

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin II**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Expression und klinische Relevanz der Liganden für die  
immunregulatorischen Moleküle 4-1BB und GITR bei  
der Akuten Myeloischen Leukämie**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Alexander Hans Wacker**

**aus  
Tübingen**

**2008**

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

Professor Dr. I. B. Autenrieth

Professor Dr. H. R. Salih

Professor Dr. M. Bitzer



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>AML.....</b>	<b>6</b>
1.1.1	Definition und Epidemiologie .....	6
1.1.2	Krankheitsbild .....	7
1.1.3	Ätiologie .....	8
1.1.4	Pathogenese.....	9
1.1.5	Diagnostik und Klassifikation .....	11
1.1.5.1	Unterscheidung nach der Ätiologie .....	12
1.1.5.2	Klassifikation nach Morphologie, Zytochemie, Immunphänotypisierung und Zytogenetik .....	13
1.1.6	Prognosekriterien .....	18
1.1.6.1	Allgemeine Prognosekriterien .....	18
1.1.6.2	Zytogenetische Risikogruppen.....	18
1.1.7	Therapie.....	20
1.1.7.1	Chemotherapie .....	20
1.1.7.2	Stammzelltransplantation.....	21
1.2	Überblick über das Immunsystem .....	23
1.2.1	Das adaptive Immunsystem.....	24
1.2.2	Das angeborene Immunsystem .....	25
1.3	Die Tumor Nekrose Faktor (TNF) Familie .....	26
1.3.1	4-1BB Ligand (4-1BBL).....	27
1.3.2	GITR Ligand (GITRL).....	28
1.4	Die NK Zell-vermittelte Immunüberwachung der AML.....	30
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	32
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>33</b>
2.1	Auswahl des Patientenkollektivs.....	33
2.2	Verarbeitung des Untersuchungsmaterials.....	34
2.3	Morphologische und zytochemische Untersuchungsmethoden.....	35
2.4	Durchflusszytometrische Untersuchung .....	35

2.4.1	Antikörper.....	36
2.5	Zytogenetische Untersuchungsmethoden .....	36
2.6	Statistische Berechnungen.....	37
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>38</b>
3.1	Expression von GITRL und 4-1BBL bei verschiedenen FAB-Typen .....	41
3.2	Expression von GITRL und 4-1BBL bei primärer und sekundärer AML .....	46
3.3	Expression von GITRL und 4-1BBL bei verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen.....	49
3.4	Expression von GITRL und 4-1BBL und Therapieansprechen der Patienten .....	54
3.5	Expression von GITRL und 4-1BBL und Überleben.....	57
3.6	Korrelation der Expression von GITRL und 4-1BBL mit der Expression von MHC Klasse I und CD 86.....	60
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>64</b>
4.1	Expression der Zielmoleküle innerhalb verschiedener FAB-Typen .....	67
4.2	Expression der Zielmoleküle bei primärer versus sekundärer AML.....	68
4.3	Expression der Zielmoleküle bei verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen.....	69
4.4	Expression und Therapieansprechen.....	70
4.5	Expression und Überleben .....	72
4.6	Korrelation von GITRL und 4-1BBL mit der Expression von Major-Histocompatibility-Complex Class I (MHC Klasse I) und CD 86 .....	75
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>94</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 AML

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Der Begriff Leukämie („weißes Blut“) geht auf R. Virchow 1845 zurück und bezieht sich auf die verbreiterte, weiße Leukozytenmanschette (‘buffy coat’ auf der Erythrozytensäule nach Zentrifugieren des Blutes) bei Leukämiepatienten mit sehr hohen Leukozytenzahlen (Herold G, 1998).

Leukämien sind definiert als maligne Neoplasien der hämatopoetischen Zellen. Die Einteilung der Leukämien erfolgt nach der Zellreihe, von welcher die jeweiligen Leukämiezellen abstammen (lymphatisch/myeloisch) und nach dem Krankheitsverlauf (chronisch/akut), zudem nach dem Differenzierungsgrad der pathologischen Zellen (reifzellig/unreifzellig) und der Ätiologie (primär/sekundär).

Die akute myeloische Leukämie (AML) entsteht durch klonale Expansion myeloischer Vorläuferzellen (Progenitoren). Diese ist Folge verschiedener genetischer Veränderungen, welche die Reifung, Differenzierung und Proliferation beeinflussen. In der Folge kommt es zu einer Akkumulation dieser reifungsgestörten leukämischen Zellen im Knochenmark, was zu einer zunehmenden Verdrängung der normalen Hämatopoese führt. Es resultiert eine zunehmende Knochenmarkinsuffizienz, welche mit Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie einhergeht. Zudem kommt es zu einer Ausschwemmung leukämischer Zellen in das periphere Blut und möglicherweise auch zu einem Übergreifen auf extramedulläre Organe und so letztlich zu entsprechenden klinischen Folgeerscheinungen (Wilms K, 1984).

Die neoplastische Zellpopulation der AML wird durch eine unreife Blastenpopulation repräsentiert. Die „Lücke“ in der Reifungsreihe der Granulozyten mit Vorherrschen unreifer Paramyelozyten und gesunder, ausdifferenzierter Granulozyten bei starker Verminderung der Zwischenstufen wird als „hiatus leucaemicus“ bezeichnet.

Die AML ist eine Erkrankung des höheren Erwachsenenalters, etwas 80% der Fälle treten zwischen dem 60. und 65. Lebensjahr auf. Die Inzidenz beträgt ca. 2-3 Fälle pro 100.000 Einwohnern pro Jahr, dabei etwa 10 Fälle pro 100.000 Einwohner bei den über 70-jährigen (Schön D, 1996) und 0,6 Fälle pro 100.000 Einwohner bei den unter 15-jährigen (Graf N, 1995). Das männliche Geschlecht ist gegenüber dem weiblichen im Verhältnis von etwa 3:2 betroffen. Eine geringere Erkrankungswahrscheinlichkeit haben Frauen mit der Blutgruppe 0 (Jackson N, 1999).

### **1.1.2 Krankheitsbild**

Das klinische Krankheitsbild ist in erster Linie Ausdruck der hämatopoetischen Insuffizienz und erst in zweiter Linie der Zellinfiltration von Organen und Geweben. Der Beginn der Erkrankung verläuft häufig akut. Neben Allgemeinsymptomen wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Fieber, Gewichtsverlust, Kopfschmerzen oder Schlaflosigkeit besteht als Folge der Verminderung funktionstüchtiger Leukozyten eine erhöhte Infektionsbereitschaft.

Auch ohne nachweisbare entzündliche Veränderung tritt oft hohes Fieber auf. Dieses möglicherweise durch den Krankheitsprozess selbst verursachte Fieber zeigt mit morgendlich hohen und abendlich niedrigeren Temperaturen einen vom üblichen Fieverlauf abweichenden Rhythmus.

Aufgrund der verminderten Thrombozytenzahlen sowie durch einen Mangel an Gerinnungsfaktoren bei gesteigerter Fibrinolyse leiden die Patienten an einer unter Umständen lebensbedrohenden Blutungsbereitschaft. Vergrößerungen von Lymphknoten, Leber oder Milz sind dagegen eher selten. (Büchner T, 1997; Begemann M, 1999) Eine Beteiligung des zentralen Nervensystems ist ebenfalls selten, wobei jedoch 5-7% der Patienten asymptomatisch leukämische Blasten im Liquor cerebrospinalis aufweisen (Dekker AW, 1985). Das zerebrale Leukostase-Syndrom, bei dem es bei sehr hoher Leukozytenzahl zu Verschlüssen kleiner Gehirngefäße durch Blasten kommt tritt v.a. bei Kindern mit monoblastären Leukämien auf.

Monozytäre Leukämien disponieren zur Infiltrationen von Organen und Geweben mit Lymphomen, Hepatosplenomegalie, Hautinfiltrationen und

Gingivahyperplasie. Für die myelomonozytäre AML ist eine Häufung tumoröser Infiltrationen des zentralen Nervensystems beschrieben (Holmes R, 1985). Typisch bei der Promyelozytenleukämie ist die hämorrhagische Diathese mit Thrombozytopenie, Fibrinogenmangel und anderen Gerinnungsdefekten aufgrund Freisetzung prokoagulatorischer Substanzen aus den promyelozytären Granula, was zu einer Gerinnungsaktivierung und somit zum Verbrauch verschiedener Gerinnungsfaktoren führt (Imaoka S, 1986; Wejemmans PW, 1989).

### **1.1.3 Ätiologie**

Neuere Erkenntnisse haben zur Aufklärung der multifaktoriellen Ätiologie der AML beigetragen, auch wenn die genauen Abläufe der meisten leukämischen Transformationen noch nicht bis ins Detail erforscht sind.

In den meisten Fällen lässt sich kein auslösender exogener Faktor eruieren. Eine Exposition mit bestimmten Lösungsmitteln wie beispielsweise Benzol oder auch mit ionisierender Strahlung ist jedoch mit einer erhöhten Erkrankungshäufigkeit an AML assoziiert (Austin H, 1988; Levine EG, 1992; Ichimaru M, 1978). Auch die Aufnahme von alkylierenden Substanzen in der Nahrung sowie im Zigarettenrauch erhöht das Erkrankungsrisiko.

Der häufigste zur Entwicklung einer AML beitragende exogene Faktor ist die vorausgehende Behandlung mit einer zytostatischen Therapie, wobei hier insbesondere für Alkylanzien (z.B. Chlorambucil, Melphalan, Nitrosoharnstoffe) und Topoisomerase-II-Hemmstoffe (z.B. Etoposid, Teniposid) eine erhöhte Inzidenz beschrieben ist (Pedersen-Bjergaard J, 1993; Smith MA, 1993). Therapieassoziierte Leukämien stellen 10-20 % aller Erkrankungsfälle dar (Leone G, 1999). Sie treten in der Regel 3 – 5 Jahre nach Therapie auf. Häufig gehen der Leukämie myelodysplastische Veränderungen voraus, welche teilweise typische chromosomale Aberrationen aufweisen (Le Beau MM, 1986). Eine erhöhte genetische Disposition zur AML besteht auch bei anderen hämatologisch-immunologischen Erkrankungen, die mit chromosomalen Aberrationen oder „chromosomal breakage“-Syndromen einhergehen. Hierzu zählt z.B. das Bloom-Syndrom (Poppe B, 2001), die Fanconi-Anämie (Auerbach AD, 1992), das Kostmann Syndrom (Freedman MH, 2000) und die



paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (Harris JW, 1999). Eine angeborene Prädisposition wird durch Untersuchungen an Kindern mit Down-Syndrom (Trisomie 21) belegt, welche ein etwa 10-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AML im ersten Lebensjahrzehnt sowie eine 500-fach erhöhte Inzidenz megakaryoblastärer Leukämien aufweisen (Evans DI, 1972).

#### 1.1.4 Pathogenese

Bei der AML handelt es sich, wie bei den meisten malignen Erkrankungen, um eine genetische Erkrankung, d.h. es findet eine meist postzygotische, genetische Transformation statt, die die Eigenschaften der ursprünglich gesunden Zelle beeinflusst. Viele dieser veränderten Gene sind in die Regulation von Zellwachstum und -ausreifung oder auch in die Apoptose involviert. Eine Übersicht bekannter genetischer Veränderungen, die Häufigkeit des Auftretens sowie deren Assoziation mit bestimmten Subtypen der French-American-British- (FAB-) Klassifikation (s. Kap. 1.1.5.2) ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 Genetische Veränderungen bei der AML (Buske B, 2007)

Chromosomen-Aberration	Molekulargenetische Veränderung	Häufigkeit der Aberration [% aller AML Fälle]
-7		1,2
+8		3,0
t(8;21)	Fusionsgen AML1/ETO	4,6
t(15/17)	RAR $\alpha$ -Gen	4,5
inv(16)	Fusionsgen CBF $\beta$ /MYH11	4,3
t(11q23)	Rearrangement des MLL-Gens	2,0
inv(3)/t(3;3)		1,5
5q-Aberrationen	meist an Zytokin-Genen	0,9
Komplex aberrant		14,7
Normaler Karyotyp		47,6
Andere		15,7

inv, Inversion; t, Translokation; sAML, sekundäre AML

Nach bisherigen Daten ist die Entstehung der AML ein mehrstufiger Prozess, der zunächst auf einer klonalen Expansion einer transformierten leukämischen Stammzelle beruht. In der Folge verliert die Zelle zum einen die Fähigkeit zur normalen hämatopoetischen Differenzierung, zum anderen erwirbt die Zelle einen Proliferationsvorteil (Reilly JT, 2005). Einzelne genetische Aberrationen, z.B. im AML1-ETO-Gen oder im PML-RAR $\alpha$ -Gen führen nicht zu einer manifesten Erkrankung, es müssen mindestens zwei verschiedene genetische Veränderungen vorliegen, welche erst in Kombination in der Lage sind, die normale Steuerung von Proliferation und Differenzierung des hämatopoetischen Systems zu unterbrechen.

In einigen Fällen von AML lassen sich Veränderungen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen nachweisen, welche auch bei anderen malignen Erkrankungen eine Rolle spielen, so zum Beispiel bcl-2-Mutationen oder Mutationen im WT-1-Gen (Inoue K, 1994). Mutationen der ras-Protoonkogene werden bei ca. 30 % der AML-Patienten gefunden (Needleman SW, 1986; Farr CJ, 1988). Ebenso findet man bei 20-30% der AML-Zellen Mutationen des Wachstumsfaktorsrezeptors FL-R, was zur ligandenunabhängigen Stimulation des Rezeptors und Apoptoseresistenz der Zellen führt (Kiyoi H, 1999).

Während bei der chronisch myeloischen Leukämie die (genetisch transformierte) Ursprungszelle immer eine pluripotente Stammzelle ist (Fialkow PJ, 1967), kann sich die AML aus verschiedenen Reifungsstufen der myeloischen Stammzellreihe entwickeln. So leiten sich bei der AML etwa 1/3 der Fälle von pluripotenten Stammzellen ab, 2/3 aller AML-Zellen stammen von reiferen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Diejenigen AML-Fälle, die ihren Ursprung in den pluripotenten Stammzellen haben, scheinen überwiegend bei älteren Patienten und bei Patienten mit sekundärer Leukämie und/oder vorausgegangenem MDS aufzutreten (Fialkow PJ, 1981 und 1987). Die beschriebene Situation erklärt die klinische, morphologische, immunphänotypische und molekulare Heterogenität der AML. Nur eine kleine Anzahl hochproliferativer, sich selbst regenerierender leukämischer Stammzellen produziert im Sinne einer klonalen Expansion eine große Anzahl unreifer, nicht funktionstüchtiger Leukämiezellen, die das KM ausfüllen und die normale Hämopoese verdrängen (Koeffler HP, 1980). Je höher der Grad der

Selbsterneuerungskapazität der AML Zellen ist, desto prognostisch ungünstiger wird der Verlauf der Erkrankung gesehen (McCulloch EA, 1982). Funktionelle Zellzyklusanalysen zeigten, dass sich nur ca. 30% oder weniger der klonogenen AML-Blasten in der chemotherapiesensiblen S-Phase befinden. Dieser Anteil kann durch die Gabe von Wachstumsfaktoren verstärkt werden (Cannistra SA, 1989).

Die meisten AML-Zellen benötigen Zytokine wie z.B. GM-CSF, G-CSF, IL-3, IL-1 um zu proliferieren. Einige AML-Zellen besitzen eine autokrine Wachstumsfaktor-Produktion, so dass sie auch in vitro unabhängig von extern zugeführten Wachstumsfaktoren proliferieren können (Young DC, 1986 & 1987; Kaufman DC 1988).

### **1.1.5 Diagnostik und Klassifikation**

Die Befunde im peripheren Blut sind variabel. Neben einer Leukozytose, die bei 20 % der Patienten mehr als 100.000 Leukozyten/ $\mu$ l betragen kann, zeigt ein Teil der Patienten normale oder sogar erniedrigte Leukozytenwerte (17% der Patienten mit  $<5000$  Leukozyten/ $\mu$ l). Eine Anämie mit einem Hb-Wert  $<10$ g/dl und eine Thrombozytopenie von  $<50.000$  Thrombozyten/ $\mu$ l tritt häufig auf (Southam CM, 1951). Im Blutausstrich zeigen sich bei einem Großteil der Patienten mehr als 50% leukämische Blasten neben reifen Granulozyten.

Das Knochenmark ist in der Regel stark hyperzellulär, die Blasten des entsprechenden Zellklons überwiegen. Charakteristisch, aber nicht Voraussetzung für die Diagnose der AML ist ein mindestens normozelluläres Mark. Typisch und diagnostisch relevant ist ein Blastenanteil von mehr als 20%, wobei nach der WHO-Klassifikation der alleinige Nachweis bestimmter chromosomaler Aberrationen zur Diagnose einer AML ausreicht, auch wenn entsprechende quantitative Kriterien nicht erfüllt sind (Jaffe ES, 2001).

Differentialdiagnostisch ist insbesondere die Abgrenzung der AML gegenüber der akuten lymphatischen Leukämie essentiell. Die AML selbst stellt eine sehr heterogene Gruppe dar, weshalb die verschiedenen biologischen Subtypen mit differierendem klinischen Erscheinungsbild und unterschiedlicher therapeutischer Beeinflussbarkeit sowie Prognose abgegrenzt werden müssen. Die weitere Diagnostik beruht auf der Klassifikation mittels ätiologischer,

morphologischer, zytochemischer, immunologischer, zyto- und/oder molekulargenetischer Merkmale. Dabei erfolgt die endgültige Einteilung durch eine Kombination dieser verschiedenen Merkmale.

#### 1.1.5.1 Unterscheidung nach der Ätiologie

Man unterscheidet die sekundäre von der primären AML als eigene, sich abgrenzende Entität. Die primären Leukämien (pAML) sind mit der de novo AML gleichzusetzen. Die sekundären Leukämien (sAML) umfassen zum einen die Gruppe der Zweitneoplasien nach vorangegangener Radio- und/oder Chemotherapie, welche nach WHO-Klassifikation als therapeassozierte AML (tAML) in verschiedene Subgruppen weiter unterteilt werden, zum anderen entwickeln sie sich aus einem mehr als sechs Monate bestehenden myelodysplastischem Syndrom oder einer myeloproliferativen Erkrankung (Karp JE, 1997).

Als auslösende Chemotherapeutika gelten DNS-toxische Substanzen, die die Topoisomerase II hemmen oder zur Gruppe der Alkylanzien gehören (siehe auch Kapitel 1.1.3). Die durch Gabe von Alkylanzien hervorgerufene AML und die aus einem MDS hervorgegangene AML weisen mehrere Gemeinsamkeiten auf. Es besteht initial eine präleukämische Phase mit Dysplasie aller drei Zelllinien des KM, weiterhin zeigen sich typische zytogenetische Aberrationen meist am kurzen Arm des Chromosoms 5 oder 7. Die Prognose ist insgesamt schlecht. Der durch Inhibitoren der Topoisomerase II induzierten tAML geht dagegen keine präleukämische Phase voraus, als typische klonale Aberration findet sich häufig die Translokation  $t(11q23)$ .

Die sAML stellen ca. 10-20% aller AML-Fälle dar. Die Inzidenz nimmt aufgrund der höheren Lebenserwartung und der erfolgreicherer Behandlung von Primärtumoren zu. Insgesamt liegt der Altersmedian in der sAML-Gruppe mit 63 Jahren etwas höher als bei der pAML-Gruppe mit 57 Jahren, wobei insgesamt mehr Frauen als Männer betroffen sind. Die Rate an kompletten Remissionen nach Chemotherapie liegt mit 36% bis 55% nach der Literatur im Vergleich zur pAML niedriger. Bezüglich des Gesamtüberlebens sind die Ergebnisse innerhalb vergleichbarer zytogenetischer Risikogruppen bei der pAML und sAML vergleichbar und die Prognose korreliert in erster Linie mit den

zugrunde liegenden zytogenetischen Aberrationen (Pagana L, 2001; Hoyle CF, 1989; Gajewski JL, 1989; Samdani A, 1996).

#### 1.1.5.2 Klassifikation nach Morphologie, Zytochemie, Immunphänotypisierung und Zytogenetik

Zytomorphologische und zytochemische Methoden beruhen auf der lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellen des Knochenmarksausstriches. Die klassische Färbung mit der panoptischen May-Grünwald-Giemsa-Färbung nach Pappenheim erlaubt die Beurteilung der Zellmorphologie und lässt in manchen Fällen bereits eine weitergehende Zuordnung anhand eventuell vorhandener Zelleinschlüsse wie Granula oder Auer-Stäbchen zu. Insbesondere die Typen M3 und M4eo lassen sich häufig bereits zytologisch abgrenzen. Die mit zytochemischen Verfahren nachweisbaren Enzymaktivitäten wie Myeloperoxidase (MPO, POX), unspezifische Esterase (NSE) oder Glykogen (PAS-Färbung) helfen bei der weiteren Differenzierung der Zellen. Auf der Synopsis dieser Befunde beruht die klassische FAB (French-American-British)-Klassifikation der AML (Bennet JM, 1976 & 1985).

5-20% der AML-Fälle (FAB M0, M6 und M7, biphänotypische Leukämien) sind allerdings mit morphologischen und/oder zytochemischen Verfahren alleine schwierig zu beurteilen. Hier gewinnt die Immunphänotypisierung ihre diagnostische Bedeutung. Mit Hilfe spezifischer Fluorochrom-markierter Antikörper können spezifische Antigene auf der Oberfläche der AML-Blasten mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Immunphänotypisierung können Linienzugehörigkeit und Reifegrad der Blasten determiniert werden. Die Linienzugehörigkeit zur myeloischen Zellreihe wird in erster Linie anhand des immunologischen Nachweises der MPO festgestellt. Weitere panmyeloische Marker sind CD13, CD33 und CD65. Der immunologische Subtyp wird über weitere Oberflächenmarker zugeordnet. CD64 und CD14 charakterisieren die monozytäre Reihe, CD15, CD16 und LF die granulozytäre Reihe. Die erythroide Reihe wird durch Glykophorin A repräsentiert, die thrombozytäre durch CD41 und CD61. Reifegradassoziierte Antigene sind CD34, HLA-DR und CD117.

Zytogenetische Untersuchungsmethoden weisen chromosomale Aberrationen nach und legen weitere diagnostisch und auch prognostisch relevante Entitäten (siehe Kap. 1.1.6.2) fest. Bestimmte Karyotypanomalien sind dabei häufig mit spezifischen klinischen und morphologischen Subtypen der AML assoziiert. Die Translokation t(15;17) kann bei fast allen Leukämien des FAB-Typs M3 oder M3v nachgewiesen werden, unterschiedliche Aberrationen des langen Armes des Chromosoms 16 bei denen des FAB-Typs M4eo. Die Chromosomenaberration t(11q23) wird wie bereits oben beschrieben häufig bei der tAML nach Anwendung von Etoposid-Derivaten gefunden, Veränderungen am Chromosom 5 und 7 werden ebenfalls häufig bei sAML detektiert und gehen meist mit einer Trilineage-Dysmyelopoese einher. Neuere Methoden bei der zytogenetischen Charakterisierung stellen die PCR sowie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) dar. Hierdurch lassen sich weitaus höhere Sensitivitäten für spezifische Aberrationen erzielen, auch ist für den Nachweis nicht mehr zwingend die Analyse von Metaphasekernen wie bei der klassischen Zytogenetik erforderlich. Durch die PCR lassen sich in extrahierter DNA auf Grund der vorhergehenden Auswahl spezifischer Primer selektiv bestimmte DNA-Abschnitte exponentiell amplifizieren. In der klinischen Routine wird diese Methode vor allem zum Nachweis der t(15;17)- und t(8;21)-Translokation sowie der inv(6) eingesetzt. Als sensitivste Methode gilt hier die nested-PCR, bei der sich durch Anwendung eines zweiten Primerpaars mit erneuter Amplifikation spezifische DNA-Fragmente mit einer Sensitivität von  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  nachweisen lassen, was insbesondere bei der Diagnostik der minimalen Resterkrankung nach Therapie bedeutsam ist (Hiddemann W, 2003). Bei der FISH werden fluoreszenzmarkierte Sonden, welche spezifische chromosomale Strukturen erkennen, mit extrahierter DNA hybridisiert. Die Sonden lagern sich an die komplementären DNA-Abschnitte an, wo sie als Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden können. Die Sensitivität dieser Methode liegt bei etwa 1:500 (Hiddemann W, 2003).

Durch die Immunphänotypisierung konnte eine präzisere Typisierung morphologisch und zytochemisch nur schwer einzuordnender AML erreicht werden. Durch die Zytogenetik konnten darüber hinaus zusätzlich klinisch und

prognostisch relevante Untergruppen definiert werden und so die klassische FAB-Klassifikation sinnvoll ergänzt werden. Die derzeitige Klassifikation der deutschen AML Collaborative Group (AMLCG) stellt eine Erweiterung der FAB-Klassifikation und ihrer NCI-Version (Cheson BD, 1990) mit immunphänotypischen und zytogenetischen bzw. molekulargenetischen Markern dar (Ludwig WD, 1993).

2001 wurde von der WHO eine neue Klassifikation der AML erarbeitet, welche eine Kombination aus den klassischen zytomorphologischen und zytochemischen Methoden, der Immunphänotypisierung, der Zyto- und Molekulargenetik mit weiteren klinischen Faktoren darstellt. Die klassischen FAB-Typen finden sich hier überwiegend in der Gruppe der AML ohne weitere Spezifizierung, wohingegen AMLs mit rekurrenten zytogenetischen Aberrationen sowie therapieassoziierte AMLs und AMLs mit Multiliniendysplasien in eigenen Gruppen zusammengefasst werden. Die Grenze zwischen MDS und AML wurde ebenfalls geändert von bisher 30 % Knochenmarkblasten auf die aktuell generell akzeptierte Grenze von 20 %.

Da die WHO-Klassifikation deutlich mehr Subtypen differenziert als die FAB-Klassifikation wurde für das vorliegende Patientenkollektiv die FAB-Klassifikation verwendet, um für die einzelnen Subgruppen repräsentative Fallzahlen zu ermöglichen. Tabelle 2 zeigt die Einteilung der AML nach der FAB-Klassifikation.

Tabelle 2: French-American-British- (FAB-) Klassifikation

<b>FAB-Typ</b>	
M0	undifferenzierte Leukämie
M1	Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung
M2	Myeloblastenleukämie mit Ausreifung
M3	Promyelozytenleukämie
M3v	Variante der Promyelozytenleukämie
M4	Myelomonozytäre Leukämie
M4eo	Myelomonozytäre Leukämie mit abnormen Eosinophilen
M5	Monoblastenleukämie
M6	Erythroblastenleukämie
M7	Megakaryoblastenleukämie

Tabelle 3 zeigt die für den jeweiligen Subtyp charakteristischen morphologischen Befunde sowie assoziierte zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen und deren Häufigkeit bei dem jeweiligen FAB-Subtyp.



Tabelle 3: FAB-Klassifikation und Assoziation mit zytogenetischen und molekulargenetischen Markern (Heilmeier B, 2007; Buske B, 2007)

FAB-Subtyp	FAB-Kriterien			Assoziation mit		Häufigkeit
	Granulopoese	Monozytopoese	Erythropoese	Zytogenetik	Molekulargenetik	
M0	< 10 % POX < 3 %	< 20 %	< 50 %			
M1	< 10 % POX > 3 %	< 20 %	< 50 %	t(8;21)	AML1/ETO	1,7 %
M2	> 10 %	< 20 %	< 50 %	t(8;21)	AML1/ETO	12,5 %
M3	Hypergranulär Auer-Stäbchen	< 20 %	< 50 %	t(15;17)	PML/RAR $\alpha$	98 %
M3v	Mikrogranulär Monozytoide Kerne	< 20 %	< 50 %	t(15;17)	PML/RAR $\alpha$	
M4	> 20 %	> 20 %	< 50 %			
M4eo	> 20 % abnorme Eosinophile	> 20 %	< 50 %	inv(16) t(16;16)	CBF $\beta$ / MYH11	100 %
M5a	< 20 %	> 80 % unreif	< 50 %	11q23- Aberrationen	MLL- Aberration	31 %
M5b	< 20 %	> 80 % reif	< 50 %	11q23- Aberrationen	MLL- Aberration	17 %
M6	> 30 % der NEZ sind Blasten		> 50 %			
M7	> 30 % Megakaryoblasten		< 50 %			

NEZ, nicht-erythrozytäre Zellen; POX, Myeloperoxidase; inv, Inversion; t, Translokation

## 1.1.6 Prognosekriterien

### 1.1.6.1 Allgemeine Prognosekriterien

Das Gesamtüberleben von AML-Patienten nimmt mit steigendem Alter ab (Sorensen JT, 1993). In einigen Arbeiten konnte in Multivarianzanalysen gezeigt werden, dass das Alter einen unabhängigen Risikofaktor bezüglich Erreichen einer CR, Remissionsdauer und Gesamtüberleben darstellt, allerdings wurden keine begleitenden zytogenetischen Untersuchungen durchgeführt, so dass letztlich das gehäufte Auftreten zytogenetischer Aberrationen im höheren Alter für diese Beobachtungen verantwortlich sein könnte (Archimbaud E, 1999; Stasi R, 1996; Swirsky DM, 1986).

Eine hohe initiale Leukozytenzahl ist ebenfalls mit einer schlechteren Prognose behaftet, wobei hier insbesondere die Frühmortalität aufgrund u.a. pulmonaler Leukostase und vermehrten Blutungskomplikationen gesteigert ist (Ventura GJ, 1988; O'Brien S, 1989). Weitere mögliche Risikofaktoren sind z.B. eine erhöhte LDH (Ferrara F, 1996), die Blastenzahl im Knochenmark an Tag 7 der Induktionstherapie (Kern W, 1992) sowie die Überexpression des multidrug-resistance (MDR)-1-Gens (Te Boekhorst PA, 1995; Borg AG, 1998).

### 1.1.6.2 Zytogenetische Risikogruppen

Mittels zytogenetischer Untersuchungen konnten verschiedene genetische Transformationen bei der AML festgestellt werden, die aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften in prognostisch günstige, intermediäre und schlechte Prognosegruppen zusammengefasst werden können (Mrozek K, 1997). Klinisch charakterisiert wird die günstige Prognosegruppe mit einer Wahrscheinlichkeit von 70% für 5-jähriges Überleben und 80% für das Auftreten einer kompletten Remission nach Induktionstherapie. Die intermediäre Risikogruppe beinhaltet 60% des gesamten Patientenkollektives und ihr entspricht eine 5-Jahres-Überlebens-Wahrscheinlichkeit von 40%. In der schlechten Prognosegruppe liegt die Wahrscheinlichkeit für 5-jähriges Überleben unter 20%, die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer kompletten Remission nur bei 55%. Sie wird weiterhin durch ein schnelleres Auftreten eines Rezidivs nach erster Remission charakterisiert.

Je nach Studiengruppe werden einzelne zytogenetische Aberrationen in unterschiedliche Risikogruppen eingeteilt. Tabelle 3 zeigt die Einteilung der AML-Fälle mit Karyotypanomalien in Prognosegruppen nach verschiedenen Studiengruppen. Weitgehender Konsens besteht darin, die „Core-Binding Factor“-Leukämien der günstigen Prognosegruppe, einen normalen Karyotyp der intermediären Gruppe, und Veränderungen an Chromosomen 3, 5, 7 sowie die 11q23-Aberration und komplexe Aberrationen der ungünstigen Prognosegruppe zuzuordnen. Die akute Promyelozytenleukämie M3 mit der charakteristischen Translokation t(15;17) wird von vielen Gruppen als eigene Entität verstanden und erscheint daher in manchen dieser Einteilungen nicht. Die Gruppe mit normalem Karyotyp lässt sich anhand molekulargenetischer Marker weiter unterteilen. Von besonderer Bedeutung sind hier Mutationen im FLT3-Gen, sowie partielle Tandemduplikationen im MLL-Gen, welche jeweils mit einer ungünstigeren Prognose einhergehen (Mrozek K, 2004), während Mutationen des Nucleophosmin- (NPM1-) Gens mit einer günstigeren Prognose assoziiert sind (Dohner K, 2005; Schnittger S, 2005).

Tabelle 4: Zytogenetische Risikogruppen nach verschiedenen Studiengruppen

Studiengruppe	Risikogruppe		
	günstig	intermediär	ungünstig
AMLCG	t(8;21), t(15;17), inv(16), t(16;16)	Normaler Karyotyp andere Aberrationen	-5, -7, 5q-, 7q-, inv(3), 11q23- Aberration, 12p-Aberration, 17p-Aberration, komplexe Aberrationen
CALGB	t(8;21), inv(16), del(16), t(16;16)	Normaler Karyotyp	Andere Aberrationen <sup>1</sup>
SWOG	t(8;21), inv(16), t(16;16), +14	Normaler Karyotyp andere Aberrationen <sup>1</sup>	-5, -7, 5q-, 7q-, inv(3), 11q23- Aberration, +13, 17p- Aberration, 20q-, HSR, komplexe Aberrationen
EORTC	t(8;21), inv(16)		-5, -7, 5q-, 7q-, 3q-Aberration komplexe Aberrationen

AMLCG, AML Collaborative Group; CALGB, Cancer And Leukemia Group B; SWOG, South Western Oncology Group; EORTC, European Organisation for Research and Treatment of Cancer  
t, Translokation; del, Deletion; inv, Inversion; <sup>1</sup> ausgenommen t(15;17)

## 1.1.7 Therapie

### 1.1.7.1 Chemotherapie

Primäres Ziel einer Behandlung der AML ist das Erreichen und Erhalten einer kompletten Remission (CR), wobei unter CR eine morphologische Eradikation des malignen Klon sowie einer Erholung des peripheren Blutbildes verstanden wird. Die Therapie gliedert sich in eine Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungsphase auf. Die Notwendigkeit einer Konsolidierungstherapie nach Erreichen der Remission ist für eine längere rezidivfreie Überlebenszeit mittlerweile unbestritten.

Die Art der Induktionsbehandlung und Post-Remissionsbehandlung sowie die zeitliche Abfolge der verschiedenen Therapieabschnitte als auch die Art und der Zeitpunkt einer integrierten Stammzelltransplantation ist derzeit Inhalt zahlreicher klinischer Studien. Basis der Induktionstherapie ist seit mehreren Jahrzehnten eine Kombination aus Cytarabin (AraC) mit einem Anthracyclin (Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Mitoxantrone). In neueren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass durch eine Doppelinduktion mit Applikation eines zweiten Chemotherapiezyklus vor vollständiger Regeneration eine signifikant höhere Rate an Langzeitremissionen erzielt werden kann (Hansen OP, 1991). Der Einsatz zusätzlicher Substanzen wie ATRA, Gemtuzumab-Ozogamicin (GO), Cloretazin oder Thioguanin etc. ist derzeit Gegenstand von Studien.

Bei der akuten Promyelozytenleukämie (APL) wird zusätzlich All-trans-Retinolsäure (ATRA) verabreicht. Durch das Überangebot von ATRA wird die durch die Zusammenlagerung der Gene RAR $\alpha$  und PML entstandene Korepression des für die Differenzierung verantwortlichen DNA-Stranges aufgehoben, und die Promyelozyten reifen innerhalb von 4-5 Wochen aus. Durch ATRA alleine wird aber in der Regel keine stabile Remission erreicht (Fenaux P, 1993; Tallmann MS, 1997). Zur Heilung ist daher die Kombination mit einer potenten Chemotherapie erforderlich (Lengfelder E, 2001).

Als Konsolidierungstherapie oder Postremissionstherapie werden unterschiedliche Strategien eingesetzt. Diese sind abhängig von

Patientenfaktoren wie Alter und Allgemeinzustand, in erster Linie jedoch vom Typ der vorliegenden AML und Risikogruppe, sowie vom Vorhandensein eines passenden Familien- oder Fremdspenders. Während viele Niedrigrisiko-Leukämien mit einer alleinigen Chemotherapie behandelt werden können, so werden in der intermediären und besonders der ungünstigen Prognosegruppe intensivere Postremissionstherapien, in erster Linie die Stammzelltransplantation, durchgeführt.

Die in die Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit eingeflossenen AML-Fälle wurden je nach FAB-Typ, Alter und Komorbiditäten nach unterschiedlichen Therapieprotokollen behandelt. Alle Patienten, welche für eine Induktionstherapie qualifizierten, wurden mit einer Kombinationschemotherapie mit Cytarabin und einem Anthracyclin behandelt. Patienten, welche aufgrund von Alter oder Komorbiditäten nicht für eine intensivere Therapie qualifizierten, wurden entweder rein zytoreduktiv mit Hydroxyurea oder im Rahmen eines Studienprotokolles für ältere Patienten mit Gemtuzumab-Ozogamicin (GO) behandelt. Einige Patienten verstarben innerhalb kurzer Zeit an Komplikationen der Grunderkrankung, ohne dass eine spezifische Therapie verabreicht wurde.

#### 1.1.7.2 Stammzelltransplantation

Zur Postremissionstherapie gehört auch die Stammzelltransplantation (SZT). Man unterscheidet die allogene von der autologen SZT. Hierbei stellt die allogene SZT die effektivste, allerdings auch die komplikationsreichste Therapie dar. Durch die hohe transplantationsassoziierte Mortalität wird in vielen Studien die geringere Rezidivrate im Hinblick auf das Gesamtüberleben aufgewogen. Für eine allogene SZT kommen verschiedene Arten von Stammzell-Spendern in Betracht: HLA-identische verwandte oder unverwandte Spender bzw. HLA-differente Verwandte. Der Stellenwert der SZT ist beim Auftreten eines Rezidivs bzw. in zweiter Remission unbestritten. Bei der Indikationsstellung zur allogenen SZT in erster Remission spielt die Prognose des Patienten eine entscheidende Rolle. Je höher das Rezidivrisiko und je besser der Allgemeinzustand des Patienten, desto eher wird man sich bei Vorliegen eines geeigneten Spenders für die allogene Transplantation

entscheiden. Der Stellenwert der nicht-myeloablativen Konditionierung zur Reduktion von Akuttoxizitäten vor allem bei älteren Patienten wird derzeit in zahlreichen Studien geprüft.

Die autologe Stammzelltransplantation nach myeloablativer Therapie und intensiver Konsolidierungstherapie zeigte ebenfalls eine signifikant verminderte Rezidivrate bei erhöhter Mortalität und nicht verbessertem Gesamtüberleben (Buchner T, 2006; Visani G, 1999; Gondo H, 1997). Durch verbesserte Methoden des Aufreinigens des Stammzellapherisates („purging“) wird versucht, diese Methode in Zukunft eventuell noch zu verbessern.

## 1.2 Überblick über das Immunsystem

Im Rahmen der Evolution hat sich ein komplexes Immunsystem entwickelt, welches dem Schutz der Integrität des Organismus vor exogenen Pathogenen wie z.B. Viren, Bakterien oder Protozoen, zum anderen aber auch vor maligne entarteten körpereigenen Zellen dient. Um diese komplexe Aufgabe zu erfüllen beinhaltet das Immunsystem verschiedene Komponenten. Der zelluläre Teil des Immunsystems umfasst eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, die z.T. in gesonderten Organen (z.B. im Thymus) heranreifen und in anderen spezialisierten Organen (z.B. in Milz und Lymphknoten) aktiviert werden. Die Zellen des Immunsystems werden in der Regel lebenslang neu gebildet, nehmen verschiedenste Funktionen wahr, zeigen Präferenzen für bestimmte Gewebe und weisen eine sehr unterschiedliche Lebensdauer auf. Bezüglich ihrer Abstammung werden sie der myeloischen (z.B. Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen) und lymphatischen (T Zellen, B Zellen, Natürliche Killer (NK) Zellen) Reihe zugeordnet. Der zweite Teil des Immunsystems, der humorale Anteil, umfasst lösliche Moleküle, die entweder Reaktionen gegen Pathogene vermitteln können (z.B. Komplement, Lysozym, Immunglobuline/Antikörper) oder für die Kommunikation und Interaktion der verschiedenen Zellen des Immunsystems miteinander von entscheidender Bedeutung sind (z.B. Zytokine, Chemokine).

Neben der Unterteilung in einen zellulären und einen humoralen Teil kann das Immunsystem auch in einen angeborenen und einen adaptiven Teil gegliedert werden. Während das angeborene Immunsystem einen schnellen allgemeinen Schutz vor „Standard-Pathogenen“ bietet, generiert das adaptive Immunsystem einen auf beliebige Fremd-Strukturen „maßgeschneiderten“ Schutz, der in der Regel sehr effektiv und langlebig ist. In Tabelle 5 ist die Unterteilung des Immunsystems und die Zugehörigkeit verschiedener Komponenten schematisch dargestellt.

Tabelle 5: Komponenten des Immunsystems

	<b>Zellulärer Anteil</b>	<b>Humoraler Anteil</b>
<b>Angeborenes Immunsystem</b>	Granulozyten Monozyten Makrophagen Dendritische Zellen NK Zellen	Komplement Lysozym Spezifische Zytokine
<b>Adaptives/erworbenes Immunsystem</b>	T Zellen B Zellen	Antikörper Spezifische Zytokine

### 1.2.1 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist eine Errungenschaft der Vertebraten (Litman GW, 1999). Es beruht im Wesentlichen auf der zufälligen Zusammenstellung der für die Antigenrezeptoren kodierenden Gene aus variablen Einzelsegmenten durch „ungenau somatische Rekombination“ in lymphozytären Vorläuferzellen (Thompson CB, 1995). Die auf diese Weise erreichte klonale Diversität wurde auf  $10^{16}$  bis  $10^{20}$  taxiert (Davis MM, 1988; Carding SR, 2002). Nach der somatischen Rekombination werden die *de novo* generierten Antigenrezeptoren auf ihre Reaktionsfähigkeit sowie Toleranz gegenüber körpereigenen Selbst-Strukturen überprüft und selbst-reaktive Vorläuferzellen eliminiert. Selbst-tolerante, reaktionsfähige Zellen werden in die Peripherie entlassen (Nossal GJ, 1994; Nemazee D, 2000; Starr TK, 2003). Die Aktivierung dieser „naiven“, peripheren Lymphozyten durch spezifische Signale führt schließlich zur Ausreifung zu Effektorzellen (Bretscher P, 1970; Lenschow DJ, 1996). Während schließlich B-Lymphozyten Immunglobuline zur Neutralisation, Opsonierung und Phagozytose frei zugänglicher („extrazellulärer“) Antigene produzieren können, erkennen T-Lymphozyten über ihre T Zellrezeptoren Antigenstrukturen vor allem auf körpereigenen Zellen.



### 1.2.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch konserviert und bei fast allen vielzelligen Organismen zu finden (Hoffmann JA, 1999). Hierzu zählen die Zellen der myeloischen Zellreihe wie z.B. Granulozyten und Monozyten/Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC), aber auch die NK-Zellen als Vertreter der Lymphozyten sowie diverse molekulare Abwehrsysteme (z.B. Lysozym, Komplementsystem). All diesen Komponenten ist gemeinsam, dass sie antigenunabhängig sofort aktiviert werden können und eine rasche Immunreaktion bewerkstelligen. Hierdurch wird auch die etwa vier bis sieben Tage währende Zeitspanne bis zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems überbrückt. Die schnelle Immunreaktion beruht unter anderem auf invarianten, pathogenspezifischen Rezeptorsystemen wie z.B. den Toll-ähnlichen Rezeptoren, welche eine spezifische Erkennung molekularer Struktureinheiten von Mikroorganismen und Viren ermöglichen (Janeway CA, 2003). Dies gilt vor allem für die myeloischen Komponenten des angeborenen Immunsystems. Toll-ähnlichen Rezeptoren und andere „pattern recognition receptors“ (PRR) vermitteln u.a. die Aktivierung der Komplementkaskade, die Oponierung bakterieller Zellwände, die Induktion von Phagozytose und Apoptose und die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen, was zusammen mit der durch PRR induzierten Zelloberflächenexpression kostimulierender Moleküle und Synthese proinflammatorischer Mediatoren durch antigen-präsentierende Zellen (APC) wiederum Voraussetzung für die Initiation einer adaptiven Immunantwort ist (Fearon DT, 1996; Banchereau J, 1998; Guermonprez P, 2002).

Die Mechanismen bei der Aktivierung von NK Zellen, welche als einzige Komponente des angeborenen Immunsystems der lymphatischen Reihe zuzurechnen sind, werden aktuell durch zwei Hypothesen beschrieben.

Die „Missing-Self“ Hypothese wurde in der Mitte der 1980er Jahre durch Klas Kärre vorgeschlagen und besagt, dass NK Zellen andere Zellen abtöten, wenn diese nicht bestimmte Signalproteine, die MHC Klasse I Moleküle, auf ihrer Oberfläche aufweisen (Kärre K, 1985). MHC Klasse I Moleküle werden von nahezu allen gesunden Körperzellen exprimiert und definieren damit das „individuelle Selbst“. Auf der Oberfläche der körpereigenen NK Zellen befinden

sich entsprechende Rezeptoren, welche die entsprechenden MHC-Moleküle erkennen. Bei einem Fehlen derselben auf der Oberfläche, beispielsweise bei Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen, können die entsprechenden Zielzellen durch die NK Zellen abgetötet werden.

Gemäß der „Induced Self“ Hypothese werden NK Zellen durch Stimulation von aktivierenden Rezeptoren zur Ausübung von Effektorfunktionen veranlasst. Ein charakteristischer und mittlerweile gut charakterisierter aktivierender NK Zell Rezeptor ist z.B. NKG2D, dessen immunologische Rolle in den letzten Jahren im Zusammenhang mit der „Induced Self“ Hypothese eine große Aufmerksamkeit erfahren hat. Dies ist insbesondere dadurch begründet dass die NKG2D Liganden-Expression im Zusammenhang mit malignen Transformationsprozessen zu stehen scheint. Es wurde gezeigt, dass durch die Expression einer ausreichenden Menge an NKG2D Liganden NK Zellen in die Lage versetzt werden, die entsprechenden Zellen auch trotz Anwesenheit von hemmenden MHC Klasse I Molekülen zu eliminieren (Lanier L, 2005).

Die Aktivität von NK-Zellen wird also letztlich durch eine Balance aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert (Lanier L, 2005). Aktivierende Signale werden neben NKG2D durch verschiedene weitere aktivierende Rezeptoren (z.B. KLRB1, 2B4, CD16, CD96, Natural Cytotoxicity Rezeptoren) mit zum Teil noch unbekanntem Liganden vermittelt. Hemmende Signale erfolgen, neben MHC Klasse I erkennenden Rezeptoren, durch zahlreiche weitere inhibitorische Rezeptoren (z.B. LAIR-1, MAFA, gp49B1, CD95, CD66a) mit ebenfalls zum Teil noch unbekanntem Liganden (Lanier L, 2005). Zu den Rezeptoren und Liganden, welche die Aktivität von NK Zellen beeinflussen gehören auch zahlreiche Mitglieder der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Superfamilie.

### **1.3 Die Tumor Nekrose Faktor (TNF) Familie**

Die TNF Superfamilie umfasst insgesamt mehr als 20 Proteine, welche eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Aktivierung, Differenzierung und Apoptose von verschiedenen Komponenten des Immunsystems, insbesondere auch des angeborenen Anteils, spielen (Locksley RM, 2001). Frühere und gegenwärtige Arbeiten der AG Salih beschäftigen sich mit der Rolle verschiedener TNF

Familienmitglieder bei der Interaktion von Tumor und Immunsystem. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen die TNF Familienmitglieder Glucocorticoid-Induced TNF Related Protein (GITR) sowie 4-1BB und ihre zugehörigen Liganden.

### **1.3.1 4-1BB Ligand (4-1BBL)**

4-1BB oder CD137 wurde initial als kostimulatorischer Rezeptor auf T Zellen beschrieben. Aktivierung des 4-1BB-Rezeptors auf T Zellen verursacht deren Expansion, inhibiert T Zell-abhängige Antikörperproduktion und verhindert superantigeninduzierten T Zelltod. In mehreren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass durch Stimulation von 4-1BB, z.B. mittels Applikation agonistischer Antikörper (Melero I, 1997) oder nach Transfektion von zellgebundenen anti-4-1BB-„single-chain Fv“- Fragmenten in Tumorzellen (Ye Z, 2002) eine ausgeprägte, durch Aktivierung von T Zellen vermittelte Antitumorreaktion induziert werden kann. Der natürliche Ligand des 4-1BB-Rezeptors, der 4-1BB-Ligand, ist auf verschiedenen Typen von APC wie B Zellen, Monozyten und DC nachgewiesen worden und kann nach Aktivierung auch auf T Lymphozyten induziert werden (Kwon B, 2000). Es zeigte sich in der Folge, dass 4-1BBL nicht nur als Ligand für den 4-1BB-Rezeptor fungiert, sondern selbst noch weitere immunmodulatorische Eigenschaften besitzt. Wie für viele Mitglieder der TNF Familie gilt auch für 4-1BBL, dass durch diesen Signale in beide Richtungen, das heißt auch in die den Liganden exprimierende Zelle transduziert werden („reverse signaling“). Hieraus können, unter anderem in verschiedenen Zelltypen, aber auch in Abhängigkeit vom jeweiligen Aktivierungsstatus der betreffenden Zelle, unterschiedliche Effekte resultieren. Es wurde nachgewiesen, dass über 4-1BBL Monozyten aktiviert und unter anderem die Freisetzung von Interleukin-8, einem proinflammatorischen Zytokin, induziert werden kann (Langstein J, 1998). Dagegen wird in B und T Lymphozyten über 4-1BBL Apoptose induziert (Michel JS, 1999), und auch in Monozyten wurde nach 4-1BBL-Ligation eine Proliferationshemmung durch Apoptose beschrieben (Langstein J, 1999). In Vorarbeiten der AG Salih konnte 4-1BBL erstmals in vitro und ex vivo auf Tumorzellen nachgewiesen und durch „reverse signaling“ über 4-1BBL eine Freisetzung von IL-8 induziert werden

(Salih HR, 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass 4-1BBL von der Zelloberfläche verschiedener hämatopoetischer Zellen in löslicher Form freigesetzt wird und dass 4-1BBL auch in löslicher Form T Zellen beeinflussen kann. Untersuchungen von Patientenserum ergaben, dass löslicher 4-1BBL in hoher Konzentration im Blut von Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen vorliegt. (Salih HR, 2001). Serumspiegel von löslichem 4-1BBL sind mit Progress maligner Erkrankungen und dem Überleben von Patienten korreliert (Salih HR, 2004), und löslicher 4-1BBL ist so wohl in der Lage, Immunreaktionen sowohl lokal als auch systemisch zu beeinflussen. In aktuellen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass auch AML Zellen 4-1BBL exprimieren und über 4-1BBL deren Zytokinproduktion verändert wird. Zudem konnten gezeigt werden, dass 4-1BB nach Aktivierung auf NK Zellen induziert wird. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass 4-1BB auf humanen NK Zellen im Gegensatz zu T Zellen und murinen NK Zellen inhibitorische Signale vermittelt (Bässler T, 2007). Die Ursache für diesen Zellreihen- und speziesspezifischen Unterschied ist bisher nicht bekannt.

### **1.3.2 GITR Ligand (GITRL)**

Im Menschen sind Glucocorticoid-Inducible TNF Related Protein (GITR/TNFRS18) und sein Ligand (GITRL) erst seit 1999 als Mitglieder der TNF Proteinfamilie bekannt (Gurney AL, 1999; Kwon B, 1999). Zwei Jahre zuvor war GITR erstmals in der Maus beschrieben worden (Nocentini G, 1997). GITR wird konstitutiv schwach auf CD4+ und CD8+ T Zellen exprimiert, eine erhöhte Expression wurde nach deren Aktivierung sowie konstitutiv auf regulatorischen T Zellen (Treg) nachgewiesen (Ronchetti S, 2002; Shimizu J, 2002). In der Maus wurde eine schwache Expression zusätzlich auf B Zellen, NKT Zellen und Makrophagen gezeigt (Shimizu J, 2002; Li Z, 2003; Shin H, 2002). Der zugehörige Ligand GITRL wurde im murinen System auf DC, Monozyten, Makrophagen und Osteoklasten detektiert (Kim JD, 2003; Nocentini G, 2005; Tone M, 2003; Yu KY, 2003). Beim Menschen ist GITRL in verschiedenen Normalgeweben wie Dünndarm, Niere, Testis und Ovarien beschrieben worden (Gurney AL, 1999), ansonsten war bisher zur Expression

von humanem GITRL nichts bekannt.

Die Untersuchungen bezüglich der Funktion von GITR fokussierten in den letzten Jahren auf T Zellen. In Mausmodellen wurde gezeigt, dass GITR eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, GVHD und bei der Immunreaktion gegen Viren spielt (Muriglian SJ, 2004; Kohm AP, 2004; Suvas S, 2005). Weiterhin wurde im murinen System gezeigt, dass eine Applikation von Antikörpern gegen GITR zur Eradikation von Tumoren führen kann (Ko K, 2005).

Mehrere Arbeiten zeigten, dass GITR kostimulatorische Signale an CD4 und CD8 T Zellen vermitteln kann (Kanamaru F, 2004; Esparza EM, 2005a; Esparza EM, 2005b). Im Gegensatz dazu erwiesen sich T Zellen von GITR-/- Mäusen nach CD3-Stimulation als hyperreaktiv, und GITR hemmt die suppressorische Aktivität von Treg (Shimizu J, 2002; Ronchetti S, 2004; Ji HB, 2004; McHugh RS, 2002; La Cava A, 2005). Dies legt nahe, dass sowohl aktivierende als auch hemmende Signale über GITR vermittelt werden können. Da die suppressorische Aktivität humaner Treg durch GITR Stimulation nicht beeinflusst wird (Levings MK, 2002), scheint GITR zudem im Menschen und in der Maus verschiedene Funktionen innezuhaben. Unterschiedliche Funktionen homologer Rezeptoren in Maus und Mensch, aber selbst innerhalb derselben Spezies wurden bereits für andere Immunrezeptoren nachgewiesen. So sind sowohl Aktivierung als auch Hemmung von T- und NK Zellfunktionen durch NKR-P1A beschrieben worden, und auch 2B4/CD244 hemmt NK Zellfunktionen in der Maus, fungiert jedoch im Menschen sowohl als aktivierender als auch als hemmender Rezeptor (Lanier L, 2005). Es zeigte sich, dass 2B4 unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit von der Differenzierung oder Aktivierung von NK Zellen über positiv oder negativ wirksame Adaptermoleküle in seinem Signalweg vermittelt (Roncagalli R, 2005). GITR weist eine hohe Sequenzhomologie mit 4-1BB auf und scheint, ebenfalls in Abhängigkeit vom biologischen Umfeld und/oder Stimulationsniveau, auch Apoptose auslösen zu können (Kwon B, 1999; Hauer J, 2005; Esparza EM, 2006; Spinicelli S, 2002). Bezüglich der Funktion von GITRL ist bekannt, dass dieses Molekül in murinen Makrophagen MMP-9 und NO Freisetzung, andererseits aber auch Apoptose induzieren kann (Lee HS, 2003; Lee HS, 2004; Shin HH, 2002). Entsprechend

kann also GITRL wie auch für 4-1BBL beschriebene Signale in die Liganden-exprimierende Zellen vermitteln, was zu deren Aktivierung führt.

Während bisherige Untersuchungen zu GITR auf T Zellen abzielten, konnte von Katrin Baltz aus der AG Salih gezeigt werden, dass auch NK Zellen GITR und solide Tumorzellen dessen Liganden (GITRL) exprimieren (Baltz K, 2007). GITRL vermittelt über bidirektionale Signale eine verminderte Immunogenität und Freisetzung immunsuppressiver Zytokine von Tumorzellen sowie Hemmung von NK Zellfunktionen.

#### **1.4 Die NK Zell-vermittelte Immunüberwachung der AML**

Wie bereits beschrieben spielen NK Zellen als zytotoxische Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Tumoren (Lanier L, 2005). Jüngste Daten belegen insbesondere die Bedeutung von NK Zellen bei der Immunüberwachung von malignen hämatopoetischen Erkrankungen. Nach haploidenter Stammzelltransplantation wird z.B. Alloreaktivität von NK Zellen durch einen "Mismatch" von MHC Klasse I Molekülen auf Leukämiezellen einerseits und den MHC Klasse I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren auf den Donor-NK Zellen andererseits generiert. Die in diesem allogenen Kontext erfolgende NK Zell-Aktivierung bewirkt einen erhöhten Schutz vor Rezidiven der Leukämie und verbessert das „Engraftment“ des Transplantates, ohne GvHD zu verursachen (Ruggieri L, 2002). Darüber hinaus mehren sich Befunde, wonach auch autologe NK Zellen eine Rolle bei der Immunkontrolle von Leukämien spielen. So wurde beschrieben, dass die Anzahl und Aktivität von NK Zellen im Blut von Leukämiepatienten im Vergleich zu gesunden Personen reduziert ist und dass die Aktivität autologer NK Zellen mit dem Überleben von Leukämiepatienten assoziiert ist (Lowdell MW, 2002; Tajima F, 1996; Pierson BA, 1996). Deshalb ist die Frage, wie NK Zellen maligne hämatopoetische Zellen erkennen und abtöten und welche immunregulatorischen Moleküle hierfür relevant sind von großem wissenschaftlichem, aber auch klinischem Interesse (Farag SS, 2006). Die Funktion MHC Klasse I-spezifischer inhibitorischer NK-Zell-Rezeptoren wie den Rezeptoren aus der KIR- (Mensch)

und Ly49-Familie (Maus) ist bereits gut erforscht. Weit weniger dagegen ist zur Expression und Funktion von Liganden für andere wichtige NK-Zell-Rezeptoren auf Leukämiezellen bekannt. Die zur Verfügung stehenden Daten belegen, dass immunregulatorische Proteine eine zentrale Rolle in der Pathogenese von malignen hämatopoetischen Erkrankungen spielen. Insbesondere für die oben beschriebene Aktivierung allogener NK Zellen gegenüber Patientenleukämiezellen sind die entsprechenden molekularen Rezeptor-Liganden-Systeme jedoch nur unzureichend charakterisiert.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Expression immunregulatorischer Proteine auf malignen Zellen spielt wie beschrieben eine zentrale Rolle für die Interaktion von Tumorzellen (und somit auch AML Zellen) mit dem Immunsystem, und entsprechend wurde in zahlreichen Arbeiten ein Zusammenhang zwischen Oberflächenexpression und/oder Spiegeln der löslichen Form verschiedener immunregulatorischer Moleküle im Plasma mit klinischen Faktoren wie Therapieansprechen, Wahrscheinlichkeit einer anhaltenden Remission, zytogenetischem Risiko oder auch Gesamtüberleben nachgewiesen (Graf M, 2004; Graf M, 2003; Graf M, 2006; Brouwer RE, 2006; Okabe-Kado J, 1998; Wakimoto N, 1998; Whiteway A, 2003; Albitar M, 2007; Hentschel N, 2006).

Nachdem wir beobachten konnten dass 4-1BBL und GITRL auf AML Zellen exprimiert werden und die Anti-Tumorreaktivität von NK Zellen gegen AML Zellen vermindern untersuchten wir daher die Expression von GITRL und 4-1BBL auf AML-Blasten von mehr als 50 Patienten im Hinblick auf eine Korrelation mit klinischen Faktoren wie FAB-Typ, Art der Leukämie (primär/sekundär), zytogenetischem Risiko, Ansprechen auf Therapie sowie Überleben. Weiterhin untersuchten wir, inwiefern die Expression von GITRL und 4-1BBL mit der Expression anderer immunregulatorischer Moleküle wie MHC Klasse I und CD86 korreliert. Ziel war, aufbauend auf den neu erarbeiteten Funktionen der Molekülsysteme GITR-GITRL und 4-1BB-4-1BBL bei der Immunüberwachung der AML durch NK Zellen, den Stellenwert von 4-1BBL und GITRL als Marker bei der AML aufzuklären.



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Auswahl des Patientenkollektivs**

In diese Arbeit gingen Untersuchungen an Proben von insgesamt 47 AML Patienten ein, die am Universitätsklinikum Tübingen diagnostiziert wurden. Weitere 8 Proben wurden analysiert, welche aus dem Labor für Leukämiediagnostik der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Grosshadern zugesandt wurden. Eine schriftliche Einverständniserklärung in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki lag von allen Patienten vor, und die Untersuchung wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien der lokalen Ethikkommission durchgeführt.

Die morphologischen, zytochemischen und diagnostischen Befunde wurden vom hämatologischen Labor der Medizinischen Klinik II der Universität Tübingen sowie der Medizinischen Klinik III des Klinikums Grosshadern der Universität München erstellt. Die immunzytologische Charakterisierungen der Expressionen der Zielmoleküle in den Proben wurden von Herrn Dr. med. M. Krusch und Frau T. Baessler aus der AG Salih in Tübingen durchgeführt. Sämtliche Befunde bzw. immunzytologischen Messergebnisse wurden für weitere Auswertungen und Reanalysen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Um die klinische Relevanz der erhobenen Befunde zu untersuchen wurde von allen Patienten der klinische Verlauf (Art der Therapie, Ansprechen auf die Therapie, Knochenmarktransplantation, Rezidiv, Versterben) erfasst, sofern diese Daten vorlagen. Eine hämatologische/klinische Vollremission wurde nach den EORTC-Kriterien festgelegt (Zittoun R, 1996): Kein Nachweis von Leukämiezellen im peripheren Blut, Erholung des Blutbildes (Leukozyten  $>2000-10000/\mu\text{l}$ , Granulozyten  $>1.500/\mu\text{l}$ , Thrombozyten  $>100.000/\mu\text{l}$ , Hb $>12\text{g/dl}$ ), Normalisierung von Organvergrößerungen, weniger als 5% Blasten aller kernhaltigen Zellen im Knochenmark. Wenn der Anteil der blastären Zellen durch einen Induktionszyklus nach Regeneration des Knochenmarks dagegen nicht unter 5 % abfiel oder gar angestiegen war, wurde dies als refraktäre

Leukämie oder Persistenz der Erkrankung definiert. Als Rezidiv nach dem Erreichen einer Remission wurde definiert, wenn der Blastenanteil im Knochenmark wieder auf mehr als 5 % anstieg. Als Frührezidiv wurde ein Rezidiv innerhalb von sechs Monaten nach Diagnosestellung bezeichnet (Wilmanns W, 1996). Als FrühTod wurde das Versterben eines Patienten innerhalb von einem Monat nach Diagnosestellung definiert (Wilmanns W, 1996).

## **2.2 Verarbeitung des Untersuchungsmaterials**

Das Knochenmark (KM) zur Routinediagnostik wurde nach Aufklärung der Patienten durch Punktion des hinteren Beckenkammes gewonnen. Die Antikoagulation der KM-Proben erfolgte mit Heparin oder EDTA. Zur morphologischen und zytochemischen Beurteilung wurden KM-Ausstriche angefertigt. Für zytogenetische Untersuchungen wurden heparinisierte Voll-KM-Proben angesetzt. Zur Untersuchung der Zielmolekülexpression wurden frisch separierte mononukleäre Zellen (PBMC) des peripheren Blutes verwendet, die nach Venenpunktion und Verdünnung mit Hank's Puffer über Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Hypaque) gewonnen wurden (Böyum A, 1984). Dadurch wurden Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten abgetrennt, und gesunde bzw. leukämische hämatopoetische Vorläuferzellen sowie Lymphozyten und Monozyten konnten weiter untersucht werden. PBMC, die nicht am selben Tag weiterverarbeitet werden konnten, wurden nach Zugabe von fetalem Kälberserum/DMSO bis zur weiteren Verwendung in flüssigen Stickstoff bei -196 Grad Celsius konserviert (Fliedner TM, 1977).

## **2.3 Morphologische und zytochemische Untersuchungsmethoden**

Die Knochenmarksausstriche wurden nach der panoptischen Methode von Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) gefärbt und morphologisch entsprechend den FAB-Kriterien beurteilt (siehe Tabelle 3). Ebenso wurde der Anteil der Blasten im Ausstrich anhand der Morphologie bestimmt. Zur genaueren Differenzierung wurden die Knochenmarksausstriche zusätzlich zytochemisch mit Myeloperoxidase Sudanschwarz, alpha-Naphthylacetat-Esterase und PAS (Periodic Schiff Säure) gefärbt. Die peripheren Blutausstriche wurden ebenfalls nach Pappenheim gefärbt, und die Blastenzahl im peripheren Blut anhand der Morphologie bestimmt.

## **2.4 Durchflusszytometrische Untersuchung**

Die Durchflusszytometrie mittels „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS) stellt eine Standarduntersuchung zur Bestimmung der Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche oder im Zytoplasma verschiedener Zellen dar. Alle Messungen wurden an einem Durchflusszytometer der Firma BD (FACSCalibur) durchgeführt. Das Gerät wurde den Herstellerangaben entsprechend gewartet, Geräteeinstellungen wurden regelmäßig durch Messungen mit Fluorochrom konjugierten Beads überprüft. Isotypkontrollen (IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG2a-PE, IgG1PE-CY5) wurden regelmäßig mitgeführt. Die durchflusszytometrische Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit dem Programm CellQuest (Firma BD).

PBMC von AML-Patienten wurden mit dem entsprechenden primären monoklonalen Antikörper (mAb) gegen die Zielmoleküle oder der Isotyp-Kontrolle (10 µg/µl) inkubiert, gefolgt von Ziege-anti-Maus-Konjugat (1:100) als sekundäres Reagens. Die Leukämiezellen wurden durch Staining mit anti-CD33 oder anti-CD34-FITC Konjugaten selektiert. Die Analyse erfolgte dann durch Multicolor FACS.

Spezifische Fluoreszenz-Indices (SFI) wurden durch Division des medianen

Fluoreszenzsignals des entsprechenden spezifischen mAb durch das Signal der korrespondierenden Isotypkontrolle errechnet. Leukämische Blasten wurden als positiv eingestuft, wenn die mediane Fluoreszenz mindestens 1,5-fach höher lag als bei der entsprechenden Isotypkontrolle (SFI = 1,5).

#### **2.4.1 Antikörper**

Zur Untersuchung der Zielantigene wurden monoklonale Antikörper gegen GITRL, 4-1BBL, CD80/86 und MHC Klasse I verwendet. Die gegen 4-1BBL gerichteten Antikörper waren von Prof. Dr. H. Salih im Rahmen seines Post-Doc Aufenthaltes generiert worden und sind hinlänglich beschrieben (Salih HR, 2001). Die anti-GITRL Antikörper, IgG1 Isotyp-Kontrollen und Antikörper gegen CD80/66 wurden von R&D Systems (Wiesbaden, Germany) kommerziell erworben. Der gegen MHC Klasse I gerichtete Antikörper Klon W6/32 steht innerhalb der Universität Tübingen als Hybridom zur Verfügung und ist hinlänglich beschrieben (Salih HR, 2003)

### **2.5 Zytogenetische Untersuchungsmethoden**

Bei allen Patienten wurden sofern möglich zytogenetische Untersuchungen durchgeführt. Diese wurden im Institut für Medizinische Genetik der Universität Tübingen, im Labor Dr. Enders in Dortmund oder, falls die Patienten in entsprechende Therapiestudien eingeschleust wurden, in den entsprechenden Referenzlabors der Studiengruppen durchgeführt. Die Chromosomen wurden entsprechend den ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)-Kriterien interpretiert (Mitelman K, 1995)

Die untersuchten Fälle wurden nach der Einteilung der AMLCG in günstige, intermediäre und ungünstige zytogenetische Prognosegruppen eingeteilt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Einteilung in zytogenetische Risikogruppen nach AMLCG

Risikogruppe	Zytogenetik
günstig	t(8;21), t(15;17), inv(16), t(16;16)
intermediär	Normaler Karyotyp, andere Aberrationen
ungünstig	-5, -7, 5q-, 7q-, inv(3), 11q23-Aberration, 12p-Aberration, 17p-Aberration, komplexe Aberrationen

t, Translokation; del, Deletion; inv, Inversion

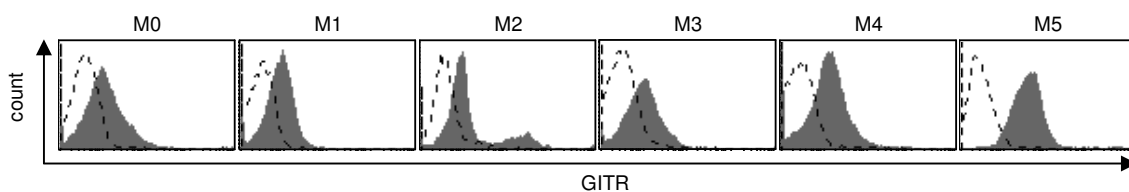
## 2.6 Statistische Berechnungen

Die statistische Auswertung dieser Arbeit wurde mit den Programmen JMP 4.0.4 (SAS Institute Inc.) und Excel (Microsoft) durchgeführt. Dabei wurden Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane und Schwankungsbereiche mit Excel ermittelt. Gruppenvergleiche sowie die Korrelation der Expression bzw. Positivität für GITRL bzw. 4-1BBL mit jeweiligen klinischen Parametern wurden mit dem Programm JMP 4.0.4 mittels Chi-Quadrat-Test oder Anova-Test ermittelt. Ein p-Wert  $\leq 0.05$  galt als statistisch signifikant. Die Korrelation zwischen GITRL bzw. 4-1BBL und MHC-I bzw. CD86 wurde ebenfalls mit dem Programm JMP 4.0.4 durchgeführt.

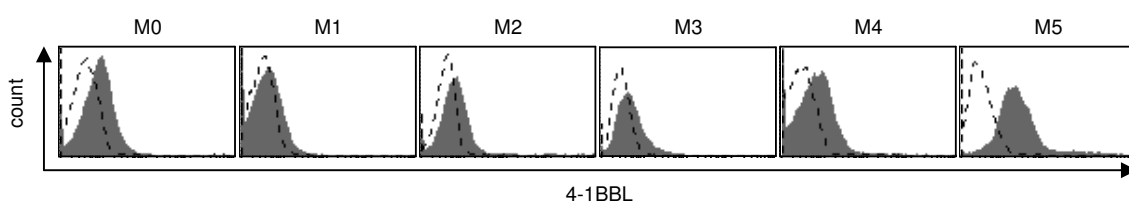
### 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde vorrangig die Expression von GITRL und 4-1BBL und zur Korrelation die von CD86 und MHC Klasse I in Blutproben von insgesamt 55 AML-Patienten untersucht. Da nicht immer *alle* Marker bei *allen* Patienten untersucht wurden variieren die Fallzahlen innerhalb der einzelnen Gruppen. Ebenso liegen nicht für alle Patienten Informationen über Art der Therapie, Therapieansprechen sowie Überleben vor, da ein Teil der Patienten an andere Krankenhäuser verlegt wurde, ein anderer Teil derzeit noch therapiert wird, oder die Nachbeobachtungszeit noch zu kurz ist.

Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen exemplarisch die Expression von GITRL und 4-1BBL für verschiedene FAB-Typen im Vergleich mit den jeweiligen Isotypkontrollen.



**Abbildung 1: Expression von GITRL (dunkle Fläche) im Vergleich zur Isotypkontrolle (gestrichelte Kurve) bei verschiedenen FAB-Typen.**



**Abbildung 2: Expression von 4-1BBL (dunkle Fläche) im Vergleich zur Isotypkontrolle (gestrichelte Kurve) bei verschiedenen FAB-Typen.**

Entsprechend wurde die Assoziation von GITRL und 4-1BBL mit verschiedenen FAB-Typen, der primären und sekundären AML und mit der zytogenetischen Risikogruppe untersucht. Zusätzlich wurde die prognostische Bedeutung der Zielmoleküle in Bezug auf das Erreichen einer Remission und des Überlebens untersucht sowie die Korrelation mit CD86 und MHC Klasse I. Tabelle 7 zeigt die Charakteristika des gesamten untersuchten Patientenkollektivs.

Tabelle 7: Patientenkollektiv

Patienten	n=55
Alter [Jahre] (Median/ SB)	63 (18 – 84)
Geschlecht m/w [n (%)]	20 (36,4%)/35 (63,6%)
Blastenanzahl PB [%] (MW $\pm$ SD)	74 $\pm$ 23
Leukozyten [G/l] (MW $\pm$ SD (SB))	60,4 $\pm$ 76 (1,0 – 322,5)
Hb [g/dl] (MW $\pm$ SD (SB))	9,2 $\pm$ 1,96 (5,5 – 15,9)
Thrombozyten [1000/ $\mu$ l] (MW $\pm$ SD (SB))	63,9 $\pm$ 61,3 (3 – 299)
FAB-Typ	n (%)
M0	2 (3,6)
M1	8 (14,5)
M2	17 (30,9)
M3	4 (7,3)
M4	10 (18,2)
M5	8 (14,5)
M6	1 (1,8)
M7	1 (1,8)
AML aus MDS/ nicht klassifizierbar	3 (5,5)
ly AML	1 (1,8)
Zytogenetik	n (%)
günstig	6 (13,6%)
intermediär	27 (61,4%)
ungünstig	11 (25,0%)
Therapie	n
Induktionstherapie	30
Zytoreduktion	11
keine Therapie	2
keine Angaben	12
Remission/ Persistenz	16 (59%)/11 (41%)
Überleben/ Tod	19 (58%)/14 (42%)

n, Anzahl; PB, peripheres Blut; MW, Mittelwert; SB, Schwankungsbreite; SD, Standardabweichung; ly AML, AML mit Koexpression lymphatischer Marker

Von den 55 Patienten mit AML konnten 51 einem FAB-Typ zugeordnet werden, von den übrigen wurden 3 als „sekundäre AML“ ohne Angabe eines FAB Typs klassifiziert, eine als AML mit Koexpression lymphatischer Marker (ly AML).

In 51 Fällen lag eine primäre AML vor, bei 4 Patienten eine sekundäre AML.

Das mediane Alter der Patienten lag bei 63 Jahren (18 – 84) mit einem Verhältnis von Männern zu Frauen von 1:1,75. Die mittlere Leukozytenzahl betrug 60.400/ $\mu$ l mit einer Streubreite von 1.000/ $\mu$ l bis 322.500/ $\mu$ l und einem mittleren Blastenteil von 74  $\pm$  23 %.

Zytogenetische Daten, welche eine Einstufung in die entsprechende Risikogruppe ermöglichten, lagen bei 44 der 55 Patienten (80 %) vor. Hierbei

wiesen 6 Patienten (13,6 %) ein günstiges Risiko auf, 27 Patienten (61,4 %) ein intermediäres Risiko und 11 Patienten (25,0 %) einen ungünstigen Karyotyp.

Bei 30 Patienten wurde eine Induktionstherapie durchgeführt, wobei verschiedene Chemotherapieschemata verwendet wurden. Alle Patienten erhielten Cytarabin in Kombination mit einem Anthracyclin (Idarubicin, Epirubicin, Daunorubicin oder Mitoxantrone), ein Teil der Patienten erhielt zusätzlich Etoposid oder Gemtuzumab-Ozogamicin. Patienten mit AML M3 wurden mit einem ATRA-basierten Therapieprotokoll behandelt. 11 Patienten wurden aufgrund von Alter und Komorbiditäten lediglich zytoreduktiv behandelt (Hydroxyurea oder niedrig-dosiertes Cytarabin), zwei Patienten erhielten keine spezifische Behandlung. Die übrigen Patienten starben entweder vor Therapieeinleitung oder es lagen keine Daten zur weiteren Therapie vor.

Von den 30 Patienten, bei denen eine Induktionstherapie durchgeführt wurde, liegen bei 27 Patienten Daten zum Therapieansprechen vor. 16 Patienten (59 %) erreichten eine komplette Remission, 11 Patienten (41 %) zeigten eine Blastenpersistenz.

Bei 34 der 55 Patienten (62 %) lagen Daten bezüglich des Überlebens vor. Bei einem Teil der übrigen Patienten liegen keine Daten zum weiteren Krankheitsverlauf vor, bei einem anderen Teil der Patienten ist die Nachbeobachtungszeit noch zu kurz, so dass diese nicht in die Auswertung eingingen.

Eine Übersicht über die Expression von GITRL und 4-1BBL sowie den Anteil der GITRL- bzw. 4-1BBL-positiven Fälle zeigt die Tabelle 8.



Tabelle 8: Expression von GITRL bzw. 4-1BBL in Bezug auf das gesamte Patientenkollektiv

Patienten	n=55
GITRL (SFI) m±SEM	3,02 ± 0,40
Anzahl positiver Fälle (SFI = 1,5) (n/%)	31 (56,4 %)
4-1BBL (SFI) <sup>1</sup> m±SEM	1,55 ± 0,14
Anzahl positiver Fälle <sup>1</sup> (SFI = 1,5) (n/%)	16 (30,2 %)

SFI, Spezifischer Fluoreszenzindex; m±SEM, Mittelwert ± Standardfehler

<sup>1</sup> 53 auswertbare Fälle

### 3.1 Expression von GITRL und 4-1BBL bei verschiedenen FAB-Typen

Untersucht wurde hier die Expression der Zielmoleküle bei 51 Patienten, welche sicher einem definierten FAB-Typ zugeordnet werden konnten, sowie 4 Patienten, bei welchen entweder nur die Angabe „sekundäre AML“ (n=3) ohne Bestimmung des FAB-Typs oder eine AML mit Koexpression lymphatischer Marker vorlag, welche innerhalb der FAB-Klassifikation nicht abgebildet wird. Tabelle 9 zeigt die klinischen Charakteristika der Patienten aufgeschlüsselt nach FAB-Typ.

Tabelle 9: Patientenkollektiv nach FAB-Typen

FAB-Typ	M0 (n=2)	M1 (n=8)	M2 (n=17)	M3 (n=4)	M4 (n=10)	M5 (n=8)	M6 (n=1)	M7 (n=1)	n. k. (n=4)
Alter (y) Median (Schwankungsbreite)	66,5 (65-68)	50,5 (33-78)	62 (30-76)	56 (20-69)	61 (18-82)	57,5 (18-84)	67	27	69,5 (40-78)
PB Blasten (m±s)%	93±1	88±11	72±24	74±18	68±26	77±20	50	76	64±43
Zytogenetik									
günstig (n)	0	0	2	4	0	0	0	0	0
intermediär (n)	0	6	10	0	5	3	0	0	2
ungünstig (n)	0	1	1	0	3	3	1	1	1
keine Angaben	2	1	4	0	2	2	0	0	1
Induktionstherapie	0	4	11	4	7	3			1
Remission/ Persistenz		2/2	9/2	2/0	2/4	1/2			0/1
Überleben/ Tod	0/1	3/2	6/5	3/0	3/1	1/4		1/0	2/1

PB, peripheres Blut; m±s, Mittelwert ± Standardabweichung; y, Jahre; n.k., nicht klassifiziert

Die Expression von GITRL und 4-1BBL wurde als spezifischer Fluoreszenzindex (SFI) für jeden Patienten bestimmt. Eine Probe wurde wie beschrieben als positiv für den jeweiligen Liganden definiert, wenn der SFI für mindestens 1,5 betrug.

Tabelle 10 zeigt die Expression von GITRL und 4-1BBL jeweils als absolute SFI-Werte und als Anzahl der positiven Patienten in Abhängigkeit vom FAB-Typ.

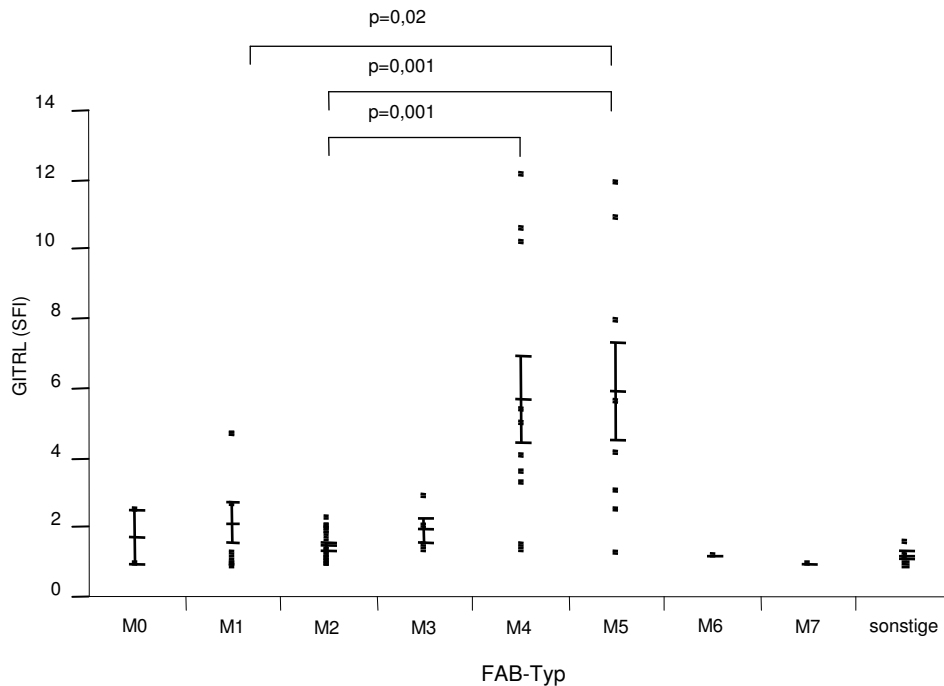
Tabelle 10: Expression von GITRL und 4-1BBL in Abhängigkeit vom FAB-Typ

FAB-Typ	M0 (n=2)	M1 (n=8)	M2 (n=17)	M3 (n=4)	M4 (n=10)	M5 (n=8)	M6 (n=1)	M7 (n=1)	nicht klass. (n=4)
GITRL (SFI) m±SEM	1,8±0,8	2,2±0,6	1,5±0,1	2,0±0,3	5,7±1,2	5,9±1,4	1,2	1,0	1,2±0,1
Anzahl positiver Fälle (n/%)	1 50 %	3 37,5 %	7 41 %	3 75 %	9 90 %	7 87,5 %	0	0	1 25 %
4-1BBL (SFI) m±SEM	1,5±0,5	1,4±0,3	1,2±0,04	1,3±0,1	1,8±0,3	2,7±0,7	1,4	1,0	1,0±0,03
Anzahl positiver Fälle (n/%)	1 50 %	1 14,3 % <sup>1</sup>	10 59 %	1 33,3 % <sup>2</sup>	6 60 %	6 75 %	0	0	0

SFI, Spezifischer Fluoreszenzindex; m±SEM, Mittelwert ± Standardfehler

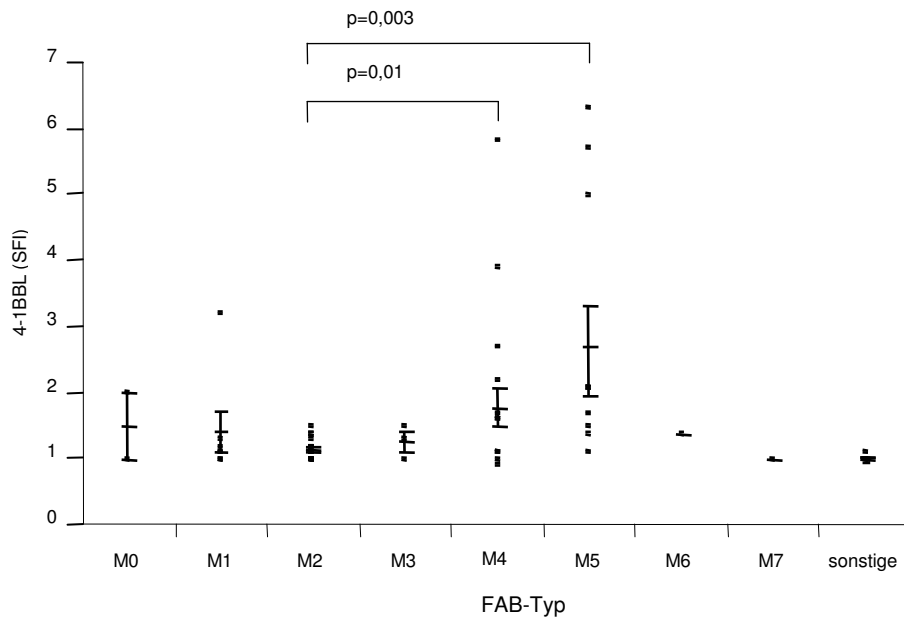
<sup>1</sup> nur 7 von 8 Patienten auswertbar, <sup>2</sup> nur 3 von 4 Patienten auswertbar

Es zeigt sich ein statistisch hochsignifikanter Unterschied bezüglich der Expression von GITRL und 4-1BBL bei Patienten mit den monozytären Leukämien M4 und M5 im Vergleich mit den FAB-Typen M1 und M2. Aufgrund der niedrigen Fallzahl in den Untergruppen M0 und M3 sowie M6 und M7 erreicht der Unterschied zu den monozytären Leukämien hier keine statistische Signifikanz. Diese Daten sind in Abbildung 1 und 2 dargestellt. Gezeigt sind die SFI der einzelnen Patienten für GITRL bzw. 4-1BBL in Abhängigkeit des FAB-Typs, sowie der Mittelwert und der Standardfehler für die einzelnen Untergruppen.



**Abbildung 1: Expression von GITRL in Abhängigkeit vom FAB-Typ**

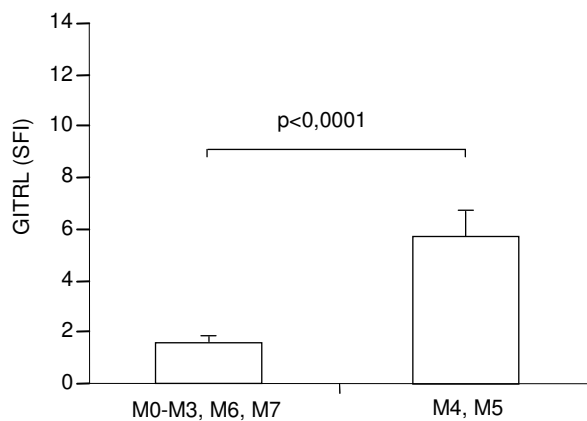
Dargestellt sind die gemessenen Einzelwerte der spezifischen Fluoreszenzindices für GITRL in Abhängigkeit des FAB-Typs sowie die Mittelwerte und Standardfehler. Exemplarisch sind die p-Werte für die AML M5 im Vergleich mit M1 und M2 sowie für die AML M4 im Vergleich zur AML M2 angegeben.



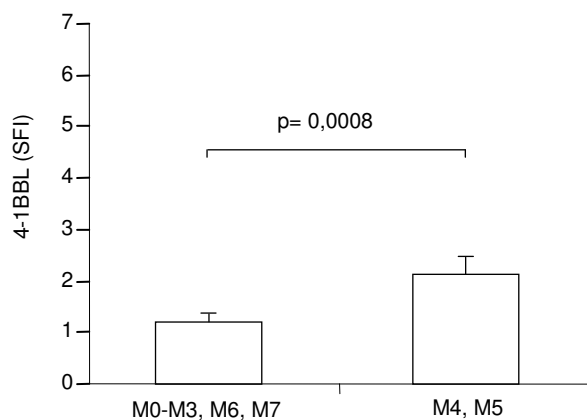
**Abbildung 2: Expression von 4-1BBL in Abhängigkeit vom FAB-Typ**

Dargestellt sind die gemessenen Einzelwerte der spezifischen Fluoreszenzindices für 4-1BBL in Abhängigkeit des FAB-Typs sowie die Mittelwerte und Standardfehler. Exemplarisch sind die p-Werte für die AML M4 und M5 im Vergleich mit der AML M2 angegeben.

In Abbildung 3 und 4 wurden, in Anlehnung an die physiologischerweise in entsprechenden gesunden Zellen vorliegenden Expressionsmuster der Zielmoleküle, die Patienten mit den monozytären Leukämien auf der einen Seite und den nicht-monozytären Leukämien auf der anderen Seite jeweils als Gruppe zusammengefasst und die Expression von GITRL und 4-1BBL für die beiden Gruppen verglichen.



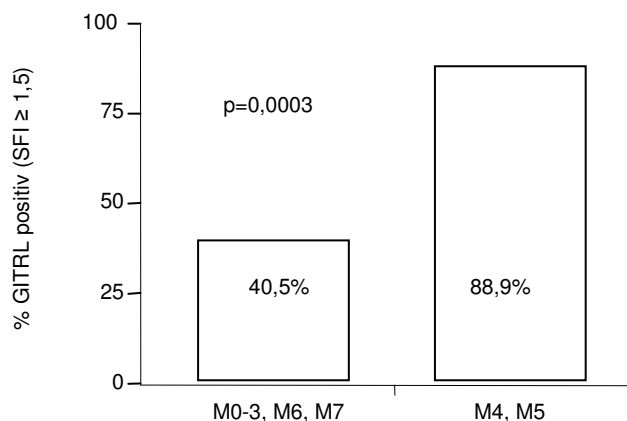
**Abbildung 3: Expression von GITRL bei monozytären und nicht-monozytären Leukämien**  
Die SFI für GITRL wurden jeweils für die monozytären Leukämien AML FAB M4 und M5 und die nicht-monozytären Leukämien FAB M0 – M3, M6 und M7 zusammengefasst. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die beiden Gruppen.



**Abbildung 4: Expression von 4-1BBL bei monozytären und nicht-monozytären Leukämien**  
Die SFI für 4-1BBL wurden jeweils für die monozytären Leukämien AML FAB M4 und M5 und die nicht-monozytären Leukämien FAB M0 – M3, M6 und M7 zusammengefasst. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die beiden Gruppen.

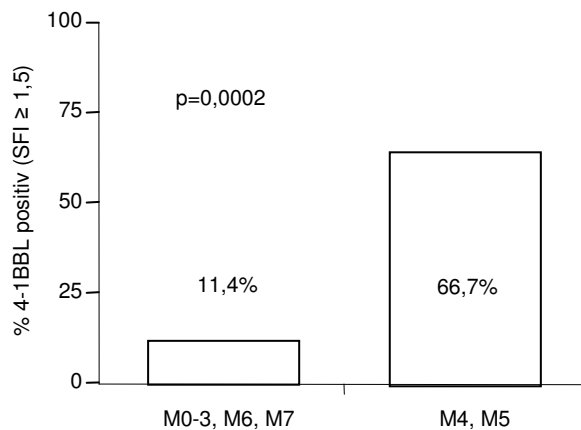
Es zeigt sich ein statistisch hochsignifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit einer durchschnittlichen Expression von GITRL von 5,8 in der Gruppe der monozytären Leukämien gegenüber 1,7 bei den nicht-monozytären Leukämien und von 4-1BBL von 2,2 in der Gruppe der monozytären Leukämien gegenüber 1,2 bei den nicht-monozytären Leukämien ( $p < 0,0001$  bzw.  $p = 0,0008$ ).

In den Abbildung 5 und 6 wurden die Patienten anhand des SFI in GITRL- bzw. 4-1BBL-positive und negative Fälle unterteilt. Patienten wurden wie beschrieben als positiv eingestuft, wenn der SFI für den entsprechenden Liganden 1,5 oder mehr betrug. Verglichen wurde dann die Anzahl der positiven Patienten mit dem FAB-Typ, wobei die Leukämien in monozytäre (M4, M5) und nicht-monozytäre (M0, M1, M2, M3, M6, M7) Leukämien unterteilt wurden. Während in der Gruppe der monozytären Leukämien fast 90 % GITRL bzw. 67 % 4-1BBL exprimierten, zeigten die nicht-monozytären Leukämien lediglich in 40 % (GITRL) bzw. 11 % (4-1BBL) eine Expression des jeweiligen Liganden. Dieser Unterschied war jeweils hochsignifikant ( $p = 0,0003$  für GITRL bzw.  $0,0002$  für 4-1BBL).



**Abbildung 5: GITRL-Positivität bei monozytären im Vergleich mit nicht-monozytären Leukämien**

Die Proben wurden nach SFI in negative und positive Fälle unterteilt. Ein SFI  $\geq 1,5$  wurde als positiv definiert. Dargestellt ist der Anteil GITRL-positiver Fälle in Abhängigkeit des Vorliegens einer monozytären oder nicht-monozytären AML.



**Abbildung 6: 4-1BBL-Positivität bei monozytären im Vergleich mit nicht-monozytären Leukämien**

Die Proben wurden nach SFI in negative und positive Fälle unterteilt. Ein SFI  $\geq 1,5$  wurde als positiv definiert. Dargestellt sind die 4-1BBL-positiven Fälle in Abhängigkeit des Vorliegens einer monozytären oder nicht-monozytären AML.

### 3.2 Expression von GITRL und 4-1BBL bei primärer und sekundärer AML

Untersucht wurde nun die Expression von GITRL und 4-1BBL im Hinblick auf Patienten mit primärer und sekundärer AML. Von den 55 analysierten Patienten wiesen 51 eine pAML auf, vier Patienten eine sAML. Die Patienten mit sAML zeigten hier eine deutlich geringere Expression von GITRL und 4-1BBL. Aufgrund der geringen Fallzahl in der Gruppe mit sAML erreichte das Ergebnis jedoch keine statistische Signifikanz ( $p=0,19$  für GITRL und  $p=0,36$  für 4-1BBL). Auch bei Analyse der positiven Patienten ( $SFI \geq 1,5$ ) zeigte sich für 4-1BBL kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,08$ ; Daten nicht gezeigt), allerdings zeigten sich signifikant mehr GITRL-positive Fälle in der Gruppe mit pAML, wie Abb. 9 verdeutlicht ( $p=0,008$ ).

Tabelle 10 zeigt die Charakteristika der Patienten in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer primären oder sekundären AML.

Tabelle 10: Patientenkollektiv nach p-/sAML

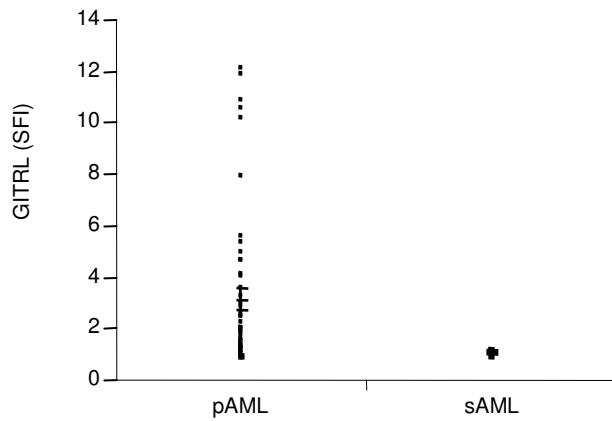
Typ AML	pAML	sAML
Anzahl	n=51	n=4
Alter [y] Median (Schwankungsbreite)	59 (18-84)	70,5 (65-78)
PB Blasten [%] (m±s)	76 ± 21	54 ± 39
Induktionstherapie	30	n.a.
Remission/ Persistenz	16/11	n.a.
Überleben/ Tod	18/13	n.a.
GITRL [SFI] (m±SEM)	3,17 ± 0,43	1,13 ± 0,05
Anzahl positiver Fälle (SFI = 1,5) (n/%)	31 60,8 %	0 0 %
4-1BBL [SFI] (m±SEM)	1,58 ± 0,15	1,10 ± 0,10
Anzahl positiver Fälle (SFI = 1,5) (n/%)	16 32,7 %	0 0 %

m±SEM, Mittelwert ± Standardfehler; m±s, Mittelwert ± Standardabweichung;  
pAML primäre AML, sAML sekundäre AML, PB peripheres Blut, SFI Spezifischer  
Fluoreszenzindex, y Jahre, n.a. nicht angegeben

In der Gruppe der Patienten mit sAML liegen für keinen Patienten Daten bezüglich einer Induktionstherapie oder des Überlebens vor. Bezüglich des Alters zeigte sich ein Trend zu höherem Alter in der Gruppe der Patienten mit sAML, ohne allerdings statistische Signifikanz zu erreichen ( $p=0,07$ ). Bezüglich der Blastenzahl im peripheren Blut zeigte sich ein Trend zu einer niedrigeren Blastenzahl in der Gruppe der sAML-Patienten ( $p=0,06$ ).

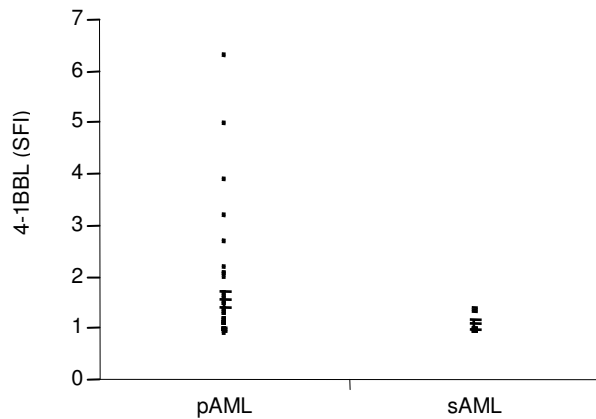
Die Abbildungen 7 und 8 veranschaulichen die Verteilung der GITRL- bzw. 4-1BBL-Expression in Abhängigkeit vom Vorliegen einer primären oder sekundären AML. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte der Patienten, sowie Mittelwert und SEM der jeweiligen Gruppe. In beiden Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression von GITRL ( $p=0,19$ ) bzw. 4-1BBL ( $p=0,36$ ).

Betrachtet man allerdings die Anzahl der positiven Fälle für den jeweiligen Liganden, so zeigen sich signifikant mehr GITRL-positive Fälle in der Gruppe der pAML als in der Gruppe der sAML (Abbildung). Für 4-1BBL lässt sich auch bei Analyse der positiven Fälle kein signifikanter Unterschied nachweisen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 7: Expression von GITRL bei primärer und sekundärer AML**

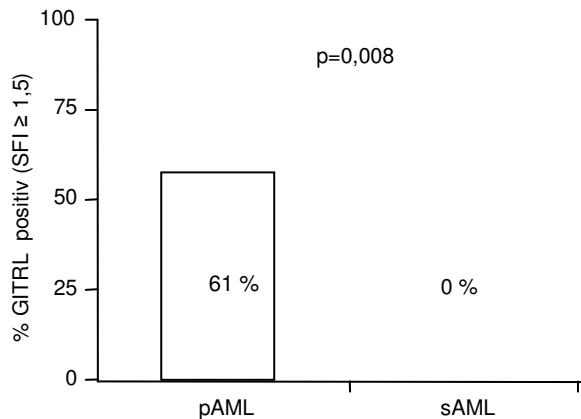
Die Proben wurden unterteilt in primäre und sekundäre AMLs. Die SFI-Werte für die jeweiligen Proben sowie Mittelwert und Standardfehler sind dargestellt.



**Abbildung 8: Expression von 4-1BBL bei primärer und sekundärer AML**

Die Proben wurden unterteilt in primäre und sekundäre AMLs. Die SFI-Werte für die jeweiligen Proben sowie Mittelwert und Standardfehler sind dargestellt.





**Abbildung 9: Anzahl GITRL-positiver Fälle bei primärer und sekundärer AML**

Die Proben wurden unterteilt in primäre und sekundäre AMLs. Dargestellt ist die Anzahl der GITRL-positiven Fälle bei primärer und sekundärer AML.

### 3.3 Expression von GITRL und 4-1BBL bei verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen

Die Expression von GITRL und 4-1BBL wurde gemäß der vorliegenden Patientenpopulation bei 6 Patienten mit prognostisch günstigem, 27 Patienten mit intermediärem und 11 Patienten mit prognostisch ungünstigem Karyotyp untersucht. Der Altersmedian lag mit 51 Jahren in der intermediären Prognosegruppe etwas unterhalb von dem der günstigen und ungünstigen Prognosegruppe (Altersmedian: 55,5 bzw. 63 Jahre), ohne allerdings statistische Signifikanz zu erreichen. Die prognostisch günstige Gruppe setzte sich zu 33 % aus M2- und zu 67 % aus M3-Patienten zusammen. Der Anteil von monozytären Leukämien lag in der schlechten Prognosegruppe bei über 50%. Die intermediäre Risikogruppe war heterogen zusammengesetzt, am meisten waren Patienten mit dem FAB-Typ M1, M2 und M4 vertreten.

Tabelle 11 zeigt eine Übersicht über die Patientencharakteristika nach zytogenetischer Risikogruppe, sowie die Expression von GITRL und 4-1BBL und die Anzahl positiver Fälle in den jeweiligen Risikogruppen.

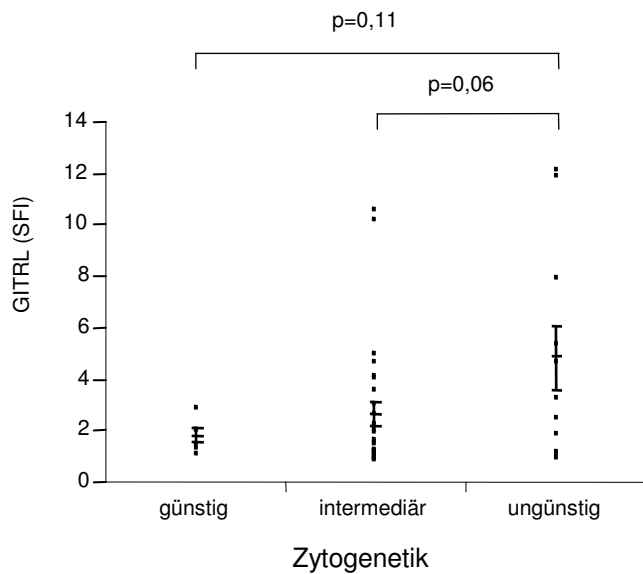
Tabelle 11 Patientenkollektiv nach Risikogruppen

Risikogruppe	günstig	intermediär	ungünstig
Patientenzahl	n=6	n=27	n=11
Alter (y) Median (Schwankungsbreite)	55,5 (20-69)	51 (18-82)	63 (18-69)
PB Blasten (m±s)%	75 ± 15	78 ± 20	53 ± 30
Induktionstherapie	5	20	7
Remission/ Persistenz	3/0	9/9	3/3
Überleben/ Tod	3/0	14/6	1/3
FAB-Typ	n	n	n
M0	0	0	0
M1	0	6	1
M2	2	10	1
M3	4	0	0
M4	0	6	3
M5	0	3	3
M6	0	0	1
M7	0	0	1
sonstige/ unklass.	0	2	1
GITRL SFI (m±SEM)	1,85 ± 0,27	2,70 ± 0,49	4,84 ± 1,25
Anzahl positiver Fälle (n%)	4 66,7 %	15 55,6 %	8 72,7 %
4-1BBL SFI (m±SEM)	1,24 ± 0,10	1,39 ± 0,13	2,03 ± 0,47
Anzahl positiver Fälle (n%)	1 20 % <sup>1</sup>	6 23,1 %	6 54,5 %

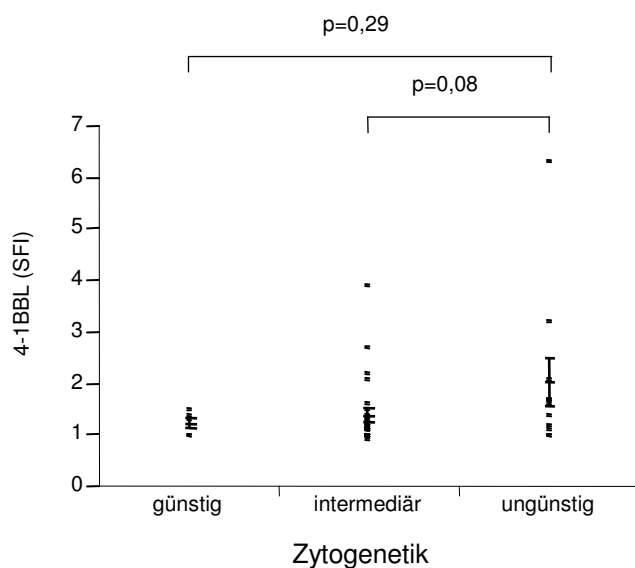
m±SEM, Mittelwert ± Standardfehler; m±s, Mittelwert ± Standardabweichung;  
PB, peripheres Blut; SFI, Spezifischer Fluoreszenzindex; y, Jahre; <sup>1</sup> nur 5 Patienten auswertbar

Während die Patienten mit günstiger Zytogenetik einen mittleren SFI von 1,85 für GITRL bzw. 1,24 für 4-1BBL aufweisen, zeigen besonders die Patienten mit ungünstigem Karyotyp deutlich höhere Werte mit einem mittleren SFI von 4,84 (GITRL) bzw. 2,03 (4-1BBL).

Die Abbildung 10 und 11 zeigen grafisch die Expression von GITRL und 4-1BBL in Abhängigkeit der zytogenetischen Risikogruppe. Es zeigt sich in dieser Auswertung insbesondere bezüglich GITRL ein Trend zur vermehrten Expression der Liganden bei Patienten mit ungünstigem Karyotyp im Vergleich mit den Patienten mit intermediärem oder günstigem Karyotyp, ohne allerdings statistische Signifikanz zu erreichen.

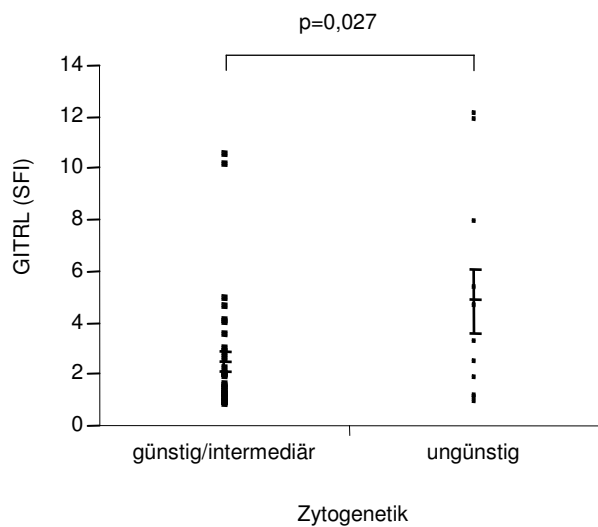


**Abbildung 10: Expression von GITRL in Abhängigkeit der zytogenetischen Risikogruppe**  
 Die Proben wurden unterteilt nach der zytogenetischen Risikogruppe (vgl. Tabelle 5). Die SFI-Werte für die jeweiligen Proben sowie Mittelwert und Standardfehler sind dargestellt.

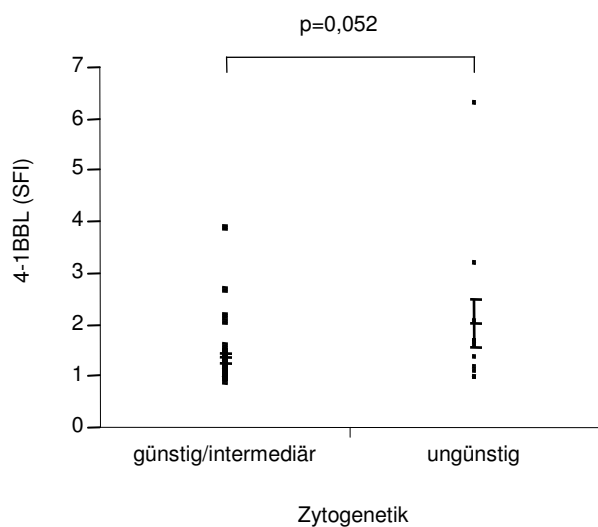


**Abbildung 11: Expression von 4-1BBL in Abhängigkeit der zytogenetischen Risikogruppe**  
 Die Proben wurden unterteilt nach der zytogenetischen Risikogruppe (vgl. Tabelle 5). Die SFI-Werte für die jeweiligen Proben sowie Mittelwert und Standardfehler sind dargestellt.

In Abbildung 12 und 13 wurden die Patienten mit günstigem und intermediärem Karyotyp in einer Gruppe zusammengefasst. Es zeigt sich eine signifikant höhere Expression von GITRL in der ungünstigen Prognosegruppe, während sich bei 4-1BBL weiterhin nur ein grenzwertig signifikanter Trend ( $p=0,052$ ) zeigt.

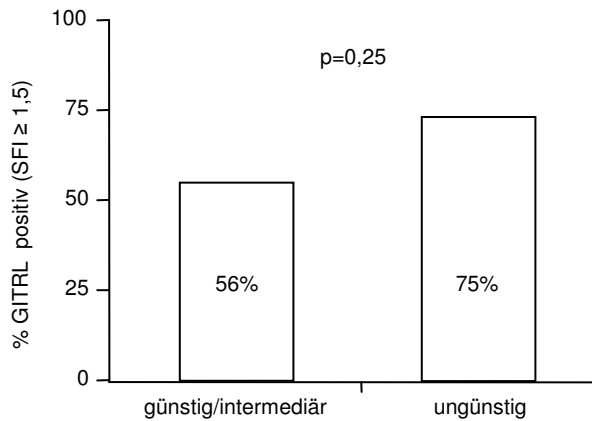


**Abbildung 12: Expression von GITRL in Abhängigkeit der zytogenetischen Risikogruppe**  
 Die Proben wurden unterteilt nach der zytogenetischen Risikogruppe (vgl. Tabelle 5), wobei die günstige und die intermediäre Prognosegruppe zusammengefasst wurden. Die SFI-Werte für die jeweiligen Proben sowie Mittelwert und Standardfehler sind dargestellt.



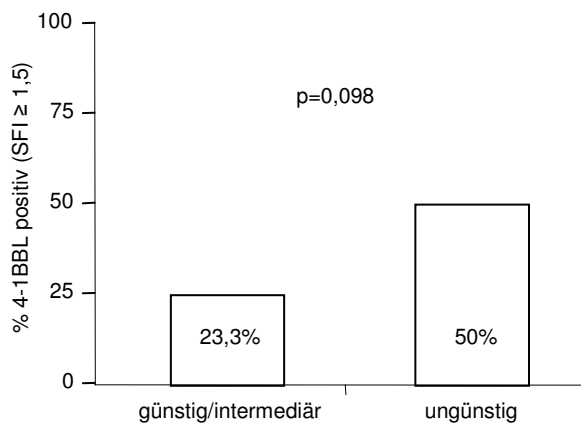
**Abbildung 13: Expression von 4-1BBL in Abhängigkeit der zytogenetischen Risikogruppe**  
 Die Proben wurden unterteilt nach der zytogenetischen Risikogruppe (vgl. Tabelle 5), wobei die günstige und die intermediäre Prognosegruppe zusammengefasst wurden. Die SFI-Werte für die jeweiligen Proben sowie Mittelwert und Standardfehler sind dargestellt.

Wird anstelle des SFI die Anzahl der positiven Proben mit einem  $SFI \geq 1,5$  aufgetragen, so zeigt sich, wie in Abbildung 14 und 15 dargestellt, kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.



**Abbildung 14: GITRL-Positivität bei ungünstiger Zytogenetik im Vergleich mit günstiger und intermediärer Zytogenetik**

Gezeigt ist der Anteil von GITRL-positiven Fällen (SFI ≥ 1,5) in Abhängigkeit der zytogenetischen Risikogruppe.



**Abbildung 15: 4-1BBL-Positivität bei ungünstiger Zytogenetik im Vergleich mit günstiger und intermediärer Zytogenetik**

Gezeigt ist der Anteil von 4-1BBL-positiven Fällen (SFI ≥ 1,5) in Abhängigkeit der zytogenetischen Risikogruppe.

### **3.4 Expression von GITRL und 4-1BBL und Therapieansprechen der Patienten**

Wir untersuchten daraufhin, ob sich bezüglich der Expression von GITRL und 4-1BBL ein signifikanter Unterschied des Ansprechens der Patienten auf die Induktionstherapie nachweisen ließ. Von den insgesamt 30 Patienten, welche eine Induktionstherapie erhielten, lagen für 27 Patienten Daten bzgl. des Therapieansprechens vor. 16 der 27 Patienten (59,3 %) erreichten eine komplette Remission (CR) nach der ersten Chemotherapie, 11 Patienten (40,7 %) erreichten keine CR. Das mediane Alter bei den Patienten, welche keine CR erreichten, lag mit 41 Jahren gegenüber 50,5 Jahren niedriger als bei den Patienten, welche eine Remission erreichten ( $p=0,14$ ). Die Patienten mit Blastenpersistenz wiesen initial eine etwas höhere Blastenzahl im peripheren Blut auf ( $p=0,17$ ). Erwartungsgemäß verstarben mehr Patienten in der Gruppe mit Blastenpersistenz (55 %) als in der Gruppe, welche eine CR erreichten (16,7 %).

Bei den FAB-Typen zeigte sich bei den Patienten, welche eine CR erreichten, anteilmäßig mehr Patienten mit AML M2 (9/16; 56,3 %), als in der Gesamtgruppe (30,9 %), während sich in der Gruppe mit Blastenpersistenz etwas mehr Patienten mit AML M4 zeigten. Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

Die Expression von GITRL und 4-1BBL war in beiden Patientengruppen identisch. Auch bei der Anzahl GITRL- bzw. 4-1BBL-positiver Fälle zeigte sich kein Unterschied zwischen der Gruppe, welche eine CR erreichte, und der Gruppe mit Blastenpersistenz.

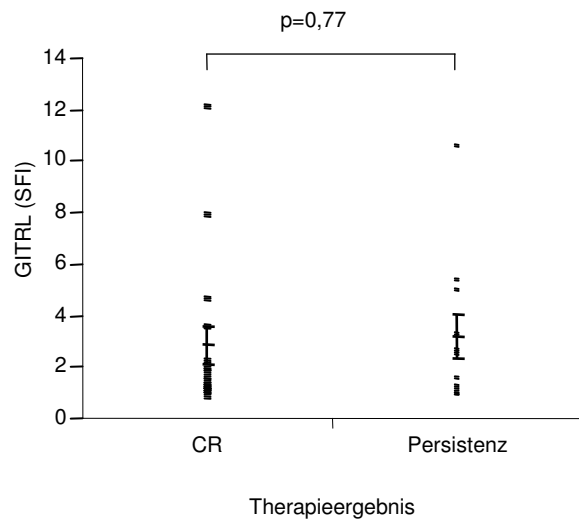
Tabelle 12 zeigt das bezüglich des Therapieansprechens auswertbare Patientenkollektiv.

Tabelle 12 Patientenkollektiv nach Therapieansprechen

Therapieansprechen	Komplette Remission	Blastenpersistenz
	n=16	n=11
Alter (y) Median (Schwankungsbreite)	50,5 (20-72)	41 (18-67)
PB Blasten (m±s)%	68 ± 29	81 ± 17
Zytogenetik		
günstig	3	0
intermediär	10	8
ungünstig	3	3
FAB-Typ		
M0	0	0
M1	2	2
M2	9	2
M3	2	0
M4	2	4
M5	1	2
M6	0	0
M7	0	0
sonstige	0	1
Überleben/ Tod	10/2	5/4
GITRL (SFI) m±SEM	2,88 ± 0,77	3,23 ± 0,87
Anzahl positiver Fälle (n/%)	9 56,3 %	7 63,6 %
4-1BBL (SFI) m±SEM	1,27 ± 0,09	1,32 ± 0,12
Anzahl positiver Fälle (n/%)	4 28,6 %	3 27,3 %

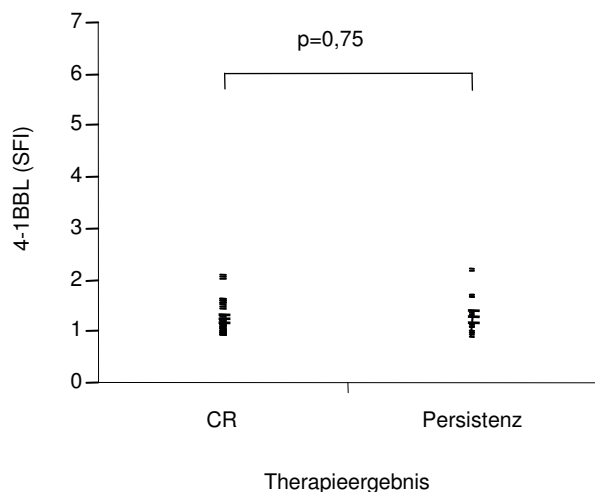
m±SEM, Mittelwert ± Standardfehler; m±s, Mittelwert ± Standardabweichung;  
PB, peripheres Blut; SFI, Spezifischer Fluoreszenzindex; y, Jahre

Die Abbildung 16 und 17 zeigen die Expression von GITRL bzw. 4-1 BBL in Abhängigkeit des Therapieansprechens. Es zeigt sich sowohl für GITRL als auch für 4-1BBL für beide Gruppen eine nahezu identische Expression der jeweiligen Liganden (p=0,77 bzw. p=0,75). Auch bei Unterteilung in positive und negative Fälle kann kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Therapieansprechen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 16: Expression von GITRL und Therapieansprechen**

Dargestellt sind die SFI-Werte der GITRL-Expression sowie Mittelwert und Standardfehler der Expression für Patienten, welche nach Induktionstherapie eine komplette Remission erreichten (CR) oder kein ausreichendes Therapieansprechen (Persistenz) zeigten.



**Abbildung 17: Expression von 4-1BBL und Therapieansprechen**

Dargestellt sind die SFI-Werte der 4-1BBL-Expression sowie Mittelwert und Standardfehler der Expression für Patienten, welche nach Induktionstherapie eine komplette Remission erreichten (CR) oder kein ausreichendes Therapieansprechen (Persistenz) zeigten.

Wir untersuchten weiterhin, ob sich bezüglich der Expression von MHC Klasse I und CD86 in unserer Studienpopulation eine signifikante Korrelation mit dem Therapieansprechen nachweisen ließ. Auch hier konnte jedoch keine eindeutige Korrelation nachgewiesen werden, wenngleich sich ein Trend zu vermehrter Expression von MHC Klasse I ( $p=0,14$ ) und CD86 ( $p=0,195$ ) in der Gruppe mit Blastenpersistenz nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt).



### **3.5 Expression von GITRL und 4-1BBL und Überleben**

Weiterhin untersuchten wir die Patientenpopulation auf Faktoren, welche sich auf das Überleben auswirkten. Es lagen diesbezüglich Daten von 34 Patienten vor. Von diesen Patienten verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraumes 15 Patienten (44 %), 19 Patienten (56 %) überlebten.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich des Alters. Das Alter der Patienten, welche überlebten, lag im Median bei 47 Jahren, während das mediane Alter in der Patientengruppe, welche verstarben bei 64 Jahren lag ( $p=0,03$ ).

Daten zur Zytogenetik lagen für alle 19 überlebenden Patienten vor, bei den Patienten, welche verstarben nur in 9 der 15 Fälle. Passend zum Gesamtkollektiv wies die überwiegende Zahl der Patienten einen intermediären Karyotyp auf.

Es konnten 31 der 34 Patienten einem definierten FAB-Typ zugeordnet werden. In der Gruppe der Patienten, welche überlebten, zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der FAB-Typen, in der anderen Gruppe lag bei 5 Patienten (33 %) eine AML FAB M5 vor. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

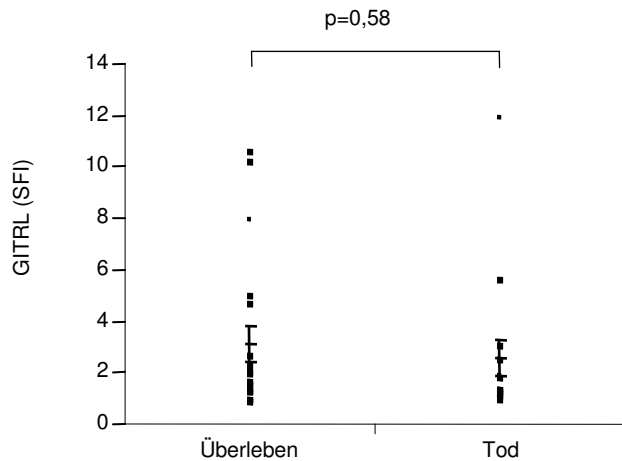
Die Patientencharakteristika nach Überleben aufgeteilt sind in Tabelle 13 detailliert dargestellt.

Tabelle 13 Patientenkollektiv nach Überleben

Überleben	Ja	Nein	
	n=19	n=15	
Alter (y) Median (Schwankungsbreite)	47 (18 – 78)	64 (18 – 74)	p = 0,03
PB Blasten (m±s)%	79 ± 22	75 ± 21	n.s.
Zytogenetik			
günstig	3	0	
intermediär	14	6	
ungünstig	2	3	n.s.
FAB-Typ			
M0	0	1	
M1	3	2	
M2	6	5	
M3	3	0	
M4	3	1	
M5	1	5	n.s.
M6	0	0	
M7	1	0	
sonstige	2	1	
GITRL (SFI) m±SEM	3,17 ± 0,71	2,61 ± 0,73	n.s.
Anzahl positiver Fälle (SFI = 1,5) (n/%)	12 63,2 %	7 46,7 %	n.s.
4-1BBL (SFI) m±SEM	1,41 ± 0,18	1,66 ± 0,34	n.s.
Anzahl positiver Fälle (SFI = 1,5) (n/%)	4 23,5 %	5 33,3 %	n.s.

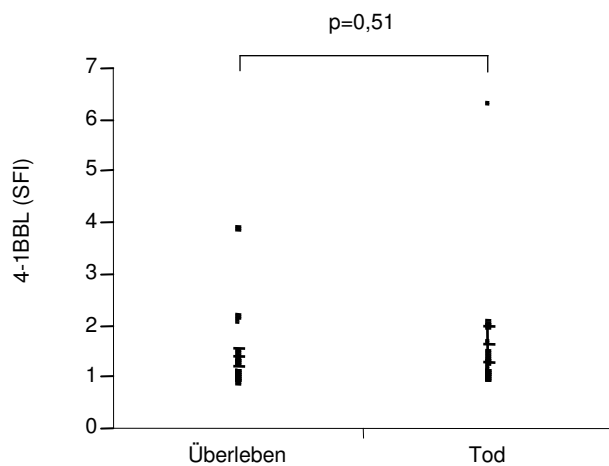
m±SEM, Mittelwert ± Standardfehler; m±s, Mittelwert ± Standardabweichung; n.s., nicht signifikant; PB, peripheres Blut; SFI, Spezifischer Fluoreszenzindex; y, Jahre.

Bezüglich der Expression von GITRL und 4-1BBL zeigte sich zwischen den beiden Gruppen mit einem mittleren SFI von 3,17 gegenüber 2,61 bei GITRL und 1,41 gegenüber 1,66 bei 4-1BBL kein signifikanter Unterschied. Auch bei der Anzahl der GITRL- bzw. 4-1BBL-positiven Fälle konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Abbildung 18 und 19 zeigen die Expression von GITRL bzw. 4-1BBL in Abhängigkeit des Überlebens.



**Abbildung 18: GITRL-Expression in Abhängigkeit des Überlebens**

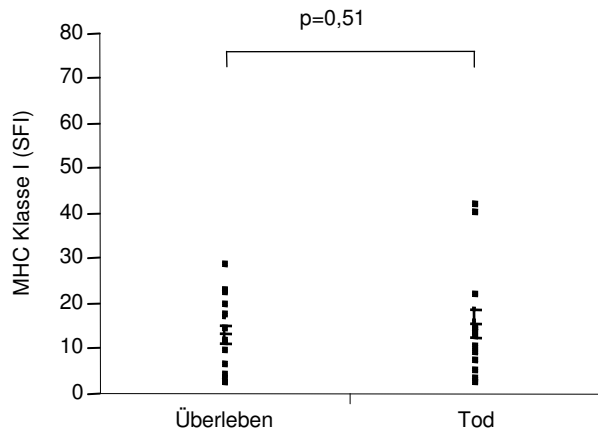
Dargestellt sind die SFI-Werte der GITRL-Expression sowie Mittelwert und Standardfehler für Patienten in Abhängigkeit des Überlebens.



**Abbildung 19: 4-1BBL-Expression in Abhängigkeit des Überlebens**

Dargestellt sind die SFI-Werte der 4-1BBL-Expression sowie Mittelwert und Standardfehler für Patienten in Abhängigkeit des Überlebens.

Als weiteren Punkt untersuchten wir, ob eine vermehrte Expression des Major-Histocompatibility-Complex Class I (MHC Klasse I) prognostische Bedeutung in Bezug auf das Überleben zeigt. Auch hier ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachweisen, wie Abbildung 19 verdeutlicht.



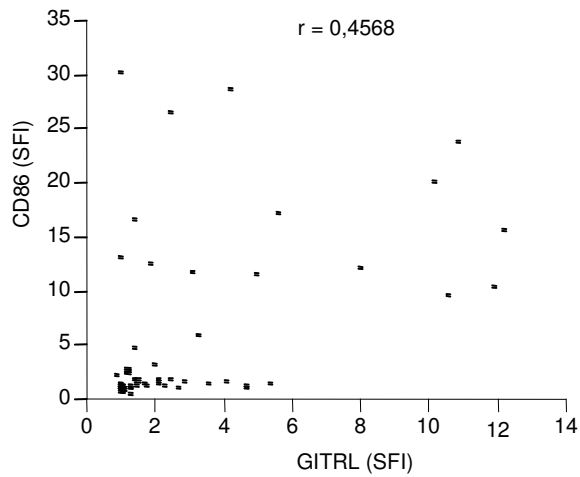
**Abbildung 20: Expression von MHC Klasse I in Abhängigkeit des Überlebens**  
 Dargestellt sind die SFI-Werte der MHC-I-Expression sowie Mittelwert und Standardfehler für Patienten in Abhängigkeit des Überlebens.

### 3.6 Korrelation der Expression von GITRL und 4-1BBL mit der Expression von MHC Klasse I und CD 86

Sowohl MHC Klasse I als auch CD86 spielen eine wichtige Rolle in der Immunregulation und in der Interaktion von Tumorzellen und dem Immunsystem.

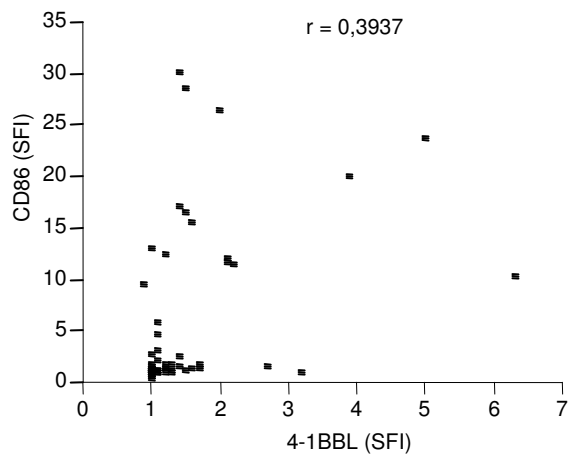
Wir untersuchten daher, ob zwischen der Expression von GITRL bzw. 4-1BBL und der Expression mit MHC Klasse I oder CD 86 ein Zusammenhang besteht. Hierbei wurde zunächst die Expression von GITRL und 4-1BBL mit der Expression von MHC Klasse I und CD86 verglichen.

Die folgenden Abbildungen 21 bis 24 verdeutlichen, dass keine Korrelation zwischen der Expression von GITRL und 4-1BBL und der Expression von MHC Klasse I und CD86 besteht.



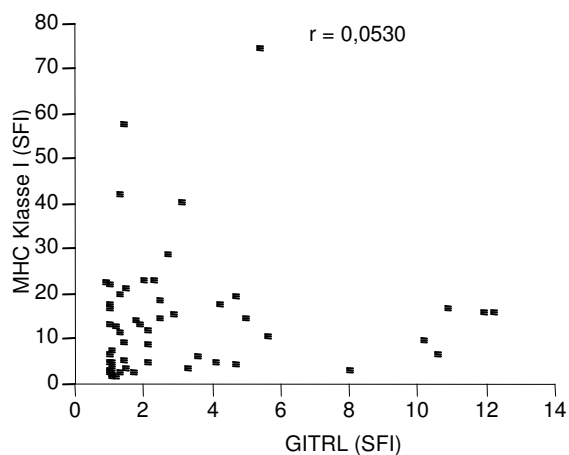
**Abbildung 21: Korrelation von GITRL und CD86**

Dargestellt sind die SFI-Werte für CD86 in Abhängigkeit der SFI-Werte für GITRL, sowie der Korrelationskoeffizient  $r$ .

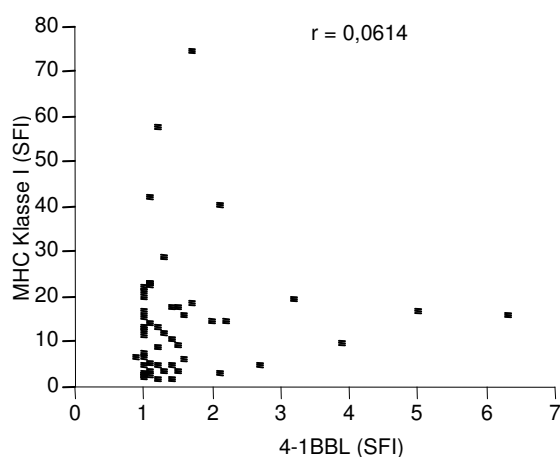


**Abbildung 22: Korrelation von 4-1BBL und CD86**

Dargestellt sind die SFI-Werte für CD86 in Abhängigkeit der SFI-Werte für 4-1BBL, sowie der Korrelationskoeffizient  $r$ .



**Abbildung 23: Korrelation der Expression von GITRL und MHC Klasse I**  
 Dargestellt sind die SFI-Werte für MHC Klasse I in Abhängigkeit der SFI-Werte für GITRL, sowie der Korrelationskoeffizient r.



**Abbildung 24: Korrelation der Expression von 4-1BBL und MHC Klasse I**  
 Dargestellt sind die SFI-Werte für MHC Klasse I in Abhängigkeit der SFI-Werte für 4-1BBL, sowie der Korrelationskoeffizient r.

Weiterhin wurde untersucht, ob GITRL- bzw. 4-1BBL-positive Fälle eine erhöhte Expression von MHC Klasse I oder CD86 im Vergleich mit GITRL- oder 4-1BBL-negativen Fällen aufweisen. Tabelle 14 zeigt die entsprechenden Mittelwerte der SFI von MHC Klasse I bzw. CD86 in Abhängigkeit der Expression von GITRL und 4-1BBL. Es zeigte sich für MHC Klasse I kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Expression. Es zeigt sich allerdings, dass Patienten mit Expression von 4-1BBL eine signifikant höhere Expression von CD86 aufweisen als Patienten, welche kein 4-1BBL exprimieren. Ein

ähnlicher Trend zeigt sich auch für die Expression von CD86 in Abhängigkeit der Expression von GITRL, hier wird jedoch keine statistische Signifikanz erreicht.

Tabelle 14 Expression von MHC Klasse I und CD 86

	GITRL-positive Fälle [m±s]	GITRL-negative Fälle [m±s]		4-1BBL-positive Fälle [m±s]	4-1BBL-negative Fälle [m±s]	
MHC Klasse I [SFI]	15,9 ± 14,0	13,0 ± 13,7	n.s.	18,1 ± 17,6	13,4 ± 11,9	n.s.
CD 86 [SFI]	7,8 ± 8,5	3,9 ± 7,0	p = 0,09	11,9 ± 9,7	3,8 ± 6,0	p = 0,0007

m±s, Mittelwert ± Standardabweichung; SFI, Spezifischer Fluoreszenzindex

## 4 Diskussion

Die Idee von einer Immunreaktion gegen Tumoren wurde schon von Paul Ehrlich Ende des neunzehnten Jahrhunderts formuliert. Er postulierte, dass im Menschen mit hoher Frequenz aberrante „Keime“ entstehen, welche vom Immunsystem in Schach gehalten würden (Ehrlich P, 1909). In der Folge wurde von verschiedenen Untersuchern gezeigt, dass Tumoren sich nach Transplantation in allogene Tiere zurückbildeten, was als Hinweis für die Existenz einer Immunreaktion gegen Tumoren gewertet wurde. Diese frühen Arbeiten fielen jedoch in Misskredit als sich zeigte, dass diese Tumorregression lediglich eine Folge der genetischen Verschiedenheit von Spender und Empfänger war. Erst Jahre später, als genetisch homogene Versuchstiere zur Verfügung standen wurde es möglich, Immunreaktionen in Tieren mit Tumoren umfassend zu untersuchen, und Ehrlichs Idee wurde von Burnett und Thomas zum Konzept der „Immune Surveillance“ weiterentwickelt. Darin wurde postuliert, dass das Immunsystem den Körper kontinuierlich auf die Anwesenheit abnormaler Zellen hin kontrolliert und diese eliminiert. Darüber hinaus wurde auch postuliert, dass eine wichtige Funktion des Immunsystems darin besteht, Tumorwachstum zu verzögern oder Regression etablierter Tumoren zu verursachen. Dem zellulären Arm des Immunsystems ist die Anwesenheit von Tumorzellen offensichtlich „bewusst“, was unter anderem durch die Tatsache belegt wird, wie leicht tumorinfiltrierende Lymphozyten mit Spezifität für Tumor-assoziierte Antigene aus einer Tumorprobe generiert werden können (Kawakami Y, 1992; Toplian SL, 1989). Insgesamt scheint also eine relativ „friedliche“ Koexistenz zwischen Tumor und einem untätigen Immunsystem vorzuliegen. Damit stellt sich die Frage, ob Tumorzellen aktive Strategien entwickeln, um einem Angriff des Immunsystems zu entgehen oder ob sie von diesem schlicht ignoriert werden. Mittlerweile werden eine Reihe von Faktoren diskutiert, welche die Interaktion von Tumor und Immunsystem beeinflussen und durch welche sich Tumorzellen mehr oder weniger „aktiv“ einer Kontrolle des Immunsystems entziehen („Immune Escape“). Diese sind in Tabelle 15 zusammengefasst.



Tabelle 15: Faktoren mit Einfluss auf die Interaktion von Tumor und Immunsystem

## **I Allgemeine Faktoren:**

### Immunsuppression durch

1. Kachexie
2. Veränderte T Zellrezeptor Signaltransduktion
3. Zirkulierende immunsuppressive Zytokine

### Systemische Toleranz durch

4. Klonale Erschöpfung
5. Replikative Alterung
6. Lösliches MHC
7. Epitop Mimikry

## **II Spezifische Faktoren**

### Inadäquate Immunogenität des Tumors durch

1. Mangelndes „Danger“ Signal
2. Unzureichende Antigenexpression
3. Mangelnde Expression kostimulatorischer Moleküle

### „Immune Escape“ Mechanismen

4. Abnormale Antigenprozessierung
5. Verlust oder Reduktion tumorassoziierter Antigene und/oder MHC
6. Lokale Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen und löslichem MHC
7. Lokales Epitop Mimikry
8. Veränderung der Tumor-Immunzell-Interaktion durch Expression und Freisetzung immunregulatorischer Oberflächenmoleküle

Aus den in der Tabelle aufgeführten Ergebnissen wird klar, dass die Interaktion von Tumorzellen mit Immuneffektorzellen durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren beeinflusst wird. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich dabei mit Punkt II 8, der Bedeutung der Expression immunregulatorischer Oberflächenmoleküle, und im speziellen Falle hier durch AML Zellen. Es versteht sich von selbst, dass neben den untersuchten und in dieser Arbeit beschriebenen

Molekülsystemen eine ganze Reihe weiterer immunregulatorischer Moleküle von Tumorzellen/AML Zellen exprimiert und ggf. auch freigesetzt werden, was die Interaktion von AML und Immunsystem und letztlich damit auch den klinischen Verlauf der Erkrankung beeinflusst. Ein entsprechender Effekt konnte bereits für zahlreiche Moleküle gezeigt werden. So berichteten Graf et al (Graf M, 2006), dass die Expression von CD11b (MAC-1) bei der AML mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Ebenso ist auch eine hohe Expression von Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor (UPA-R), einem Membranprotein, welches eine Rolle bei der Extravasation und Gewebsinvasion spielt, mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Graf M, 2005b). Für L-Selectin (CD62L) konnte bei der AML eine klare Assoziation mit einem ungünstigen zytogenetischen Risiko nachgewiesen werden (Graf M, 2003). Auch für Zytokinrezeptoren wie hG-CSF-R (CD114), hGM-CSF-R (CD116), hSCF-R (CD117) und hIL-3-R (CD123) wurde ein entsprechender Zusammenhang mit klinischen Variablen gezeigt (Graf M, 2004). Okabe-Kado et al und Wakimoto et al berichteten ähnliche Ergebnisse für differenzierungsinhibierende Faktoren wie nm23-H1 und nm23-H2 (Okabe-Kado J, 1998; Wakimoto N, 1998). Brouwer et al untersuchten an einem größeren Kollektiv von AML-Patienten die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und CD40 sowie von Adhäsionsmolekülen wie unter anderen CD11a-c, CD58 und CD62L und deren Bedeutung für die Prognose und fanden ebenfalls signifikante Unterschiede bezüglich der Prognose, insbesondere für CD40 und CD11a (Brouwer RE, 2001). Whiteway et al zeigten, dass etwa 50 % aller AML eine Expression von CD86 auf den leukämischen Blasten aufweisen, sowie dass Patienten, welche weder CD80 noch CD86 auf den leukämischen Blasten exprimierten, eine signifikant kürzere Remissionsdauer aufwiesen, als die Patienten, welche mindestens eines der kostimulatorischen Moleküle exprimierten (Whiteway A, 2003).

Von der AG Salih konnte wie in der Einleitung beschrieben gezeigt werden, dass die Expression of 4-1BBL und GITRL nach Bindung an deren respektive Liganden auf NK Zellen zu einer Reduktion der NK Zell-Vermittelten Immunreaktion gegen AML Zellen führt. In dieser Arbeit wurde nun untersucht ob die Expression der beiden Zielmoleküle mit speziellen Subgruppen und

bekannten Prognosefaktoren der AML, aber auch mit klinischen Parametern wie z.B. dem Überleben der Patienten korreliert. Dafür wurden Proben von insgesamt 55 Patienten mit AML untersucht. Jedoch standen nicht alle analysierten Parameter bei jedem Patienten zur Verfügung, was insbesondere für klinische Variablen gilt.

#### **4.1 Expression der Zielmoleküle innerhalb verschiedener FAB-Typen**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im untersuchten Patientenkollektiv sowohl die Expression von GITRL als auch von 4-1BBL mit einer myelomonozytären Differenzierung korreliert. Es findet sich sowohl eine verstärkte Expression der Liganden als auch eine signifikant höhere Anzahl an GITRL- bzw. 4-1BBL-positiven Fällen in der Gruppe der myelomonozytären Leukämien FAB M4 und M5 im Vergleich mit den anderen FAB-Typen. Ähnliche Ergebnisse zeigen auch andere Arbeiten, welche die Expression anderer immunregulatorischer Moleküle auf AML-Blasten untersuchten. So konnten Brouwer et al zeigen, dass unter anderem CD11a und CD86 verstärkt bei den FAB-Typen M4 und M5 exprimiert werden. Auch Whiteway et al zeigten eine verstärkte Expression von CD86 bei monozytären Leukämien. Im Gegensatz hierzu fanden Graf et al keine verstärkte CD86-Expression bei monozytären Leukämien. Die Ursache für diese teils widersprüchlichen Ergebnisse bzgl. der Expression von CD86 bleibt unklar, mag aber durch unterschiedliche Arbeits- und Untersuchungstechniken bzw. unterschiedliche verwendete Reagenzien bedingt sein.

Unsere Beobachtung erscheint im Hinblick auf das bekannte Expressionsmuster der beiden Zielmoleküle bei gesunden hämatopoetischen Zellen plausibel. Sowohl GITRL als auch 4-1BBL werden von APC exprimiert, wozu die Monozyten gehören, und eine wichtige physiologische Rolle der beiden Moleküle für die Modulation von Effektorfunktion von APC wurde bereits beschrieben (Watts TH, 2005). Im Licht der Ergebnisse von Hentschel et al, welche keine erhöhten Serumspiegel von s4-1BBL bei Patienten mit

monozytären Leukämien im Vergleich mit den anderen FAB-Typen fanden weisen unsere Ergebnisse daraufhin, dass Expression und Freisetzung zumindest von 4-1BBL nicht notwendigerweise korrelieren müssen. Zudem legen unsere Ergebnisse nahe, dass das von Hentschel et al nachgewiesene lösliche 4-1BBL nicht zwingend wie postuliert durch Shedding von der Zelloberfläche der malignen Zellen, sondern evtl. durch andere Mechanismen wie z.B. alternatives Splicing freigesetzt worden sein könnte.

#### **4.2 Expression der Zielmoleküle bei primärer versus sekundärer AML**

Aufgrund der potentiellen pathogenetischen Unterschiede bei der Entstehung von primären und sekundären Leukämien/AML war es von Interesse, eine Unterscheidung der erarbeiteten Ergebnisse bzgl. dieses Parameters vorzunehmen. Dies gilt umso mehr, da Hentschel et al bzgl. der Expression von löslichem 4-1BBL einen Trend zu erhöhten Spiegeln in Patienten mit pAML verglichen mit sAML beobachten konnten, welcher jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Hentschel N, 2006). In unserer Untersuchung ist bedauerlicherweise jedoch die Fallzahl in der Gruppe der sekundären AML mit nur vier von 55 untersuchten Patienten insgesamt zu gering, um eine Aussage über eine unterschiedliche Expression von GITRL und 4-1BBL treffen zu können. Es zeigen sich zwar statistisch signifikant mehr Patienten mit GITRL-Positivität in der Gruppe mit primärer AML, aufgrund der geringen Fallzahl muss diese Beobachtung jedoch eher als ein zufälliges Ergebnis als ein tatsächlich relevanter Unterschied gewertet werden.

### **4.3 Expression der Zielmoleküle bei verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen**

Es existiert eine Vielzahl verschiedener Einteilungen zur Risikostratifizierung der AML nach der Zytogenetik. Eine Übersicht hierzu ist in Tabelle 4 in Kap. 1.1.6.2 dargestellt. Übereinstimmend werden jedoch in den verschiedenen Einteilungen insbesondere die CBF-Leukämien mit inv(16), t(8;21) und die AML FAB M3 mit t(15;17) als prognostisch günstig angesehen, Veränderungen an Chromosom 3, 5 und 7, 11q23-Aberrationen sowie ein komplexer Karyotyp gelten als ungünstig. Da ein Großteil der Patienten im Rahmen von Behandlungsprotokollen der AMLCG therapiert wurde ist der zytogenetischen Risikostratifizierung die Einteilung dieser Studiengruppe zugrunde gelegt.

Der Zytogenetik kommt bei der Beurteilung der Prognose von AML Patienten eine zentrale Bedeutung zu. Patienten mit günstiger Zytogenetik erreichen Remissionsraten von bis zu 90 % und 5-Jahres-Überlebensraten von über 70 %, während Patienten mit ungünstigem Karyotyp Remissionsraten von nur etwa 55 % und 5-Jahres-Überlebensraten von unter 20 % aufweisen. Die genauen Mechanismen der Therapieresistenz bei ungünstigem Karyotyp sind nicht im Detail bekannt. Postuliert wird unter anderem eine Kombination von zellspezifischen Faktoren in Bezug auf Chemotherapiesensitivität wie die vermehrte Aktivität von chemotherapieresistenz-vermittelnden Genen mit möglicherweise verminderter Immunogenität der Leukämiezellen. In diesem Zusammenhang ist es von besonderem Interesse dass für die Expression anderer immunmodulatorischer Moleküle wie den G-CSF Rezeptor oder CD62L eine Assoziation mit dem zytogenetischen Risiko nachgewiesen werden konnte (Graf M, 2004, Graf M, 2003).

Entsprechend untersuchten wir, ob die Expression von 4-1BBL und GITRL, welche die Immunogenität von Tumorzellen/AML Zellen nachhaltig beeinflusst (Baltz KM, 2007a; Baltz KM, 2007b; Salih HR, 2000; Kloss M, 2007; Baessler T, 2007a; Baessler T, 2007b) mit den zytogenetischen Befunden der untersuchten Patienten korreliert. Für insgesamt 44 Patienten standen

zytogenetische Befunde zur Verfügung, davon wiesen 6 Patienten einen günstigen, 27 Patienten einen intermediären und 11 Patienten einen prognostisch ungünstigen Karyotyp auf. Interessanterweise wies die Gruppe mit schlechter Prognose einen Anteil von mehr als 50 % monozytären AML auf, welche wie oben beschrieben signifikant mit einer erhöhten Expression der Zielmoleküle assoziiert sind. Unsere Analyse ergab insbesondere bezüglich GITRL einen Trend zur vermehrten Expression bei Patienten mit ungünstigem Karyotyp im Vergleich mit intermediärem oder günstigem Karyotyp. Eine statistische Signifikanz der Unterschiede zeigte sich, wenn die Patienten mit günstigem und intermediärem Karyotyp in einer Gruppe zusammengefasst wurden. So ergab sich eine signifikant höhere Expression von GITRL in der ungünstigen Prognosegruppe, während sich bei 4-1BBL weiterhin nur ein grenzwertig signifikanter Trend ( $p=0,052$ ) zeigte. In diesem Zusammenhang ist es interessant dass höhere Serumspiegel an löslichem 4-1BBL bei AML Patienten mit ungünstiger Zytogenetik als bei intermediärem Risiko vorliegen, wobei jedoch in dieser Arbeit keine statistische Signifikanz erreicht wurde (Hentschel N, 2006). Die Interpretation dieser Ergebnisse ist schwierig, jedoch wäre vorstellbar, dass die Menge des auf der Zelloberfläche detektierbaren 4-1BBL individuell unterschiedlich (z.B. gemäß der Konzentration/Art der im Serum des jeweiligen Patienten vorliegenden Metalloproteasen) durch Shedding reduziert wird, was so die Wertigkeit des Oberflächenexpressionsniveaus, aber auch der löslichen Form als Marker beeinflussen würde. Es soll an dieser Stelle auch darauf hingewiesen werden, dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ergibt, wenn anstelle des SFI Wertes die Anzahl der positiven Proben aufgetragen wird, was die Bedeutung dieser Auswertung weiter relativiert.

#### **4.4 Expression und Therapieansprechen**

Eine weitere wichtige Frage ist, ob die Expression der immunmodulatorischen Moleküle GITRL oder 4-1BBL auf AML Zellen mit Unterschieden im Ansprechen auf die Induktionstherapie assoziiert ist. Während diesbezüglich für

die Zielmoleküle bisher keine Daten vorliegen konnte gezeigt werden, dass die Expression anderer kostimulatorischer Moleküle wie z.B. erhöhte Expression von CD86 mit einem schlechten Therapieansprechen der AML assoziiert ist (Graf M, 2005a). In unserem Patientenkollektiv zeigte sich ebenfalls ein Trend zu vermehrter Expression von CD86 in der Gruppe der Therapieversager ( $p = 0,195$ , Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurde von Whiteway et al gezeigt, dass Patienten, welche weder CD80 noch CD86 auf den leukämischen Blasten exprimierten, eine signifikant kürzere Remissionsdauer aufwiesen als die Patienten, welche mindestens eines der kostimulatorischen Moleküle exprimierten (Whiteway A, 2003). Diese Unterschiede sind am ehesten unterschiedlichen Untersuchungstechniken oder Reagenzien zuzuschreiben, mögen jedoch auch durch unterschiedliche Patientenpopulationen bedingt sein. Die Untersuchung des Stellenwertes der Expression von GITRL und 4-1BBL in den 27 Patienten, welche eine Induktionstherapie erhalten hatten und für welche Daten bzgl. des Therapieansprechens vorlagen ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression der Zielmoleküle und dem Ansprechen auf die Induktionstherapie. Man könnte, obwohl die auswertbare Patientenpopulation in unserer Studie wohl zu klein ist um weitreichende Rückschlüsse zu ziehen, aus diesen Daten schließen, dass das Ansprechen auf Therapie in erster Linie von Chemotherapieresistenzmechanismen der malignen Zellen, wie zum Beispiel der Überexpression von Proteinen, welche Zytostatika aus der Zelle transportieren können, abhängt und allenfalls in geringem Ausmaß von immunologischen Faktoren und der Interaktion von NK und anderen Immunzellen mit den malignen Zellen selbst beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang muss jedoch diskutiert werden, dass Houtenbos et al zeigen konnten, dass durch die Zugabe von 4-1BBL zu Kokulturen von AML-DCs mit Lymphozyten eine verstärkte Proliferation von CD8+ T-Zellen induziert wird. Entsprechend wird das zytolytische Potential von T-Zellen in Zytotoxizitäts-Assays mit AML-Blasten durch Zugabe von 4-1BBL verstärkt (Houtenbos I, 2007). Zudem sind in diesem Zusammenhang die bereits eingangs erwähnten Daten bzgl. der Bedeutung von NK Zellen bei der Immunüberwachung von malignen hämatopoetischen Erkrankungen zu nennen. Die z.B. nach

haploidenter Stammzelltransplantation erfolgende NK-Zell-Aktivierung bewirkt einen erhöhten Schutz vor Rezidiven der Leukämie und verbessert das „Engraftment“ des Transplantates, ohne GvHD zu verursachen (Ruggieri L, 2002). Auch im autologen Kontext liegen zahlreiche Hinweise auf eine bedeutsame Rolle des Immunsystems bei Leukämien vor: So ist die Anzahl und Aktivität von NK Zellen im Blut von Leukämiepatienten im Vergleich zu gesunden Personen reduziert und NK Zell Aktivität mit dem Überleben von Leukämiepatienten assoziiert (Lowdell MW, 2002; Tajima F, 1996; Pierson BA, 1996).

Es ist jedoch vorstellbar, dass die von uns untersuchten Zielmoleküle in der Interaktion von Immunsystem und AML entweder per se nicht von übergeordneter Relevanz sind oder deren Wirkung durch die Expression anderer, z.B. aktivierender Moleküle neutralisiert werden kann. Die generelle Bedeutung immunregulatorischer Proteine in der Pathogenese von malignen hämatopoetischen Erkrankungen sowie auch die speziell der von uns untersuchten Zielmoleküle ist jedoch in jedem Falle hinreichend belegt (Lanier L, 2005, Baltz KM, 2007a; Baltz KM, 2007b; Kloss M, 2007; Baessler T, 2007a; Baessler T, 2007b).

#### **4.5 Expression und Überleben**

Für verschiedene immunregulatorische Moleküle konnte in vorangehenden Arbeiten ein Zusammenhang der Expression auf der Zelloberfläche maligner Zellen oder auch der Serumspiegel der löslichen Formen der Moleküle mit der Prognose nachgewiesen werden. Bezüglich der Rolle verschiedener Moleküle bei Leukämien konnten z.B. Albitar et al nachweisen, dass Patienten mit AML und MDS im Vergleich mit gesunden Probanden deutlich höhere Spiegel an löslichem HLA Klasse I im Serum aufweisen. Ein erhöhter Spiegel von HLA Klasse I war dabei mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben und ereignisfreien Überleben assoziiert (Albitar M, 2007). Brouwer et al untersuchten an einem größeren Kollektiv von AML-Patienten die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und CD40 sowie von



Adhäsionsmolekülen wie unter anderen CD11a-c, CD58 und CD62L und deren Bedeutung für die Prognose und fanden ebenfalls signifikante Unterschiede bezüglich der Expression, insbesondere für CD40 und CD11a (Brouwer RE, 2001). Erhöhte Spiegel von sCD86 bei Patienten mit AML sind weiterhin mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Hock BD, 2003). Whiteway et al zeigten, dass etwa 50 % aller AML eine Expression von CD86 auf den leukämischen Blasten aufweisen, sowie dass Patienten, welche weder CD80 noch CD86 auf den leukämischen Blasten exprimierten, eine signifikant kürzere Remissionsdauer aufwiesen als die Patienten, welche mindestens eines der kostimulatorischen Moleküle exprimierten (Whiteway A, 2003). Wir fanden jedoch im Gegensatz dazu in unserer Patientenpopulation von 34 auswertbaren Patienten keine Korrelation von CD86 oder MHC Klasse I mit dem Überleben (Daten nicht gezeigt).

Bezüglich der Assoziation der Oberflächenexpression der von uns untersuchten Zielmoleküle mit dem Überleben von AML Patienten ist bisher nichts bekannt. Hentschel et al konnten für löslichen 4-1BBL zeigen, dass niedrigere Serumspiegel mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines progressionsfreien Überlebens von Patienten mit AML assoziiert sind. Diese Ergebnisse wiesen jedoch keine statistische Signifikanz auf. In dieser Arbeit wurde vermutet, dass erhöhte Serumspiegel von 4-1BBL auf vermehrtem Shedding von der Zelloberfläche beruhen, und durch die dadurch verminderte Expression auf der Zelloberfläche sowohl eine veränderte Immunogenität vorliegt als auch vermindert Reverse signaling über 4-1BBL in die ligandenexprimierenden Zellen erfolgt (Hentschel N, 2006). Zudem wurde gezeigt, dass die Spiegel an löslichem 4-1BBL mit der Krankheitsprogression bei Patienten mit MDS korrelieren (Salih HR, 2004).

Wir gingen daher davon aus, dass auch die Expression von GITRL und 4-1BBL auf AML Blasten von Patienten möglicherweise mit der Prognose in Bezug auf das Überleben assoziiert sein könnte. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch keine Korrelation zwischen Expression von GITRL oder 4-1BBL und Gesamtüberleben, weder für die einzelnen Liganden noch für die verschiedenen Kombinationen (GITRL positiv/4-1BBL positiv, GITRL positiv/4-1BBL negativ oder vice versa; Daten nicht gezeigt). Nebenbefundlich zeigte

sich auch keine Korrelation der Expression von MHC Klasse I mit dem Überleben. Diese Ergebnisse erscheinen überraschend, da ein signifikanter Unterschied der Expression von GITRL und 4-1BBL bei Patienten mit ungünstiger Zytogenetik im Vergleich mit intermediärer oder günstiger Zytogenetik gezeigt werden konnte und ungünstige Zytogenetik per se einen der stärksten Risikofaktoren bei der AML darstellt. Es wäre somit zu erwarten gewesen, dass sich eine signifikant erhöhte Expression von GITRL oder 4-1BBL bei Patienten mit ungünstiger Zytogenetik auch in ein schlechteres Gesamtüberleben übersetzen lässt. Weshalb das in dieser Arbeit nicht der Fall ist kann verschiedene Ursachen haben. Die Anzahl der Patienten, zu denen Daten bezüglich des Überlebens vorliegen ist relativ niedrig, so dass schon eine gering unterschiedliche Verteilung sonstiger Risikofaktoren das Ergebnis diesbezüglich stark beeinflussen kann. Um kleine Unterschiede herauszuarbeiten wären erheblich größere Fallzahlen notwendig, als hier untersucht wurden. Betrachtet man die bisherigen Ergebnisse mit nahezu identischem Überleben in allen Gruppen unabhängig von der Expression von GITRL und 4-1BBL wären Fallzahlen von mehreren hundert Patienten in jeder Gruppe notwendig. Eine weitere theoretisch denkbare Möglichkeit wäre, dass die Expression von GITRL/4-1BBL mit einer stärkeren Immunogenität der AML Zellen für adaptive Immunantworten durch T Zellen einhergeht, bei welchen die Stimulation der entsprechenden Rezeptoren im Gegensatz zu NK Zellen aktivierende Signale vermitteln würde. Als Folge würde der prognostisch ungünstige Faktor der Zytogenetik in unserem Patientenkollektiv durch die in dieser Gruppe vermehrte Expression der Zielmoleküle aufgehoben werden. Diese Überlegungen sind jedoch rein spekulativ, da bisher keinerlei Daten bzgl. eines Vergleichs des Stellenwertes der T Zell-vermittelten verglichen mit der NK Zell-vermittelten Immunität gegen AML Zellen vorliegen. Somit kann die beschriebene Beobachtung in der vorliegenden Arbeit letztlich nicht erklärt werden.

#### **4.6 Korrelation von GITRL und 4-1BBL mit der Expression von Major-Histocompatibility-Complex Class I (MHC Klasse I) und CD 86**

Abschließend wurde untersucht, ob GITRL- bzw. 4-1BBL-positive Fälle eine erhöhte Expression von MHC Klasse I oder CD86 im Vergleich mit GITRL- oder 4-1BBL-negativen Fällen aufweisen. Es zeigte sich für MHC Klasse I keine Assoziation mit der Expression der Zielmoleküle. In vorausgehenden Arbeiten wurde dagegen mehrfach eine prognostische Relevanz der Expression von MHC Klasse I und CD86 sowohl in zellständiger als auch in löslicher Form beschrieben. Es wurde berichtet, dass erhöhte Spiegel von löslichem CD86 bei Patienten mit AML mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Hock BD, 2003). Auch für lösliches MHC Klasse I zeigte sich eine Korrelation zwischen Serumspiegel und Wahrscheinlichkeit des Erreichens einer CR, Dauer der CR und Gesamtüberleben (Albitar M, 2007). Brouwer et al untersuchten an einem größeren Kollektiv von AML-Patienten die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und CD40 sowie von Adhäsionsmolekülen wie unter anderen CD11a-c, CD58 und CD62L und deren Bedeutung für die Prognose und fanden ebenfalls signifikante Unterschiede bezüglich der Prognose, insbesondere für CD40 und CD11a. Whiteway et al zeigten, dass die Blasten von etwa 50 % aller AML Patienten CD86 exprimieren sowie dass Patienten, welche weder CD80 noch CD86 auf den leukämischen Blasten exprimierten, eine signifikant kürzere Remissionsdauer aufwiesen als die Patienten, welche mindestens eines der kostimulatorischen Moleküle exprimierten (Whiteway A, 2003). In unserer Untersuchung fanden wir, wie unter Kapitel 3.5 beschrieben, keine Korrelation von CD86 oder MHC Klasse I mit dem Überleben. Dennoch hatten uns die oben beschriebenen Ergebnisse von Whiteway et al bzgl. einer differentiellen Wertigkeit der kombinierten versus der Einzelbestimmung von CD80 und CD86 sowie die herausragende Rolle von MHC Klasse I bei der Inhibition von NK Zellfunktionen bewogen, eine potentielle Korrelation von CD86 mit den von uns analysierten Zielmolekülen zu untersuchen. Hinzu kommt, dass Re und Mitarbeiter berichteten, dass CD86 auf ca. 50 % aller AMLs exprimiert wird und eine monozytisch-dendritische

Differenzierung anzeigt (Re F, 2002). Dagegen beschrieben Graf et al eine Positivität von CD86 bei ca. 65 % der untersuchten Fälle von AML mit einer heterogenen Verteilung innerhalb der FAB-Typen. Unser Ergebnis, dass Patienten mit Expression von 4-1BBL und GITRL eine höhere Expression von CD86 aufweisen als Patienten, welche kein 4-1BBL/GITRL exprimieren ist in Anbetracht der Assoziation der Zielmoleküle mit monozytärer Differenzierung nicht überraschend. Während die Höhe der Expression der jeweiligen Liganden nicht mit der Höhe der Expression von CD86 oder GITRL korrelierte, so fanden wir jedoch, dass sowohl GITRL-positive als auch 4-1BBL positive Proben eine höhere Expression von CD86 zeigten als GITRL- bzw. 4-1BBL-negative Proben. Der Unterschied war für GITRL jedoch nicht signifikant ( $p=0,09$ ), für 4-1BBL allerdings hochsignifikant ( $p=0,0007$ ). Dieses Ergebnis erscheint in Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei CD86 ebenso wie bei GITRL und 4-1BBL um kostimulatorische Moleküle handelt, welche entsprechend auch bei nicht-malignen Zellen der Hämatopoese vom selben Zelltyp, z.B. Monozyten gemeinsam exprimiert werden plausibel.

Damit bleibt zusammenfassend festzustellen, dass die Expression von GITRL und 4-1BBL zwar eine signifikante Korrelation mit AML Fällen mit monozytärerer Differenzierung aufweisen und die Expression der Zielmoleküle, insbesondere von GITRL mit einem ungünstigen zytogenetischen Risiko assoziiert ist. Jedoch ergab sich im Gegensatz zu den mit anderen immunregulatorischen Molekülen beschriebenen Ergebnissen keine Korrelation mit klinisch relevanten Parametern wie Therapieansprechen und Überleben. Damit muss geschlossen werden, dass die Untersuchung der Expression von GITRL und 4-1BBL auf AML Zellen zwar von bedeutendem physiologischem Interesse ist, jedoch im klinischen Alltag vermutlich keinen Stellenwert besitzt.

## 5 Zusammenfassung

Bei der Abwehr von Tumorzellen allgemein und vor allem auch bei der Immunüberwachung der AML spielen NK Zellen eine entscheidende Rolle. Die Reaktivität der NK Zellen wird durch eine Balance aus aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren reguliert. In Vorarbeiten konnte von der AG Salih gezeigt werden, dass AML Zellen die TNF Familienmitglieder 4-1BBL und GITRL exprimieren und dadurch die Reaktivität von NK Zellen, welche 4-1BB und GITR exprimieren, vermindern. In dieser Arbeit wurden 4-1BBL und GITRL im Hinblick auf ihre Expression bei der AML, ihre Korrelation mit bekannten prognostischen Faktoren sowie ihre Bedeutung in Bezug auf das Therapieansprechen und Überleben untersucht. Diese Fragestellung ergab sich aus bisher publizierten Arbeiten, welche einen Stellenwert anderer immunregulatorischer Moleküle wie z.B. MHC Klasse I oder CD86 als prognostische Marker bei der AML belegen. Wir konnten zeigen, dass sowohl GITRL als auch 4-1BBL auf Blasten von Patienten mit monozytären Leukämien (AML FAB M4 und M5) signifikant vermehrt exprimiert werden als bei anderen FAB Typen. Zudem zeigte sich eine deutliche Korrelation der Expression der beiden Zielmoleküle mit einem prognostisch ungünstigen Karyotyp. Dies übersetzte sich jedoch nicht in eine Korrelation mit klinisch relevanten Faktoren wie Therapieansprechen und Überleben. Darüber hinaus untersuchten wir die Korrelation der Zielmolekülexpression mit der Expression von CD86 oder MHC Klasse I, welche einen prognostischen Stellenwert besitzen. Es zeigte sich, dass Patienten mit Expression von 4-1BBL eine signifikant höhere Expression von CD86 aufweisen als Patienten, welche kein 4-1BBL exprimieren. Ein ähnlicher Trend zeigt sich auch für die Expression von CD86 in Abhängigkeit der Expression von GITRL, jedoch nicht bezüglich der Expression von MHC Klasse I. Während die mangelnde Korrelation der Zielmoleküle mit Therapieansprechen und Überleben an der zu kleinen Fallzahl der untersuchten Patienten liegen mag legen unsere Ergebnisse dennoch nahe, dass die Bestimmung von 4-1BBL und GITRL auf AML Zellen keinen klinischen Stellenwert besitzt. Möglicherweise wird die Funktion dieser NK Zell-inhibitorischen Moleküle durch weitere aktivierende Liganden oder durch einen

differentiellen Effekt auf andere Immuneffektorzellen wie z.B. T Zellen kompensiert.

## 6 Literaturverzeichnis

Albitar M, Johnson M, Do KA, Day A, Jilani I, Pierce S, Estey E, Kantarjian H, Keating M, Verstovsek S, O'Brien S, Giles FJ: Levels of soluble HLA-I and beta2M in patients with acute myeloid leukemia and advanced myelodysplastic syndrome: association with clinical behavior and outcome of induction therapy. *Leukemia*. 2007; 21(3): 480-8.

Archimbaud E, Jehn U, Thomas X, De Cataldo F, Fillet G, Belhabri A, Peaud PY, Martin C, Amadori S, Willemze R: Multicenter randomized phase II trial of idarubicin vs mitoxantrone, combined with VP-16 and cytarabine for induction/consolidation therapy, followed by a feasibility study of autologous peripheral blood stem cell transplantation in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1999;13(6): 843-9.

Auerbach AD: Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes. *Leukemia*. 1992; 6 Suppl. 1: 1-4.

Austin H, Delzell E, Cole P: Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. *Amer J Epidem* 1988, 127: 419-439.

Baessler T, Krusch M, Baltz KM, Kloss M, Kanz L, Salih HR: Glucocorticoid-induced TNF related protein ligand is expressed on primary acute myeloid leukemia cells, modulates AML cell cytokine production and impairs NK cell mediated immune surveillance by inhibiting cytotoxicity and IFN-gamma production. *Onkologie*. 2007; 30 (suppl.3): 109.

Baessler T, Krusch M, Baltz KM, Kanz L, Salih HR: CD137/4-1BB ligan stimulates primary AML cell cytokine production via bidirectional signalling and induces cytotoxicity and IFN-gamma production of CD137-expressing NK cells in humans. *Onkologie*. 2007; 30 (suppl.3): 181.

Baltz KM, Krusch M, Bringmann A, Brossart P, Mayer F, Kloss M, Baessler T, Kumbier I, Peterfi A, Kupka S, Kroeber S, Menzel D, Radsak MP, Rammensee HG, Salih HR: Cancer immunoediting by GITR (glucocorticoid induced TNF-related protein) ligand in humans: NK cel/tumor cell interactions. *FASEB J*. 2007; 21(10): 2442-54.

Baltz KM, Krusch M, Baessler T, Bringmann A, Kanz L, Brossart P, Salih HR: Neutralization of tumor-derived soluble glucocorticoid-induced TNF related protein ligand detectable in patient sera increases anti-tumor reactivity of NK cells. *Onkologie*. 2007; 30 (suppl.3): 56.

Begemann M (Hrsg.): Akute Leukämien. In: *Praktische Hämatologie*, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart-New York, 11. Aufl.: 183-218.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976; 33(4): 451-8.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985;103(4): 620-5.

Böyum A: Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens.* 1984; 4: 269-274.

Borg AG, Burgess R, Green LM, Scheper RJ, Yin JA: Overexpression of lung-resistance protein and increased P-glycoprotein function in acute myeloid leukaemia cells predict a poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *Br J Haematol.* 1998;103(4):1083-91.

Brouwer RE, Hoefnagel J, Borger van Der Burg B, Jedema I, Zwinderman KH, Starrenburg IC, Kluin-Nelemans HC, Barge RM, Willemze R, Falkenburg JH: Expression of co-stimulatory and adhesion molecules and chemokine or apoptosis receptors on acute myeloid leukaemia: high CD40 and CD11a expression correlates with poor prognosis. *Br J Haematol.* 2001; 115(2): 298-308.

Buchner T, Berdel WE, Schoch C, Haferlach T, Serve HL, Kienast J, Schnittger S, Kern W, Tchinda J, Reichle A, Lengfelder E, Staib P, Ludwig WD, Aul C, Eimermacher H, Balleisen L, Sauerland MC, Heinecke A, Wormann B, Hiddemann W: Double induction containing either two courses or one course of high-dose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by either autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2006; 24(16): 2480-9.

Büchner T: Akute myeloische Leukämie (AML) in Hämatologie-Onkologie; Hrsg: von Ostendorf PC, Seeber S; Urban und Schwarzenberg, München, 1997: 463- 474.

Buske B, Spiekermann K, Hiddemann W, et al.: Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie. In: Hiddemann W, Huber H, Bartram CR, Hrsg. *Die Onkologie*, 2. Aufl. Berlin–Heidelberg–New York: Springer, 2007: in press.

Cannistra SA, Groshek P, Griffin JD: Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances the cytotoxic effects of cytosine arabinoside in the myeloid blast crisis phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 1989; 3: 328-334.

Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD, Brunning R, Gale RP, Grever MR, Keating MJ, et al.: Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 1990; 8(5): 813-9.



Dekker AW, Elderson A, Punt K, Sixma JJ: Meningeal involvement in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer*. 1985; 56: 2078-2082.

Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Frohling S, Dohner H: Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106(12): 3740-6.

Ehrlich P: *Ned Tijdschr Geneeskd*. 1909.

Esparza EM and Arch RH: Glucocorticoid-induced TNF receptor functions as a costimulatory receptor that promotes survival in early phases of T cell activation. *J Immunol*. 2005; 174: 7869-7874.

Esparza EM and Arch RH: Glucocorticoid-induced TNF receptor, a costimulatory receptor on naive and activated T cells, uses TNF receptor-associated factor 2 in a novel fashion as an inhibitor of NF-kappa B activation. *J Immunol*. 2005; 174: 7875-7882.

Esparza EM, Lindsten T, Stockhausen JM, Arch RH: Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR)-associated Factor 5 Is a Critical Intermediate of Costimulatory Signaling Pathways Triggered by Glucocorticoid-induced TNFR in T Cells. *J Biol Chem*. 2006; 281: 8559-8564

Evans DI, Steward JK. Down's syndrome and leukaemia. *Lancet*. 1972; 2: 1322.

Farag SS and Caligiuri MA.: Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*. 2006; 20: 123-137.

Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, McCormick F, Marshall CJ: Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 1629-1633.

Fenaux P, Le Deley MC, Castaigne S, Archimbaud E, Chomienne C, Link H, Guerci A, Duarte M, Daniel MT, Bowen D, et al.: Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a multicenter randomized trial. European APL 91 Group. *Blood*. 1993; 82(11): 3241-9.

Ferrara F, Mirto S: Serum LDH value as a predictor of clinical outcome in acute myelogenous leukaemia of the elderly. *Br J Haematol*. 1996; 92: 627-31.

Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A: Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1967; 58: 1468-1471.

Fialkow PJ, Singer JW, Adamson JW, Vaidya K, Dow LW, Ochs J, Moohr JW: Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin. *Blood*. 1981; 57: 1068-1073.

Fialkow PJ, Singer JW, Raskind WH, Adamson JW, Jacobson RJ, Bernstein ID, Dow LW, Najfeld V, Veith R: Clonal development, stem cell differentiation and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1987; 317: 1468-1473.

Fliedner TM, Körbling M, Calvow W, Bruch C, Herbst E: Cryopreservation of blood mononuclear leucocytes and stem cells suspended in a large fluid volume. *Blood*, 1977; 35: 195-202.

Freedman MH: Diamond-Blackfan anaemia. *Bailliere's Best Pract Res Clin Haematol*. 2000; 13: 391-409.

Gajewski JL, Ho WG, Nimer SD, Hirji KF, Gekelman L, Jacobs AD, Champlin RE: Efficacy of intensive chemotherapy for acute myelogenous leukemia associated with a preleukemic syndrome. *J Clin Oncol*. 1989; 7(11): 1637-45.

Gondo H, Harada M, Miyamoto T, Takenaka K, Tanimoto K, Mizuno S, Fujisaki T, Nagafuji K, Hayashi S, Eto T, Taniguchi S, Akashi K, Harada N, Yamasaki K, Shibuya T, Matsuishi E, Ohno Y, Makino S, Takamatsu Y, Murakawa M, Teshima T, Hirota Y, Okamura T, Kinukawa N, Niho Y, et al.: Autologous peripheral blood stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 1997 Nov; 20(10): 821-6.

Graf M, Reif S, Hecht K, Pelka-Fleischer R, Pfister K, Nuessler V, Schmetzer H: Low L-selectin (CD62L) expression in acute myeloid leukemia correlates with a bad cytogenetic risk. *Eur J Haematol*. 2003. 71(5): 366-76.

Graf M, Hecht K, Reif S, Pelka-Fleischer R, Pfister K, Schmetzer H: Expression and prognostic value of hemopoietic cytokine receptors in acute myeloid leukemia (AML): implications for future therapeutical strategies. *Eur J Haematol*. 2004. 72(2): 89-106.

Graf M, Reif S, Hecht K, Pelka-Fleischer R, Kroell T, Pfister K, Schmetzer H: High expression of costimulatory molecules correlates with low relapse-free survival probability in acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol*. 2005 a; 84(5): 287-97.

Graf M, Reif S, Hecht K, Pelka-Fleischer R, Pfister K, Schmetzer H: High expression of urokinase plasminogen activator receptor (UPA-R) in acute myeloid leukemia (AML) is associated with worse prognosis. *Am J Hematol*. 2005 b. 79(1): 26-35.

Graf M, Reif S, Kroll T, Hecht K, Nuessler V, Schmetzer H: Expression of MAC-1 (CD11b) in acute myeloid leukemia (AML) is associated with an unfavorable prognosis. *Am J Hematol*. 2006. 81(4): 227-35.

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

Gurney AL, Marsters SA, Huang RM, Pitti RM, Mark DT, Baldwin DT, Gray AM, Dowd AD, Brush AD, Heldens AD, Schow AD, Goddard AD, Wood WI, Baker KP, Godowski PJ, Ashkenazi A: Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Curr Biol.* 1999; 9: 215-218

Hansen OP, Pedersen-Bjergaard J, Ellegaard J, Brincker H, Boesen AM, Christensen BE, Drivsholm A, Hippe E, Jans H, Jensen KB, et al.: Aclarubicin plus cytosine arabinoside versus daunorubicin plus cytosine arabinoside in previously untreated patients with acute myeloid leukemia: a Danish national phase III trial. The Danish Society of Hematology Study Group on AML, Denmark. *Leukemia.* 1991; 5(6): 510-6.

Harris JW, Kosciak R, Lazarus HM, Eshleman JR, Medof ME: Leukemia arising out of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Leuk Lymphoma.* 1999; 32(5-6): 401-26.

Hauer, J., Puschner S, Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, Federle C, Engelmann H: TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 2874-2879.

Heilmeier B, Buske C, Spiekermann K, Bohlander S, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Braess J: Diagnostik, Klassifikation und Prognosefaktoren der akuten myeloischen Leukämie. *Med Ist.* 2007; 102: 296–308.

Hentschel N, Krusch M, Kiener PA, Kolb HJ, Salih HR, Schmetzer HM: Serum levels of sCD137 (4-1BB) ligand are prognostic factors for progression in acute myeloid leukemia but not in non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol.* 2006; 77(2): 91-101.

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

Hiddemann W, Haferlach T, Hrsg. *Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome*, Manual des Tumorzentrums München, 2. Aufl. München–Wien–New York: Zuckschwerdt, 2003: 1–16.

Hock BD, McKenzie JL, Patton WN, Haring LF, Yang Y, Shen Y, Estey EH, Albitar M: The clinical significance of soluble CD86 levels in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer.* 2003; 98(8): 1681-8.

Hock BD, Patton WN, Budhia S, Mannari D, Roberts P, McKenzie JL: Human plasma contains a soluble form of CD86 which is present at elevated levels in some leukaemia patients. *Leukemia.* 2002 ; 16(5): 865-73.

Holmes R, Keating MJ, Cork A: A unique pattern of central nervous system leukemia in acute myelomonocytic leukemia associated with inv(16) (p13q22). *Blood*. 1985; 65: 1071-1078.

Houtenbos I, Westers TM, Dijkhuis A, de Gruijl TD, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA: Leukemia-specific T-cell reactivity induced by leukemic dendritic cells is augmented by 4-1BB targeting. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(1): 307-15.

Hoyle CF, de Bastos M, Wheatley K, Sherrington PD, Fischer PJ, Rees JK, Gray R, Hayhoe FG: AML associated with previous cytotoxic therapy, MDS or myeloproliferative disorders: Results from the MRC's 9th AML trial. *Br J Haematol*. 1989; 72: 45-53.

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

Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, Kita K, Hiraoka A, Masaoka T, Nasu K, et al.: WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. 1994; 84(9): 3071-9.

Jackson N, Menon BS, Zarina W, Zawani N, Naing NN: Why is acute leukemia more common in males? A possible sex-determined risk linked to the AB0 blood group genes. *Ann Hematol*. 1999; 78: 233-236.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2001.

Ji HB, Liao G, Faubion WA, Abadia-Molina AC, Cozzo C, Laroux FS, Caton A, Terhorst C: Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J Immunol*. 2004; 172: 5823-5827.

Kanamaru F, Youngnak P, Hashiguchi M, Nishioka T, Takahashi T, Sakaguchi S, Ishikawa I, Azuma M: Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells. *J Immunol*. 2004; 172: 7306-7314.

Karp JE, Smith MA: The molecular pathogenesis of treatment-induced (secondary) leukemias: foundations for treatment and prevention. *Semin Oncol*. 1997; 24: 103-113.

Kaufman DC, Baer MR, Gao XZ, Wang Z, Preisler HD: Enhanced expression of the granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor gene in acute myelocytic leukemia cells following in vitro blast cell enrichment. *Blood*. 1988; 72: 1329-1332.

Kawakami Y, Zakut R, Topalian SL, Stotter H, Rosenberg SA: Shared human melanoma antigens. Recognition by tumor-infiltrating lymphocytes in HLA-A2.1-transfected melanomas. *J Immunol.* 1992; 148: 638-643.

Kern W, Behre G, Schilling CH von, et al.: Akute myeloische Leukämie (AML) beim Erwachsenen. In: Hiddemann W, Haferlach T, Hrsg. Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome, Manual des Tumorzentrums München, 2. Aufl. München–Wien–New York: Zuckschwerdt, 2003: 17–48.

Kim JD, Choi BK, Bae JS, Lee UH, Han IS, Lee HW, Youn BS, Vinay DS, Kwon BS: Cloning and characterization of GITR ligand. *Genes Immun.* 2003; 4: 564-569.

Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R: Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood.* 1999; 93: 3074-3080.

Kloss M, Krusch M, Baltz KM, Kanz L, Salih HR: Glucocorticoid-induced TNF related protein ligand in macrophage-mediated immune response. *Onkologie.* 2007; 30(suppl.3): 103.

Ko K, Yamazaki S, Nakamura K, Nishioka T, Hirota K, Yamaguchi T, Shimizu J, Nomura T, Chiba T, Sakaguchi S: Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2005; 202: 885-891.

Koeffler HP, Golde DW: Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood.* 1980; 56: 344-350.

Kohm AP, Williams JS, Miller SD: Cutting edge: ligation of the glucocorticoid-induced TNF receptor enhances autoreactive CD4+ T cell activation and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2004; 172: 4686-4690.

Kwon B, Yu KY, Ni J, Yu GL, Jang IK, Kim YJ, Xing L, Liu D, Wang SX, Kwon BS: Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem.* 1999; 274: 6056-6061.

Kwon B., Moon CH, Kang S, Seo SK, Kwon, BS: 4-1BB: Still in the midst of darkness. *Mol. Cells.* 2000; 10: 119-126.

La Cava A, Fang CJ, Singh RP, Ebling F, Hahn BH: Manipulation of immune regulation in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2005; 4: 515-519.

Langstein J, Michel J, Fritsche J, Kreutz M, Andreesen R, Schwarz H: CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bi-directional signaling. *J Immunol.* 1998; 160: 2488-94.

Langstein J, Michel J, Schwarz H: CD137 induces proliferation and endomitosis in monocytes. *Blood.* 1999; 94: 3161-8.

Lanier LL: NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23: 225-274.

Roncagalli R, Taylor JE, Zhang S, Shi X, Chen R, Cruz-Munoz ME, Yin L, Latour S, Veillette A: Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol.* 2005; 6: 1002-1010.

Le Beau MM, Albain KS, Larson RA, Vardiman JW, Davis EM, Blough RR, Golomb HM, Rowley JD: Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol.* 1986; 4(3): 325-45.

Lee HS, Shin HH, Kwon BS, Choi HS: Soluble glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (sGITR) increased MMP-9 activity in murine macrophage. *J Cell Biochem.* 2003; 88: 1048-1056.

Lee HS, Park SY, Lee HW, Choi HS: Secretions of MMP-9 by soluble glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (sGITR) mediated by protein kinase C (PKC)delta and phospholipase D (PLD) in murine macrophage. *J Cell Biochem.* 2004; 92: 481-490.

Lengfelder E, Hehlmann R, Büchner T: Aktuelle Therapiekonzepte bei akuter Promyelozytenleukämie. *Dtsch Med Wochenschr* 2001, 126: 1073-1079.

Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L: The incidence of secondary leukemias. *Haematologica.* 1999; 84(10): 937-45.

Levine EG, Bloomfield CD: Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol.* 1992; 19: 47-84.

Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG: Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med.* 2002; 196: 1335-1346.

Li Z, Mahesh SP, Kim BJ, Buggage RR, Nussenblatt RB: Expression of glucocorticoid induced TNF receptor family related protein (GITR) on peripheral T cells from normal human donors and patients with non-infectious uveitis. *J Autoimmun.* 2003; 21: 83-92.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* 2001, 104: 487–501.

Lowdell MW, Craston R, Samuel D, Wood ME, O'Neill E, Saha V, Prentice HG: Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *Br J Haematol.* 2002; 117: 821-827

Ludwig WD, Thiel E: Diagnostik der akuten Leukämien mit morphologischen, immunologischen und zytologischen Verfahren. *Internist.* 1993; 54: 498-510.

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

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC: CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 2002; 16: 311-323.

Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellström KE, Mittler RS, Chen L: Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nature Medicine.* 1997; 6: 682-85.

Michel JS, Pauly P, Langstein P, Krammer PH, Schwarz H: CD137-induced apoptosis is independent of CD95. *Immunology.* 1999; 98: 42-6.

Mitelman K: ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. Karger: Basel, 1995.

Mrozek K, Heinonen K, Lawrence D, Carroll AJ, Koduru PR, Rao KW, Strout MP, Hutchison RE, Moore JO, Mayer RJ, Schiffer CA, Bloomfield CD: Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9; 11)(p22; q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia group B study. *Blood.* 1997; 90(11): 4532-8.

Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD: Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* 2004; 18: 115–36.

Muriglan SJ, Ramirez-Montagut T, Alpdogan O, Van Huystee TW, Eng JM, Hubbard VM, Kochman AA, Tjoe KH, Riccardi C, Pandolfi PP, Sakaguchi S, Houghton AN, Van Den Brink MR: GITR activation induces an opposite effect on alloreactive CD4(+) and CD8(+) T cells in graft-versus-host disease. *J Exp Med.* 2004; 200: 149-157.

Needleman SW, Kraus MH, Srivastava SK, Levine PH, Aaronson SA: High frequency of N-ras activation in acute myelogenous leukemia. *Blood.* 1986; 67: 753-757.

Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Migliorati G, Riccardi C: A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 6216-6221

Nocentini G and Riccardi C: GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol*. 2005; 35: 1016-1022.

O'Brien S, Kantarjian HM, Keating M, Gagnon G, Cork A, Trujillo J, McCredie KB: Association of granulocytosis with poor prognosis in patients with acute myelogenous leukemia and translocation of chromosomes 8 and 21. *J Clin Oncol*. 1989; 7(8): 1081-6.

Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y: Differentiation inhibitory factor Nm23 as a prognostic factor for acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1998; 32(1-2): 19-28.

Pagana L, Pulsoni A, Tosti ME, Avvisati G, Mele L, Mele M, Martino B, Visani G, Cerri R, Di Bona E, Invernizzi R, Nosari A, Clavio M, Allione B, Coser P, Candoni A, Levis A, Camera A, Melillo L, Leone G, Mandelli F; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto: Clinical and biological features of acute myeloid leukaemia occurring as second malignancy: GIMEMA archive of adult acute leukaemia. *Br J Haematol*. 2001; 112: 109-117.

Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Larsen SO, Andersson M, Daugaard G, Erbsoll J, Hansen SW, Hou-Jensen K, Nielsen D, Sigsgaard TC, et al. Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Cytogenetic characteristics of 115 consecutive cases and risk in seven cohorts of patients treated intensively for malignant diseases in the Copenhagen series. *Leukemia*. 1993; 7(12): 1975-86.

Pierson BA and Miller JS: CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood*. 1996; 88: 2279-2287

Poppe B, Van Limbergen H, Van Roy N, Vandecruys E, De Paepe A, Benoit Y, Spelemann F: Chromosomal aberrations in Bloom syndrome patients with myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001; 128: 39-42.

Re F, Arpinati M, Testoni N, Ricci P, Terragna C, Preda P, Ruggeri D, Senese B, Chirumbolo G, Martelli V, Urbini B, Baccarani M, Tura S, Rondelli D: Expression of CD86 in acute myelogenous leukemia is a marker of dendritic/monocytic lineage. *Exp Hematol*. 2002; 30(2): 126-34.

Reilly JT: Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol*. 2005; 128: 18-34.



Ronchetti S, Nocentini G, Riccardi C, Pandolfi PP: Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood*. 2002; 100: 350-352.

Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, Ayroldi E, Riccardi C: GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol*. 2004; 34: 613-622.

Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A: Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002; 295: 2097-2100

Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, Starling GC, Loo DT, Lee F, Aruffo AA, Trail PA, Kiener PA.: Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol*. 2000; 165(5): 2903-10.

Salih HR, Schmetzer HM, Burke C, Starling GC, Dunn R, Pelka-Fleischer R, Nüssler V, Kiener PA: Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies. *J Immunol*. 2001; 167: 4059-66.

Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, Steinle A: Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*. 2003; 102(4): 1389-96.

Salih HR, Nuessler V, Denzlinger C, Starling GC, Kiener PA, Schmetzer HM: Serum levels of CD137 ligand and CD178 are prognostic factors for progression of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2004; 45(2): 301-8.

Samdani A, Vijapurkar U, Grimm MA, Spier CS, Grogan TM, Glinsmann-Gibson BJ, List AF: Cytogenetics and P-glycoprotein (PGP) are independent predictors of treatment outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Leuk Res*. 1996; 20(2): 175-80.

Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B: Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005; 106(12): 3733-9.

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

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S: Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2002; 3: 135-142.

Shin HH, Kwon BS, Choi HS: Recombinant glucocorticoid induced tumour necrosis factor receptor (rGITR) induced COX-2 activity in murine macrophage Raw 264.7 cells. *Cytokine*. 2002; 19: 187-192.

Shin HH, Lee MH, Kim SG, Lee YH, Kwon BS, Choi HS: Recombinant glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (rGITR) induces NOS in murine macrophage. *FEBS Lett*. 2002; 514: 275-280.

Smith MA, Rubinstein L, Cazenave L, Ungerleider RS, Maurer HM, Heyn R, Khan FM, Gehan E: Report of the Cancer Therapy Evaluation Program monitoring plan for secondary acute myeloid leukemia following treatment with epipodophyllotoxins. *J Natl Cancer Inst*. 1993; 85(7): 554-8.

Sorensen JT, Gerald K, Bodensteiner D, Holmes FF: Effect of age on survival in acute leukemia. 1950-1990. *Cancer*. 1993; 72(5): 1602-6.

Southam CM, Craver LF, Dargeon HW et al: A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer*. 1951; 4: 39-59.

Spinicelli S, Nocentini G, Ronchetti S, Krausz LT, Bianchini R, Riccardi C: GITR interacts with the pro-apoptotic protein Siva and induces apoptosis. *Cell Death Differ*. 2002; 9: 1382-1384.

Stasi R, Venditti A, Del Poeta G, Aronica G, Dentamaro T, Cecconi M, Stipa E, Scimo MT, Masi M, Amadori S: Intensive treatment of patients age 60 years and older with de novo acute myeloid leukemia: analysis of prognostic factors. *Cancer*. 1996 ; 77(12): 2476-88.

Suvas S, Kim B, Sarangi PP, Tone M, Waldmann H, Rouse BT: In vivo kinetics of GITR and GITR ligand expression and their functional significance in regulating viral immunopathology. *J Virol*. 2005; 79: 11935-11942.

Swirsky DM, de Bastos M, Parish SE, Rees JK, Hayhoe FG: Features affecting outcome during remission induction of acute myeloid leukaemia in 619 adult patients. *Br J Haematol*. 1986; 64(3): 435-53.

Tajima F, Kawatani T, Endo A, Kawasaki H: Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia. *Leukemia*. 1996; 10: 478-482

Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Ogden A, Shepherd L, Willman C, Bloomfield CD, Rowe JM, Wiernik PH. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1997; 337(15): 1021-8. Erratum in: *N Engl J Med*. 1997; 337(22): 1639.

te Boekhorst PA, Lowenberg B, van Kapel J, Nooter K, Sonneveld P: Multidrug resistant cells with high proliferative capacity determine response to therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1995; 9(6): 1025-31.

Tone M, Tone Y, Adams E, Yates SF, Frewin MR, Cobbold SP, Waldmann H: Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 15059-15064.

Topalian SL, Solomon D, Rosenberg SA: Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J. Immunol*. 1989; 142: 3714-3725.

Ventura GJ, Hester JP, Smith TL, Keating MJ: Acute myeloblastic leukemia with hyperleukocytosis: risk factors for early mortality in induction. *Am J Hematol*. 1988; 27(1): 34-7.

Visani G, Lemoli R, Tosi P, Martinelli G, Testoni N, Ricci P, Motta M, Gherlinzoni F, Leopardi G, Pastano R, Rizzi S, Piccaluga P, Isidori A, Tura S: Use of peripheral blood stem cells for autologous transplantation in acute myeloid leukemia patients allows faster engraftment and equivalent disease-free survival compared with bone marrow cells. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24(5): 467-72.

Wakimoto N, Yokoyama A, Okabe-Kado J, Nagata N, Motoyoshi K, Honma Y: Combined analysis of differentiation inhibitory factor nm23-H1 and nm23-H2 as prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer*. 1998; 77(2): 2298-303.

Watts TH: TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 23-68.

Whiteway A, Corbett T, Anderson R, Macdonald I, Prentice HG: Expression of co-stimulatory molecules on acute myeloid leukaemia blasts may effect duration of first remission. *Br J Haematol*. 2003; 120(3): 442-51.

Wijermans PW, Rebel VI, Ossenkoppele GJ, Huijgens PC, Langenhuijsen MM: Combined procoagulant activity of acute promyelocytic leukemic cells: reversal of the bleeding disorder by cell differentiation. *Blood*. 1989; 73: 800-805.

Willmanns W, Nüssler V (Hrsg.): Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Leukämien und myelodysplastische Syndrome. 1. Auflage, 1996: 29-75.

Wilms K: Akute Leukämien. In: Lehrbuch der Inneren Medizin, Kapitel Erkrankungen der Leukopoese (W. Siegenthaler, Hrsg.) 1992, 3. Aufl., Georg – Thieme-Verlag Stuttgart- New York: S. 699 ff.

Ye Z, Hellström I, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Ledbetter JA, Hellström KE: Gene therapy for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB. *Nature Medicine*. 2002; 8: 343-8.

Young DC, Griffin JD: Autocrine secretion of GM-CSF in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1986; 68: 1178-1181.

Young DC, Wagner K, Griffin JD: Constitutive expression of the granulocyte-macrophage- colony stimulating factor gene in acute myelocytic leukemia. *J Clin Invest*. 1987; 79: 100-106.

Yu KY, Kim HS, Song SY, Min SS, Jeong JJ, Youn BS: Identification of a ligand for glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor constitutively expressed in dendritic cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. 2003; 310: 433-438.

Zittoun R: The EORTC trials for acute myelogenous leukemia. EORTC Leukemia Cooperative Group. European Organisation of Research and Treatment of Cancer. *Hematol Cell Ther* 1996; 38: 247-252.

## 7 Danksagung

Besonders herzlicher Dank gebührt Prof. Dr. med. H. Salih für die Themenstellung und die intensive Betreuung dieser Arbeit. Ganz besonders haben mir seine engagierte Diskussionsbereitschaft, seine konkreten Anregungen, sowie nicht zuletzt die exzellente Unterstützung auch während der Fertigstellung der Arbeit geholfen.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Salih, insbesondere Tina Bässler und Dr. med. Matthias Krusch, aber auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die hervorragende Zusammenarbeit und die Überlassung der zytometrischen Daten.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. K. Jaschonek und Herrn PD Dr. med. F. Mayer für die sehr gute Zusammenarbeit und die Unterstützung in den letzten Jahren bedanken.

Ein besonderer Dank auch an meine Familie und meine Lebensgefährtin für die stete Hilfsbereitschaft in allen Phasen dieser Arbeit und nicht zuletzt für das Ertragen meiner Launen während der Fertigstellung dieser Arbeit.

## 8 Lebenslauf

Alexander Hans Wacker

Geboren am 31. Dezember 1970 in Tübingen

### Schulbildung

1977 - 1980	Hohbuch-Grundschule, Reutlingen
1980 - 1989	Johannes-Kepler-Gymnasium, Reutlingen
April 1989	Allgemeine Hochschulreife am Johannes-Kepler-Gymnasium Reutlingen

### Zivildienst

10/1989 bis 12/1990	Ableistung des Ersatzdienstes im Mobilien Sozialen Hilfsdienst der Körperbehindertenförderung Neckar-Alb
---------------------	--

### Studium

1990 - 1991	Studium der Mathematik an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1991 - 1998	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
08.05.1998	Staatsexamen in Humanmedizin

### Berufstätigkeit

Seit 11/1998	Ärztlicher Mitarbeiter Medizinische Klinik II, Eberhardt Karls Universität, Tübingen
12/2005	Facharztanerkennung Innere Medizin
07/2007	Zusatzbezeichnung Rheumatologie