

Vor der 'MNC'-Stimulation konnten zwischen den späteren 'Lysierern' und 'Nicht-Lysierern' keine signifikanten Expressionsunterschiede der regulatorischen Untergruppen beobachtet werden (nicht abgebildet).

6.4.2 T-Zell-Profile nach 'MNC'- oder 'DC'-Stimulation bei AML-Patienten

6.4.2.1 *Expressionsprofile der Aktivierungs- und Proliferationsmarker zeigen nach ,DC'- oder ,MNC'-Stimulation keine signifikanten Unterschiede bei AML-Patienten*

Nach der 'DC'-Stimulation konnten keine signifikanten Unterschiede der Anteile aktivierter T-Zellen (positiv für CD69⁺, CD71⁺, CD25⁺, CD122⁺ und CD127⁺) zwischen der Gruppe der 'Lysierer' und 'Nicht-Lysierer' aufgezeigt werden (siehe **Abb. 5a, rechte Seite**). Nach 'MNC'-Stimulation konnten jedoch tendenziell höhere Werte an CD127⁺CD8⁺ T-Zellen ($p \leq 0.1$) sowie CD127⁺CD4⁺ T-Zellen ($p \leq 0.1$) in der Gruppe der 'Nicht-Lysierer' beobachtet werden (nicht abgebildet), obwohl sich vor der ,MNC'-Stimulation diesbezüglich keine Unterschiede zeigten.

6.4.2.2 *Die Gruppe der ,Lysierer' weist signifikant niedrigere Anzahlen an CD8⁺ T_{reg} und T_{eff/em reg} nach ,DC', jedoch nicht nach ,MNC'- Stimulation bei AML-Patienten auf*

Für die folgenden regulatorischen T-Zell-Expressionsprofile konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe der Lysierer und Nicht-Lysierer nach ,DC'-Stimulation nachgewiesen werden: CD152⁺, CD4⁺T_{reg}, CD73⁺, CD39⁺, CD39⁺CD25⁺⁺CD127_{low}, T_{naive reg} und T_{cm reg} (siehe **Abb. 5b, rechte Seite**).

Tendenziell niedrigere Mengen an CD39⁺CD4⁺ T-Zellen (bezogen auf CD4⁺ Zellen) wurden bei den Lysierern im Vergleich zu den Nicht-Lysierern nach ,DC'-Stimulation beobachtet (29%±14% versus 44%±13%, $p \leq 0.1$).

Wie bereits zuvor beschreiben, konnte vor der 'DC'-Stimulation in der späteren Gruppe der 'Lysierer' tendenziell niedrigere Anteile an CD8⁺ T_{reg} (bezogen auf CD8⁺-Zellen; $p \leq 0.1$) sowie T_{eff/em reg} (bezogen auf T_{eff/em}) gezeigt werden (s. Kapitel 6.4.1.2). Diese Unterschiede zeigten nun nach 'DC'-Stimulation statistische Signifikanz. Nach der ,DC'-Stimulation konnten in der Gruppe der 'Lysierer' signifikant niedrigere Werte an CD8⁺ T_{reg} (bezogen auf

CD8⁺-Zellen) verglichen mit der Gruppe der 'Nicht-Lysierer' beobachtet werden (45±15% versus 76±13%, p<0.05). Darüber hinaus zeigten 'DC'-stimulierte T-Zellen mit lytischer Aktivität signifikant niedrigere Anteile an T_{eff/em reg} (bezogen auf die T_{eff/em}) im Vergleich zu den 'Nicht-Lysierern' nach 'DC'-Stimulation (49±12% versus 75%±7%, p<0.005, **siehe Abb. 5b, rechte Seite**). Interessanterweise konnten diese Korrelationen zwischen den Expressionsprofilen der regulatorischen T-Zellen und der antileukämischen Funktionalität nach 'MNC'-Stimulation nicht beobachtet werden. Die Anteile der CD4⁺ T_{reg} (bezogen auf CD4⁺-Zellen) zeigten nach 'DC'- oder 'MNC'-Stimulation keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe der 'Lysierer' und der Gruppe der 'Nicht-Lysierer' (52±15% vs. 51±19%). Aus diesem Grund scheint diese Zellpopulation nicht prädiktiv für die antileukämische Funktion der 'DC'- oder 'MNC'-stimulierten T-Zellen zu sein.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie somit, dass niedrige Anteile an T_{reg}-Subpopulationen (CD8⁺ T_{reg}, T_{eff/em reg} und CD39⁺CD4⁺) in unstimulierten und noch mehr in 'DC'-stimulierten T-Zellen mit einer verbesserten ex-vivo antileukämischen T-Zellaktivität einhergehen (**siehe Abb. 5b**).

Vor 'DC'-Stimulation

Nach 'DC'-Stimulation

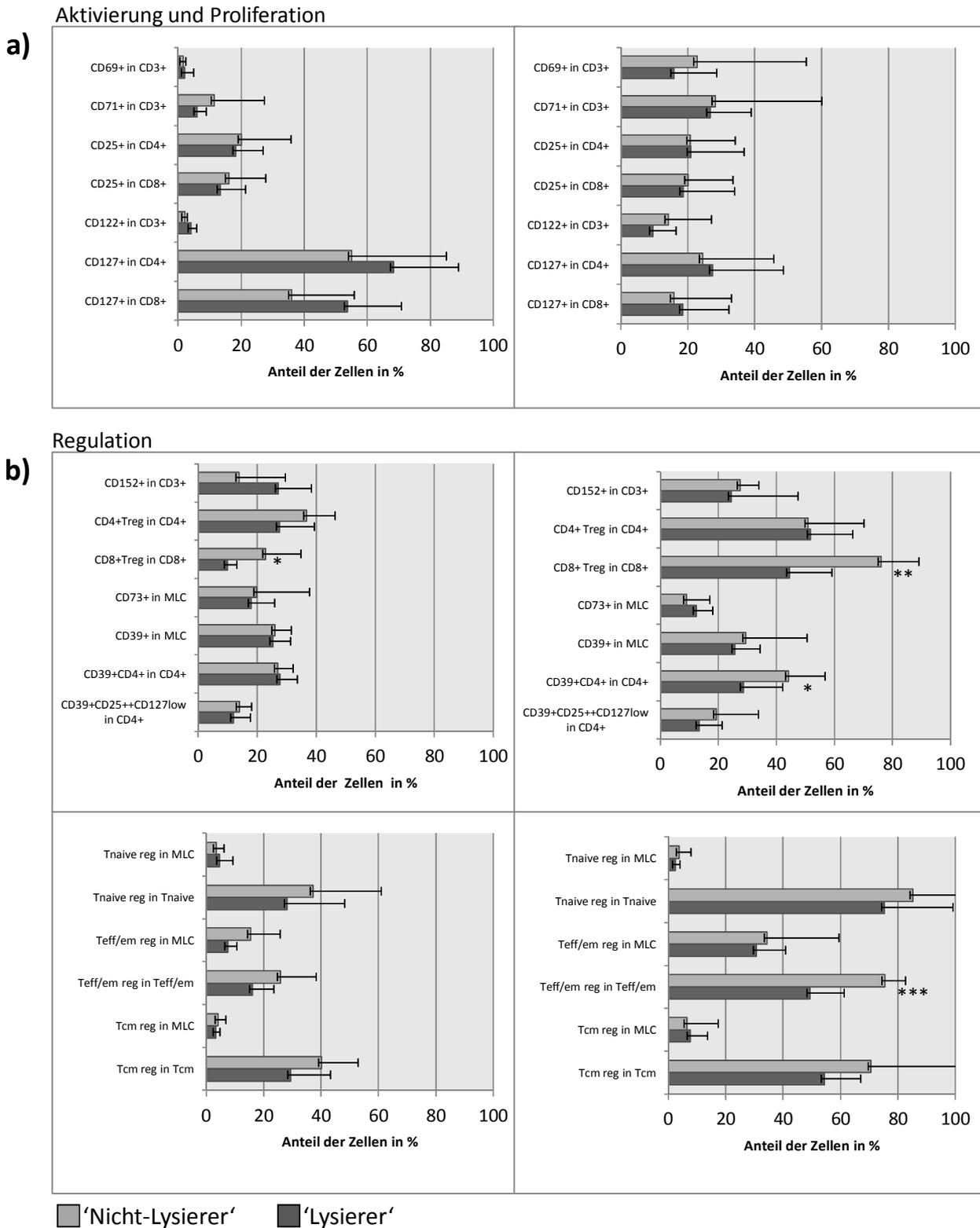


Abbildung 5: Korrelation der T-Zell-Untergruppen mit der antileukämischen Funktion von 'DC'-stimulierten T-Zellen (*p=0.05-0.1, **=p < 0.05, ***=p < 0.005).

6.5 Cut-off-Werte der T_{reg} -Subpopulationen sind prädiktiv für die antileukämische Reaktivität von unstimulierten sowie von ‘DC’-stimulierten T-Zellen bei AML-Patienten (Abb. 6)

Mit dem Ziel bessere prädiktive Parameter des antileukämischen Verhaltens von ‘DC’-stimulierten oder unstimulierten T-Zellen zu erhalten, wurden die Fälle hinsichtlich ihrer antileukämischen Funktionalität gruppiert und Cut-off-Werte für die folgenden regulatorischen Subpopulationen definiert: $CD8^+ T_{reg}$ (bezogen auf $CD8^+$ -Zellen), $T_{eff/em reg}$ (bezogen auf $T_{eff/em}$), $T_{cm reg}$ (bezogen auf T_{cm}) und $T_{naive reg}$ (bezogen auf T_{naive}). Es konnten Cut-off-Werte definiert werden, welche bereits vor der ‘DC’-Stimulation eine Vorhersage der späteren lytischen Aktivität erlaubten (**siehe Abb. 6**). Im Detail konnte gezeigt werden, dass die Fälle nach ‘DC’-Stimulation mit weniger als 60% $CD8^+ T_{reg}$ (bezogen auf $CD8^+$ -Zellen), weniger als 60% $T_{eff/em reg}$ (bezogen auf $T_{eff/em}$ -Zellen) sowie weniger als 70% $T_{cm reg}$ (bezogen auf T_{cm} -Zellen) in 80% bis 100% eine positive antileukämische T-Zell-Aktivität aufwiesen. Die Fälle mit höheren Anteilen dieser regulatorischen T-Zellen hatten eine hohe Wahrscheinlichkeit (67-100%), der Gruppe der ‘Nicht-Lysierer’ anzugehören. Darüber hinaus zeigte sich, dass diese Cut-off-Werte nach der ‘DC’-Stimulation zusätzlich an Aussagekraft gewannen und zwischen den Gruppen eine noch bessere Diskrimination erlaubten. Diese Cut-off-Werte konnten nur nach ‘DC’-, nicht aber nach ‘MNC’-Stimulation beobachtet werden. Darüber hinaus konnten keine Cut-off-Werte bezüglich der Expression der Aktivierungs- und Proliferationsmarker definiert werden.

Im nächsten Schritt wurde versucht anhand dieser Ergebnisse eine Korrelation mit dem klinischen Verlauf der Patienten herzustellen. 5 der 12 Patienten erhielten eine Immuntherapie, wobei 3 Patienten nicht ansprachen (‘Non-Responder’), ein Patient auf die Therapie ansprach (‘Responder’) sowie ein Patient aufgrund von SZT-bezogenen Komplikationen verstarb. Eine statistisch wirksame Aussage bezüglich des klinischen Outcomes war auf Grund der zu geringen Datenlage von nur einem verwertbaren ‘Responder’

nicht möglich. Der 'Responder'-Patient hatte vor der 'DC'-Stimulation im Vergleich zu den 'Non-Respondern' niedrigere Anteile an $CD8^+$ T_{reg} sowie $T_{eff/em\ reg}$ und höhere Anteile von $T_{naive\ reg}$ vor sowie nach der 'DC'-Stimulation (nicht abgebildet).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Fälle mit antileukämischer Funktion im Allgemeinen niedrigere Anteile an T_{reg} -Subpopulationen (im Speziellen $CD8^+$ T_{reg} und $T_{eff/em\ reg}$) bereits in unstimulierten sowie deutlich bei 'DC'-stimulierten T-Zellen aufwiesen.

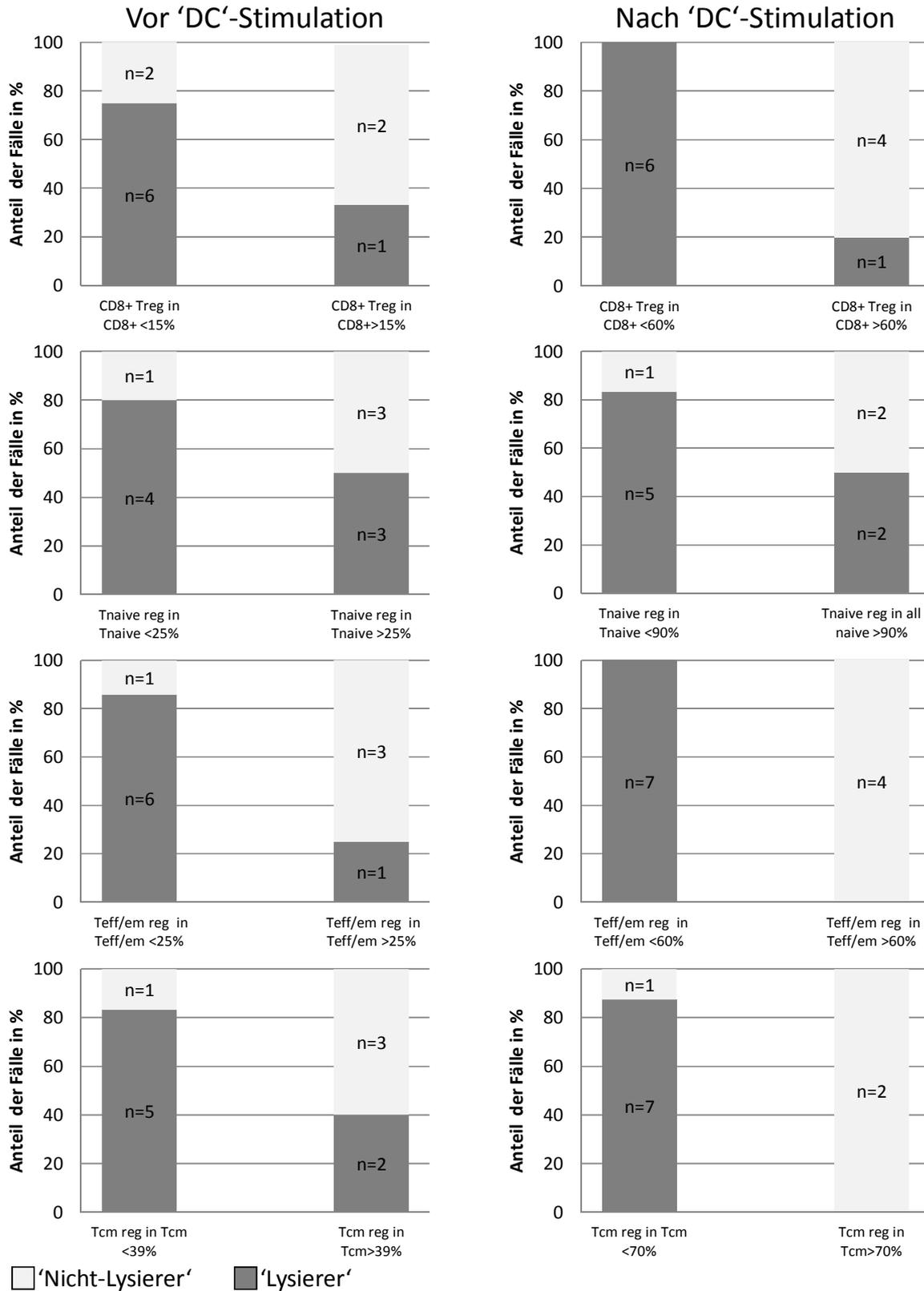


Abbildung 6: Cut-off-Werte der T_{reg}-Subpopulationen können die antileukämische Reaktivität von unstimulierten sowie von 'DC'-stimulierten T-Zellen vorhersagen.

7 Diskussion

Regulatorische T-Zellen (iT_{reg}) und ihre verschiedenen Untergruppen spielen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Immunantworten. In Bezug auf Patienten, die an akuter myeloischer Leukämie (AML) erkrankt sind, ist der Einfluss der T_{reg} von besonderem Interesse: Einerseits konnte der immunsuppressive Effekt der T_{reg} und ihre Fähigkeit lebensgefährliche ‘Graft-versus-Host’-Erkrankungen (GVHD) nachhaltig zu unterdrücken nachgewiesen werden [59-61], andererseits korreliert eine hohe Anzahl an T_{reg} nach Stammzelltherapie beziehungsweise nach adoptivem T_{reg} -Zelltransfer aber auch mit einem verminderten ‘Graft-versus-Leukemia’ (GvL) -Effekt, welcher bei AML Patienten gewollt ist [62-64]. Es konnte gezeigt werden, dass die aus leukämischen Blasten generierten dendritische Zellen (DC_{leu}) effektive professionelle antigenpräsentierende Zellen sind, welche die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von naiven T-Zellen in verschiedene T-Effektorzellen induzieren. Unsere Forschungsgruppe zeigte kürzlich, dass diese Umwandlung von leukämischen Blasten in DC_{leu} einerseits die Vermittlung einer antileukämischen T-Zell-Antwort verbessern kann und darüber hinaus ein praktikables Ex-vivo-Modell zur Erforschung stimulatorischer Effekte auf T-Zellen bereitstellt [55]. Um neue Einblicke in die Rolle der T_{reg} sowie der Vermittlung antileukämischer T-Zell-Antworten zu gewinnen, untersuchten wir das Profil von unstimulierten, mit ex-vivo DC_{leu} enthaltenden DC (‘DC’)-stimulierten oder mit leukämischen Blasten enthaltenden mononukleärer Zellen (‘MNC’)-stimulierten T-Zellen von AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Zuletzt wurde der Einfluss der T_{reg} Subpopulationen auf die antileukämische Funktionalität untersucht, indem die T_{reg} Verteilung mit einer effektiven antileukämischen T-Zell Zytotoxizität (‘Lysierer’ versus ‘Nicht-Lysierer’) korreliert wurde.

Zunächst konnte in der vorliegende Studie frühere Ergebnisse unserer Forschungsgruppe bestätigt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass ‘DC’-stimulierte T-Zellen die

Vermittlung der antileukämischen T-Zell-Antwort im Vergleich zu 'MNC'-stimulierten T-Zellen verbessern. In der vorliegenden Untersuchung zeigten unstimulierte T-Zellen eine geringere Induktion der antileukämischen T-Zell-Antwort als 'DC'-stimulierte T-Zellen, jedoch eine höhere prozentuale antileukämische Funktion als 'MNC'-stimulierte T-Zellen [55, 56]. Diese Ergebnisse tragen zu der Annahme bei, dass das blasteninduzierte inhibitorische Mikromilieu durch die Konversion der Blasten zu DC_{leu} abgeschafft werden kann [54].

Aktivierung und Proliferation nach 'DC'- oder 'MNC'-Stimulation

Eine T-Zell-Stimulation mit 'DC' oder 'MNC' führt zu einer allgemeinen T-Zell-Aktivierung und -Proliferation [56]. Während der 'DC'- oder 'MNC'-Stimulation konnte eine Hochregulation der Aktivierungs- und Proliferationsoberflächenmarker gemessen werden. Analog zu früheren Studien konnte auch in der vorliegenden Untersuchung das typische Bild einer frühzeitigen Hochregulation von CD69⁺ bereits an Tag 1 sowie eine verzögerte Hochregulation des Proliferationsmarkers CD71⁺ mit einer maximalen Oberflächenexpression auf T-Zellen an Tag 5 beobachtet werden [65, 66]. CD25⁺ wurde bereits auf der Oberfläche von unstimulierten T-Zellen relativ stark exprimiert und zeigte im gesamten Zeitverlauf der T-Zellstimulation keine signifikante Hochregulation. Nguyen et al. beschrieben die kombinierte Expression von CD71⁺ und CD25⁺ als zuverlässigen Marker der T-Zell-Proliferation [66]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen jedoch darauf hin, dass die singuläre Expression von CD71⁺ der verlässlichste Marker für die Evaluation der T-Zell-Proliferation sein könnte. Im Einklang mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen konnte auch in der vorliegenden Studie eine Herunterregulation von CD127⁺, dem IL-7-Rezeptor, während der T-Zell-Proliferation gezeigt werden [67, 68]. Der IL-7-Rezeptor ist wie aus Studien bekannt in der frühen Phase der T-Zellaktivierung wichtig [69]. Wir beobachteten eine signifikant erhöhte Oberflächenexpression von CD127⁺ auf unstimulierten T-Zellen in

gesunden Probanden im Vergleich zu AML-Patienten. Dies könnte auf ein höheres Proliferationspotenzial gesunder T-Zellen verglichen mit den T-Zellen bei AML hindeuten.

CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{low} T_{reg} an Stelle von FOXP3⁺ T_{reg}

T_{reg} werden ursprünglich anhand der Expression des intrazellulären Transkriptionsfaktors FOXP3⁺, einem bedeutsamen Regulator der Entwicklung und Funktion von T_{reg}, definiert. FOXP3⁺ wird als einer der verlässlichsten T_{reg}-Marker angesehen [34, 70], jedoch existieren auch Studien, die die Existenz von suppressiven T-Zellen, welche kein FOXP3⁺ exprimieren, beschreiben [53]. Zahlreiche Studien konnten eine hohe Korrelation zwischen der Expression von FOXP3⁺ und der niedrig exprimierten IL-7-Rezeptor- α -Kette (CD127^{low}) auf T_{reg} belegen [71-73]. Darüber hinaus beschrieben Hartigan-O'Connor et al. suppressive CD25⁺ CD127^{low} T-Zellen, die FOXP3⁺ nur in geringem Maße exprimieren [73]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie die Expression von CD127^{low} als T_{reg} Marker genutzt, um FOXP3⁺ sowohl als auch FOXP3⁻ T_{reg} zu beschreiben. Darüber hinaus wurde durch die ansonsten ausschließliche Fokussierung auf extrazelluläre Marker eine Beeinträchtigung der Zellfärbe-Methodik durch Permeabilisierungstechniken, welche für die Messung intrazellulärer Marker unabdingbar wären, verhindert.

Eine hohe Anzahl bestimmter T_{reg} Untergruppen korreliert mit malignen Erkrankungen

Es wurde bereits demonstriert, dass eine erhöhte Anzahl an T_{reg} sowie der Verlust an T_{reg}-vermittelter Immuntoleranz mit mehreren soliden malignen Tumoren sowie hämatologischen Erkrankungen korreliert [64]. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine signifikant höhere Anzahl verschiedener T_{reg}-Untergruppen in unstimulierten T-Zellen aufwiesen. Diese Erkenntnis korreliert mit den Ergebnissen früherer Studien [30, 74]. Shenghui et al. konnten bereits zeigen, dass eine erhöhte Anzahl von T_{reg} im peripheren Blut sowie im Knochenmark mit einer schlechteren Prognose bei AML-Patienten assoziiert ist [75]. Obwohl die meisten dieser Studien auf die

bereits gut erforschten $CD4^+CD25^{\text{high}}FOXP3^+$ T_{reg} beschränkt waren, gab es in der letzten Zeit einige Berichte über andere Subpopulationen an T_{reg} von klinischem Interesse. Darüber hinaus konnte kürzlich neben $CD4^+$ T_{reg} auch die Existenz von zytotoxischen $CD4^+$ T-Zellen gezeigt werden. Dies widerspricht dem Paradigma von $CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen [76]. Derzeit werden die bisher weniger gut untersuchten $CD8^+$ T_{reg} -Populationen und ihre suppressive Rolle bei Tumorerkrankungen intensiv erforscht [77, 78]. Es gibt derzeit vermehrt Anhaltspunkte, die darauf hinweisen, dass $CD8^+$ T_{reg} im Tumormikromilieu solider Tumorerkrankungen wie dem Prostata- oder Ovarialkarzinom akkumulieren [78-80]. Darüber hinaus konnten von Chaput et al. signifikant höhere Anteile von zirkulierenden $CD8^+$ T_{reg} im peripheren Blut von Patienten mit Kolonkarzinom beschrieben werden [81]. Demgegenüber ist derzeit nur wenig über zirkulierende $CD8^+$ T_{reg} im peripheren Blut von AML-Patienten bekannt.

Vor kurzem konnten verschiedenen Arbeitsgruppen T_{reg} -Subpopulationen beschreiben, die aus phänotypisch und funktionell verschiedenen Subtypen wie naiven T_{reg} oder Effektor- T_{reg} bestehen und sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Differenzierung in Effektor- oder Memory-Zellen nach Antigenkontakt unterscheiden [51-53, 82]. In der vorliegenden Studie konnte eine höhere Anzahl von $CD4^+$ T_{reg} und $CD8^+$ T_{reg} sowie von $T_{\text{naive reg}}$, $T_{\text{cm reg}}$, $T_{\text{eff/em reg}}$ im peripheren Blut von AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gezeigt werden. Diese Ergebnisse implizieren, dass die regulatorischen und Effektor-T-Zellen eine höhere Plastizität aufweisen als ursprünglich angenommen.

Eine weitere Untergruppe der T_{reg} ist definiert durch die Vermittlung der suppressiven Wirkung von Adenosin, welches via den Ektoenzymen $CD39^+$ (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase) und $CD73^+$ (ecto-5'-nucleotidase 1), welche die sequentielle Hydrolyse von ATP/ADP katalysieren, entsteht [83]. Beim Menschen wird $CD39^+$ auf B-Zellen, leukämischen Blasten, T-Zellen sowie T_{reg} , jedoch mit Beschränkung auf die $T_{\text{eff/em reg}}$,

exprimiert [84]. Szczepanski et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass T_{reg} bei AML-Patienten $CD39^+$ und $CD73^+$ exprimieren und dadurch ATP effizienter hydrolysieren können als T_{reg} von gesunden Probanden [30]. Da die meisten unserer AML-Patienten während chemotherapeutischer Behandlung untersucht wurden, fanden wir in den unstimulierten T-Zellen der AML-Patienten eine stärkere Expression von $CD39^+$ und eine geringere Expression von $CD73^+$ als bei gesunden Probanden. Dies weist darauf hin, dass die Oberflächenexpression von $CD39^+$ und $CD73^+$ bei AML-Patienten durch Effekte der Tumorlyse, insbesondere durch entstehende freie Nukleotide beeinflusst wird. Aufgrund dieser unterschiedlichen Expressionslevel schlagen wir vor, $CD39^+$ T_{reg} nur bei AML-Patienten *ohne* erhöhte Werte an freien Nukleotiden (beispielsweise auf Grund einer Chemotherapie) zu überwachen.

CTLA4 ($CD152^+$) vermittelt die Suppression indem es an $CD80^+$ und $CD86^+$ auf DC bindet, wodurch diese kostimulatorischen Oberflächenmoleküle der T-Zell-Aktivierung auf DC reduziert werden [85]. Wir konnten weder einen signifikanten Unterschied in der Oberflächenexpression von $CD152^+$ auf den T_{reg} von AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden feststellen, noch einen Anstieg dieses Oberflächenmarkers während der 'DC'- oder 'MNC'-Stimulation. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CTLA4 in diesem Setting keine bedeutende Rolle spielt. Dies wird durch die Ergebnisse früherer Untersuchungen bestätigt [86].

Die kinetische Entwicklung der T_{reg} Untergruppen während der Stimulation

Ein allgemeines Problem aller T_{reg} -Marker ist ihre generelle Hochregulation auf aktivierten T-Zellen, wodurch ihre spezifische Korrelation mit T_{reg} reduziert wird. Eine aktuelle Publikation zeigte in diesem Zusammenhang eine generelle in-vitro-Vermehrung von $CD4^+$ T_{reg} durch 'DC'-Stimulation während der MLR [87]. Mahic et al. beschrieben einen Anstieg von $CD8^+$ T_{reg} durch eine kontinuierliche Antigen-Stimulation [88]. Während der 'DC'- oder 'MNC'-

Stimulation fanden wir einen kontinuierlichen Anstieg der meisten der T_{reg} -Untergruppen sowohl bei AML-Patienten als auch bei gesunden Probanden. Nach der Stimulation via MLR konnten immer noch signifikant erhöhte Werte von $T_{cm\ reg}$ und $T_{eff/em\ reg}$ sowie tendenziell erhöhte Werte $CD4^+$ und $CD8^+$ T_{reg} bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erfasst werden.

Ältere Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Hochregulation von $CD39^+$ während der ex-vivo-Stimulation von gesunden T-Zellen mit Nukleosiden während die Expression von $CD73^+$ abnahm ([89]; unpublizierte Daten). Auch in der vorliegenden Studie konnte während der 'DC'- und 'MNC'-Stimulation bei gesunden Probanden eine Hochregulation von $CD39^+$ und eine Herunterregulation von $CD73^+$ beobachtet werden. Interessanterweise zeigten sich bei AML-Patienten während der Stimulation keine Unterschiede der Expression von $CD39^+$ und $CD73^+$. Dies ist wahrscheinlich durch die bereits vor der Kultur erhöhte Expression von $CD39^+$ sowie die niedrige Expression von $CD73^+$ bedingt (siehe oben).

Die antileukämische Funktionalität korreliert mit der Anzahl an T_{reg}

In der vorliegenden Studie konnte eine antileukämische T-Zell-Antwort in 60% der Fälle nach 'DC'-Stimulation sowie in 40% nach 'MNC'-Stimulation beobachtet werden. Aus diesem Grund scheint die 'DC'-Stimulation eine geeignete Option zu sein, um die T-Zell-Anergie zu reversieren und eine erneute antileukämische T-Zell-Antwort zu generieren. Diese Beobachtung wird durch weitere Studien unserer Arbeitsgruppe unterstützt [54, 55]. Im Zusammenhang mit der aktuellen Studie konnten darüber hinaus nachgewiesen werden, dass Unterschiede der T_{reg} -Profile mit der antileukämischen Funktionalität nach 'DC'-, nicht aber nach 'MNC'-Stimulation korrelieren. Zusätzlich konnten ex-vivo Cut-off-Werte, die die antileukämische Funktionalität vorhersagen können, definiert werden.

In der vorliegenden Studie konnten nach ‘DC’-Stimulation signifikant höhere Anteile von $CD8^+$ T_{reg} , und $T_{eff/em\ reg}$ in der Gruppe der „Nicht-Lysierer“ als in der Gruppe der „Lysierer“ nachgewiesen werden. Die Expressionsrate dieser T_{reg} -Untergruppen war in der Gruppe der „Lysierer“ demzufolge vergleichbar mit dem Expressionsprofil der gesunden Probanden. Überraschenderweise konnten keine Korrelationen bezüglich der $CD4^+$ T_{reg} zwischen der Gruppe der “Nicht-Lysierer” und der Gruppe der “Lysierer” aufgezeigt werden.

8 Ausblick

Zusammenfassend geben die Ergebnisse neue Einblicke in die zellulären Profile sowie die antileukämische T-Zell-Funktionalität von T_{reg} . Unsere Untersuchungen deuten auf eine bedeutende Rolle der $CD8^+$ T_{reg} und $T_{eff/em\ reg}$ in der Vermittlung des „Immuno-escape-Phänomens“ bei AML-Patienten hin. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Verhältnisse von bestimmten T-Zellen die antileukämische Funktionalität neu generieren können und dabei mit erniedrigten Werten von T_{reg} -Subtypen einhergehen. Es konnten sogar Cut-off-Werte für T_{reg} definiert werden, die eine Abschätzung des „lytischen Potenzials“ der T-Zellen der jeweiligen Patienten zulassen. Die Expression von $CD39^+$ und $CD73^+$ auf T_{reg} -Untergruppen muss bei Patienten mit einem hohen Zell-Turnover aufgrund von Chemotherapie kritisch betrachtet werden. Aus klinischer Sicht lässt sich aus den vorliegenden Daten die Empfehlung aussprechen, diese bestimmten T_{reg} -Untergruppen ($CD8^+$ T_{reg} , und $T_{eff/em\ reg}$) zu überwachen mit dem Ziel in-vivo Cut-off-Werte zu definieren. Im Hinblick auf immuntherapeutische Ansätze sind weitere Untersuchungen notwendig, um mehr über die Mechanismen, welche in die Suppression der antileukämischen GVL Reaktion involviert sind, zu lernen um dann gezielte Strategien zur Manipulation der T_{reg} Untergruppen (z.B. zur Abschaffung eines inhibitorischen Blasteninduzierten Mikromilieu in vivo) zu finden. Aber auch bezüglich der genaueren Mechanismen, welche zur Reduktion einer GVH-Erkrankung beitragen und inwiefern diese z. B. durch Elimination autoreaktiver T-Zellen beeinflussbar sind, sind weitere Untersuchungen notwendig.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Helga Schmetzer für die Überlassung dieses Themas und die sowohl fachlich kompetente als auch sehr warmherzige Betreuung, die schnellen Korrekturen sowie die stete Hilfsbereitschaft in allen Fragen bedanken.

Bei Herrn Prof. Hiddemann möchte ich mich für die Möglichkeit zur Promotion an seiner Klinik bedanken.

Besonderer Dank gebührt Tanja Kröll für die Einarbeitung in die Methodik und die sofortige Hilfe bei etwaigen Problemen.

Zudem bedanke ich mich bei meinen Mitdoktoranden Valentin Vogt und Christian Ansprenger für die freundschaftliche Atmosphäre sowie gute Zusammenarbeit während der experimentellen Phase.

Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei meinem Lebensgefährten Alexander Kretschmer für die langjährige Motivationshilfe und Unterstützung bedanken.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums und ihre uneingeschränkte Unterstützung sowie ihr Vertrauen in mich.

10 Publikationsverzeichnis

Kongressbeiträge:

J. Schick, V. Vogt, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, C. Köhne, H.J. Kolb, R. Buhmann, H. Schmetzer. *Antileukaemic T-cell responses after dendritic cell stimulation can be predicted by compositions of regulatory T-cell subpopulations, especially with respect to regulatory central memory and regulatory CD8 cells*. Bone Marrow Transplantation 46, supp 1, abstr. 1048 (2011)

V. Vogt, **J. Schick**, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, C. Köhne, R. Buhmann, H.J. Kolb, H. Schmetzer. *Antileukaemic T-cell responses after DC-stimulation can be predicted by composition of T-cell subpopulations especially with respect to naïve, central memory and non-naïve T-cells*. Bone Marrow Transplantation 46, supp 1, abstr. 1047 (2011)

H. Schmetzer, B. Steger, D. Bund, A. Gallo, G. Doessinger, **J. Schick**, V. Vogt, C. Grabrucker, A. Liepert, M. Freudenreich, S. Milosevic, J. Tischer, S. Reuther, F. Schuster, D. Busch, J. Adamski, A. Borkhardt, H.J. Kolb, C. Schmid, R. Buhmann. *The T-cells' role in anti-leukemic reactions and perspectives for future therapies of acute myeloid leukemia (AML)*. 13. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Herrsching, p55: Vortrag (2011).

J. Schick, V. Vogt, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, C.H. Köhne, H.J. Kolb, J. Tischer, R. Buhmann, H. Schmetzer. *Antileukaemic T-cell responses can be predicted by compositions of regulatory T-cell subpopulations, especially with respect to regulatory effector-memory and regulatory CD8+ T-cells*. Bone Marrow Transplantation 47, supp 1, abstr. 898 (2012).

V. Vogt, **J. Schick**, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, H. Köhne, R. Buhmann, H.J. Kolb, H. Schmetzer. *Antileukemic T-cell response after DC stimulation can be predicted by the composition of T-cell subpopulations: Tcm, Teff as well as by the expression of activation markers and β integrins on T-cells*. Bone Marrow Transplantation 47, supp 1, abstr. 882 (2012).

B. Steger, S. Milosevic, G. Doessinger, S. Reuther, A. Liepert, M. Zerwes, **J. Schick**, V. Vogt, F. Schuster, T. Kroell, D. Busch, A. Borkhardt, H.J. Kolb, J. Tischer, R. Buhmann, H. Schmetzer. *CD4+ and CD8+ T-cell reactions against leukaemia-associated or minor histocompatibility antigens in AML patients after allogeneic SCT*. 14. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Herrsching, p55: Vortrag (2012).

J. Schick, V. Vogt, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, C.H. Köhne, H.J. Kolb, J. Tischer, R. Buhmann, H. Schmetzer. *Antileukaemic T-cell responses can be predicted by compositions of regulatory T-cell subpopulations, especially with respect to regulatory effector-memory and regulatory CD8+ T-cells*. 14. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Herrsching, p50: Vortrag (2012).

.C. Ansprenger, **J. Schick**, V. Vogt, M. Zerwes, T. Kroell, H. Kolb, B. Mayr, A. Mayr, H. Schmetzer. *Paramunity-inducing factors have the capacity to improve DC-maturity, proportions of DCleu and early T-cell proliferation, but impair ex-vivo antileukemic functionality and therefore require thorough analyses before application in man*. Bone Marrow Transplantation 47, supp 1, abstr. 883 (2012).

B. Steger, S. Milosevic, G. Doessinger, S. Reuther, A. Liepert, M. Zerwes, **J. Schick**, V. Vogt, F. Schuster, T. Kroell, D. Busch, A. Borkhardt, H.J. Kolb, J. Tischer, R. Buhmann, H. Schmetzer. *CD4+ and CD8+ T-cell reactions against leukaemia-associated or minor histocompatibility antigens in AML patients after allogeneic SCT*. Bone Marrow Transplantation 47, supp 1, abstr. 884 (2012).

Originalarbeiten:

J. Schick, V. Vogt, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, D. Kraemer, CH. Köhne, A. Hausmann, R. Buhmann, J. Tischer, H. Schmetzer. *Antileukemic T-cell responses can be predicted by the composition of specific regulatory T-cell subpopulations*. J. Immunotherapy, Vol.36, number 4, 223-237; May 2013 (2013) *Impact-punkte:3.5*

B. Steger, S. Milosevic, G. Doessinger, S. Reuther, A. Liepert, M. Zerwes, **J. Schick**, V. Vogt, F. Schuster, T. Kröll, D. H. Busch, A. Borkhardt, H.J. Kolb, J. Tischer, R. Buhmann, H. Schmetzer. *CD4+ and CD8+ T-cell reactions against leukemia-associated- or minor histocompatibility antigens in AML patients after allogeneic SCT*. Im Druck Immunobiology (2013): *Impact-punkte:2.8*

V. Vogt, **J. Schick**, C. Ansprenger, M. Zerwes, T. Kröll, C. Schweiger, D. Krämer, C.-H. Köhne, A. Hausmann, R. Buhmann, J. Tischer, H. Schmetzer: *Profiles of activation-, differentiation markers or β -integrines contribute to predict T-cells' antileukemic responses after DC-stimulation*. Im Druck J. Immunotherapy (2013): *Impact-punkte:3.5*

In Vorbereitung

C. Ansprenger, **J. Schick**, V. Vogt, M. Zerwes, I. Harabacz, T. Kroell, H. Kolb, B. Mayr, A. Mayr, H. Schmetzer. *Paramunity-inducing factors have the capacity to improve DC-maturity, proportions of DCleu and early T-cell proliferation, but impair ex-vivo antileukemic functionality and therefore require thorough analyses before application in man*. In Vorbereitung (2014).

Buchbeiträge:

The T-cells' Role in Antileukemic Reactions- Perspectives for Future Therapies, H. Schmetzer and C. Schmid Taner Demirer, *New advances in Stem Cell Transplantation, in Tech Part 1: 'Basic Aspects of Stem Cell Transplantation' Chapter 4, pg 59-82*

3.2 T-Zellen addressing unknown leukemia-specific antigens

3.2.1 Establishment and maintenance of protective immunity by dendritic cells derived from leukemic blasts (Group leaders: Borkhardt, Buhmann, Schmetzer; Scientists: Fischbacher, Freudenreich, Grabrucker, Liepert, Merle, Reuther, **Schick**, Schuster, Vogt)

3.2.2 Antileukemic T-cell profiles to predict antileukemic reactions of DC/DCleu stimulated T-Zellen and prognosis of patients (Group leaders: Schmetzer, Scientists: Fischbacher, Freudenreich, Grabrucker, Liepert, Merle, **Schick**, Vogt)

11 Literaturverzeichnis

1. **Schmetzer, H.M.**, et al., *Quantification of ex vivo generated dendritic cells (DC) and leukemia-derived DC contributes to estimate the quality of DC, to detect optimal DC-generating methods or to optimize DC-mediated T-cell-activation-procedures ex vivo or in vivo.* *Leukemia*, 2007. **21**(6): p. 1338-41.
2. Giles, F.J., *New drugs in acute myeloid leukemia.* *Curr Oncol Rep*, 2002. **4**(5): p. 369-74.
3. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes.* *Br J Haematol*, 1982. **51**(2): p. 189-99.
4. Hossfeld, D.K.e.a., *Myelodysplastische Syndrome: Neue WHO-Klassifikation und Aspekte zur Pathogene, Prognose und Therapie.* *Dtsch Arztebl* 2001, 2001. **98**(36): p. A-2272.
5. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group.* *Br J Haematol*, 1976. **33**(4): p. 451-8.
6. Pollyea, D.A., H.E. Kohrt, and B.C. Medeiros, *Acute myeloid leukaemia in the elderly: a review.* *Br J Haematol*, 2011. **152**(5): p. 524-42.
7. Yanada, M. and T. Naoe, *Acute myeloid leukemia in older adults.* *Int J Hematol*, 2012. **96**(2): p. 186-93.
8. Estey, E.H., *Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management.* *Am J Hematol*. **87**(1): p. 89-99.
9. Ljungman, P., et al., *Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe.* *Bone Marrow Transplant*, 2006. **37**(5): p. 439-49.
10. Vogelsang, G.B., L. Lee, and D.M. Bensen-Kennedy, *Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant.* *Annu Rev Med*, 2003. **54**: p. 29-52.
11. Cahn, J.Y., et al., *Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study.* *Blood*, 2005. **106**(4): p. 1495-500.
12. Goulmy, E., et al., *Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation.* *N Engl J Med*, 1996. **334**(5): p. 281-5.
13. Loiseau, P., et al., *HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival.* *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007. **13**(8): p. 965-74.
14. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease.* *Lancet*, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
15. Kolb, H.J., *Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes.* *Blood*, 2008. **112**(12): p. 4371-83.
16. **Scholl, N.**, et al., *The role of soluble and cell-surface expressed 4-1BB ligand in patients with malignant hemopoietic disorders.* *Leuk Lymphoma*, 2009. **50**(3): p. 427-36.
17. Tait, B.D., *HLA class I expression on human cancer cells. Implications for effective immunotherapy.* *Hum Immunol*, 2000. **61**(2): p. 158-65.
18. van Luijn, M.M., et al., *Impaired antigen presentation in neoplasia: basic mechanisms and implications for acute myeloid leukemia.* *Immunotherapy*, 2010. **2**(1): p. 85-97.
19. Garrido, F., et al., *Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours.* *Immunol Today*, 1997. **18**(2): p. 89-95.

20. Salih, H.R., et al., *Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 4059-66.
21. Mahic, M., et al., *Differentiation of naive CD4+ T cells into CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells by continuous antigen stimulation*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(5): p. 1111-7.
22. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
23. Lindley, S., et al., *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 92-9.
24. Bladon, J. and P.C. Taylor, *Extracorporeal photopheresis induces apoptosis in the lymphocytes of cutaneous T-cell lymphoma and graft-versus-host disease patients*. Br J Haematol, 1999. **107**(4): p. 707-11.
25. Zhang, H., et al., *TGF-beta-induced myelin peptide-specific regulatory T cells mediate antigen-specific suppression of induction of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 6629-36.
26. DiPaolo, R.J., et al., *Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells*. J Immunol, 2007. **179**(7): p. 4685-93.
27. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
28. Wildin, R.S., et al., *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 18-20.
29. Zhou, Q., et al., *Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive cytotoxic T-cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia*. Blood, 2009. **114**(18): p. 3793-802.
30. Szczepanski, M.J., et al., *Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(10): p. 3325-32.
31. Mougiakakos, D., et al., *Regulatory T cells in cancer*. Adv Cancer Res, 2010. **107**: p. 57-117.
32. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
33. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
34. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
35. Corthay, A., *How do regulatory T cells work?* Scand J Immunol, 2009. **70**(4): p. 326-36.
36. Asseman, C., et al., *An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 995-1004.
37. Fahlen, L., et al., *T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 737-46.
38. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
39. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.

40. Lieberman, J., *The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 361-70.
41. Grossman, W.J., et al., *Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2840-8.
42. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
43. Kobie, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6780-6.
44. Zarek, P.E., et al., *A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells*. Blood, 2008. **111**(1): p. 251-9.
45. Bopp, T., et al., *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1303-10.
46. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
47. Tadokoro, C.E., et al., *Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 505-11.
48. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 762-74.
49. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
50. Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars, *CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1538-43.
51. Kleinewietfeld, M., et al., *CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2877-86.
52. Seddiki, N., et al., *Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2830-8.
53. Miyara, M., et al., *Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor*. Immunity, 2009. **30**(6): p. 899-911.
54. **Schmetzer, H.M.**, *Antileukemic T-cell-mediated immune reactions: limitations and perspectives for future therapies*. Immunotherapy, 2011. **3**(7): p. 809-11.
55. **Grabrucker, C.**, et al., *The quality and quantity of leukemia-derived dendritic cells from patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome are a predictive factor for the lytic potential of dendritic cells-primed leukemia-specific T cells*. J Immunother, 2010. **33**(5): p. 523-37.
56. **Liepert, A., et al.**, *Quality of T-cells after stimulation with leukemia-derived dendritic cells (DC) from patients with acute myeloid leukemia (AML) or myeloid dysplastic syndrome (MDS) is predictive for their leukemia cytotoxic potential*. Cell Immunol, 2010. **265**(1): p. 23-30.
57. **Kremser, A.**, et al., *Dendritic cells (DCs) can be successfully generated from leukemic blasts in individual patients with AML or MDS: an evaluation of different methods*. J Immunother, 2010. **33**(2): p. 185-99.
58. **Dreyssig, J.**, et al., *Various 'dendritic cell antigens' are already expressed on uncultured blasts in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes*. Immunotherapy, 2011. **3**(9): p. 1113-24.

59. Taylor, P.A., C.J. Lees, and B.R. Blazar, *The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3493-9.
60. Edinger, M., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1144-50.
61. Hoffmann, P., et al., *Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 389-99.
62. Jones, S.C., G.F. Murphy, and R. Korngold, *Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD425 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response*. Biol Blood Marrow Transplant, 2003. **9**(4): p. 243-56.
63. Trenado, A., et al., *Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia*. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1688-96.
64. Beyer, M. and J.L. Schultze, *Regulatory T cells in cancer*. Blood, 2006. **108**(3): p. 804-11.
65. Sancho, D., M. Gomez, and F. Sanchez-Madrid, *CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation*. Trends Immunol, 2005. **26**(3): p. 136-40.
66. Nguyen, X.D., et al., *Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells*. J Immunol Methods, 2003. **275**(1-2): p. 57-68.
67. Xue, H.H., et al., *IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13759-64.
68. Foxwell, B.M., et al., *Activation induced changes in expression and structure of the IL-7 receptor on human T cells*. Int Immunol, 1992. **4**(2): p. 277-82.
69. Peschon, J.J., et al., *Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1955-60.
70. Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 490-500.
71. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
72. Seddiki, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1693-700.
73. Hartigan-O'Connor, D.J., et al., *Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells*. J Immunol Methods, 2007. **319**(1-2): p. 41-52.
74. Wang, X., et al., *Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients*. Eur J Haematol, 2005. **75**(6): p. 468-76.
75. Shenghui, Z., et al., *Elevated frequencies of CD4 CD25 CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia*. Int J Cancer, 2010. **129**(6): p. 1373-81.
76. Steger, B., et al., *CD4 and CD8 T-cell reactions against leukemia-associated- or minor-histocompatibility-antigens in AML-patients after allogeneic SCT*. Immunobiology.
77. Smith, T.R. and V. Kumar, *Revival of CD8+ Treg-mediated suppression*. Trends Immunol, 2008. **29**(7): p. 337-42.
78. Wang, R.F., *CD8+ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer*. Hum Immunol, 2008. **69**(11): p. 811-4.

79. Joosten, S.A., et al., *Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 8029-34.
80. Wei, S., et al., *Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5020-6.
81. Chaput, N., et al., *Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue*. Gut, 2009. **58**(4): p. 520-9.
82. Valmori, D., et al., *A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1953-62.
83. Hasko, G., et al., *Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(9): p. 759-70.
84. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
85. Andre, S., et al., *Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications*. Am J Pathol, 2009. **174**(5): p. 1575-87.
86. Tang, Q., et al., *Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(11): p. 2996-3005.
87. Yamazaki, S., et al., *Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 314-29.
88. Mahic, M., et al., *Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)/CD25(+)/FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation*. Eur J Immunol, 2008. **38**(3): p. 640-6.
89. **Schmetzer, H.**, Weiler M., Kroell T., Buhmann R., *Impact of purine Nucleosides on the in vitro Human T- Cells' Proliferation*. in Vorbereitung, 2014.

Fettgedruckt Arbeiten aus der AG Schmetzer

Eidesstattliche Versicherung

Schick, Julia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
**Praediktive Relevanz regulatorischer T-Zellsubpopulationen nach
Stimulation mit dendritischen Zellen leukaemischer Abstammung fuer die
antileukaemische T-Zellantwort**

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

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

Muenchen, 15.04.2014

Ort, Datum


Unterschrift Doktorandin/Doktorand