

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

Immunogene Wirkung des TEL/AML1 Onkopeptids auf  
leukämische Zelllinien

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Amrit Roy

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.12.2016

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Zusammenfassung .....	5
Abstract.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1 Einleitung.....	11
1.1 Hämatopoese .....	11
1.2 Leukämien .....	11
1.2.1 Akute lymphatische Leukämie.....	13
1.2.1.1 Diagnostik.....	14
1.2.1.2 Therapie .....	16
1.3 TEL-Protein .....	18
1.3.1 Struktur des TEL-Proteins .....	19
1.3.2 Funktion des TEL-Proteins .....	19
1.3.3 TEL assoziierte hämatopoetische Erkrankungen .....	20
1.4 AML1-Protein .....	21
1.4.1 Struktur des AML1-Proteins .....	21
1.4.2 Rolle in der Hämatopoese .....	23
1.4.3 AML1 assoziierte hämatopoetische Erkrankungen .....	24
1.5 Fusionsprotein TEL/AML1.....	25
1.5.1 Ätiologie.....	26
1.5.2 Wirkung der TEL/AML1 Translokation.....	28
1.5.3 Therapiemöglichkeiten .....	29
1.6 Dendritische Zellen .....	30
1.6.1 Dendritische Zelltherapien bei malignen Erkrankungen .....	32
1.6.2 Aus leukämischen Blasten generierte dendritische Zellen.....	35
1.6.3 Zytokinkombination zur Umwandlung in leukämische DCs .....	36
2 Fragestellung .....	37
3 Material und Methoden .....	39
3.1 Material .....	39
3.1.1 Verwendete Zellarten.....	39
3.1.2 Zytokine und Peptide.....	40
3.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze .....	40
3.1.4 FACS-Antikörper .....	41

3.1.5	Sonstige Reagenzien & Chemikalien.....	41
3.1.6	Puffer und zusammengesetzte Lösungen.....	42
3.1.7	Software .....	42
3.1.8	Geräte.....	43
3.1.9	Verbrauchsmaterialien .....	44
3.2	Methoden.....	45
3.2.1	Zellkulturverfahren .....	45
3.2.1.1	Sterile Arbeitsmaßnahmen.....	45
3.2.1.2	Kultivierung der Zelllinien.....	45
3.2.1.3	Gewinnung und Isolation von Monozyten .....	46
3.2.1.4	Behandlung der Zellen.....	46
3.2.1.5	Zellquantifizierung und Zellvitalität .....	48
3.2.2	Untersuchung von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie.....	48
3.2.3	Statistische Auswertung.....	50
4	Ergebnisse.....	51
4.1	Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf TEL/AML1 positive leukämische Blasten (REH) .....	51
4.1.1	Vitalität und Zellzahl.....	52
4.1.2	Immunphänotypisierung.....	54
4.2	Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf TEL/AML1 negative leukämische Blasten (K562).....	62
4.2.1	Vitalität und Zellzahl.....	62
4.2.2	Immunphänotypisierung.....	63
4.3	Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf Monozyten .....	70
4.3.1	Vitalität und Zellzahl.....	70
4.3.2	Immunphänotypisierung.....	71
5	Diskussion.....	78
5.1	Immunphänotypische Beurteilung nach Gabe von TEL/AML1 Peptid .....	79
5.1.1	TEL/AML1 positive REH-Zelllinie (ALL).....	79
5.1.2	TEL/AML1 negative K562-Zelllinie (CML) .....	82
5.1.3	Humane Monozyten.....	84
5.2	Kritische Einordnung der Ergebnisse.....	84
5.3	Schlussfolgerung .....	87
6	Abbildungsverzeichnis .....	88
7	Tabellenverzeichnis .....	92
8	Literaturverzeichnis .....	95

9	Anhang (Excel-Makro) .....	106
10	Danksagung .....	108
11	Lebenslauf .....	109

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die dendritische Zelltherapie bietet bei der Behandlung von Krebserkrankungen einen neuartigen therapeutischen Ansatz. Bei der Leukämie besteht die Möglichkeit leukämische Blasten durch Zytokin-Stimulation in leukämische dendritische Zellen (DC) zu differenzieren. Dadurch können neben unbekanntem Tumorantigenen spezifische Tumor-assoziierte Antigene (TAA) dem Immunsystem präsentiert werden (Blair et al., 2001; B. A. Choudhury et al., 1999; Cignetti et al., 1999). Ein solches spezifisches TAA ist das TEL/AML1 Fusionsprotein, welches als Produkt aus der Translokation t(12;21)(p13;q22) entsteht. Es ist das häufigste Fusionsgen in der kindlichen akuten lymphatischen Leukämie (B-Vorläufer-Zell-ALL) (Shurtleff et al., 1995). *Yotnda et al.* haben 1998 zum ersten Mal gezeigt, dass eine TEL/AML1 Fusionssequenz eine zytotoxische T-Zellantwort auslösen kann (Yotnda et al., 1998). *Schmidt et al.* erarbeiteten 2009 erfolgreich Zytokincocktails, die aus TEL/AML1-positive leukämische Blasten dendritische Zellen generieren (Schmidt et al., 2009).

Ziel dieser Arbeit ist es festzustellen, ob die zusätzliche Gabe des TEL/AML1 Fusionspeptids die zytokininduzierte Differenzierung leukämischer TEL/AML1 positiver Blasten in DCs optimiert. In diesem Fall könnte eine spezifische DC-Therapie gegen die TEL/AML1 positive ALL entstehen.

**Methoden:** Wir verwendeten eine Peptidsequenz des TEL/AML1 Onkoproteins aus der Fusionsregion. Dieses ist ein nicht natürliches Peptid und wird von gesunden Zellen nicht synthetisiert. Die Wirkung des TEL/AML1 Peptids wurde durchflusszytometrisch in drei Konzentrationsstufen auf die Differenzierung der TEL/AML1 positiven ALL Zelllinie (REH) zu DCs untersucht. Zum Vergleich erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung anhand TEL/AML1 negativer CML Zelllinien (K562) (Chronisch myeloische Leukämie) und humaner Monozyten.

**Ergebnis:** Es ist gelungen, eine mäßige Differenzierung humaner Monozyten in reife Antigen-präsentierenden Zellen (APC) zu erzielen. Allerdings führte das TEL/AML1 Peptid unerwartet zu einer Herabregulation der Differenzierung von TEL/AML1 positiven ALL Zelllinien zu DCs. Im Vergleich zeigte das TEL/AML1 Peptid auf die TEL/AML1 negative CML Zelllinie keine Wirkung.

**Schlussfolgerung:** In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Fusionssequenz von TEL/AML1 die Differenzierung zu leukämischen DCs trotz Zytokin-Stimulation hemmt. Diese Wirkung scheint spezifisch bei der TEL/AML1 positiven Leukämiezelllinie zu sein, da es zu keiner Wirkung auf die TEL/AML1 negative CML Zelllinie kam. Somit ist dieses Peptid offensichtlich nicht geeignet für eine DC-Therapie. Außerdem scheint die Fusionssequenz per se den leukämischen Blastenzustand zu bewahren. Ein Grund hierfür könnte eine intrazelluläre Kopplung oder Interaktion mit einem weiteren Protein sein. Dieses könnte zur Hemmung der Differenzierung führen. In weiteren Studien sollte die Wirkung der TEL/AML1 Fusionssequenz auf TEL/AML1 positive leukämische Blasten untersucht werden um den Pathomechanismus bei der TEL/AML1 positiven ALL besser zu verstehen.

## Abstract

**Background:** Dendritic cell (DC) therapy offers a novel therapeutic approach in the treatment of different forms of cancer. In the case of leukemia the aim of the DC therapy would be to differentiate leukemic blasts through cytokine stimulation into dendritic cells. Thus known and unknown tumor-associated antigens are presented to the immune system (Blair et al., 2001; B. A. Choudhury et al., 1999; Cignetti et al., 1999). Further an ideal target as a tumor-associated antigen could be the oncoprotein TEL/AML1, which is a result of the chromosomal translocation (12;21)(p13;q22) and represents the most common fusion gene in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) (Shurtleff et al., 1995). *Yotnda et al.* has shown that this epitope created through the fusion gene of TEL and AML1 leads to a cytotoxic T-cell response (Yotnda et al., 1998). In 2009 *Schmidt et al.* successfully developed cytokin-cocktails, which differentiated TEL/AML1-positive leukemic blasts into dendritic cells (Schmidt et al., 2009).

Due to these findings, it is assumed that the addition of the TEL/AML1 peptide would enhance the cytokine-stimulated differentiation of TEL/AML1 positive leukemic blasts into leukemic DCs. This could lead to a specific DC-therapy against the TEL/AML1 positive ALL.

**Methods:** We used a peptide sequence of the TEL/AML1 oncoprotein representing the fusion region. As this peptide is not synthesized naturally by healthy cells, it would have the highest probability of triggering an immunogenic reaction. Via flow cytometry several concentration levels of the TEL/AML1 peptide were examined on the differentiation of the cell lines into APCs *in vitro*. As a source for leukemic blasts we used the human TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemic (ALL) cell line of REH cells comparing them with the human TEL/AML1 negative chronic myeloid leukemic (CML) cell line of K562 and human monocytes.

**Results:** It was possible to moderately induce monocytes into mature antigen presenting cells. Unexpectedly though the TEL/AML1 peptide decreased the differentiation of the TEL/AML1 positive ALL cell line (REH) into DCs. In comparison the peptide didn't have any effect on the TEL/AML1 negative CML cell line (K562).

**Conclusion:** The TEL/AML1 fusion sequence seems to inhibit the differentiation into leukemic DCs in spite of cytokine stimulation. Due to this, the peptide is probably not suitable for a dendritic cell therapy. This effect seems to be specific for the TEL/AML1 positive leukemic cell line, as no effect was observed on the TEL/AML1 negative CML cell line. The results show that the TEL/AML1 peptide could be responsible in conserving a leukemic state on TEL/AML1 positive leukemic blasts. A possible cause could be an intracellular binding or interaction with another protein. This could lead to an inhibition of differentiation. Due to these discoveries further research is needed to evaluate the function of the TEL/AML1 fusion peptide in the pathomechanism of the TEL/AML1 positive ALL.

## Abkürzungsverzeichnis

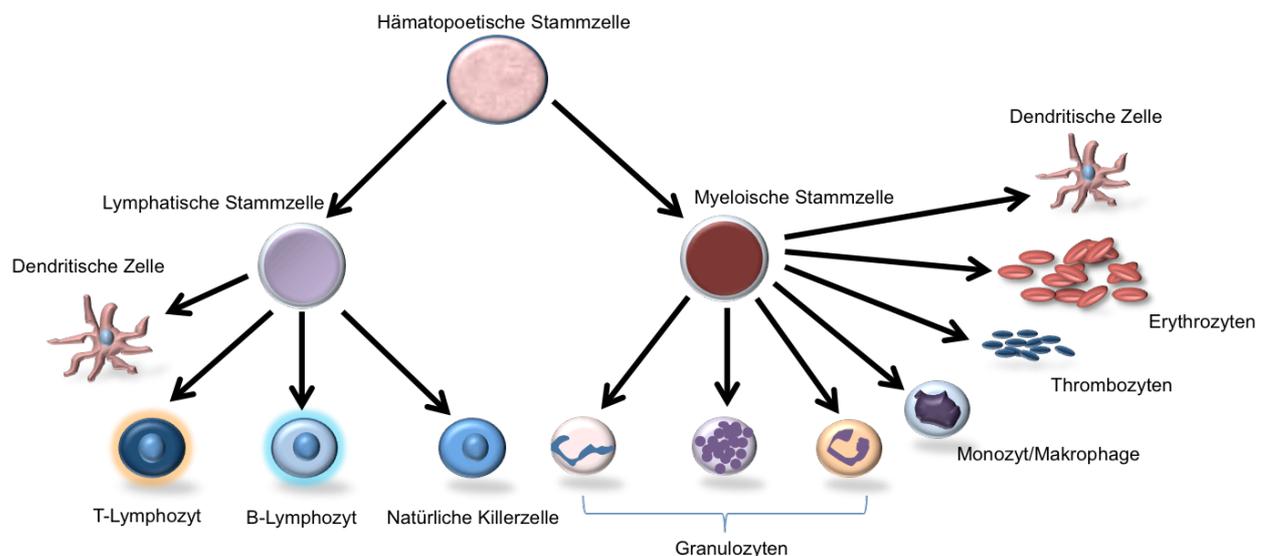
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AML1	akut myeloisches leukämisches 1 Protein
APC	antigenpräsentierende Zelle(n)
CBF $\beta$	Core-binding factor $\beta$
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
CLL	Chronische lymphoblastische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CTL	zytotoxische(r) T-Lymphozyt(en)
DC	dendritische Zelle(n)
Del	Deletion
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsä
Ets1	V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
FACS	fluorescence activated cell sorter
FBS	fetales Kälberserum, fetal bovine serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt-3L	fms-like tyrosine kinase 3 ligand
FSC	Forward Scatter
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
HDAC	Histondeacetylasen
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	humane(s) Lymphozyten-Antigen(e)
HPV	Humanes Papilloma Virus
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
HTLV-I	humane T-Zell Leukemia Virus-I
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor

MDS	myelodysplastisches Syndrom
MDSC	Myeloid-derived Suppressor Cells
MHC	Major histocompatibility complex
NK	Natürliche Killerzellen
NMTS	Nuclear matrix targeting Signal
N-CoR	Nuclear receptor co-repressor 1
PAS	Periodic Acid Schiff Reaktion
PEBP2aB	Polyomavirus enhancer-binding Protein 2 alpha B subunit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SA	Standardabweichung
SCF	stem cell factor
SSC	Side Scatter
SEM	Standard error of mean
TAA	Tumor-assoziierte-Antigene
TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
t	Translokation

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämatopoese

Die Blutbildung, bzw. Hämatopoese findet hauptsächlich im Knochenmark statt (Linggi et al.). Sie besteht aus hämatopoetischen Stammzellen, die sich weiter entlang myeloischer und lymphatischer Stammzelllinien unterteilen (Abbildung 1) (Colby-Graham et al., 2003; Palis et al., 1999). Die Blutbildung kann durch Proliferation maligne entarteter, unreifer Zellen der Hämatopoese gestört werden (Schrappe et al., 2008b). Dieses kann zu einer Leukämie führen.



**Abbildung 1:** Entwicklung der myeloischen und lymphopoetischen Zelllinien aus den hämatopoetischen Stammzellen (HSZ); (Eigene Abbildung nach Röder, 2003).

## 1.2 Leukämien

Der Begriff Leukämie (altgriechisch: „weißes Blut“) wurde erstmals von Rudolf Virchow 1845 beschrieben (Virchow, 1856). Unter dem Begriff Leukämie wird eine Vielzahl von malignen Erkrankungen der Hämatopoese verstanden, die zu einer exponentiellen Entartung innerhalb der hämatopoetischen Zellreihen führen. Je nachdem welche Entwicklungsstufe der Zellreihe entartet, kann dies zu einer klonalen Expansion und Transformation dieser unreifen Zellen, der sogenannten Blasten, führen und die normale Hämatopoese verdrängen (Schrappe et al., 2008b).

Leukämien werden neben dem Ursprungszelltyp (myeloisch, lymphopoetisch; Abbildung 1) auch nach dem Krankheitsverlaufs in akut und chronisch eingeteilt (Riede, 2004).

Die vier häufigsten Leukämieformen sind:

- Akute myeloische Leukämie (AML)
- Chronische myeloische Leukämie (CML)
- Akute lymphatische Leukämie (ALL)
- Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

	AML	ALL	CML	CLL	Sonstige	Ungenau bezeichnet
Männer	25 %	7 %	10 %	40 %	10 %	8 %
Frauen	29 %	8 %	10 %	34 %	9 %	10 %

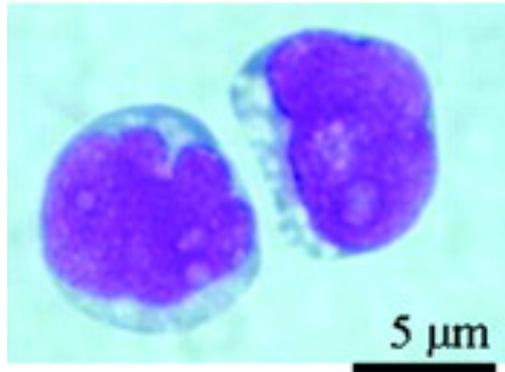
**Tabelle 1:** Anteile der verschiedenen Leukämieformen an allen Neuerkrankungen nach Geschlecht, Deutschland, 2007– 2008 (Robert Koch-Institut, 2012)

Bei der Ätiologie der Leukämie spielen viele bekannte und unbekannte Faktoren eine Rolle. Es ist bekannt, dass z.B. ionisierende Strahlung bei der Strahlentherapie und Zytostatika im Rahmen der Chemotherapie Risikofaktoren darstellen (Classen, 2004). Der Einfluss von Viren wird ebenfalls untersucht und ist Gegenstand der Forschung (Robert Koch-Institut, 2012). Das humane T-Zell-Leukemia-Virus-I (HTLV-I) verursacht eine seltene endemische Sonderform der T-ALL (Classen, 2004; Uchiyama, 1997). In mehreren Studien zeigt sich auch eine erhöhte Korrelation zwischen Epstein-Barr Virus Infektionen und Leukämien wie ALL (Sehgal et al., 2010).

Neben einer viralen Ätiologie spielen auch genetische Mutationen eine entscheidende Rolle. Patienten mit Trisomie 21 (= Down-Syndrom) erkranken vermehrt an der akuten myeloischen Leukämie (Strati et al., 2013). Die Entdeckung und Identifizierung genetischer Veränderungen hat neue Prognose-, Diagnose- und Therapiemöglichkeiten eröffnet (Pui, Schrappe, et al., 2004; Sawyers, 1998). Darunter zählen vor allem genetische Anomalien, wie die TEL/AML1 Translokation t(12;21)(p13;q22), welche bei der kindlichen ALL auftritt (Fuka et al., 2011).

### 1.2.1 Akute lymphatische Leukämie

Die ALL ist eine maligne Erkrankung, welche durch erworbene genetische Mutationen und klonale Zellexpansion einer unreifen, entarteten Vorläuferzelle (Abbildung 2) der lymphatischen Zelllinie charakterisiert ist (Zelent et al., 2004).



**Abbildung 2:** Blutausstrich bei einem ALL Patienten mit leukämischen Blasten (Schmidt, et al., 2009)

Die ALL ist eine seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von etwa 1,4 Neuerkrankungen/100.000/Jahr. Sie macht 90 % der akuten Leukämien im Kindesalter aus und ist somit die häufigste bei Kindern diagnostizierte Leukämie (N. et al., 2005). Die ALL wird ab einem Blastenanteil von über 25% im Knochenmark diagnostiziert (Creutzig et al., 2013; Schrappe et al., 2008a). Die exponentielle Zellexpansion, häufig vergesellschaftet mit einer Hepatosplenomegalie, bewirkt eine Verdrängung der Hämatopoese im Knochenmark, was zur Anämie und Leistungsminderung führt (Linggi et al.). Hinzu kommen eine Thrombozytopenie mit erhöhter Blutungsneigung und eine Leukozytose (N. et al., 2005). Diese führen zur erhöhten Infektanfälligkeit und Immunschwäche. Knochenschmerzen treten ebenfalls auf und sind auf Infiltrationen des Knochenmarks durch leukämische Blasten zurückzuführen. Letztlich verläuft die ALL ohne adäquate Behandlung letal (Colby-Graham et al., 2003).

### 1.2.1.1 Diagnostik

Die Diagnostik der akuten lymphatischen Leukämien (ALL) stützt sich auf folgende Methoden:

- Zytomorphologie/-chemie
- Immunphänotypisierung
- Zytogenetik und Molekularbiologie

Aus diesen leiten sich die Therapiemöglichkeiten und Prognosen der Erkrankung her.

#### Zytomorphologie/-chemie

Die Einteilung der ALL in die Stadien L1-L3 der FAB-Klassifikation (**F**rench-**A**merican-**B**ritish) (Bennett et al., 1976) erfolgt anhand zytomorphologischer Aspekte der Blasten (Tabelle 2). Zwar hat sie als Nachweisverfahren an Bedeutung verloren, wird aber in zweifelhaften Fällen immer noch zurate gezogen. Die ALL zeigt eine positive PAS (Periodsäure-Schiff)-Reaktion (Classen, 2004). Die Zytochemie wurde mittlerweile durch die Immunphänotypisierung der Oberflächenantigene ersetzt (N. et al., 2005).

FAB-Subtyp	Morphologie
L1	Kleine Blasten mit spärlichem Zytoplasma und homogenem Chromatin
L2	Heterogene Zellpopulation mit irregulären Zellkernen, heterogenem Chromatin, gelegentlich Basophilie
L3	Große homogene Blasten mit homogenen Chromatin, regulär konfigurierten Zellkern und ausgeprägter Basophilie

**Tabelle 2:** FAB-Klassifikation der ALL nach *Benett et al.* (Bennett et al., 1976). Zytomorphologische und zytochemische Einteilung der ALL-Blasten.

#### Immunphänotypisierung

Aufgrund der Komplexität der Leukämie wird diese je nach betroffener Zelllinie behandelt. Die Therapieregime sind für lymphatische und myeloische Leukämien unterschiedlich. Aus diesem Grund ist die immunologische Typisierung, insbesondere dann wichtig, wenn die betroffene Zelllinie nicht eindeutig identifiziert werden kann

(Burmester, 1998). Dafür werden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt, um festzustellen, ob und in welcher Häufigkeit sich spezifische Antigene an der Zelloberfläche oder im Zytoplasma finden (Schrappe et al., 2008a). Die ALL wird nach dem EGIL-Schema eingeteilt (European Group on Immunological Classification of Leukemia, Tabelle 3) und ist für die Abgrenzung verschiedener ALL-Subtypen, wie B-Zelllinien- oder T-Zelllinien-ALL, relevant (Bene et al., 1995).

	B-Linien-ALL*				T-Linien-ALL <sup>†</sup>			
	pro-B	common	prä-B	reife	pro-T	prä-T	kortikale (thymische)	reife
<b>B-Zell-Antigene</b>								
CD19	+	+	+	+	-	-	-	-
cyCD22	+	+	+	+	-	-	-	-
CD79alpha	+	+	+	+	-	-	-	-
cyIgM	-	-	+	-	-	-	-	-
mIg	-	-	-	+ <sup>°</sup>	-	-	-	-
<b>T-Zell-Antigene</b>								
cyCD3	-	-	-	-	+	+	+/-	-
CD7	-	-	-	-	+	+	+	+
CD2	-	-	-	-	-	+	+	+
CD1a	-	-	-	-	-	-	+	-
mCD3	-	-	-	-	-	-	+/-	+
<b>Vorläuferzell-Antigene</b>								
TdT	+	+	+	-	+	+	+	+/-
HLA-DR	+	+	+	+	+/-	-	-	-
CD10	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-

\* Mindestens zwei von drei B-Zell-Marker (CD19, CD79a oder CD22) müssen positiv sein

+ cyCD3 oder mCD3 muss nachweisbar sein

° Wenn mIg negativ, zusätzlicher Nachweis von Leichtketten erforderlich

**Tabelle 3:** Immunologische Klassifikation der ALL nach dem EGIL-Schema. Ein Antigennachweis gilt nur bei Expression von  $\geq 20\%$  der Oberflächenmarker bzw. bei  $\geq 10\%$  für CD3, CD79a und TdT aufgrund der hohen Spezifität als positiv (Bene, et al., 1995, (N. et al., 2005). CD: Cluster of differentiation, cy: zytoplasmatisch, Ig: Immunglobulin, m: membranständig, TdT: terminale Desoxyribonukleotidyltransferase, HLA: humane(s) Lymphozyten-Antigen, m: Membran.

### Zyto- und Molekulargenetik

Chromosomale Anomalien wie Translokationen (t) können eine Leukämie einleiten (Pui, Schrappe, et al., 2004). Unter einer Translokation versteht man Mutationen, bei denen Chromosomenabschnitte unterschiedlicher Gene an eine andere Position innerhalb des Chromosomenbestandes miteinander fusionieren. Sie führen zu Funktionsverlusten oder Überaktivität eines Genproduktes (Burmester, 1998). Dabei gibt es gravierende Unterschiede zwischen den ALL-Mutationen im Erwachsenenalter und der pädiatrischen ALL.

Bei der Erwachsenen-ALL besteht eine ungünstige Prognose für t(8;14), t(2;8) und t(8;22). Eine weitere Translokation bei der ALL ist die Translokation t(9;22), auch Philadelphia-Chromosomen genannt. Hier kodiert das Bcr-Abl-Fusionsgen ein Fusionsprotein mit erhöhter Tyrosinkinase-Aktivität (Druker et al., 1996) .

Bei der pädiatrischen ALL weist die Translokation t(1;19) auf ein schlechtes Ansprechen auf konventionelle Chemotherapien hin. Die häufigste zytogenetische Veränderung bei der pädiatrischen ALL ist das TEL-AML1-Fusionsgen infolge der Translokation t(12;21)(p13;q22). Dies hat eine günstige Prognose (Shurtleff et al., 1995).

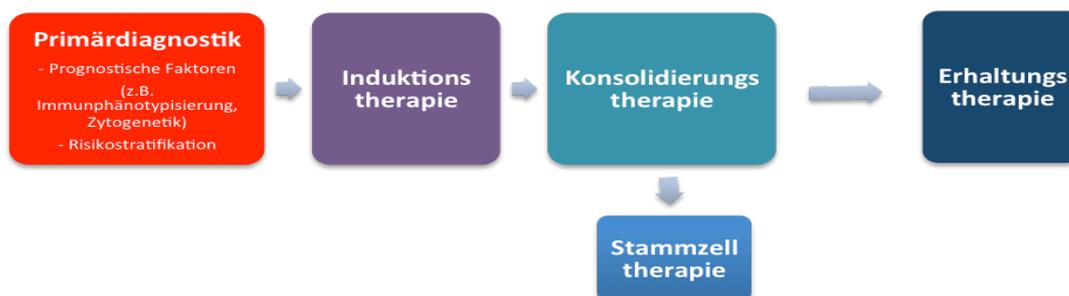
#### **1.2.1.2 Therapie**

Die Therapie der ALL basiert auf einem Chemotherapieregime bestehend aus drei Phasen. Die Wahl der Therapieregimen und -intensität richtet sich dabei nach der individuellen Immunphänotypisierung, Zytogenetik und weiteren prognostischen Faktoren (Tabelle 4). Auf Grundlage dessen wird für jeden Patienten eine Risikostratifikation, d.h. eine Abschätzung von wichtigen prognostischen Faktoren ermittelt (N. et al., 2005; Schrappe et al., 2008b)

Faktor	Günstige Prognose	Ungünstige Prognose
Leukozyten	< 20.000/μl	> 100.000/μl
Alter	1-5 J.	<1 J., >10 J.
Ansprechen nach 7 Tagen Prednison + MTX Vortherapie	< 1000 Blasten/μl	>1000 Blasten/μl
Ansprechen auf initiale Induktionstherapie	< 5 % Blasten im KM	> 5 % Blasten im KM
Nachweis von MRD	Negativ nach 5 Wochen	Positiv nach 12 Wochen
Chromosomenzahl	> 50	< 46
Translokationen/Fusionsgene	t(12;21) /TEL-AML1	t(9;22)/ BCR- ABL; t(4;11)/ MLL-AF4

**Tabelle 4:** Prognostische Faktoren bei der ALL-Therapie (Schrappe et al., 2008b) MTX: Methotrexat, J.:Jahre, MRD: Minimal residual disease - Anzahl leukämischer Blasten nach Therapie als Indikator für eine Rückfallwahrscheinlichkeit (Marshall et al., 2003)

Die Therapie wird mit einer Induktionstherapie, z.B. mit Prednison, Daunorubicin, Vincristin und L-Asparaginase, mit dem Ziel der Vollremission initiiert. Unter einer Vollremission versteht man die Normalisierung des Blutbildes und des Knochenmarks mit <5% Blastenanteil. Anschließend folgt eine Konsolidierungstherapie zur Aufrechterhaltung des leukämiefreien Zustands. Zuletzt folgt eine mehrjährige Erhaltungstherapie, z.B. mit 6-Mercaptopurin und Methotrexat (Classen, 2004; N. et al., 2005). Bei Patienten mit einer hohen Risikostratifikation erfolgt nach der Konsolidierungstherapie eine Stammzelltransplantation, um die Wahrscheinlichkeit für ein kuratives Ergebnis zu erhöhen (Abbildung 3) (Classen, 2004).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der ALL-Therapie (Chiaretti et al., 2014)

Durch molekularbiologische Fortschritte wurden mittlerweile zielgerichtete Therapieregime für die ALL entwickelt. Dazu zählt der etablierte Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib, der spezifisch gegen das Fusionsprodukt des Philadelphia-Chromosoms ausgerichtet ist. Daraus resultiert eine längere Überlebensrate und eine verminderte Rezidivrate (Brissot et al., 2014). Ähnlich verhält es sich mit einer Reihe von humanisierten monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmarker, wie z.B. das Rituximab. Dieses wirkt zielgerichtet gegen CD20 auf B-Zellen und wird gegen B-Linien-ALL eingesetzt (Litzow, 2013). Als Feld für zielgerichtete Therapieregimen werden zunehmend Fusionsproteine aus Translokationen bei Leukämien in den Fokus genommen (Velders et al., 2001). Ähnlich wie das verwendete Imatinib gegen das Fusionsprodukt des Philadelphia-Chromosoms, könnte das TEL/AML1 Onkoprotein als Produkt der Translokation t(12;21)(p13;q22) ein spezifisches Angriffsziel für neue Therapieansätze bieten. Das TEL/AML1-Protein setzt sich dabei aus dem TEL-Protein und dem AML1-Protein zusammen.

### **1.3 TEL-Protein**

Das TEL-Protein (Translocation Ets-leukemia) auch bekannt als ETV6 (ets variant Gen 6) ist ein Transkriptionsfaktor der ets (E-26 transforming specific) Familie und wird vom TEL-Gen auf Chromosom 12p13 kodiert. Dabei scheinen Mutationen des Chromosom 12 Ursachen diverser Leukämien zu sein (Kobayashi et al., 1994). *Johannson et al.* zeigten, dass die Deletion des kurzen Arms von Chromosomen 12 (del(12p)) eine der häufigsten Deletionen bei der ALL und AML darstellen (Johannson et al., 1993). Mittlerweile sind mehr als 40 Translokationen mit dem TEL-Gen bekannt (Tabelle 5) (Odero et al., 2001).

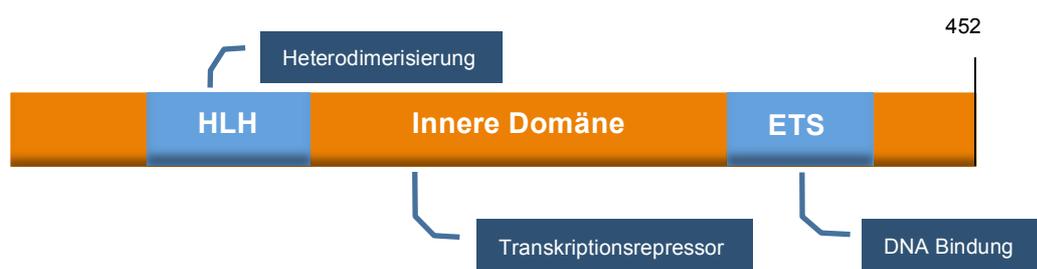
TEL-Fusionspartner	Translokation	Erkrankung	Referenz
TEL/AML1	t(12;21)(p13;q22)	ALL	(Shurtleff et al., 1995)
TEL/MN1	t(12;22)(p13;q11)	AML, MDS	(Buijs et al., 1995; Buijs et al., 2000)
TEL/NTRK3	t(12;15)(p13;q25)	AML, sekretorisches Mammakarzinom	(Eguchi et al., 1999; Tognon et al., 2002)
TEL/JAK2	t(9;12)(p24;p13)	Prä-B-Zell-ALL, T-ALL	(Lacronique et al., 1997; Peeters et al., 1997)

**Tabelle 5:** Auswahl an TEL-Fusionspartner aus chromosomalen Translokationen; MN: Meningeoma; NTRK: Neurotrophische Tyrosinrezeptorkinase; JAK: Januskinase. (Nach Bohlander et al. 2005)

### 1.3.1 Struktur des TEL-Proteins

Das TEL-Protein besteht aus 452 Aminosäuren und es existieren zwei Isoformen. Wie alle Proteine der ets-Familie enthält das TEL-Protein eine ets-Domäne (Mavrothalassitis et al., 2000). Die ets-Domäne (Abbildung 4) dient der Bindung an eine spezifische DNA-Sequenz und der Protein-zu-Protein Interaktion (Oikawa et al., 2003).

Eine weitere wichtige Domäne ist die HLH-Domäne (Helix-loop-Helix). Ihre Funktion beinhaltet die Heterodimerisierung, d.h. die Herstellung einer Verknüpfung zwischen zwei verschiedenen Molekülen, in diesem Fall zwischen Transkriptionsproteinen (Grimshaw et al., 2004).



**Abbildung 4:** TEL-Proteinstruktur 452: Anzahl der Aminosäuren; Beschriftung in dunkelblau: Funktion der jeweiligen Domäne (Eigene modifizierte Abbildung nach De Braekeleer et al., 2012)

### 1.3.2 Funktion des TEL-Proteins

Es konnte in mehreren Studien demonstriert werden, dass das TEL-Protein essenziell für die Entwicklung der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark ist (L. C. Wang et al., 1998). Weitere Studien haben gezeigt, dass das TEL-Protein ein starker

Transkriptionsrepressor ist. Insbesondere die HLH-Domäne und die innere Domäne zwischen der HLH- und der ets-Domäne sind für die Repressionsfunktion verantwortlich (Chakrabarti et al., 1999; Lopez et al., 1999). Außerdem scheint das TEL-Gen eine Funktion als Tumorsuppressor-Gen zu haben (Bohlander, 2005). In 70% der Fälle einer pädiatrischen TEL/AML1 positiven ALL, findet sich eine Deletion des nicht translozierten zweiten TEL-Gens (Cave et al., 1997).

### **1.3.3 TEL assoziierte hämatopoetische Erkrankungen**

Seit dem Nachweis des TEL-Gens 1994 in der Translokation t(5;12) bei einem Patienten mit chronisch myelomonozytärer Leukämie (Golub et al., 1994), wurden viele weitere Translokationen mit dem TEL-Gen bei malignen hämatologischen Erkrankungen entdeckt (Tabelle 5) (Berger et al., 1997; Tosi et al., 1998; Wlodarska et al., 1998). Durch die Translokation und Bildung von Fusionsgenen hat sich eine wichtige Funktion des TEL-Gens als Tumorsuppressor-Gen gezeigt, die dabei scheinbar verloren geht. Es konnte bei einer T-ALL mit einer TEL/ABL2 Translokation die Ausschaltung des nichttranslozierten TEL-Gens auf dem zweiten Chromosomen durch Punktmutation beobachtet werden (L. Wang et al., 2001). Weitere Studien am Maus-Modell demonstrierten ebenfalls, dass das TEL-Gen eine zentrale Rolle bei der Suppression von Leukämien spielt (Lowell, 2004; McWhirter et al., 1993).

Daraus resultiert, dass nach der Fusion eine vollkommen neue Funktion des Fusionsgens entsteht, die zu einer Leukämie führen kann (Bohlander, 2005; De Braekeleer et al., 2012). Ein prominentes Beispiel dafür ist das TEL/AML1 Fusionsgen (Bohlander, 2005). Als Fusionspartner für das TEL-Gen dient dabei das AML1-Gen. Von Interesse dabei ist, dass der Transkriptionsfaktor AML1 mit seinem Co-Faktor CBF $\beta$  der häufigste Angriffspunkt ist, wenn es infolge von Translokationen zu akuten Leukämien kommt (Okuda et al., 1996).

## 1.4 AML1-Protein

Das akut myeloische leukämische 1-Protein (AML1) ist unter einer Vielzahl von Namen bekannt, die die Vielfalt der Assoziationen und Funktionen von AML1 beschreiben (Tabelle 6). Es spielt eine zentrale Rolle in der Hämatopoese und ist in vielen Translokationen involviert, die zu einer Leukämie führen (Lam et al., 2012). Der Einfachheit halber verbleiben wir bei AML1 als Synonym.

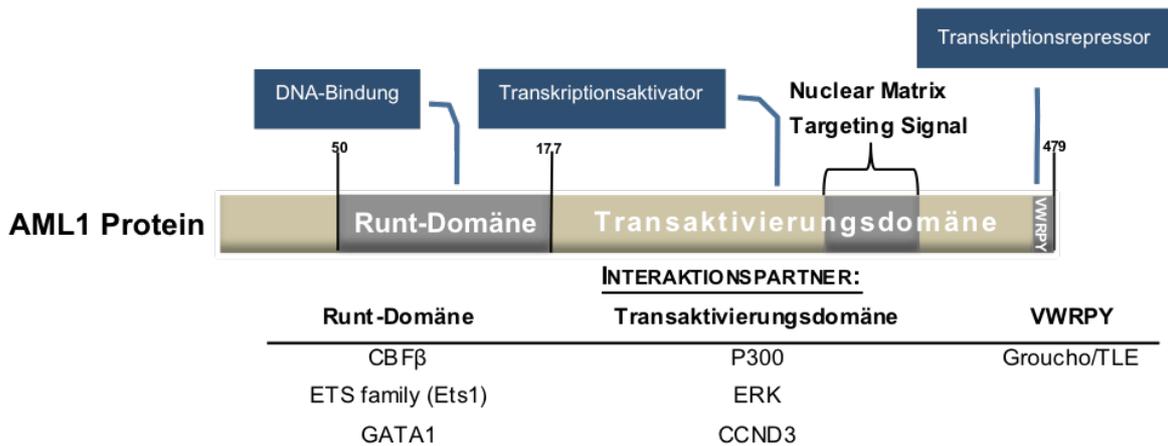
Nomenklatur	Abkürzungen
Runx1 (Drosophila)	Runx1
Acute myelogenous leukemia ( <b>Tang et al.</b> )	AML
Polyomavirus enhancer-binding protein 2 alpha subunit (mouse)	PEBP2alpha
Enhancer core-binding factor $\alpha$ of murine leukemia viruses	CBFalpha
Polyoma enhancer A-binding factor 2 (mouse)	PEA2
SL3-3 and AKV core-binding factor (mouse)	S/A-CBF
Nuclear factor delta E3A ( <b>Tang et al.</b> )	NF-deltaE3A
Myeloid nuclear factor 1 (mouse)	MyNF1
Osteoblast-specific factor 2 (mouse)	OSF2
T-cell tumor integration locus 1 protein (mouse)	til-1
Runt domain-encoding gene (Caenorhabditis elegans)	run

**Tabelle 6:** Synonyme für Runt-verwandte DNA-bindende Aktivitäten und deren Abkürzungen

(van Wijnen et al., 2004)

### 1.4.1 Struktur des AML1-Proteins

AML1-Protein, auch bekannt als RUNX1 (Runt-related transcription factor 1), ist ein Transkriptionsfaktor, welcher vom AML1-Gen auf Chromosom 21q22 kodiert wird. Als Merkmal der RUNX-Proteine besitzen alle eine DNA-bindende Runt-Domäne (Abbildung 6) (Lam et al., 2012). Das AML1-Protein wurde erstmals in der DNA (Desoxyribonucleic acid) eines AML-Patienten identifiziert (Miyoshi et al., 1991).



**Abbildung 5:** AML1-Protein und einige Interaktionspartner (Eigene Abbildung nach Zelent et al., 2004). Dunkelblaue Beschreibungen: Funktion der Domänen; Interaktionspartner: Dargestellt sind weitere Co-Faktoren, die mit den jeweiligen Domänen interagieren; GATA1: Globin Transkription Faktor1; ERK: Extrazellulär-signal regulierte Kinase; CCND3: Cyclin D3; TLE: transducin-like Enhancer of split Proteins;

Die Runt-Domäne von AML1 bindet an die DNA, wobei die Bindungsfähigkeit verstärkt wird durch Bildung eines Heterodimers mit dem Co-Faktor CBFβ (Core-binding Factor β), welches selbst keine Bindung mit der DNA eingehen kann. Das Heterodimer aus AML1 und CBFβ erhöht die Affinität von AML1 zur DNA (Ogawa et al., 1993; S. Wang et al., 1993). Erkrankungen wie die akute myeloische Leukämie (AML), familiäre Thrombozytopenie und myelodysplastisches Syndrom (MDS) weisen häufig Mutationen im DNA-Bindungsbereich der Runt-Domäne auf (Bartfeld et al., 2002; Tahirov et al., 2001; Warren et al., 2000). Das AML1-Protein verfügt über zwei weitere wichtige Regionen:

1. Eine *nuclear matrix targeting Signal* (NMTS) befindet sich im C-terminalen Bereich der Transaktivierungsdomäne. An diese Region binden verschiedene Co-Faktoren, um die Transkriptionsaktivität von AML1 zu regulieren (Zeng et al., 1998).
2. Am C-terminalen Ende von AML1 befindet sich die Aminosäuresequenz VWRPY über welche alle Mitglieder der Runt-Familie verfügen. Diese Sequenz vermittelt mit den Co-Faktoren Groucho/TLE (transducin-like Enhancer of split proteins) die Repressoraktivität von AML1 (Abbildung 5) (Aronson et al., 1997).

Das NMTS und die Aminosäuresequenz VWRPY spielen gemeinsam eine wichtige Rolle für die T-Zell-Entwicklung (Telfer et al., 2004).

Neben seiner Interaktion mit CBF $\beta$  wird die Transkriptionsaktivität des AML1-Proteins durch weitere Transkriptionsfaktoren und Co-Regulatoren determiniert (Abbildung 6). Das AML1-Protein interagiert zum Beispiel mit dem Transkriptionsfaktor Ets1 (V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene Homolog 1), um die Gene des T-Zell-Rezeptors zu regulieren (Gu et al., 2000).

#### **1.4.2 Rolle in der Hämatopoese**

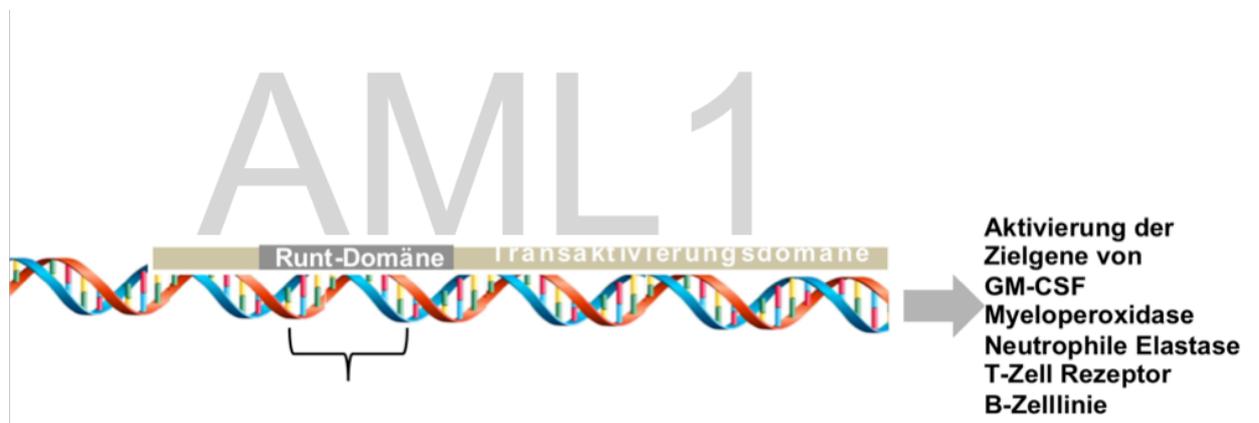
Die Hämatopoese läuft in zwei Phasen ab: Die erste Phase ist die primitive Hämatopoese, d.h. die Differenzierung von primitiven Makrophagen und frühen Erythrozyten im Dottersack im Rahmen der embryonalen Entwicklung (Palis et al., 1999). Die zweite Phase ist die definitive Hämatopoese. Das AML1 spielt dabei eine essenzielle Rolle als regulierender Transkriptionsfaktor (Lam et al., 2012; Rossetti et al., 2013; Zelent et al., 2004). Es reguliert die Differenzierung der verschiedenen reifen Zelllinien aus den hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) (Lam et al., 2012).

Die HSZ finden sich zuerst in der frühen Aorta, den Gonaden und dem Mesonephros<sup>1</sup> von Säugetieren. Sie wandern dann in die fetale Leber und beginnen mit der definitiven Hämatopoese (Medvinsky et al., 1996). Bei Mäuse-Embryos konnte AML1 in diesen Organen während der Embryogenese ermittelt werden (North et al., 1999). Bei AML1-negativen Mäusen kam es hingegen zu einem vollständigen Fehlen der definitiven fetalen Hämatopoese (Okuda et al., 1996; Q. Wang et al., 1996). Dieses zeigt eine elementare Rolle von AML1 in der Entwicklung der HSZ.

Als Transkriptionsfaktor bindet und reguliert AML1 an Promoter von Genen der myeloischen Zelllinie, wie zum Beispiel Interleukin-3 (IL-3), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF), Myeloperoxidase und neutrophile Elastase (Abbildung 6). Des Weiteren werden die T- und B-Zelllinien reguliert (Lam et al., 2012).

---

<sup>1</sup> Mesonephros: transitorisches Ausscheidungsorgan des Embryos



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Transkriptionsaktivierung durch AML1-Protein (eigene modifizierte Abbildung nach Sawyers, 1998)

### 1.4.3 AML1 assoziierte hämatopoetische Erkrankungen

Da AML1 eine zentrale Rolle als Transkriptionsfaktor in der Hämatopoese spielt, sind auch die assoziierten Erkrankungen hämatopoetischer Natur und beruhen entweder auf Mutation in der DNA-Sequenz von AML1 (Osato, 2004) oder auf strukturellen chromosomalen Veränderungen wie Translokationen (t).

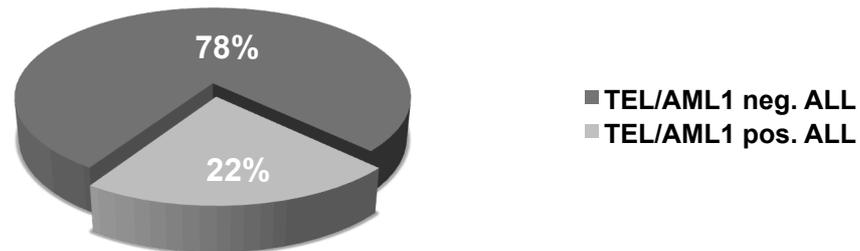
Häufig führen die Mutationen von AML1 zur Entwicklung von Leukämien. Das AML1-Gen ist dabei der häufigste Angriffspunkt für chromosomale Translokationen bei akuten Leukämien (Lam et al., 2012). Die drei häufigsten chromosomalen Translokationen, die das AML1-Gen betreffen, sind AML1-ETO, TEL-AML1 oder die Fusion mit einem der drei Gene EVI, MDS1 oder EAP auf Chromosomen 3 (Tabelle 7).

AML1-Fusionspartner	Translokation	Erkrankung	Referenz
TEL/AML1	t(12;21)(p13;q22)	ALL	(Shurtleff et al., 1995)
AML1/ETO	t(8;12)(q22;q22)	AML	(Peterson et al., 2007)
AML1/EVI	t(3;12)(q26;q22)	CML, MDS, AML	(Rubin et al., 1987)
AML1/MDS1			(Zent et al., 1996)
AML1/EAP			(Rubin et al., 1990)
			(Nucifora et al., 1994)

**Tabelle 7:** Häufigste Translokationen mit AML1 bei akuten Leukämien; ALL: Akute lymphatische Leukämie; AML: Akute myeloische Leukämie; MDS: Myelodysplastisches Syndrom; CML: Chronisch Myeloische Leukämie; ETO: Eight-Twenty One Oncoprotein; EVI: Ecotropic Virus Integration; EAP: Extrazelluläres Adhärenz-Protein; (Abbildung nach Lam et al., 2012)

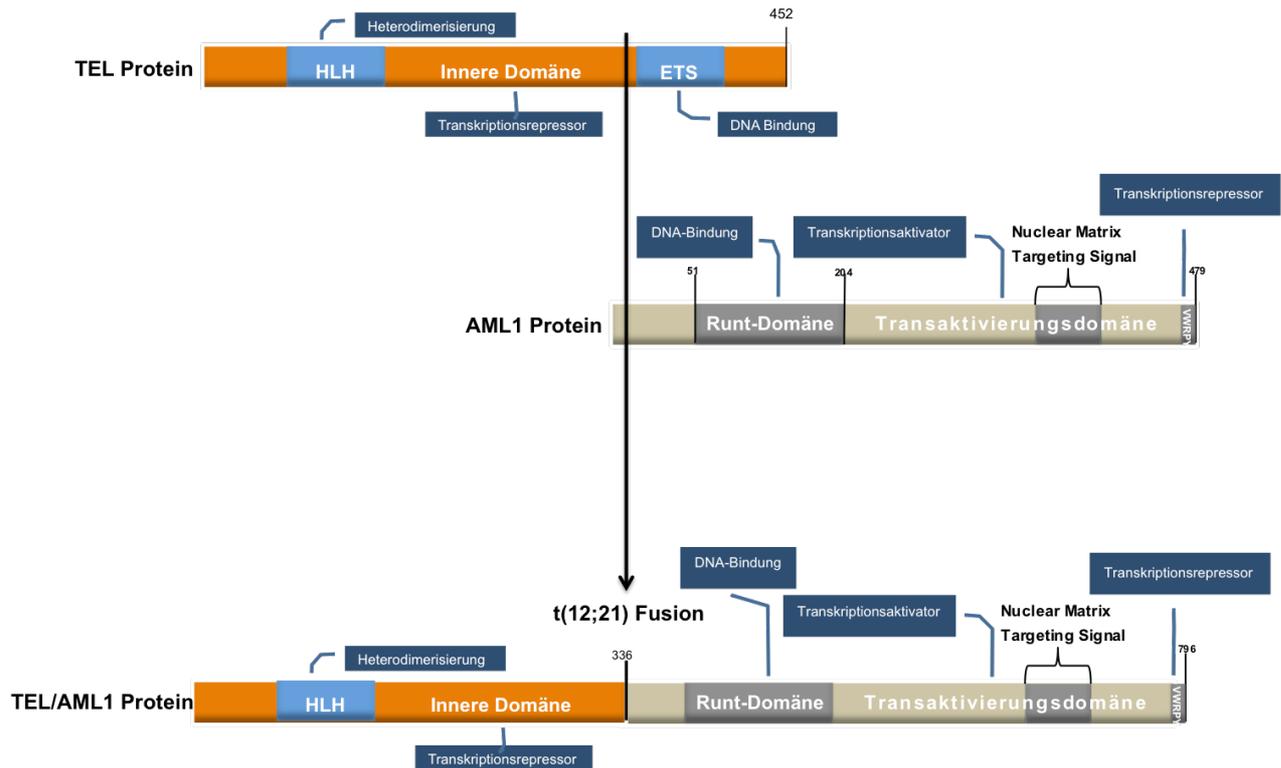
## 1.5 Fusionsprotein TEL/AML1

Die Translokation t(12;21)(p13;q22) von TEL/AML1 kommt am häufigsten bei der kindlichen B-Vorläufer-Zell-ALL vor (Shurtleff et al., 1995; Takahashi et al., 1998). Sie findet sich bei ungefähr 22% aller kindlichen ALL (Abbildung 8) (Mullighan, 2012; Shurtleff et al., 1995).



**Abbildung 7:** Anteil von TEL/AML1 an pädiatrischen ALL Erkrankungen (Eigene Abbildung nach Shurtleff et al., 1995).

Das Fusionsgen TEL/AML1 besteht fast aus dem kompletten AML1-Gen mit einem Bruch am ehesten im Intron 1 oder 2 und dem TEL-Gen mit einem Bruch in der Region zwischen Exon 5 und 6 (Baens et al., 1996; Romana et al., 1995). Dadurch kodiert das Fusionsgen die HLH-Domäne und innere Domäne (Repressionsdomäne) ohne die DNA-bindende ets-Domäne des TEL-Proteins sowie die Runt-Domäne und die Transaktivierungsdomäne des AML1-Proteins (De Braekeleer et al., 2012; Golub et al., 1995; Romana et al., 1995; Zelent et al., 2004) (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des TEL-Proteins, AML1-Proteins und des aus der Translokation t(12;21) entstehenden Fusionsproteins TEL/AML1. Der schwarze Pfeil zieht durch die Bruchstellen und zeigt auf die Fusionsstelle von TEL/AML1 Protein. Dunkelblaue Beschreibungen: Funktion der Domänen (Eigene Abbildung nach Zelent et al., 2004).

### 1.5.1 Ätiologie

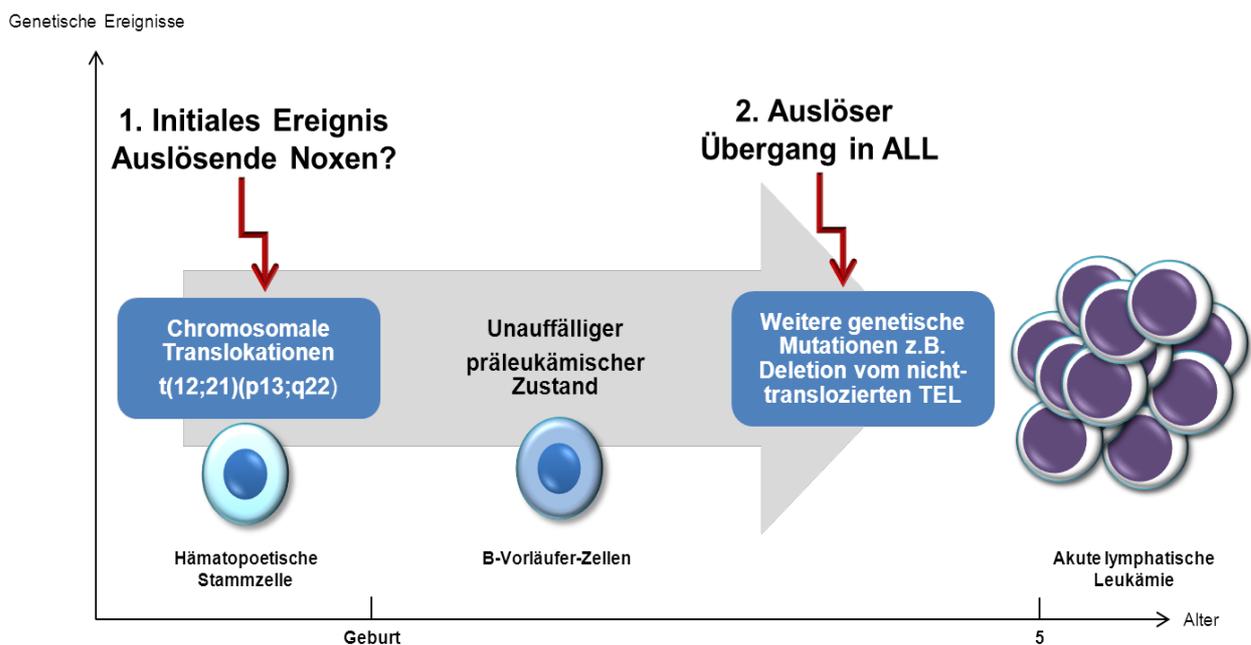
Die Ursache von Fusionsgenen sind häufig DNA-Doppelstrangbrüche, die unzureichend repariert werden und letztlich zu Fusionen von Genen wie TEL/AML1 führen (Greaves et al., 2003). Diese Fusionsgene können verminderte, gesteigerte, ausgeschaltete oder vollkommen veränderte Aktivitäten im Vergleich zu den Ursprungsgenen aufweisen (Look, 1997; Rowley, 1998). Bei den kindlichen Leukämien findet mit großer Wahrscheinlichkeit die Translokation während der fetalen Hämatopoese statt (Gale et al., 1997; Wiemels et al., 1999).

Die Gründe für diese Doppelstrangbrüche sind vielfältig und reichen von ionisierender Strahlung, Zytostatika oder können auch durch Mangel an Folsäure während einer Schwangerschaft entstehen (Robert Koch-Institut, 2012; Thompson et al., 2001). Eine genaue Ursache ist jedoch nicht bekannt.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass das Fusionsgen TEL/AML1 eine Leukämie initiieren kann, aber nicht ohne weitere Ereignisse zu einer Leukämie führt (Abbildung

9) (Andreasson et al., 2001; Bernardin et al., 2002; Yuan et al., 2001). Man weiß bei malignen Erkrankungen, dass für ihre Entstehung mehrere unterschiedliche genetische Mutationen notwendig sind (Hanahan et al., 2000). Dies bestätigt sich dadurch, dass die TEL/AML1 Translokationen auch bei Gesunden ohne Ausbruch einer Leukämie vorkommen (Mori et al., 2002).

Zusammenfassend führt das TEL/AML1-Fusionsprotein durch Veränderung der Apoptose-Eigenschaften und Regenerationsfähigkeiten zu einem präleukämischen Zustand, welcher in Kombination mit genetischen Mutationen in einem Vollbild einer ALL resultieren kann (Hong et al., 2008; Tsuzuki et al., 2012).



**Abbildung 9:** Mögliche Ätiologie, die zum Ausbruch einer TEL/AML1-positiven ALL führen kann. Eigene Abbildung nach (Zelent et al., 2004)

### 1.5.2 Wirkung der TEL/AML1 Translokation

**Inaktivierung von TEL** - Es ist bekannt, dass die Translokation von TEL/AML1 allein nicht ausreicht, um eine ALL auszulösen (Zelent et al., 2004). Ein weiteres häufiges Ereignis, welches damit einhergehen kann, ist die Deletion von 12p (del(12)(p12)) mit dem gleichnamigen Verlust des nichttranslozierten TEL-Gens (Cave et al., 1997; Raynaud et al., 1996). Aber auch in Fällen ohne TEL-Deletion, kommt es zu einem Funktionsverlust des normalen TEL-Gens (Patel et al., 2003). Dieses erfolgt durch die HLH-Domäne von TEL/AML1 vermittelten Heterodimerisierung und dem daraus resultierenden Abfangen des TEL-Proteins (Bernardin et al., 2002; Rubnitz et al., 1999; Zelent et al., 2004). In Konsequenz kann die Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens TEL als weiteres Ereignis zur ALL führen (Lopez et al., 1999; Raynaud et al., 1996).

**Wirkung auf AML1-Zielgene** - Das TEL/AML1 Fusionsprotein kann aufgrund seiner DNA-bindenden RUNT-Domäne, wie das AML1-Protein, an die Zielgene von AML1 binden. Statt eine aktivierende hat es jedoch eine transkriptional repressive Funktion (Fears et al., 1996; Hiebert et al., 1996). Die Umwandlung eines Transkriptionsfaktors von einem Aktivator zu einem Repressor durch chromosomale Translokation findet sich nicht nur bei der ALL, sondern auch bei der akuten myeloischen Leukämie, die ebenfalls Fusionsproteine mit AML1 bildet (Hiebert et al., 2001; Lin et al., 2001; Pui, Relling, et al., 2004).

In diesem Fall wird die Repressionsfunktion durch die HLH-Domäne und die Transaktivierungsdomäne vermittelt, die eine hohe Affinität mit den Protein-Co-Repressoren N-CoR (Nuclear receptor co-repressor 1) und mSin3 haben. Dieser Komplex aktiviert Histondeacetylasen (HDAC), die die DNA-Bindung an Histone verstärken, die Chromatinstruktur verdichten und dadurch das Ablesen sowie Transkription unterbinden (Chakrabarti et al., 1999). Durch die Entstehung des Fusionsproteins kann die Affinität dieser Domänen für diese Protein-Co-Repressoren noch weiter verstärkt werden (Fenrick et al., 1999; Guidez et al., 2000; Hiebert et al., 1996).

In einer Studie von *Tsuzuki et al.* konnte dazu gezeigt werden, dass es durch eine induzierte TEL/AML1 Translokation in einem Maus-Modell zu einer Repression der B-

Zell-Differenzierung auf einer Vorläufer-B-Zellstufe kommt und akkumuliert (Tsuzuki et al., 2004). Auch in der Studie von *Fuka et al.* konnte in Zelllinien durch Knock-down von TEL/AML1, einer Herabregulation der Genexpression auf RNA-Ebene, eine Repression der Apoptose und Differenzierung gezeigt werden (Fuka et al., 2011). Diese Ergebnisse demonstrieren die Bedeutung der TEL/AML1 Translokation für die Pathogenese der ALL.

### **1.5.3 Therapiemöglichkeiten**

Die Therapie der ALL besteht aus einer Chemotherapie mit Induktionstherapie, Konsolidierungstherapie und einer mehrjährigen Erhaltungstherapie (Classen, 2004). Je nach Risikostratifikation erfolgt nach der Konsolidierungstherapie eine Stammzelltransplantation (Abbildung 3) (Classen, 2004; N. et al., 2005).

Obwohl Therapieregime für die ALL existieren, könnten Therapien auf molekularbiologischer Ebene weitaus gezielter und wahrscheinlich auch nebenwirkungsärmer sein, was insbesondere bei dem vorwiegend pädiatrischen Patientenkollektiv der ALL eine große Rolle spielt (Loh et al., 2002).

Ein Beispiel für eine gezielte Therapie sind Substanzen, welche die repressiven Co-Faktoren von TEL/AML1 inhibieren und die TEL/AML1-induzierte Differenzierungsblockade aufheben. Es ist mittlerweile bekannt, dass die Blockade von HDACs im TEL/AML1 Komplex mit N-CoR/mSin3 durch HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A die TEL/AML1 Repression vermindert (Fenrick et al., 1999; Guidez et al., 2000).

Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz bei der TEL/AML1 positiven ALL könnte eine dendritische Zellvakzine sein. Die TEL/AML1 Translokation bei Erstdiagnose einer ALL hat eine gute Prognose bei einer Überlebensrate von 89-100 % (McLean et al., 1996; Shurtleff et al., 1995). Aus diesem Grund spielt die Kenntnis dieses Prognosefaktors eine essenzielle Rolle für die richtige Therapieentscheidung und könnte zugleich Angriffspunkte für neue nebenwirkungsarme Therapiemöglichkeiten bieten.

## 1.6 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind Bestandteil des Immunsystems. Sie wurden 1973 von Ralph Steinmann beschrieben als Zellen mit astartigen Zytoplasmaausläufern beschrieben (lat. *Dendriticus* - verzweigt) (Steinman et al., 1973).

DCs gehören zusammen mit Monozyten, Makrophagen und B-Zellen zu den Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und bilden eine essenzielle Schnittstelle zwischen der angeborenen und spezifischen Immunabwehr. DCs zeigen eine hohe Expression von MHC II Molekülen (Major Histocompatibility Complex). MHC II Moleküle befinden sich vermehrt auf APCs und werden mit extrazellulären Proteinen beladen, die prozessiert und als Antigene der spezifischen Immunabwehr präsentiert werden (Naik et al., 2007).

**Antigen Prozessierung** - Die DCs bilden die potentesten APCs aufgrund ihrer überlegenen Fähigkeit, exogene Antigene durch Phagozytose aufzunehmen und in Endosomen zu Peptiden zu prozessieren. Die Peptide werden auf MHC II Moleküle auf der Zelloberfläche geladen und den CD4+ T-Zellen präsentiert (Banchereau et al., 2000). Nur APCs können exogene Proteine mit MHC II präsentieren. DCs sind zusätzlich in der Lage, exogene Proteine an MHC I zu binden und durch Kreuzpräsentation CD8+ T-Zellen zu präsentieren (Banchereau et al., 2000). Endogene Antigene werden im Zytosol durch Proteasome abgebaut und mit MHC I Molekülen auf der Zelloberfläche der CD8+ T-Zellen präsentiert. Neben DCs sind auch die meisten anderen Zelltypen zu diesem Schritt in der Lage (Banchereau et al., 2000; Guermonprez et al., 2002).

**DC Reifung** – Durch exogene oder endogene Stimuli entwickeln sich reife DCs. Exogene Signale sind mikrobielle Produkte, die z.B. an TLR (Toll-ähnliche Rezeptoren) binden und die DCs aktivieren (Akira et al., 2004). Endogene Signale sind vor allem inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IFN-  $\alpha$ , die durch Zellen der Immunabwehr selbst bzw. von beschädigtem Gewebe freigegeben werden (Skoberne et al., 2004). Reife DCs zeichnen sich durch Abnahme der Phagozytose-Aktivität, Migration in die Lymphorgane und verstärkter Aktivierung der B- und T-Zellen aus. Außerdem führt die Reifung zur Expression von spezifischen immunphänotypischen

Oberflächenmerkmalen (Cluster of Differentiation (CD)), wie CD80 und CD86, die an CD28 auf T-Zellen binden und neben dem MHC II-Antigen-Komplex als zweites Signal zu einer T-Zellaktivierung führen (Peggs et al., 2008). Ein weiterer wichtiger Oberflächenmarker von DCs ist CD40, der bei der DC Reifung hochreguliert ist. Die Bindung von CD40 am korrespondierenden CD40 Ligand auf aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen führt bei DCs zu einer vermehrten Produktion von Zytokinen (TNF- $\alpha$  und IL-12), zu verstärkter Expression von MHC Molekülen und verlängerter Überlebensrate (Elgueta et al., 2009).

**Immunreaktion** – Die reifen DCs wandern in die von T- und B-Zellen bewohnten sekundären lymphatischen Organe, wie z.B. Lymphknoten, Peyersche Plaques und die Milz. Die T-Zellen binden durch ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) an die präsentierten MHC-Peptid Komplexe der DCs. Dabei werden Peptide an MHC I von CD8+ zytotoxischen T-Zellen (CTL) und an MHC II von CD4+ T-Zellen identifiziert (Banchereau et al., 2000). Die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen kann zur klonalen Expansion und Differenzierung in Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen führen. Darüber hinaus aktivieren DCs auch B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK) (Jego et al., 2005; Munz et al., 2005).

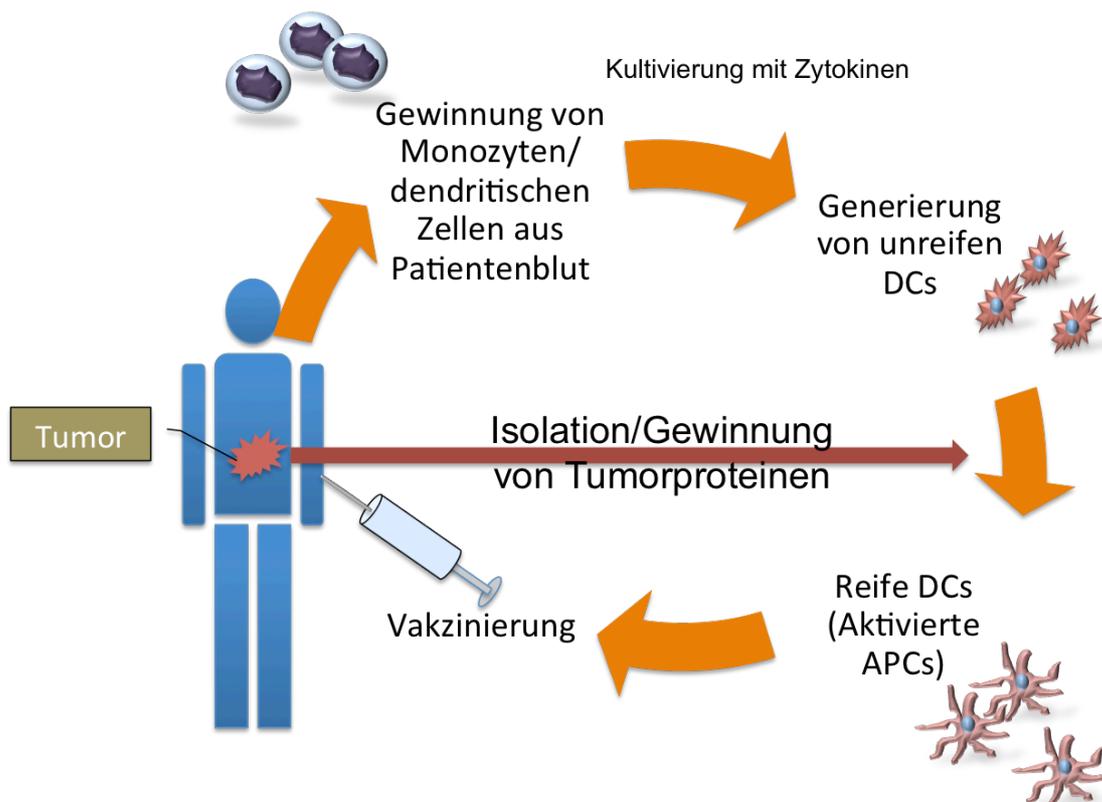
Die Aktivierung unterschiedlicher Immunzellen zeigt die zentrale Rolle von DCs. Dendritische Zellen können dadurch einen wichtigen Therapieansatz in der Behandlung immunassoziierter Erkrankungen spielen. Bei autoimmunen Erkrankungen, wie z.B. Psoriasis, konnten *Lowes et al.* zeigen, dass die erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF-alpha, durch DCs mitverursacht wird. In derselben Studie konnte durch den monoklonalen Antikörper Efalizumab die Infiltration durch DCs reduziert werden (Lowes et al., 2005). Im Bereich von Infektionserkrankungen, wie z.B. HIV (Human Immunodeficiency Virus), wurden in der Studie von *Trumpfheller et al.* DCs als Träger für spezifische Antigene gegen HIV bei Mäusen im Rahmen einer Vakzinierung verwendet (Trumpfheller et al., 2006).

Die hohe Sterblichkeit und nebenwirkungsreichen Therapien bei malignen Erkrankungen eröffnen ein weiteres Feld für DC-Therapien, da die Stimulation des

Immunsystems einen spezifischeren Ansatz und eine nebenwirkungsärmere Alternative bieten könnte (Blattman et al., 2004; Steinman, 2007; Waldmann, 2003).

### 1.6.1 Dendritische Zelltherapien bei malignen Erkrankungen

Das Prinzip der dendritischen Zelltherapie gegen Krebserkrankungen basiert auf der Stimulation des Immunsystems gegen maligne Zellen oder Tumorantigene (Mody et al., 2015). Der Vorstellung der Immuntherapie liegt zugrunde, dass Tumore über Tumorproteine verfügen, die durch ihr nicht-natürliches Vorkommen eine Immunreaktion auslösen können. Durch die Präsentation von Tumorantigenen durch dendritische Zellen können die DCs an der Schnittstelle zwischen angeborener und spezifische Immunabwehr eine antitumoröse zytotoxische T-Zell-Reaktion auslösen (Abbildung 10) (Palucka et al., 2012). Diese Stimulation erfolgt durch eine Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) sowie natürlichen Killerzellen, CD4+ und CD8+ T-Zellen (Janeway et al., 2002; Joffre et al., 2012; Lizee et al., 2013).



**Abbildung 10:** Eigene schematische Darstellung vom Ablauf einer dendritischen Zellvakzinierung nach Mody, et al. 2015. Der rote Pfeil verdeutlicht die Gewinnung von Tumormaterial, welches DCs präsentiert, phagozytiert und als Antigene dem Immunsystem präsentiert wird. DC: Dendritische Zellen; APC: Antigenpräsentierende Zellen.

Entscheidend für die Entwicklung der dendritischen Zelltherapie war 1973 die Identifizierung von dendritischen Zellen (DCs) als Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) durch *Steinman et al.* (Steinman et al., 1973). DCs internalisieren durch Phagozytose oder Endozytose Antigene, die proteolytisch verarbeitet werden und dann auf zwei Wegen dem spezifischen Immunsystem, vor allem den CD4+ und CD8+ T-Zellen, präsentiert werden (Banchereau et al., 2000).

Zum einen werden die prozessierten Antigene mit MHC Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche von DCs den CD4+ T-Zellen präsentiert (Inaba et al., 2000; Turley et al., 2000). Durch die Aktivierung produzieren CD4+ T-Zellen Zytokine wie IFN- $\gamma$  und IL-4, die eine Immunreaktion induzieren und die Proliferation von CD8+ T-Zellen bewirken (Hung et al., 1998; Joffre et al., 2012; Larsson et al., 2001; Lizee et al., 2013). Außerdem aktivieren CD4+ T-Zellen B-Lymphozyten, wodurch ebenfalls eine Immunreaktion ausgelöst wird (Janeway CA Jr, 2001).

Der zweite Mechanismus, entscheidend für den Erfolg einer dendritischen Zelltherapie, ist die Kreuzpräsentation. Darunter versteht man die Phagozytose exogener Antigene durch DCs, endogene Prozessierung und Präsentation über MHC I an CD8+ T-Zellen, die entscheidend für den Erfolg der Vakzintherapie eine zytotoxische T-Zellreaktion auslösen (Larsson et al., 2001; Mody et al., 2015). Grundsätzlich spielt die Präsentation von Antigenen über MHC I eine essenzielle Rolle bei Immunantworten im Rahmen von Transplantationsreaktionen und Toleranz gegenüber den körpereigenen Antigenen (Larsson et al., 2001).

Vorteile einer DC-Immuntherapie sind vor allem die gute Verträglichkeit und geringe Nebenwirkungsrate, die Möglichkeit der therapeutischen Immunisierung, d.h. spezifische Immunreaktion gegen die Krebsform, Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses sowie eine verminderte Rezidivwahrscheinlichkeit (Anguille et al., 2014; Blattman et al., 2004; Waldmann, 2003).

Dendritische Zelltherapien befinden sich bei zahlreichen Krebserkrankungen mittlerweile in verschiedenen Forschungsstadien. *Wang et al.* hat in Tiermodellen die Effektivität der DC-Vakzinierung vom HPV16-Antigen, HPV16E7-Peptid, (Humanes

Papilloma Virus) beim Zervix-Karzinom untersucht. Dabei konnte er eine Abnahme der Tumorgröße nachweisen und ein erhöhtes IgG Level demonstrieren. Außerdem wurde keine schädigende Wirkung auf gesunde Zellen nachgewiesen (H. L. Wang et al., 2014).

Die klinischen Ergebnisse der dendritischen Zelltherapien bei verschiedenen malignen Erkrankungen sind jedoch uneinheitlich (Kantoff et al., 2010; Schadendorf et al., 2006). In einer klinischen Phase-III Studie von *Schadendorf et al.* wurden im Rahmen der DC Vakzine mit Peptid beladene DCs gegen malignes Melanom der Standardchemotherapie mit Dacarbazine gegenübergestellt. Es konnte jedoch keine überlegene Wirkung der DC Vakzintherapie demonstriert werden (Schadendorf et al., 2006).

Es gibt auch vielversprechende Resultate, wie das der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) 2010 zugelassene Sipuleucel-T. Dabei handelt es sich um aktivierte DCs, die mit einer Prostata-spezifischen sauren Phosphatase, gekoppelt mit GM-CSF, bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom zum Einsatz kommen. In zwei Placebo-kontrollierten randomisierten Studien konnte demonstriert werden, dass die Überlebensrate unter Sipuleucel-T um 4 Monate gesteigert und die relative Mortalität um 22 % gesenkt wurde (Kantoff et al., 2010; Small et al., 2006).

Anhand der erwähnten Studien erkennt man, dass spezifische Tumorantigene eine essenzielle Voraussetzung für eine gezielte Immuntherapie sind, wie schon bei anderen malignen Erkrankungen, wie Melanomen und Nierenzell-Karzinomen demonstriert wurde (Hsu, et al., 1996; (Anguille et al., 2014).

Für den Erfolg einer dendritischen Zelltherapie sind laut *Mody et al.* folgende Eigenschaften entscheidend: Das Antigen muss tumorspezifisch sein; außerdem sollte es in der Lage sein, eine Immunantwort auszulösen und letztlich sollte es ausreichend auf DCs präsentiert werden, um eine adäquate zytotoxische T-Zellreaktion auszulösen (Mody et al., 2015).

Maligne Zellen enthalten häufig eine Vielzahl an Tumorantigenen, die eine immunogene Wirkung auf DCs haben können (Banchereau et al., 2005; Figdor et al., 2004). Aus diesem Grunde besitzen DCs die Kapazität, multiple Tumorantigene zu erkennen und nicht nur ein spezifisches Tumorantigen, was das Risiko, dem Immunsystem zu entgehen, minimiert (Banchereau et al., 1998). Diese Erkenntnis könnte bei der DC-Therapie der Leukämie eine entscheidende Rolle spielen.

### **1.6.2 Aus leukämischen Blasten generierte dendritische Zellen**

Leukämien sind bislang die einzige Krebsform, bei welcher DCs durch Zytokine direkt aus leukämischen Blasten generiert werden können (Li et al., 2006). Das hat zwei entscheidende Vorteile gegenüber konventionellen DC-Therapien, bei denen DCs mit Tumorantigenen beladen und dem Immunsystem präsentiert werden (Mody et al., 2015).

Zum einen können spezifische Tumorantigene dem Immunsystem vorgestellt werden, zum anderen präsentieren leukämische DCs dem Immunsystem zusätzlich eine Vielzahl an unbekanntem Tumorantigenen (Blair et al., 2001; B. A. Choudhury et al., 1999; Cignetti et al., 1999). In Studien konnten leukämische Blasten von AML- und CML-Patienten durch Zytokine in DCs umgewandelt werden (Cignetti et al., 1999; Kohler et al., 2000). Diese waren in der Lage, eine antileukämische T-Zell-Antwort auszulösen (B. A. Choudhury et al., 1999; Li et al., 2005). Am Beispiel von AML präsentieren die AML-DCs darüber hinaus spezifische Tumorantigene, kennzeichnend für die AML, wie Preferentially Expressed Melanoma (PRAME) oder Wilms-Tumor Gene-1 (WT-1). Sie bieten somit die Möglichkeit, sich in leukämische DCs umzuwandeln und neben unbekanntem Tumorantigenen auch spezifische Tumor-assoziierte-Antigene (TAA) zu präsentieren (Ikeda et al., 1997; Oka et al., 2000; Velders et al., 2001).

Eine Herausforderung bei der Behandlung der Leukämie stellt die geschwächte Immunabwehr der Patienten dar. Diese entsteht durch Tumorzellen-induzierte Immunsuppression und der verminderten Anzahl an DCs (Ju et al., 2010; Leung, 2009; Shibusu et al., 1998). Eine Lösung für dieses Problem bietet die *ex vivo* Generierung

von DCs aus leukämischen Blasten durch Zytokin-Mischungen (A. Choudhury et al., 1997; Wurtzen et al., 2001). Dies ist auch der Ansatz dieser Arbeit.

Als aussichtsreiche leukämische TAA haben sich Fusionsproteine aus Translokationen bei Leukämien erwiesen (Velders et al., 2001). Beispiele hierfür sind das PML/RAR $\alpha$  und das BCR/ABL Fusionsprotein (Bocchia et al., 1996; Bosch et al., 1996; Gambacorti-Passerini et al., 1993). Das BCR/ABL Fusionsprotein entsteht durch die Translokation t(9;22), auch bekannt als das Philadelphia Chromosom. Es tritt bei 2 % bis 6 % der kindlichen ALL auf und hat eine ungünstige Behandlungsprognose (Fletcher et al., 1991; Hoelzer, 1994; Lestingi et al., 1993). Eine weitere leukämiespezifische TAA ist das TEL/AML1 Fusionsprotein resultierend aus der Translokation t(12;21)(p13;q22). *Yotnda et al.* haben 1998 zum ersten Mal gezeigt, dass das TEL/AML1 Fusionsprotein eine zytotoxische T-Zellreaktion auslöst und somit als Angriffspunkt für eine leukämiespezifische DC-Therapie geeignet wäre (Yotnda et al., 1998).

### **1.6.3 Zytokinkombination zur Umwandlung in leukämische DCs**

In dieser Arbeit wurden leukämische Blasten-Zelllinien mit Zytokinen versetzt und in leukämische dendritische Zellen umgewandelt. Für die Umwandlung von leukämischen Blasten zu leukämischen DCs existieren zahlreiche Protokolle in der Literatur (Joshi et al., 2002; Pospisilova et al., 2002; Woiciechowsky et al., 2001). Für die Differenzierung haben sich die Zytokine IL-4, TNF $\alpha$ , SCF, CD40L und GM-CSF als erfolgsversprechend erwiesen (Hagihara et al., 2001; Oehler et al., 2000; Tsuchiya et al., 2002). Zusätzlich haben sich IL-3 und Flt-3L für die Differenzierung von DCs aus leukämischen Blasten in unserer Arbeitsgruppe bewährt (Schmidt et al., 2009). In der Studie von *Schmidt et al.* führte die Kombination von TNF $\alpha$ , GM-CSF, FLT-3L, SCF zusammen mit IL-3 und IL-4 zu einer gesteigerten Generierung von leukämischen DCs aus ALL-Patientenblasten (Schmidt et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Zytokinkombination (Cocktail 5) als Grundlage verwendet (Tabelle 9, Kapitel 3.2.1.4.). Das Cocktail 5 wurde mit und ohne TEL/AML1 Peptid versetzt, um festzustellen, ob das Peptid eine zusätzliche Differenzierung bewirkt. Außerdem wurde CD40 Ligand verabreicht. Durch CD40 Ligand aktivieren CD4+ T-Helferzellen dendritische Zellen, die daraufhin zytotoxische CD8+ T-Lymphozyten (CTL) verstärkt aktivieren können (Diehl et al., 1999; Velders et al., 2001).

## 2 Fragestellung

Die Therapie der ALL basiert auf Chemotherapien bzw. der Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (N. et al., 2005). Eine dendritische Zellvakzine ist wahrscheinlich nebenwirkungsärmer, spezifischer und als mögliche Therapiealternative bzw. adjuvante Therapie ein vielversprechender Ansatz, insbesondere, wenn man bei der ALL das Kindesalter der Patienten bedenkt (Leonhartsberger et al., 2012; Madan et al., 2010; Mody et al., 2015).

In der Studie von *Moldenhauer et al.* konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu anderen leukämischen Zelllinien mit einer AML1-Translokation, die TEL/AML1 positive ALL-Zelllinie REH sich unter Zytokin-Stimulation und Histondeacetylaseinhibitoren in leukämische dendritische Zellen differenzieren lässt (Moldenhauer et al., 2004). In Vorarbeiten von *Schmidt et al.* wurden daraufhin mit Zytokincocktails erfolgreich Kulturbedingungen optimiert, um aus TEL/AML1-positiven leukämischen Blasten, TEL/AML1 positive APCs zu generieren (Schmidt et al., 2009).

Da ein körperfremdes Epitop durch die Fusion von TEL und AML1 aufgrund der chromosomalen Translokation t(12;21) entsteht, könnte dies auf antigenpräsentierenden DCs zu einer anti-leukämischen Immunantwort führen. Die Aminosäuresequenzen sowohl von TEL als auch von AML1 werden vom Immunsystem per se nicht als körperfremd angesehen aufgrund ihres natürlichen Vorkommens in hämatopoetischen Zellen. Die Peptidsequenz aus der Fusionsregion von TEL/AML1 wird jedoch nicht natürlich synthetisiert und hat somit die größte Wahrscheinlichkeit, eine Immunreaktion auszulösen. Eine Immunreaktion auf diese Peptidsequenz konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (Schmidt et al., 2009; Yotnda et al., 1998; Yun et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass die zusätzliche Gabe der TEL/AML1 Fusionssequenz die Zytokin-induzierte Differenzierung leukämischer TEL/AML1 positiver leukämischer Blasten in leukämische DCs erhöht. Dies könnte die Basis einer spezifischen DC-Therapie gegen die TEL/AML1 positive ALL bilden.

Daraus ergibt sich folgende Fragestellung:

Wie ist die Wirkung des Fusionspeptids TEL/AML1 in einer Konzentrationsreihe auf

- TEL/AML1 positive leukämische Zelllinien (REH)
- TEL/AML1 negative leukämische Zelllinien (K562)
- Humane Monozyten

auf die Differenzierung in DCs unter verschiedenen Kulturbedingungen?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verwendete Zellarten

**TEL-AML1 positive REH-Zelllinie** - Die REH-Zelllinie entspricht einer B-ALL und wurde aus dem Blut eines 15-jährigen nordafrikanischen Mädchens mit ALL kultiviert. Sie wurde 1974 etabliert und dient seitdem der Erforschung der ALL insbesondere für die Immuntherapie (Rosenfeld et al., 1977). Durch die Translokation  $t(12;21)(p13;q22)$  exprimiert die REH-Zelllinie das Fusionsgen TEL-AML. Diese Zelllinie wurde von ATCC<sup>2</sup> erworben.

**K562 Zelllinie** - Diese Zelllinie wurde von einer 53-jährigen Frau mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) gewonnen. Sie ist die erste humane Zelllinie, die für die myeloische Leukämie etabliert wurde (Lozzio et al., 1975). Da die Zelllinie der myeloischen Reihe entspringt, exprimiert sie keine B-Zell-Marker, aber weist durch die Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$ , das für die CML typische Philadelphia Chromosomen auf (Klein et al., 1976). Die K562-Zelllinie stellt eine gute Quelle von CML-Blasten mit aussagekräftigen Indikatoren der Malignität für klinische und experimentelle Studien dar. Diese Zelllinie wurde von ATCC<sup>6</sup> erworben.

**Monozyten** - Sie gehören zur unspezifischen Immunabwehr, erkennen körperfremde Antigene, können sich in Makrophagen umwandeln und Phagozytose durchführen. Sie sind auch Teil der APCs und können als dendritische Zellen körperfremde Antigene mit MHC II Komplexen präsentieren. Die Hälfte der Monozytenpopulation befindet sich in der Milz. Der andere Teil zirkuliert durch das Blut, bevor es ins Gewebe einwandert (Burmester, 1998). Die gewonnenen Monozyten für die Experimente wurden von freiwilligen Spendern sowie vom Institut für Transfusionsmedizin der Charité zur Verfügung gestellt.

---

<sup>2</sup> American Type Culture Collection, USA

### 3.1.2 Zytokine und Peptide

Zytokin	Spezifische Aktivität	Hersteller
CD40-Ligand(CD40L)	$\geq 1 \times 10^5$ U/mg	PeproTech EC Ltd., London, UK
Flt-3L	$> 1 \times 10^6$ U/mg	
GM-CSF	$\geq 1 \times 10^7$ U/mg	
Interleukin 3	$\geq 1 \times 10^6$ U/mg	
Interleukin 4	$> 5 \times 10^6$ U/mg	
Stem cell factor(SCF)	$> 5 \times 10^5$ U/mg	
TNF $\alpha$	$> 2 \times 10^7$ U/mg	

Peptid	Sequenz	Hersteller
TEL-AML1 Peptid	NH <sub>2</sub> -MPIGRIAECILGMNPS-COOH	Thermo Electron GmbH

### 3.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Substanzen	Hersteller
Fetal Bovine Serum (FBS) Superior	Biochrom AG, Berlin, D
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
RPMI <sup>3</sup> 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, D

<sup>3</sup> RPMI: Roswell Park Memorial Institut-Medium

### 3.1.4 FACS<sup>4</sup>-Antikörper

Antikörper	Markierung	Hersteller
Mouse IgG1 ImmunoTools GmbH, Friesoythe, D	FITC	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Anti-Human CD4		
Anti-Human CD4		
Anti-Human CD14		
Anti-Human CD80		
Anti-Human HLA-DR		
Mouse IgG1 ImmunoTools GmbH, Friesoythe, D	PE	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Anti-Human CD1a		
Anti-Human CD3		
Anti-Human CD19		
Anti-Human CD83		
Anti-Human CD86		

FITC: Fluoresceinisothiocyanat, Ig: Immunglobulin, PE: Phycoerythrin

### 3.1.5 Sonstige Reagenzien & Chemikalien

Substanzen	Hersteller
Ethanol Merck, Darmstadt	Merck, Darmstadt
Trypanblau 0,5%	Biochrom AG, Berlin, D
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO, 33%)	Apotheke Charité Campus Virchow-Klinikum, Berlin, D
β-Mercaptoethanol	Sigma – Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe

<sup>4</sup> FACS: fluorescence activated cell sorter

### 3.1.6 Puffer und zusammengesetzte Lösungen<sup>5</sup>

<b>PBS Puffer</b> (Phosphate buffered solution) auf 1000 ml Aqua Destillata aufgefüllt		<b>Lösung</b>	<b>Hersteller</b>
		FACS Flow (Elektrolytlösung)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
		FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg, D
		FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg, D
		FACS Lysing Solution (Fixierlösung)	BD Biosciences, San José, CA, USA
		Bicoll - Trennlösung	BioChrom AG, Berlin, Germany
<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>		
NaCl	80 g		
KCl	2 g		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g		

### 3.1.7 Software

Software	Hersteller
CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg, D
GraphPad Prism Version 3.0	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
MS Office Excel 2003	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

<sup>5</sup> Alle Puffer und Lösungen wurden steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

### 3.1.8 Geräte

Geräte	Hersteller
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson, San José, USA
Hämocytometer Neubauer-improved	Optik Labor, Friedrichshofen
Handzählgerät	Upgreen Counters Taiwan
Kryobox	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, NY, USA
Mikroskop M20	Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, CH
Pinzette	CE Cimex Rostfrei, Feinlager des Logistikzentrums Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin, D
Pipette Easypet	Eppendorf, Hamburg
Pipette Research 10	
Pipette Research 20	
Pipette Research 200	
Pipette Research 1000	
Tischzentrifuge Biofuge 13	Thermo Electron, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Julabo 6A Seelbach D
Werkbank LaminAir HB 2472	Thermo Scientific, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0	Thermo Electron, USA
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D

### 3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Geräte	Hersteller
Butterfly Multifly® Set	Sarstedt Nümbrecht Germany
Deckgläser	Menzel-Glaser 22x22
Desinfektionsmittel	B/Braun Melsungen Germany
FACS Röhrchen 5 ml Rundboden Röhrchen	BD Falcon™ USA
Falcon Einmalpipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Falcon Multiwell Platte (6, 24-Well)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Falcon konisches Röhrchen (15ml, 50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Falcon Rundbodenröhrchen (5ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Falcon Zellkulturflasche (25 ml, 50 ml, 250ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Kryoröhrchen Cryo Tube (1ml)	Nunc A/S, Roskilde, DK
Kanüle (0,9 x 40mm)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Micro Tube 1,5ml Safe Seal	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Mikrotiterplatten (96-Well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Neubauer Zählkammer 0,1mm Tiefe	LO Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, D
Objektträger 76 x 26mm	Langenbrinck, Emmendingen, D
Pipettenspitzen (200µl, 1000µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Pipettenspitzen epTIPS Reloads (0,5- 20µl, 50-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Spritze (20ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Spritze mit Kanüle (1ml)	Terumo Europe N.V., Leuven, B
Sterilfilter Porengröße 0,2µm	Sartorius AG, Göttingen, D
Transferpipette (3,5ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Transwell 8,0µm Pore Size, 6,4mm Diameter	Corning Incorporated, New York, USA
Filter Cards	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkulturverfahren

#### 3.2.1.1 Sterile Arbeitsmaßnahmen

Um eine Kontamination zu vermeiden, erfolgten alle Arbeitsschritte an Zellen mit sterilen Instrumenten an der Werkbank LaminAir HB 2472 mit Laminar-Air-flow-Verfahren. Darunter versteht man meist vertikal gerichtete, turbulenzarme Luftströmungen. Dadurch entstehen staub- und partikelarme Reinsträume, die eine Kontamination der Zellkulturen minimieren (Spurk J., 2005).

#### 3.2.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Die mit DMSO<sup>6</sup> kryokonservierten REH- und K562-Zelllinien wurden im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und aufgetaut. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit 15 ml RPMI 10% (Tabelle) suspendiert und dann bei 1400 Umdrehungen/Minute für 7 Minuten zentrifugiert, um unerwünschte Partikel und das DMSO auszuwaschen.

Substanz	Konzentration
FBS (10 %)	50 ml
Penicillin/Streptomycin (0,1 %)	0,5 ml
L-Glutamin (1 %)	5 ml
RPMI	500 ml

**Tabelle 8:** Zusammensetzung des Zellnährmediums RPMI 10 % in 500 ml RPMI 1640 Medium; FBS: fetales Kälberserum; RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)

Dieser Überstand wurde dekantiert und verworfen. Die Zelllinien wurden erneut in RPMI 10 % resuspendiert, was gleichzeitig auch als Nährmedium dient. Die Zellpopulationen wurden bis  $10^6$  Zellen/ $\mu$ l mit RPMI 10% in Falcon Zellkulturflaschen von 25 ml oder 50 ml bei 37° C unter konstanter Frischluftzufuhr mit einem 5 %igen CO<sub>2</sub>-Anteil im Brutschrank kultiviert. Um die Zellzahl konstant zu halten, wurde in regelmäßigen Abständen von zwei bis drei Tagen die Zellzahl und Vitalität mit dem Hämocytometer (siehe Kapitel 3.2.1.5. Zellquantifizierung und Zellvitalität) bestimmt, der Überschuss verworfen und mit frischem RPMI 10 % ersetzt. Zusätzlich erfolgte regelmäßig ein Austausch des kompletten Mediums und Untersuchung einer Zellkulturprobe aus der

---

<sup>6</sup> DMSO (Dimethylsulfoxid): Gefrierschutzmittel für die Kryokonservierung von Zellen

Kulturflasche unter dem Mikroskop, um die Wahrscheinlichkeit der Kontamination so gering wie möglich zu halten.

### **3.2.1.3 Gewinnung und Isolation von Monozyten**

Es wurde EDTA-Blut (Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure) von gesunden Spendern bezogen. Das EDTA-Blut wurde in 50 ml Falcon Tubes mit PBS im Verhältnis 1:2 versetzt. Dieses wurde vorsichtig in 50 ml Röhrchen auf 15 ml des Dichtegradienten Biocoll geschichtet und für 30 Minuten bei 400g zentrifugiert. Die daraus resultierende Interphase wurde geerntet und bei 400g für 10 Minuten zentrifugiert. Jetzt wurde das Zellpellet zweimal in 50 ml PBS resuspendiert und erneut bei 400 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 30 ml RPMI 10 % resuspendiert und in einer 50 ml Falcon Zellkulturflasche über Nacht inkubiert. Danach wurde das Medium mit nicht-adhärenenten Zellen verworfen, da die Monozyten an der Flaschenwand haften geblieben sind. Es erfolgte noch die Kontrolle einer Zellkulturprobe aus der Kulturflasche unter dem Mikroskop um die Wahrscheinlichkeit der Kontamination so gering wie möglich zu halten. Die Monozyten wurden erneut resuspendiert mit 30 ml RPMI 10 % in Falcon Zellkulturflaschen von 25 ml oder 50 ml und bei 37 °C unter konstanter Frischluftzufuhr mit einem 5%igen CO<sub>2</sub>-Anteil im Brutschrank kultiviert.

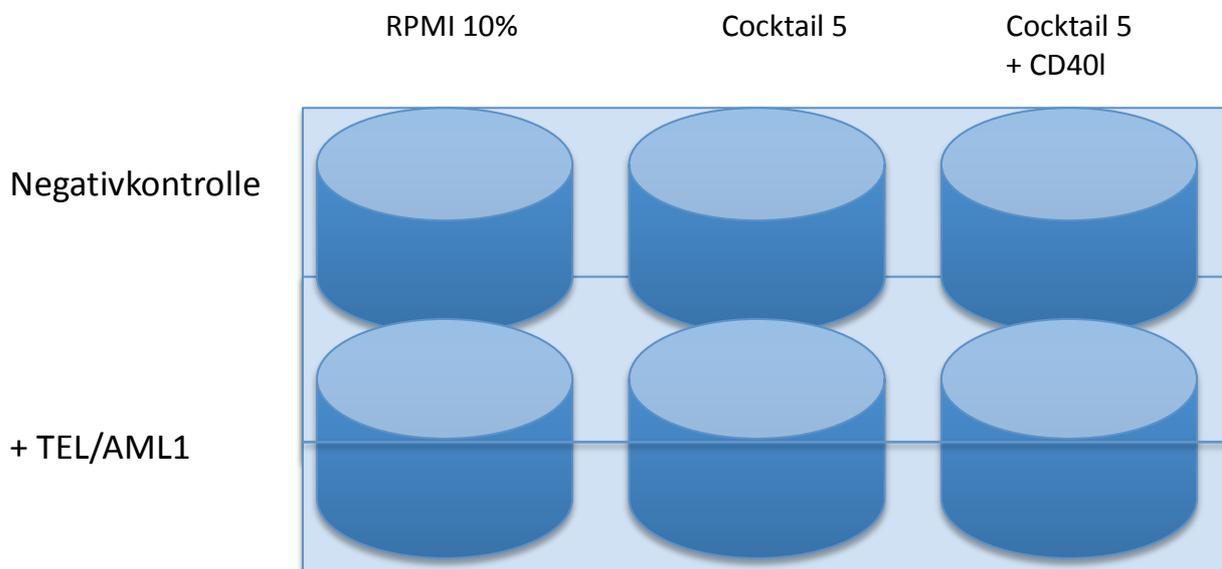
### **3.2.1.4 Behandlung der Zellen**

Bei allen Versuchen mit Zelllinien wurden zuvor die unbehandelten Zellkulturen aus dem Inkubator zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Für den Versuchsaufbau wurden anschließend auf einer 6-Well-Platte jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen mit jeweils 2 ml RPMI 10%, 2 ml Cocktail 5 (Tabelle 9) und 2 ml Cocktail 5 + CD40L (20 µl) eingesetzt. Pro 1 ml Medium wurde jeweils 10 µl Glutamin (200mM) hinzugefügt.

Substanz	Konzentration
IL-3	4 $\mu$ l
IL-4	10 $\mu$ l
GM-CSF	5 $\mu$ l
SCF (c-kit-Ligand)	10 $\mu$ l
Flt-3L	10 $\mu$ l
TNF $\alpha$	10 $\mu$ l

**Tabelle 9:** Zusammensetzung von Cocktail 5 in 2 ml RPMI 10 % Medium; IL: Interleukin; GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor; SCF: Stem Cell Factor; FLT-3L: fms-like tyrosine kinase 3 ligand; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor alpha

Die Negativkontrolle bestand aus  $2 \times 10^5$  Zellen, kultiviert in folgenden Medien: RPMI 10%, Cocktail 5 und Cocktail 5 + CD40l (Abbildung 11). Im Gegensatz zur Negativkontrolle wurden zeitgleich die Zellkulturen in identischen Medien mit TEL/AML1 Onkopeptid in Verdünnungskonzentrationen entweder von  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1) oder  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) oder  $1 \times 10^{-11}$  g/ml (1:100) für 10 Tage versetzt. Die Verdünnungsreihe soll dazu dienen, die optimale Konzentration von TEL/AML1 für die maximale Expansion der DCs zu ermitteln.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus anhand der 6-Well-Platte mit den jeweiligen Medien. Die oberen drei Wells bilden die Negativkontrolle, die unteren drei Wells enthalten TEL/AML1 als Positivkontrolle. RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium); CD40l: CD40-Ligand

### 3.2.1.5 Zellquantifizierung und Zellvitalität

An den Tagen mit durchflusszytometrischer Untersuchung der Zellen erfolgte auch eine Untersuchung der Zellzahl und Vitalität. Dabei wurden 10 µl des jeweiligen Zellmediums steril entnommen und im Verhältnis 1:2 mit dem Azofarbstoff Trypanblau verdünnt, gefärbt und dann in das Hämozytometer (Neubauer-improved) übertragen. Es wurden 4 Großquadrate im Hämozytometer unter dem Mikroskop zügig mit einem Handzählgerät (Upgreen Counters) ausgezählt und die Zellzahl mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Gesamtzellzahl pro ml} = \frac{\text{Gezählte Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

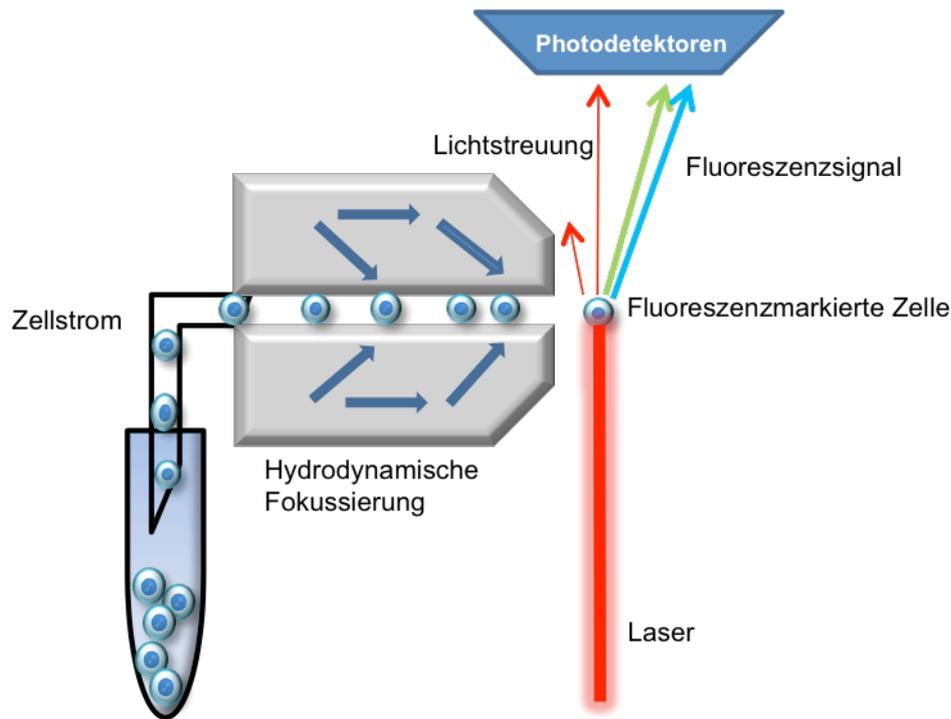
Die Vitalität wurde über den Quotienten der lebenden intakten Zellen gegenüber der Gesamtzellzahl bestimmt und prozentual ausgedrückt:

$$\text{Vitalität in \%} = \frac{\text{Lebende Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

Dabei diene der Azofarbstoff Trypanblau zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Trypanblau dringt in beschädigte Zellen ein und färbt diese blau, vitale Zellen dagegen verfärben sich nicht und erscheinen lichtmikroskopisch hell (Lindl, 2002).

### 3.2.2 Untersuchung von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer (Zytometrie: Zellvermessung) ist ein optisches Messverfahren, das in der Hämatologie und Immunologie angewandt wird. Dabei wird eine Zellsuspension über eine Kapillare in die Messkammer des Durchflusszytometers angesaugt, die Zellen von einem Laser nacheinander abgetastet und die gestreuten Lichtstrahlen von Photodetektoren gemessen (Luttmann W., 2006) (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Eigene schematische Darstellung zum Aufbau eines Durchflusszytometers (D. Wang, Hussain A., Sommovilla N., 2006). Erklärung siehe Kapitel 3.2.2.

Damit bei der Durchflusszytometrie immer nur eine Zelle nach der anderen abgetastet wird, wendet man das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung an. Dabei wird die Zellsuspension von einer Trägerflüssigkeit umgeben. Diese Trägerflüssigkeit erzeugt einen laminären Hüllstrom um die Zellsuspension und fokussiert sie in der Messkuvette, so dass die Zellen einzeln durch den Messbereich des Lasers treten. Das optische Detektionssystem erfasst dabei das Streulicht und die Fluoreszenzsignale, die von den Zellen erzeugt werden. Das entstehende Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) korreliert dabei mit dem Volumen der Zelle und das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) mit der Dichte der Strukturen im Zytoplasma, der sog. Granularität. Durch die Messung des Streulichts kann man folglich eine Aussage über die Anzahl und Verteilung der verschiedenen Zelltypen treffen (Luttmann W., 2006). Darüber hinaus können die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern, die gegen bestimmte Zellstrukturen gerichtet sind, inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert werden. Der abtastende Laserstrahl regt die Fluoreszenzfarbstoffe an, und der emittierte Lichtstrahl spezifischer Wellenlänge wird durch Photodetektoren registriert. So können Antigene auf der Zelloberfläche erkannt und quantifiziert werden (Luttmann W., 2006; Mainz, 2013).

Aus den kultivierten Zellkulturen wurde am Tag 4, 7 und 10 ein Milliliter Zellsuspension aus jedem Well entnommen und mit je ein Milliliter entsprechenden frischen Medium pro Well ersetzt. Nach Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurden die Proben aufgeteilt in 5 ml FACS Röhrchen resuspendiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 Milliliter der Waschlösung PBS-Puffer (siehe Kapitel 3.1.6) überführt und das Restmedium verworfen. Danach wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und mit jeweils 1,4 µl eines Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten monoklonalen Antikörpers und mit Phycoerythrin (PE)-markierten monoklonalen Antikörpern versetzt und 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden zu den doppeltmarkierten Proben 1 ml PBS-Puffer hinzugegeben, zentrifugiert, der Überstand mit den ungebundenen Antikörpern verworfen und die markierten Pellets in 200 µl PBS-Puffer resuspendiert. Die immunfluoreszenzmarkierten Zellproben wurden durchflusszytometrisch gemessen und mit der Software CellQuest Pro ausgewertet. Das Vorwärtsstreubild und das Seitwärtsstreubild wurden am Computer auf die gewünschte Zellpopulation eingegrenzt, um Artefakte und Zelldetritus auszuschließen. Um neben der Größe und Granularität auch den Zelltypus der eingegrenzten Zellpopulation zu bestimmen, wurden die Oberflächenmarker mittels PE- und die FITC-Fluoreszenzintensitäten in Dotplots (Punktauftragung) gegeneinander aufgetragen. Um nur den fluoreszenzpositiven Bereich für die Messungen zu extrapolieren, wurde der fluoreszenznegative Bereich durch die vorherige Messung unspezifischer Antikörperbindungen durch Isotypen-Antikörper (IgG1-FITC und IgG1-PE) mit der Zellprobe ermittelt. Der fluoreszenznegative Bereich war so eingegrenzt, dass in der Kontrollmessung mit den unspezifischen Isotypen-Antikörpern 99% aller Zellen fluoreszenznegativ waren. Diese Negativkontrolle wurde gespeichert und bei den darauffolgenden Probenmessungen von den Messwerten abgezogen. In jedem Messvorgang wurden bis zu 10.000 Einzelereignisse gemessen und die fluoreszenzpositiven Zellen in Prozent registriert.

### **3.2.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von Microsoft Excel 2003. Es wurde der Mittelwert nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Mittelwert} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Für die Berechnung der Signifikanz der Daten wurde der T-Test für unverbundene und verbundene Stichproben herangezogen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit ab der ein Ergebnis als signifikant angesehen wurde, ist für alle gewonnenen Daten auf  $p < 0,05$  festgelegt worden. Für alle Daten wurde auch die Standardabweichung (Standard error of mean = SEM) bestimmt. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt.

Für die Auswertung der Daten wurde ein spezielles Makro, ein Hilfsprogramm mit Visual Basic Applications unter Microsoft Excel programmiert. Dieses Programm ordnet automatisiert die FACS-Werte nach Zelloberflächenmarkern und wertet in einer Exceltabelle diese statistisch aus (siehe Kapitel 9: Anhang). Dadurch konnten Übertragungsfehler und Berechnungsfehler in der Auswertung minimiert werden.

## 4 Ergebnisse

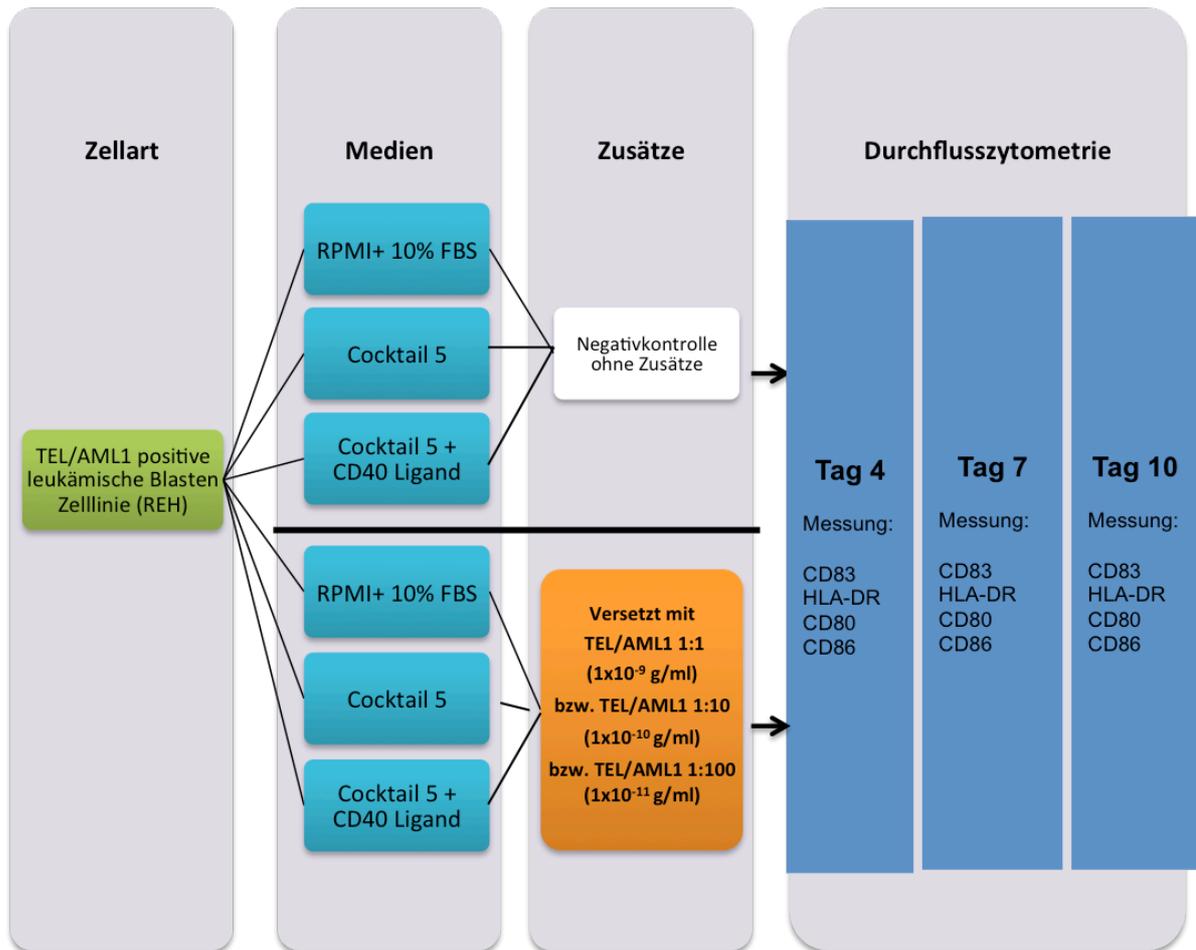
### 4.1 Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf TEL/AML1 positive leukämische Blasten (REH)

*In vitro* wurde die TEL/AML1 positive ALL-Zelllinie REH mit TEL/AML1 Onkopeptid in Verdünnungskonzentrationen  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1),  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) und  $1 \times 10^{-11}$  g/ml (1:100) für 10 Tage kultiviert. Die Verdünnungsreihe soll dazu dienen, die optimale Konzentration von TEL/AML1 für die maximale Expansion der DCs zu ermitteln. Die Negativkontrolle bestand aus  $2 \times 10^5$  REH-Zellen, versetzt in jeweils folgenden Medien: RPMI 10%, Cocktail 5 und Cocktail 5 + CD40l ohne TEL/AML1 Onkopeptid.

Der Versuchsaufbau wurde in zwei Arme unterteilt (Abbildung 7). In einem Arm wurden 10  $\mu$ l TEL/AML1 Peptid pro ml Medium in Konzentrationen von entweder  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1) oder  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) oder  $1 \times 10^{-11}$  g/ml (1:100) versetzt.

Die Kontrollgruppe erhielt keine TEL/AML1 Peptid-Gabe. Alle 2 Tage erfolgte eine Gabe von 1 ml des jeweiligen Mediums mit entsprechender Konzentration der Zytokine zur Versorgung mit Nährstoffen und zur Gewährleistung der gleichbleibenden Kulturbedingungen. Bei den TEL/AML1 versetzten Medien wurden zu je 1 ml des jeweiligen Mediums 10  $\mu$ l TEL/AML1 zusätzlich gegeben um die jeweilige TEL/AML1 Konzentration konstant zu halten.

Von Tag 0 an wurden alle 2 Tage die kultivierten Zellen mit 1 ml ihrer entsprechenden Nährmedien + Glutamin versetzt, um mit der Zellexpansion Schritt zu halten. Am Tag 4, Tag 7 und Tag 10 wurden die Zellzahl sowie die Vitalität ermittelt und die Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dieser Versuchsaufbau wurde auch für TEL/AML1 negative leukämische Zelllinien (K562) sowie bei Monozyten angewandt.



**Abbildung 13:** Versuchsaufbau zur Untersuchung der Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf die REH Zelllinie. Der gesamte Versuchsaufbau wurde insgesamt für bis zu 3 verschiedene Konzentrationsstufen von TEL/AML1 (1:1, 1:10, 1:100) mehrfach untersucht. Der identische Versuchsaufbau erfolgte auch mit TEL/AML1 negativen leukämischen Zelllinien (K562) und Monozyten.

#### 4.1.1 Vitalität und Zellzahl

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medien mit und ohne TEL/AML1. Insgesamt führte das exponentielle Zellwachstum der leukämischen Blasten zu einer Abnahme der Vitalität bis zum 10. Tag. Jedoch zeigte sich statistisch kein

signifikanter Unterschied des Zellwachstums zwischen den Konditionen mit und ohne TEL/AML1.

Vitalität in %	RPMI 10%	Cocktail 5	Cocktail 5 + CD40I	RPMI 10%+ TEL/AML1 $1 \times 10^{-11}$ g/ml	Cocktail 5 + TEL/AML1 $1 \times 10^{-11}$ g/ml	Cocktail 5 + CD40I+ TEL/AML1 $1 \times 10^{-11}$ g/ml
<b>Tag 4</b>	93,59±1,23	93,66±1,20	88,54±3,14	95,28±0,77	92,48±1,40	89,59±2,59
<b>Tag 7</b>	91,86±2,37	89,99±3,02	86,84±3,04	95,74±1,24	91,79±1,64	86,78±3,75
<b>Tag 10</b>	76,28±8,81	77,67±5,78	80,90±3,28	75,48±9,08	73,82±2,79	69,86±3,42

**Tabelle 10:** Vitalität in % (± Standardabweichung) bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen in Konditionen mit und ohne TEL/AML1  $1 \times 10^{-11}$  g/ml

Vitalität in %	RPMI 10%	Cocktail 5	Cocktail 5 + CD40I	RPMI 10%+ TEL/AML1 $1 \times 10^{-10}$ g/ml	Cocktail 5 + TEL/AML1 $1 \times 10^{-10}$ g/ml	Cocktail 5 + CD40I+ TEL/AML1 $1 \times 10^{-10}$ g/ml
<b>Tag 4</b>	89,91±2,36	91,86±1,4	86,84±1,66	90,24±1,5	88,89±0,96	85,07±0,8
<b>Tag 7</b>	88,33±4,14	87,92±2,85	80,56±2,02	83,33±3,8	86,97±3,21	78,87±1,79
<b>Tag 10</b>	88,93±1,77	88,17±1,36	82,63±2,84	80,20±6	81,04±6,04	75,77±5,65

**Tabelle 11:** Vitalität in % (± Standardabweichung) bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen in Konditionen mit und ohne TEL/AML1  $1 \times 10^{-10}$  g/ml

Vitalität in %	RPMI 10%	Cocktail 5	Cocktail 5 + CD40I	RPMI 10%+ TEL/AML1 $1 \times 10^{-9}$ g/ml	Cocktail 5 + TEL/AML1 $1 \times 10^{-9}$ g/ml	Cocktail 5 + CD40I+ TEL/AML1 $1 \times 10^{-9}$ g/ml
<b>Tag 4</b>	89,57±2,54	89,17±1,7	84,58±2,65	92,17±2,23	85,88±3,0	85,82±4,32
<b>Tag 7</b>	89,48±1,32	83,98±3,52	77,92±2,85	91,52±1,34	88,78±1,54	81,66±2,17
<b>Tag 10</b>	58,08±5,72	73,28±6,75	65,76±2,37	67,86±8,22	65,82±10,02	62,48±7,02

**Tabelle 12:** Vitalität in % (± Standardabweichung) bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen in Konditionen mit und ohne TEL/AML1  $1 \times 10^{-9}$  g/ml

#### 4.1.2 Immunphänotypisierung

Immunphänotypisch wurden die Oberflächenantigene CD83, HLA-DR, CD80, CD86 untersucht. CD83 und HLA-DR werden von reifen DCs exprimiert (Banchereau et al., 2000). Für die Interaktion zwischen T-Zellen und reifen DCs werden CD80 und CD86 auf der Oberfläche von reifen DCs präsentiert (Peggs et al., 2008). Bei den Monozyten wurden zusätzlich CD1a und CD 14 untersucht. CD1a ist ein Marker für unreife DCs und CD14 wird von Monozyten exprimiert (El-Sahrigy et al., 2015).

Die Oberflächenmarker wurden für alle Verdünnungsreihen von TEL/AML1 am Tag 4, 7 und 10 analysiert. Abschließend wurden die Mittelwerte der Negativkontrolle ohne TEL/AML1 mit den Mittelwerten der Medien versetzt mit TEL/AML1 auf signifikante Unterschiede mittels T-Test verglichen.

- **$1 \times 10^{-11}$  g/ml TEL/AML1 (1:100)**

In der Verdünnungskonzentration von  $1 \times 10^{-11}$  g/ml TEL/AML1 (1:100) sind an allen Messtagen keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte im Vergleich zu den Negativkontrollen festzustellen.

- **$1 \times 10^{-10}$  g/ml TEL/AML1 (1:10)**

Am 4. Tag und am 10. Tag fanden sind keine signifikanten Expressionsunterschiede im Vergleich zu den Negativkontrollen.

#### 7. Tag

In der Verdünnung von  $1 \times 10^{-10}$  g/ml TEL/AML1 (1:10) ist CD83/HLA-DR am Tag 7 im Cocktail 5 Medium mit TEL/AML1 signifikant vermindert exprimiert ( $p$ -Wert = 0,02) 2,72% ( $\pm$  0,22 %) im Vergleich zur Negativkontrolle mit 10,07 % ( $\pm$  1,87 %).

Am Tag 7 ist die Expression von CD80/CD86 im Cocktail 5 Medium mit TEL/AML1 signifikant vermindert ( $p$ -Wert = 0,02) mit 1,02 % ( $\pm$  0,35 %) im Vergleich zur Negativkontrolle mit 2,4 % ( $\pm$  0,33 %).

- **1x10<sup>-9</sup> g/ml TEL/AML1 (1:1)**

#### 7. Tag

Die CD83/HLA-DR Expression wird am 7. Tag im Cocktail 5 Medium mit TEL/AML1 signifikant vermindert auf 1,28 % ( $\pm$  0,05 %) im Vergleich zur Negativkontrolle mit 10,1 % ( $\pm$  1,87 %). Der *p*-Wert ist 0,01.

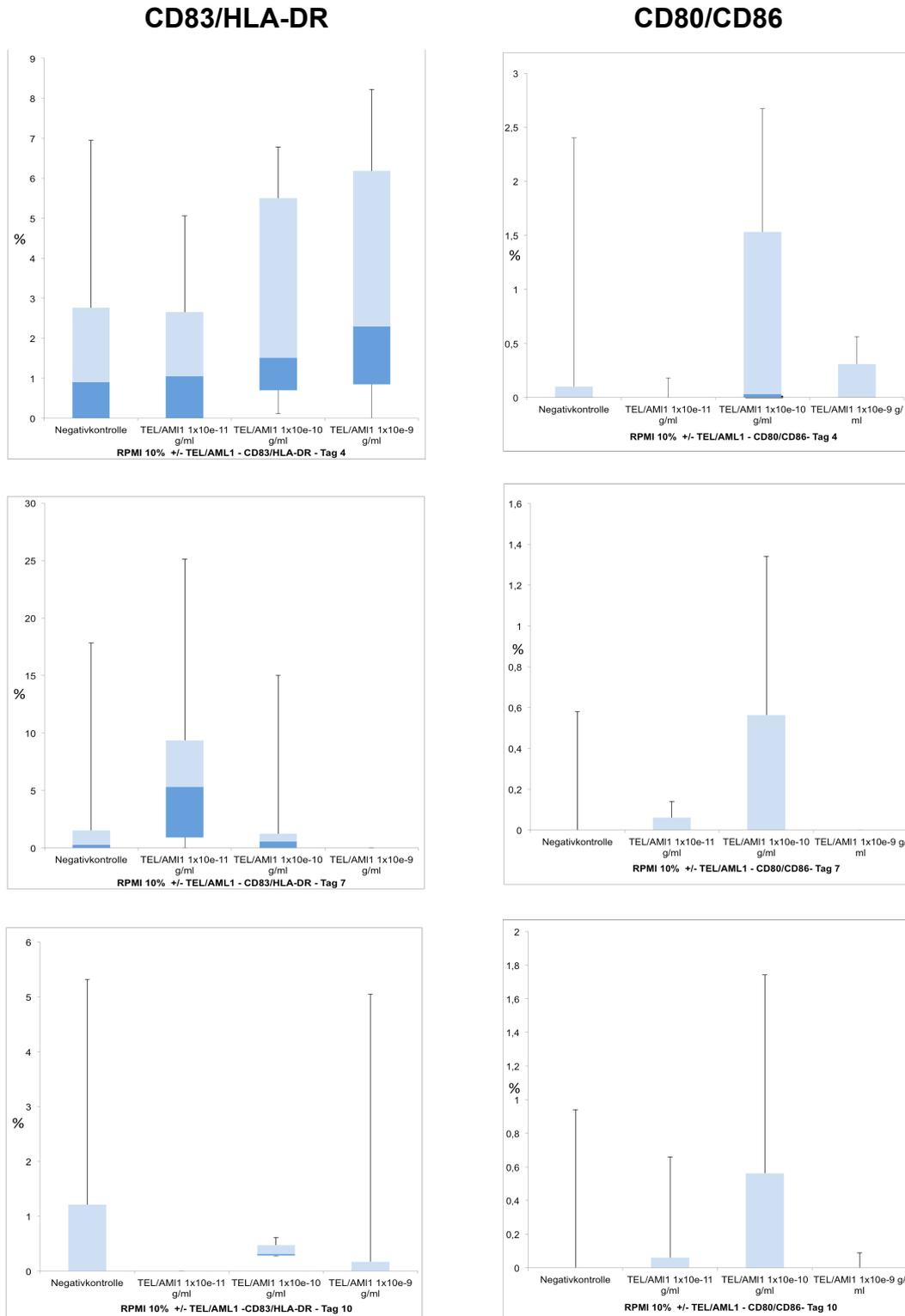
Am 7. Tag wird CD80/CD86 vermindert exprimiert im Cocktail 5 Medium mit TEL/AML1 mit 0,29 % ( $\pm$  0,17 %) im Vergleich zur Negativkontrolle mit 2,4 % ( $\pm$  0,32 %) mit einem *p*-Wert von 0,0002.

Im Medium Cocktail 5 mit CD40 Ligand versetzt mit TEL/AML1 wird CD83/HLA-DR am 7. Tag mit 3,63 % ( $\pm$  0,98 %) signifikant vermindert exprimiert im Vergleich zu der Negativkontrolle mit 16,12 % ( $\pm$  1,83 %) bei einem *p*-Wert von 0,001.

Die Expression von CD80/CD86 zeigt am 4. Tag einen tendenziellen Unterschied bei Cocktail 5 + CD40 Ligand versetzt mit TEL/AML1 mit 2,13 % ( $\pm$  0,44 %) im Vergleich zur Negativkontrolle mit 3,8 % ( $\pm$  0,68 %). Am 7. Tag wird der Unterschied für CD80/CD86 signifikant mit 1,57 % ( $\pm$  0,45 %) mit TEL/AML1 im Vergleich zu 6,88 % ( $\pm$  0,93 %) in der Negativkontrolle. Der *p*-Wert ist 0,004.

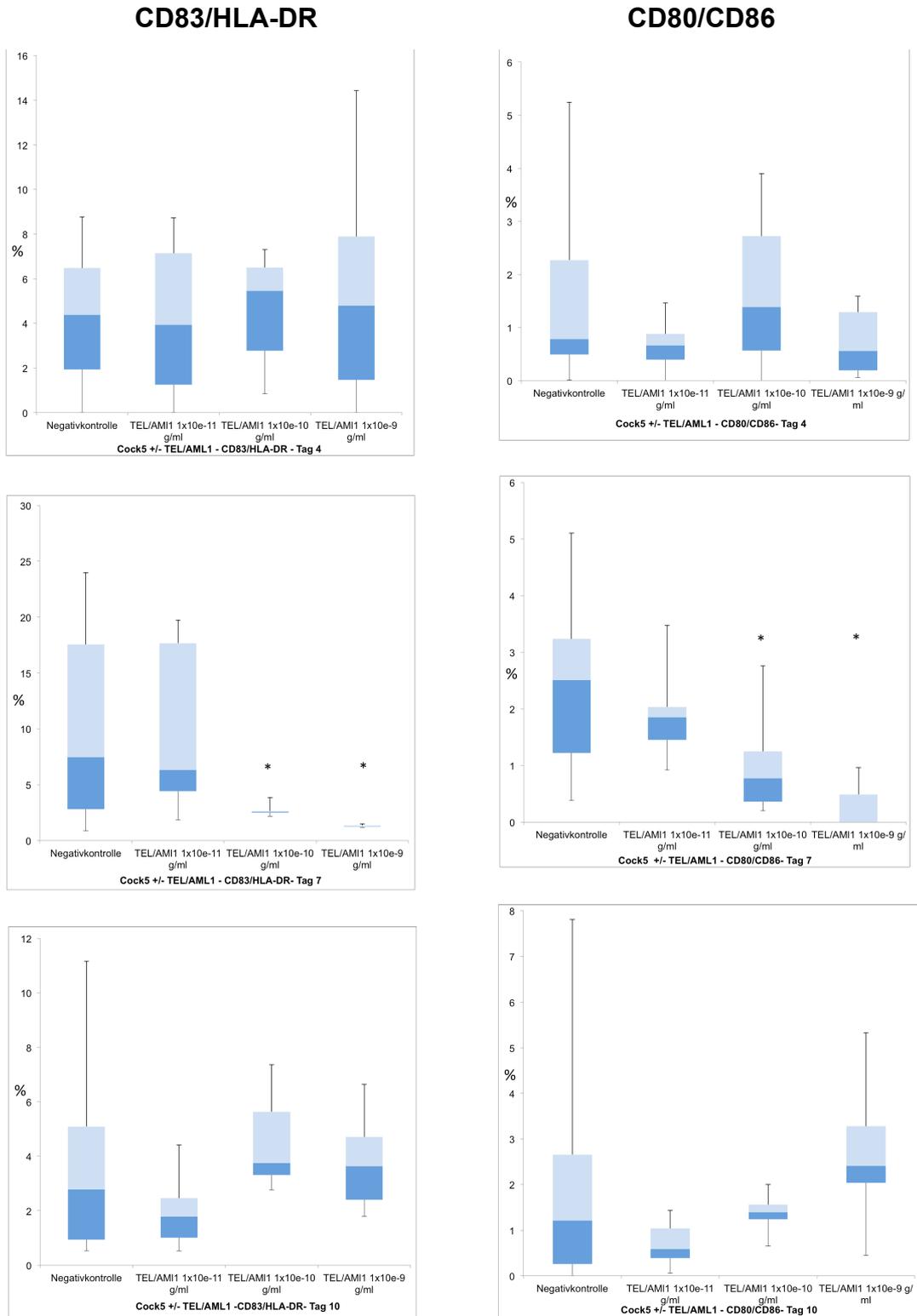
An allen weiteren Messtagen sind keine signifikanten Expressionsunterschiede im Vergleich zu den Negativkontrollen festzustellen.

**Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 positive leukämische Blasten (REH)  
in RPMI + 10 % FBS**



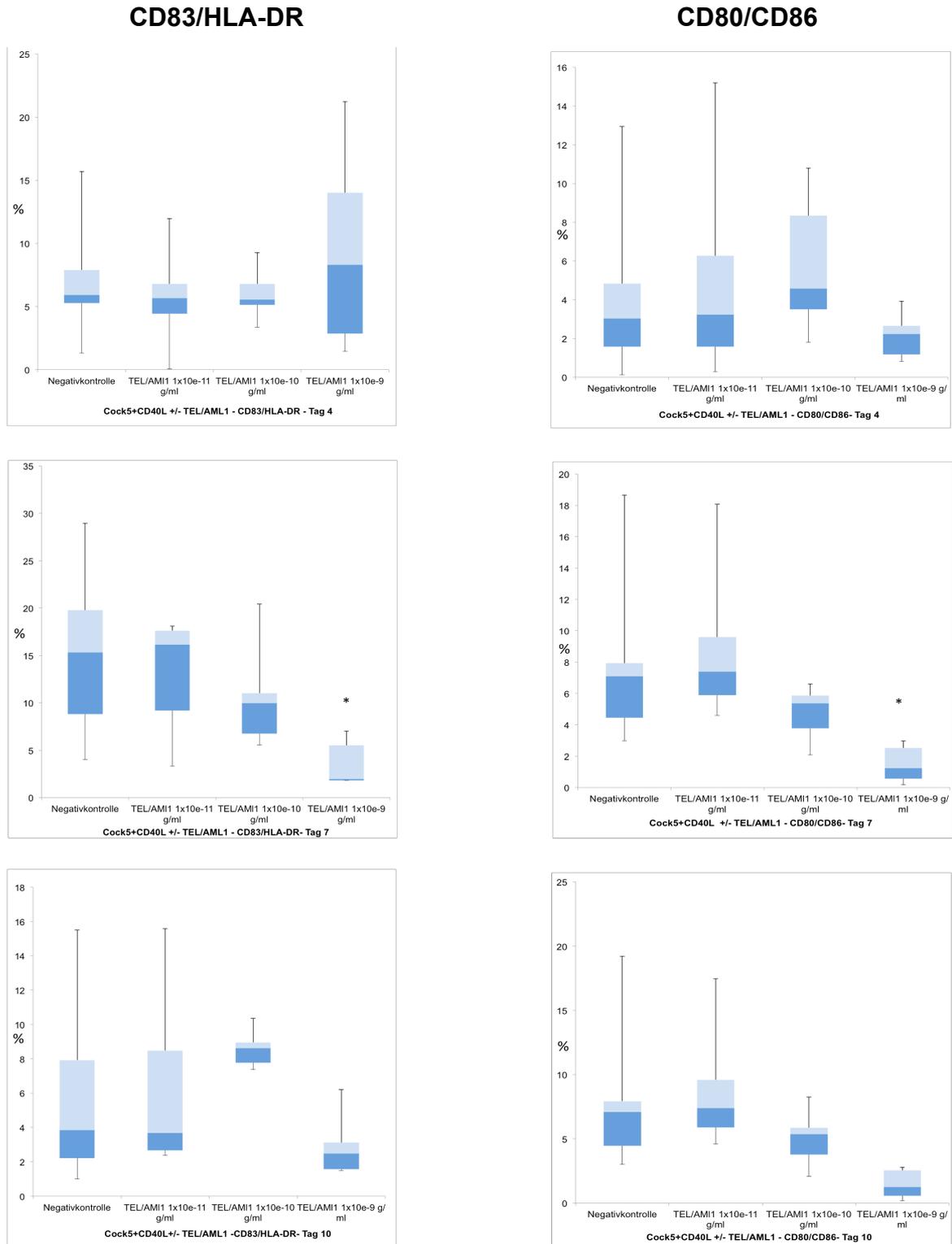
**Abbildung 14:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 positive REH-Zellen im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse: 1x10<sup>-9</sup> g/ml (1:1), 1x10<sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10<sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

## Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 positive leukämische Blasten (REH) in Cocktail 5



**Abbildung 15:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 positive REH-Zellen im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse:  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1),  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) und  $1 \times 10^{-11}$  g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die  $>1\%$  Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

**Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 positive leukämische Blasten (REH)  
in Cocktail 5 + CD40 Ligand**



**Abbildung 16:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 positive REH-Zellen im Medium Cocktail 5 + CD40 Ligand nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse: 1x10<sup>-9</sup> g/ml (1:1), 1x10<sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10<sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

**Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 positive leukämische Blasten (REH)  
in RPMI + 10 % FBS (in %)**

**Tag 4 (a)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	RPMI 10% (Kontrolle)	2,01	0,49		21
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	1,61	0,61	0,34	8
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	2,97	1,00	0,19	7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	3,44	1,31	0,12	6
CD80/CD86	RPMI 10% (Kontrolle)	0,24	0,12		21
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,02	0,02	0,15	8
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	0,82	0,38	0,04	7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	0,16	0,1	0,38	6

**Tag 7 (b)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	RPMI 10% (Kontrolle)	2,69	1,19		18
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	7,28	3,18	0,06	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	2,9	2,22	0,47	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	0	0	0,13	5
CD80/CD86	RPMI 10% (Kontrolle)	0,04	0,03		18
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,04	0,02	0,5	6
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	0,35	0,21	0,02	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	0	0	0,25	5

**Tag 10 (c)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	RPMI 10% (Kontrolle)	0,84	0,33		17
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0	0	0,09	6
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	0,38	0,05	0,23	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	1,04	0,9	0,40	5
CD80/CD86	RPMI 10% (Kontrolle)	0,21	0,09		17
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,1	0,09	0,27	6
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	1,11	0,57	0,01	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	0,02	0,02	0,15	5

**Tabelle 13:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen (1x10<sup>-9</sup> g/ml (1:1), 1x10<sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10<sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N). T/A: TEL/AML1

**Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 positive leukämische Blasten (REH)  
in Cocktail 5 (in %)**

**Tag 4 (a)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 (Kontrolle)	4,23	0,64		21
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	4,11	1,15	0,46	8
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	4,59	0,89	0,39	7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	5,55	2,02	0,22	6
CD80/CD86	Cocktail5 (Kontrolle)	1,38	0,29		21
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,65	0,17	0,08	8
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	1,7	0,51	0,3	7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	0,73	0,25	0,14	6

**Tag 7 (b)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 (Kontrolle)	10,07	1,87		18
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	10,31	2,72	0,47	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	2,72	0,22	0,02	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	1,28	0,06	0,01	5
CD80/CD86	Cocktail5 (Kontrolle)	2,4	0,33		18
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	1,89	0,28	0,29	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	1,02	0,35	0,02	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	0,29	0,17	0,002	5

**Tag 10 (c)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 (Kontrolle)	4,49	1,02		17
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	1,99	0,53	0,09	6
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	4,51	0,68	0,49	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	3,83	0,77	0,37	5
CD80/CD86	Cocktail5 (Kontrolle)	1,87	0,48		17
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,7	0,19	0,12	6
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	1,38	0,17	0,29	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	2,7	0,72	0,21	5

**Tabelle 14:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen (1x10-9 g/ml (1:1), 1x10-10 g/ml (1:10) und 1x10-11 g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1

**Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 positive leukämische Blasten (REH)  
in Cocktail5 + CD40 Ligand (in %)**

**Tag 4 (a)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 + CD40 Ligand (Kontrolle)	6,8	0,74		21
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	5,76	1,14	0,24	8
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	6,00	0,65	0,28	7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	9,37	2,92	0,12	6
CD80/CD86	Cocktail5 + CD40 Ligand (Kontrolle)	3,80	0,68		21
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	4,85	1,68	0,25	8
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	5,83	1,22	0,08	7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	2,14	0,44	0,11	6

**Tag 7 (b)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 + CD40 Ligand (Kontrolle)	16,12	1,83		18
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	13,12	2,38	0,2	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	10,5	2,02	0,06	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	3,63	0,99	0,001	5
CD80/CD86	Cocktail5 + CD40 Ligand (Kontrolle)	6,88	0,93		18
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	8,82	1,85	0,17	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	4,57	0,81	0,1	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	1,57	0,45	0,004	5

**Tag 10 (c)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 + CD40 Ligand (Kontrolle)	6,5	1,41		17
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	6,56	2,25	0,49	6
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	8,59	0,41	0,19	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	2,97	0,77	0,1	5
CD80/CD86	Cocktail5 + CD40 Ligand (Kontrolle)	2,79	0,89		17
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	2,84	1,46	0,49	6
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	4,43	1,25	0,16	6
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	1,1	0,15	0,15	5

**Tabelle 15:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen im Medium Cocktail 5+CD40L nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen (1x10<sup>-9</sup> g/ml (1:1), 1x10<sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10<sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1

## 4.2 Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf TEL/AML1 negative leukämische Blasten (K562)

Die immunmodulatorische Wirkung von TEL/AML1 wurde auch an einer TEL/AML1 negativen leukämischen Zelllinie (K562) untersucht. Der Versuchsaufbau ist identisch mit der Versuchsreihe mit der TEL/AML1 positiven leukämischen Zelllinie (REH) und erfolgt am Tag 4, 7 und 10 mit durchflusszytometrischen Messungen bei Verdünnungskonzentrationen von  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) und  $1 \times 10^{-11}$  g/ml (1:100).

### 4.2.1 Vitalität und Zellzahl

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medien mit und ohne TEL/AML1. Insgesamt führte das exponentielle Zellwachstum der leukämischen Blasten zu einer Abnahme der Vitalität bis zum 10. Tag, jedoch zeigte sich statistisch kein signifikanter Unterschied des Zellwachstums zwischen den Konditionen mit und ohne TEL/AML1.

Vitalität in %	RPMI 10%	Cocktail 5	Cocktail 5 + CD40I	RPMI 10%+ TEL/AML1 $1 \times 10^{-11}$ g/ml	Cocktail 5 + TEL/AML1 $1 \times 10^{-11}$ g/ml	Cocktail 5 + CD40I+ TEL/AML1 $1 \times 10^{-11}$ g/ml
Tag 4	89,65±1,52	83,22±3,42	87,15±1,76	89,45±2,41	83,57±2,45	81,96±3,01
Tag 7	90,27±2,74	82,26±5,02	78,17±5,86	89,41±2,76	82,97±3,56	76,50±6,07
Tag 10	81,68±4,67	77,66±5,38	75,94±7,57	76,62±5,57	75,97±6,09	75,87±6,13

**Tabelle 16:** Vitalität in % ( $\pm$  Standardabweichung) bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen in Konditionen mit und ohne TEL/AML1  $1 \times 10^{-11}$  g/ml

Vitalität in %	RPMI 10%	Cocktail 5	Cocktail 5 + CD40I	RPMI 10%+ TEL/AML1 $1 \times 10^{-10}$ g/ml	Cocktail 5 + TEL/AML1 $1 \times 10^{-10}$ g/ml	Cocktail 5 + CD40I+ TEL/AML1 $1 \times 10^{-10}$ g/ml
Tag 4	87,34±1,36	87,08±2,28	84,06±1,97	90,99±1,76	84,46±2,53	80,58±2,46
Tag 7	87,26±1,46	85,86±3,11	83,60±0,92	85,62±0,47	85,80±1,52	82,78±2,97
Tag 10	85,94±3,04	85,29±3,15	84,15±2,33	84,60±3,11	84,36±4,21	83,26±4,58

**Tabelle 17:** Vitalität in % ( $\pm$  Standardabweichung) bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen in Konditionen mit und ohne TEL/AML1  $1 \times 10^{-10}$  g/ml

#### 4.2.2 Immunphänotypisierung

Durchflusszytometrisch wurde die Expression für die identischen Oberflächenmarker untersucht wie bei der TEL/AML1 positiven leukämischen Blasten Zelllinie.

- **1x10<sup>-11</sup> g/ml TEL/AML1 (1:100)**

In der Verdünnung von 1:100 von TEL/AML1 sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Negativkontrollen festzustellen.

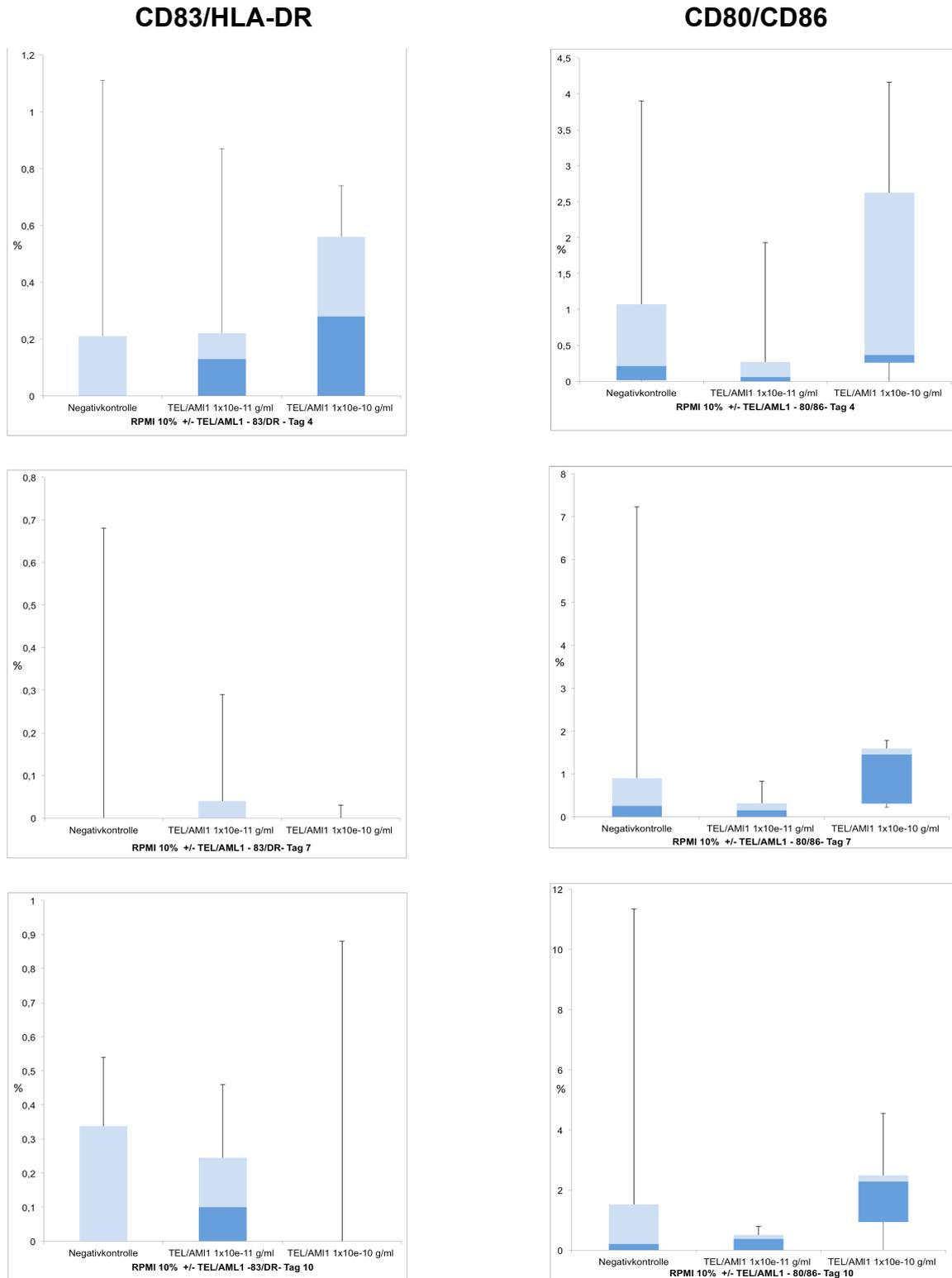
- **1x10<sup>-10</sup> g/ml TEL/AML1 (1:10)**

*10. Tag*

In der Verdünnung mit 1:10 sieht man unter TEL/AML1 kaum signifikante Expressionsunterschiede. Am 10. Tag besteht ein signifikanter Unterschied bei CD83/HLA-DR mit Cocktail 5 + CD40 Ligand von 1,36 % (± 0,3 %) auf 2,43 % (± 0,46 %) mit TEL/AML1.

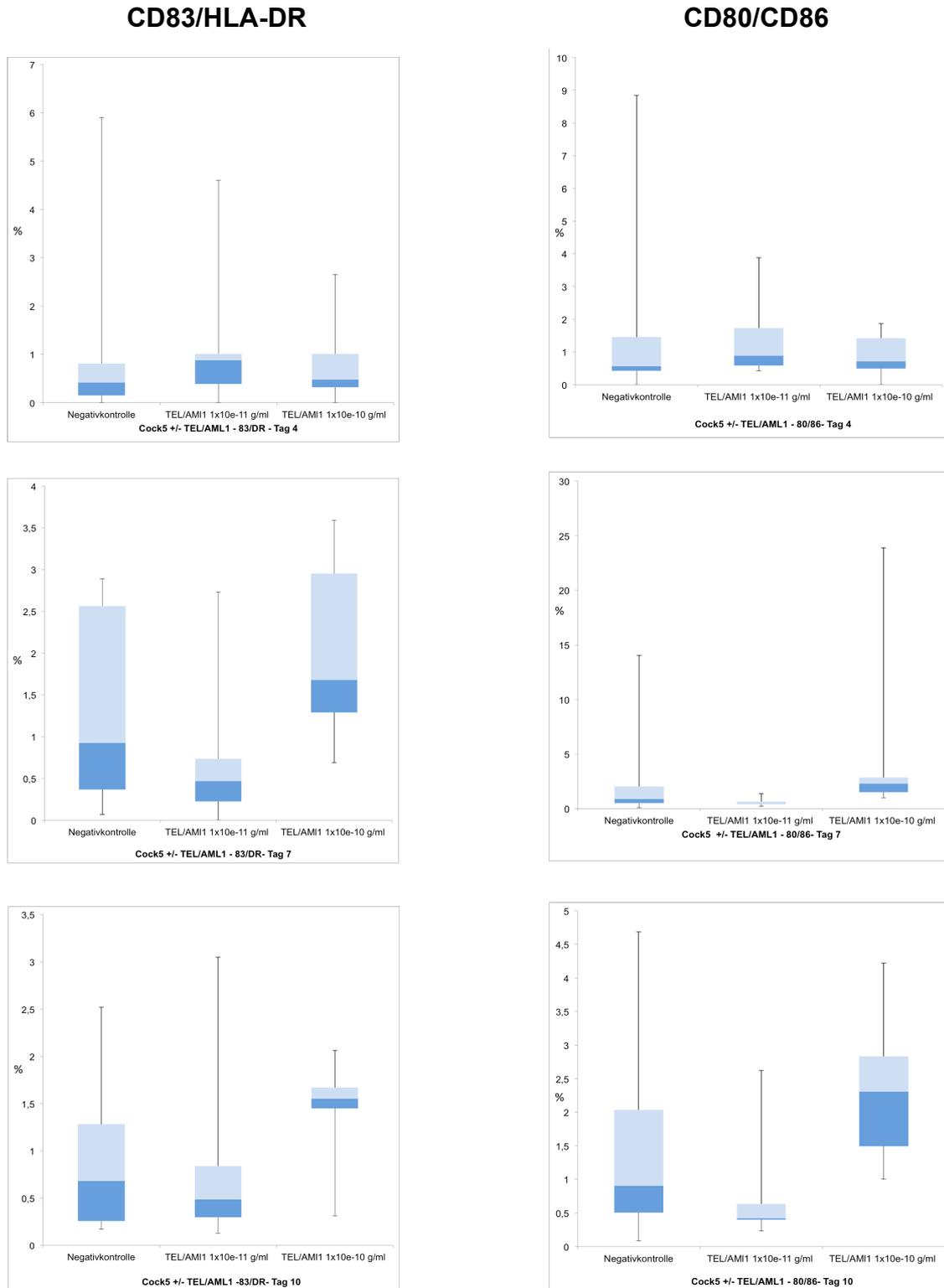
Es ließen sich an allen Messtagen keine weiteren signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Medien ermitteln.

**Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 negative leukämische Blasten (K562)  
in RPMI 10% (in %)**



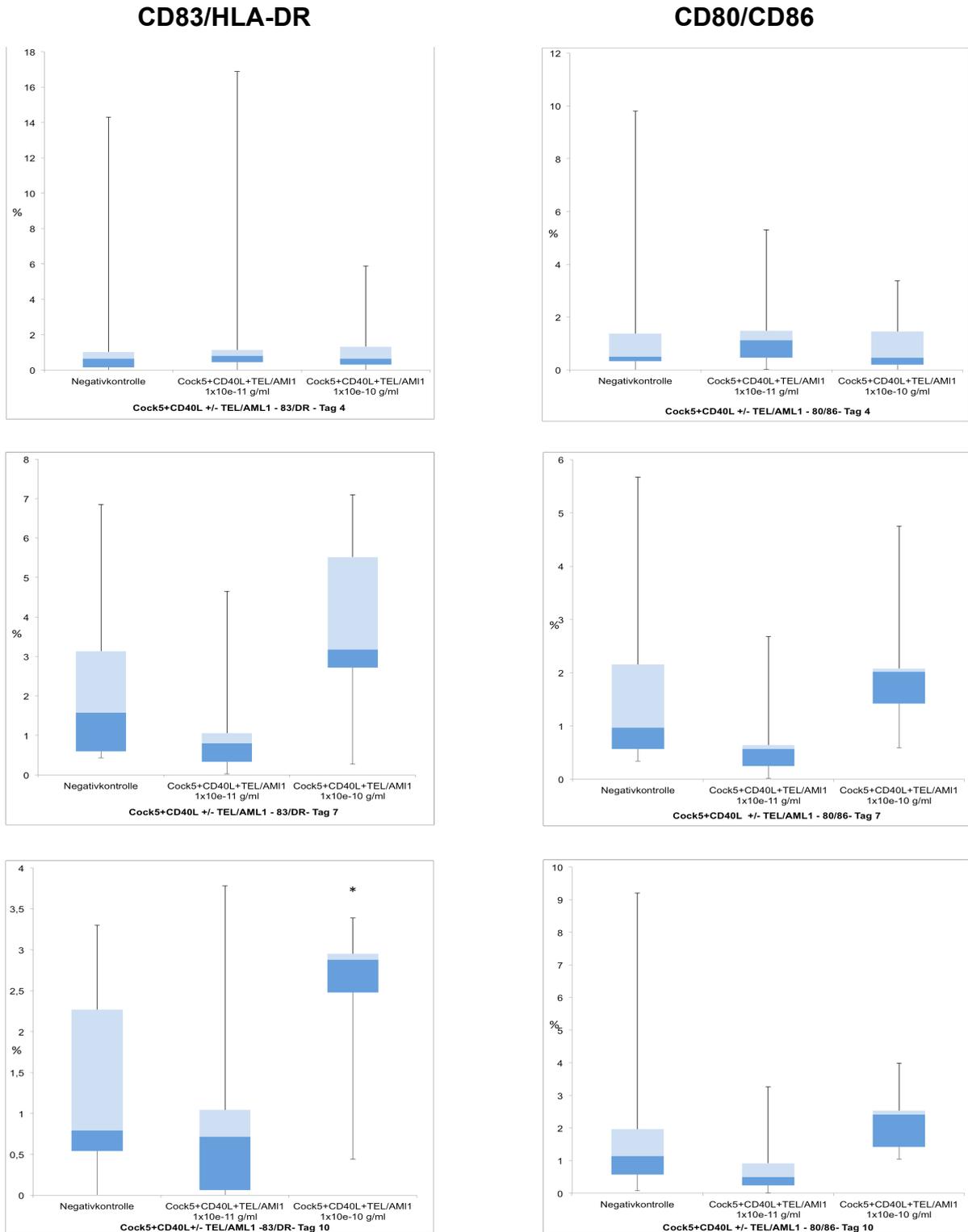
**Abbildung 17:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse: 1x10<sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10<sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

**Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 negative leukämische Blasten (K562)  
in Cocktail 5**



**Abbildung 18:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse: 1x10<sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10<sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

**Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 negative leukämische Blasten (K562)  
in Cocktail 5 + CD40 Ligand**



**Abbildung 19:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium Cocktail 5 + CD40 Ligand nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse: 1x10<sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10<sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

**Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 negative leukämische Blasten (K562)  
In RPMI + 10 % FBS (in %)**

**Tag 4 (a)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	RPMI 10% (Kontrolle)	0,18	0,08		18
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,2	0,08	0,44	11
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	0,31	0,11	0,20	7
CD80/CD86	RPMI 10% (Kontrolle)	0,74	0,26		18
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,4	0,2	0,27	11
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	1,47	0,58	0,11	7

**Tag 7 (b)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	RPMI 10% (Kontrolle)	0,08	0,06		12
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,05	0,04	0,3	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	0,01	0,01	0,23	5
CD80/CD86	RPMI 10% (Kontrolle)	1,18	0,6		12
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,23	0,11	0,27	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	1,07	0,3	0,46	5

**Tag 10 (c)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	RPMI 10% (Kontrolle)	0,14	0,06		12
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,15	0,06	0,49	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	0,18	0,16	0,40	5
CD80/CD86	RPMI 10% (Kontrolle)	1,57	0,89		12
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,32	0,1	0,22	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	2,05	0,69	0,38	5

**Tabelle 18:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen (1x10<sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10<sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N). T/A: TEL/AML1

**Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 negative leukämische Blasten (K562)  
in Cocktail 5 (in %)**

**Tag 4 (a)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 (Kontrolle)	0,92	0,35		18
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	1,03	0,36	0,36	11
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	0,83	0,32	0,44	7
CD80/CD86	Cocktail5 (Kontrolle)	1,22	0,45		18
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	1,33	0,30	0,31	11
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	0,92	0,24	0,35	7

**Tag 7 (b)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 (Kontrolle)	1,31	0,31		12
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,73	0,33	0,33	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	2,04	0,48	0,13	5
CD80/CD86	Cocktail5 (Kontrolle)	2,16	1,05		12
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,59	0,13	0,29	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	6,29	3,94	0,11	5

**Tag 10 (c)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 (Kontrolle)	0,93	0,21		12
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,82	0,31	0,42	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	1,41	0,26	0,12	5
CD80/CD86	Cocktail5 (Kontrolle)	1,46	0,38		12
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,82	0,27	0,25	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	2,0	0,59	0,25	5

**Tabelle 19:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen (1x10<sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10<sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N). T/A: TEL/AML1

**Wirkung von TEL/AML1 auf TEL/AML1 negative leukämische Blasten (K562)  
in Cocktail5 + CD40 Ligand (in %)**

**Tag 4 (a)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 + CD40	1,56	0,78		18
	Ligand (Kontrolle)				
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	2,22	1,4	0,25	11
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	1,4	0,72		7
CD80/CD86	Cocktail5 + CD40	1,21	0,51		18
	Ligand (Kontrolle)				
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	1,33	0,41	0,44	11
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	1,02	0,42	0,41	7

**Tag 7 (b)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 + CD40	2,24	0,55		12
	Ligand (Kontrolle)				
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	1,18	0,55	0,30	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	3,76	1,06	0,11	5
CD80/CD86	Cocktail5 + CD40	1,58	0,42		12
	Ligand (Kontrolle)				
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,72	0,31	0,1	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	2,17	0,62	0,24	5

**Tag 10 (c)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 + CD40	1,36	0,3		12
	Ligand (Kontrolle)				
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	0,95	0,41	0,47	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	2,42	0,46	0,05	5
CD80/CD86	Cocktail5 + CD40	1,94	0,66		12
	Ligand (Kontrolle)				
	T/A 1x10 <sup>-11</sup> g/ml	1,0	0,37	0,16	7
	T/A 1x10 <sup>-10</sup> g/ml	2,04	0,46	0,47	5

**Tabelle 20:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium Cocktail 5+CD40L nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen (1x10<sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10<sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1

### 4.3 Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf Monozyten

Um festzustellen, ob TEL/AML1 Onkopeptid eine immunogene Wirkung auf Monozyten als Bestandteil der Immunabwehr hat, wurde die Wirkung von TEL/AML1 auf Monozyten von Spendern mittels der Expression von Oberflächenmarkern überprüft. Dabei wurde auch die Expression von CD1a/CD14 untersucht.

#### 4.3.1 Vitalität und Zellzahl

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konditionen mit und ohne TEL/AML1. Insgesamt kam es zu einer Abnahme der Vitalität bis zum 10. Tag, jedoch zeigte sich statistisch kein signifikanter Unterschied des Zellwachstums zwischen den Konditionen mit und ohne TEL/AML1.

Vitalität in %	RPMI 10%	Cocktail 5	RPMI 10%+ TEL/AML1 $1 \times 10^{-9}$ g/ml	Cocktail 5 + TEL/AML1 $1 \times 10^{-9}$ g/ml
Tag 4	81,90±2,63	86,53±1,25	77,53±5,46	81,01±3,52
Tag 7	72,20±7,32	78,93±3,45	76,48±6,98	75,65±6,87
Tag 10	69,60±8,91	81,10±7,94	78,93±6,81	69,92±7,31

**Tabelle 21:** Vitalität in % ( $\pm$  Standardabweichung) bei Monozyten in Konditionen mit und ohne TEL/AML1  $1 \times 10^{-9}$  g/ml

### 4.3.2 Immunphänotypisierung

- $1 \times 10^{-9}$  g/ml TEL/AML1 (1:1)

#### 4. Tag

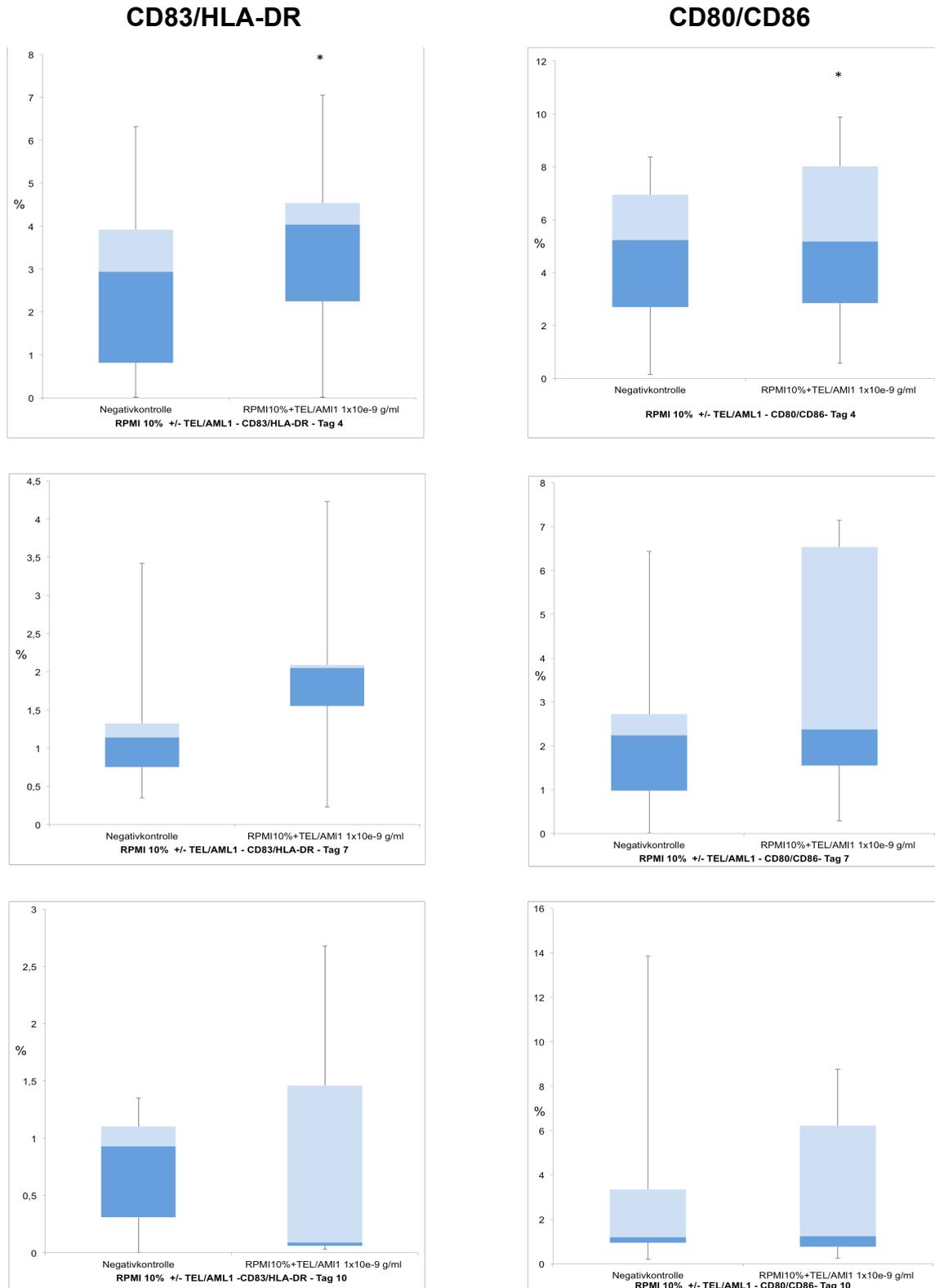
Signifikante Unterschiede zwischen der Negativ- und Positivkontrolle imponierten am Tag 4. CD83/HLA-DR wurde durchflusszytometrisch in RPMI 10 % +TEL/AML1 mit 3,52 % ( $\pm 0,85$  %) signifikant stärker exprimiert als in der Negativkontrolle mit 2,68 % ( $\pm 0,81$  %) bei einem  $p$ -Wert von 0,01.

Zusätzlich sah man bei CD80/86 am Tag 4 eine signifikant stärkere Expression in RPMI 10 % + TEL/AML1 mit 5,33 % ( $\pm 1,3$  %) im Vergleich zur Negativkontrolle mit 4,7 % ( $\pm 1,2$  %). Der  $p$ -Wert ist 0,02.

Signifikant stärker wurde auch CD80/86 am Tag 4 in Cocktail 5 + TEL/AML1 exprimiert mit 9,2 % ( $\pm 2,7$  %) zu 6,5 % ( $\pm 1,9$  %) in der Negativkontrolle. Der daraus resultierende  $p$ -Wert ist 0,03.

Es wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede an allen Messtagen mit den jeweiligen Medien festgestellt.

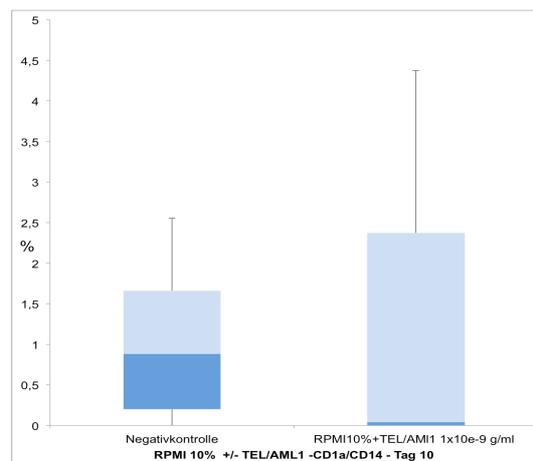
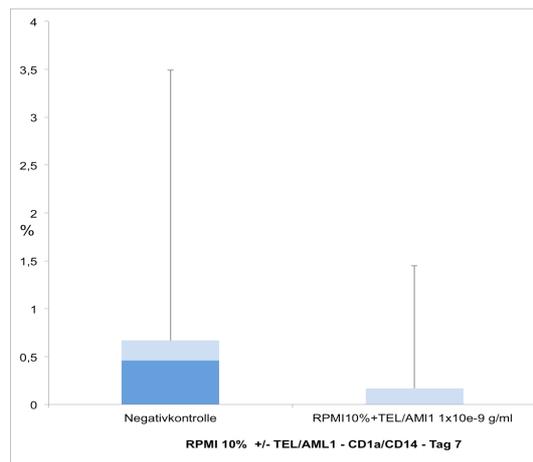
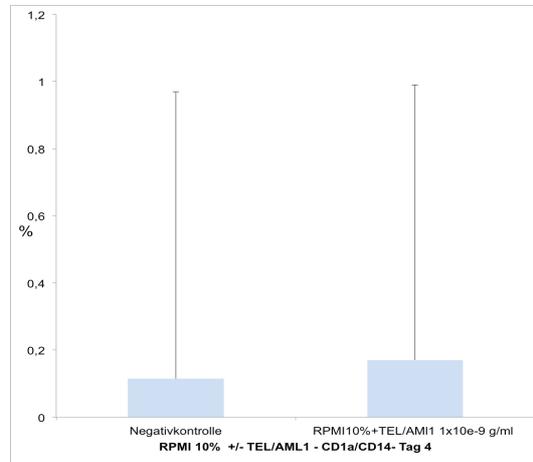
## Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf Monozyten in RPMI + 10% FBS



**Abbildung 20:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei humanen Monozyten im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 (X-Achse: 1x10<sup>-9</sup> g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

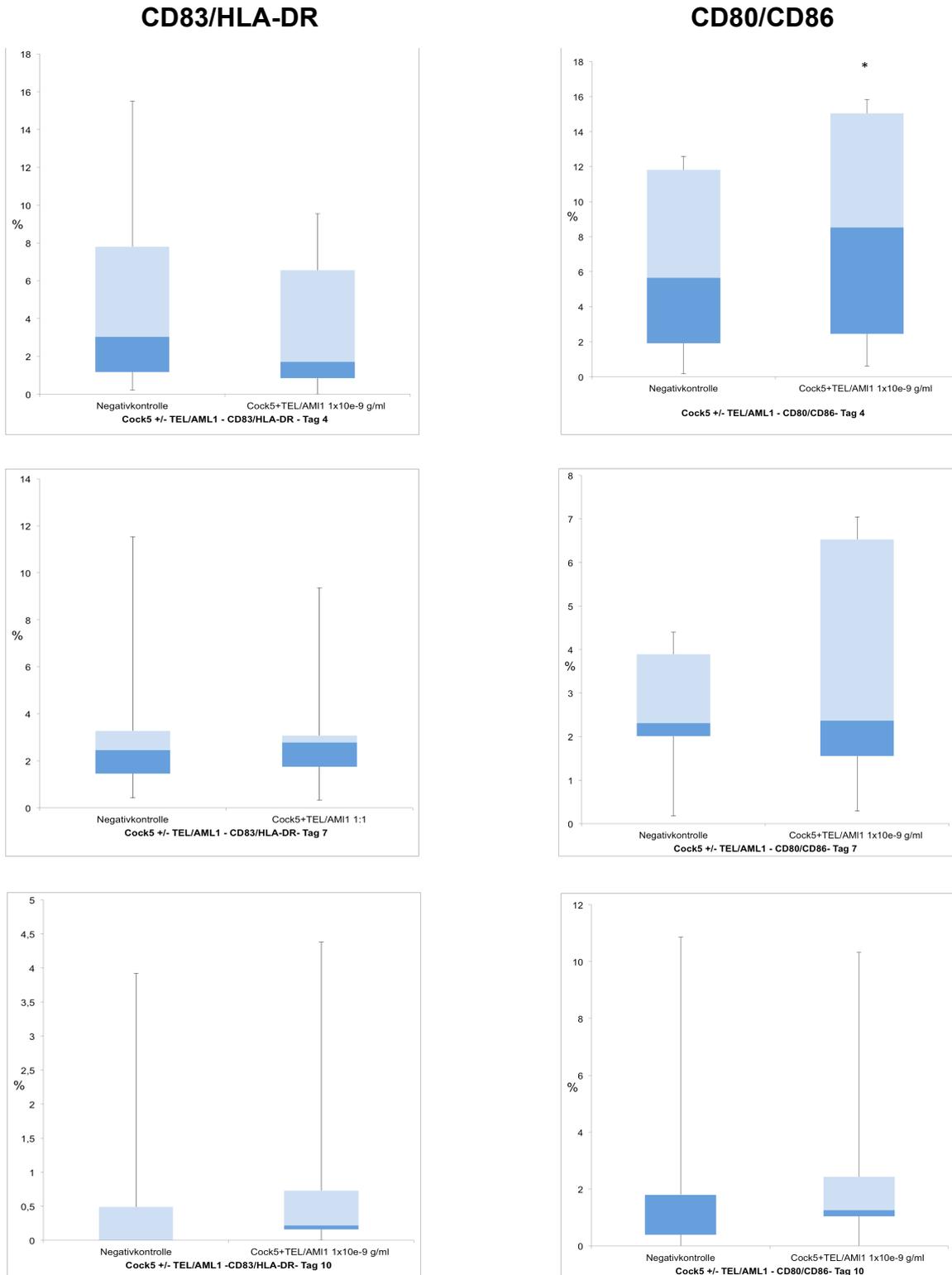
**Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf Monozyten  
in RPMI + 10% FBS**

**CD1a/CD14**



**Abbildung 21:** Häufigkeit der CD1a/CD14-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei humanen Monozyten im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 (X-Achse: 1x10-9 g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD1a/CD14. Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

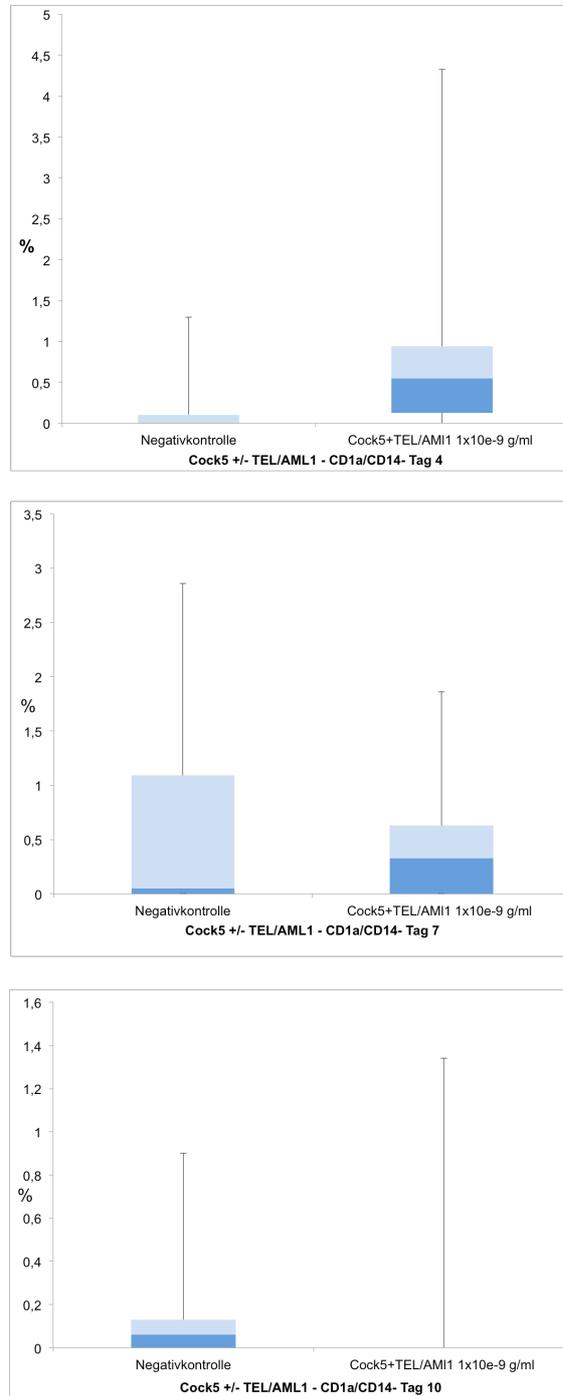
## Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf Monozyten in Cocktail 5



**Abbildung 22:** Häufigkeit der CD1a/CD14-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei humanen Monozyten im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 (X-Achse: 1x10<sup>-9</sup> g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD1a/CD14. Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Medianwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

## Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf Monozyten in Cocktail 5

### CD1a/CD14



**Abbildung 23:** Häufigkeit der CD1a/CD14-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei humanen Monozyten im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 (X-Achse:  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD1a/CD14. Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die  $>1\%$  Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

**Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf Monozyten  
in RPMI + 10 % FBS (in %)**

**Tag 4 (a)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	RPMI 10% (Kontrolle)	2,68	0,81		7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	3,52	0,85	0,01	7
CD80/CD86	RPMI 10% (Kontrolle)	4,72	1,16		7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	5,33	1,3	0,02	7
CD1a/CD14	RPMI 10% (Kontrolle)	0,17	0,13		7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	0,19	0,13	0,14	7

**Tag 7 (b)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	RPMI 10% (Kontrolle)	1,4	0,48		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	2,03	0,58	0,22	5
CD80/CD86	RPMI 10% (Kontrolle)	2,47	0,98		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	3,58	1,23	0,33	5
CD1a/CD14	RPMI 10% (Kontrolle)	0,92	0,59		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	0,32	0,25	0,21	5

**Tag 10 (c)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	RPMI 10% (Kontrolle)	0,74	0,22		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	0,86	0,47	0,4	5
CD80/CD86	RPMI 10% (Kontrolle)	3,91	2,27		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	3,45	1,52	0,4	5
CD1a/CD14	RPMI 10% (Kontrolle)	1,06	0,42		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	1,36	0,79	0,37	5

**Tabelle 22:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR-, CD1a/CD14- und CD80/86-Expression bei humanen Monozyten im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 (1x10<sup>-9</sup> g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N). T/A: TEL/AML1

**Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf Monozyten  
in Cocktail 5 (in %)**

**Tag 4 (a)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 (Kontrolle)	5,24	1,95		7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	5,91	2,5	0,42	7
CD80/CD86	Cocktail5 (Kontrolle)	6,55	1,91		7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	9,19	2,71	0,03	7
CD1a/CD14	Cocktail5 (Kontrolle)	0,22	0,17		7
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	1,00	0,54	0,12	7

**Tag 7 (b)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 (Kontrolle)	3,83	1,77		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	3,46	1,39	0,23	5
CD80/CD86	Cocktail5 (Kontrolle)	2,56	0,67		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	3,58	1,23	0,11	5
CD1a/CD14	Cocktail5 (Kontrolle)	0,8	0,5		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	0,56	0,31	0,36	5

**Tag 10 (c)**

Marker	Kondition	Mittelwert	SA	p-Wert	N
CD83/HLA-DR	Cocktail5 (Kontrolle)	0,88	0,68		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	1,1	0,74	0,15	5
CD80/CD86	Cocktail5 (Kontrolle)	2,97	1,79		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	3,01	1,67	0,46	5
CD1a/CD14	Cocktail5 (Kontrolle)	0,22	0,15		5
	T/A 1x10 <sup>-9</sup> g/ml	0,27	0,24	0,32	5

**Tabelle 23:** Häufigkeit der CD83/HLA-DR-, CD1a/CD14- und CD80/86-Expression bei humanen Monozyten im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 (1x10<sup>-9</sup> g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1

## 5 Diskussion

Genetische Veränderungen können zur Entstehung von Krebserkrankungen führen (Mody et al., 2015). Diese Veränderungen führen zu einer exponentiellen Zellteilung und Verdrängung und letztlich zum Funktionsverlust von gesundem Gewebe und zur Aufhebung des programmierten Zelltodes (Mody et al., 2015). Aufgrund der hohen Sterblichkeit und nebenwirkungsreichen Therapien bei malignen Erkrankungen könnte eine DC-Therapie einen spezifischen Ansatz und eine nebenwirkungsärmere Alternative bieten (Blattman, et al., 2004; Steinman, 2007; Waldmann, 2003).

Spezifische Tumorantigene spielen eine essenzielle Voraussetzung für eine gezielte DC Therapie (Hsu, et al., 1996; (Anguille, et al., 2014). Ein geeigneter Angriffspunkt könnte die bei der ALL auftretende TEL/AML1 Translokation t(12;21)(p13;q22) mit dem resultierenden Fusionsprotein bieten. Dabei wird die Peptidsequenz der Fusionsregion zwischen dem TEL- und AML1-Anteil von gesunden Zellen nicht synthetisiert und hat somit die größte Wahrscheinlichkeit, als körperfremd erkannt zu werden und eine immunogene Reaktion auszulösen (Yotnda et al., 1998).

In vorangehenden Studien konnte demonstriert werden, dass die Fusionssequenz des Onkopeptids TEL/AML1 über MHC I Moleküle präsentiert werden kann (Yotnda et al., 1998; Yun et al., 1999). Außerdem konnte eine zytotoxische T-Zell-Reaktion *in vitro* gegen die Fusionssequenz von TEL/AML1 (RIAECILGM) beobachtet werden (Moldenhauer et al., 2004; Yotnda et al., 1998; Yun et al., 1999).

Ziel dieser Arbeit war es, durch die zusätzliche Gabe des TEL/AML1 Peptid die Umwandlung von leukämischen TEL/AML1 positiven Zelllinien in DCs zu steigern. Dafür ließen wir für diese Arbeit die Sequenz aus der Fusionsregion des TEL/AML1 Onkopeptids durch Thermo Electron® GmbH synthetisieren. Diese enthält die komplette Sequenz der von *Yotnda et al.* untersuchten Fusionssequenz (MPIGRIAECILGMNPS). Zum Vergleich wurde auch die Wirkung von TEL/AML1 Peptid auf TEL/AML1 negative leukämische Blasten und humane Monozyten untersucht.

## 5.1 Immunphänotypische Beurteilung nach Gabe von TEL/AML1 Peptid

Um festzustellen, ob die zusätzliche Gabe von TEL/AML1 Peptid zu einer gesteigerten Differenzierung in DCs führt, wurden durchflusszytometrisch die Marker CD83, HLA-DR, CD80 und CD86 auf den leukämischen DCs untersucht.

CD83 wird von reifen DCs exprimiert (Banchereau et al., 2000). HLA-DR ist ein MHC-II Molekül und wird ebenfalls von reifen DCs präsentiert (Banchereau et al., 2000). Für die Interaktion zwischen T-Zellen und reifen DCs werden CD80 und CD86 auf der Oberfläche von reifen DCs präsentiert, die an CD28 auf T-Zellen binden und neben MHC II-Antigen-Komplex als zweites Signal zu einer T-Zellaktivierung führen (Peggs et al., 2008). Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von Monozyten wurde zusätzlich CD1a und CD 14 untersucht. CD1a ist ein Marker für unreife DCs und CD14 wird von Monozyten exprimiert (El-Sahrigy et al., 2015).

### 5.1.1 TEL/AML1 positive REH-Zelllinie (ALL)

Yotnda et al. konnten zum ersten Mal zeigen, dass das TEL/AML1 Peptid mit der Fusionssequenz (RIAECILGM) als Tumor-assoziiertes Antigen eine zytotoxische T-Zellreaktion durch CD8+ T-Killerzellen auslöst (Yotnda et al., 1998). Basierend auf derselben Studie wurde davon ausgegangen, dass dieses TEL/AML1 Fusionspeptid hierfür an MHC I bindet (Schmidt et al., 2009; Yotnda et al., 1998). In weiteren Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Fusionssequenz von TEL/AML1 nicht nur spezifische zytotoxische T-Zellreaktionen durch CD8+ T-Killerzellen auslöst, sondern auch CD4+ T-Helferzellen zur Proliferation stimulieren kann (Schmidt et al., 2009; Yun et al., 1999).

Aufgrund der Studienlage gehen wir davon aus, dass die zusätzliche Gabe dieses TEL/AML1 Fusionspeptids bei der TEL/AML1 positiven ALL Zelllinie (REH) zu einer gesteigerten Transformation in leukämische DCs unter Zytokin-Cocktails führt. Dies könnte zu einer optimierten DC-Therapie führen.

Um die optimale Wirkung von TEL/AML1 Peptid zu ermitteln, erfolgte die Gabe in verschiedenen Konzentrationsstufen von  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1),  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) und  $1 \times 10^{-11}$  g/ml (1:100) (Abbildung 13, Kapitel 4.1). In der Verdünnung von  $1 \times 10^{-11}$  g/ml

(1:100) TEL/AML1 Peptid zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Wahrscheinlich war die Konzentration von TEL/AML1 zu niedrig um zu signifikanten Veränderungen zu führen. Erst ab einer Konzentration von  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1) und  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) zeigte sich eine Wirkung durch das TEL/AML1 Peptid auf die TEL/AML1 positive REH Zelllinie.

Im Gegensatz zu unseren Erwartungen führte TEL/AML1 Peptid am 7. Tag sowohl in der Konzentrationsstufe  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) als auch in  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1) Konzentrationsstufe zu einer signifikanten Verminderung der Expression aller dendritischen Zellmarker. CD83/HLA-DR wurde im Cocktail 5 Medium unter TEL/AML1  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) von 10,07 % auf 2,72 % signifikant herunterreguliert ( $p$ -Wert = 0,02). In der Konzentrationsstufe  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1) wurde diese Wirkung noch deutlicher, wo die CD83/HLA-DR Expression im Cocktail 5 Medium mit TEL/AML1 Peptid zu einer signifikant noch stärkeren Verminderung von 10,1 % auf 1,28 % führte ( $p$ -Wert = 0,01). Auch die für die Interaktion zwischen T-Zellen und reifen DCs verantwortlichen Marker CD80 und CD86 wurden in der Konzentrationsstufe  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) und  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1) am 7. Tag signifikant herunterreguliert. In der Konzentrationsstufe  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) sank die Expression von CD80/CD86 im Cocktail 5 Medium signifikant von 2,4 % auf 1,02 % ( $p$ -Wert = 0,02), in der Konzentrationsstufe  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1) sogar von 2,4 % auf 0,29 % ( $p$ -Wert von 0,001).

Vergleichbare Ergebnisse präsentieren sich unter Cocktail 5 + CD40 Ligand. Auch hier zeigt sich am 7. Tag in der Konzentrationsstufe  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1) eine signifikant verminderte Expression von CD83/HLA-DR von 16,12 % auf 3,63 % unter TEL/AML1 Peptidgabe ( $p$ -Wert von 0,001). Ebenfalls konnte dies für CD80/CD86 demonstriert werden, mit einer signifikanten Herabregulation von 6,88 % auf 1,57 % unter TEL/AML1 Peptidgabe ( $p$ -Wert = 0,004).

Zusammenfassend scheint die Wirkung von TEL/AML1 Peptid erst am 7. Tag in Konzentrationen von  $1 \times 10^{-10}$  g/ml TEL/AML1 (1:10) und  $1 \times 10^{-9}$  g/ml TEL/AML1 (1:1) seine maximale Entfaltung zu zeigen. Entgegen der Hypothese führt das TEL/AML1 Peptid zu einer signifikanten Herabregulation der DC-Marker trotz Zytokinstimulation.

Aufgrund der Resultate muss zunächst die Effektivität der verwendeten TEL/AML1 Fusionssequenz geprüft werden. Es wurde die identische Fusionssequenz, wie die von *Yotnda et al.* untersuchten Fusionssequenz (RIAECILGM), verwendet (Yotnda et al., 1998). In der Studie von *Yun et al.* konnte diese Peptidsequenz ebenfalls eine CD4+ T-Zellproliferation auslösen (Yun et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die gleiche Sequenz, um einige Aminosäuresequenzen erweitert, verwendet (MPIGRIAECILGMNPS). Diese Sequenz enthält einen größeren Bereich der Fusionsregion. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnte schon diese Sequenz erfolgreich verwendet werden (Schmidt et al., 2009). In der Studie von *Schmidt et al.* konnte eine zytotoxische T-Zellreaktion durch diese TEL/AML1 Fusionssequenz ausgelöst werden (Schmidt et al., 2009; Yun et al., 1999). Dieses zeigt die Funktionsfähigkeit dieser erweiterten Fusionssequenz.

Es stellt sich auch die Frage, ob der verwendete Zytokin-Cocktail keine Wirkung hat. Der Cocktail 5 wurde jedoch schon in der Studie von *Schmidt et al.* erfolgreich zur Umwandlung humaner TEL/AML1 positiver ALL Blasten in leukämische DCs verwendet (Schmidt et al., 2009). Dabei zeigten sich bei den humanen leukämischen TEL/AML1 positiven Blasten durchflusszytometrisch erhöhte CD83/HLA-DR Expressionen (47 %) und CD80/86 Expressionen (35 %) (Schmidt et al., 2009). Diese Diskrepanz zu den aktuellen Ergebnissen könnte an der Verwendung eines anderen Grundmediums (StemSpan™ 3000) sowie 10 % humanen Serums liegen, was eine Vielzahl humaner Zytokine enthält und eine zusätzliche Stimulation bewirkt. Da in dieser Arbeit mit humanen stabilen monoklonalen Zelllinien gearbeitet wurde, wurde als Grundmedium das bewährte RPMI + 10 % Fetal bovine Serum (FBS) verwendet, was ausreichend für Zelllinien ist, jedoch keine so starke Stimulation bewirkt (ATCC, 2014).

Ein stimulierender Effekt auf die Expression der DC-Oberflächenmarker durch Cocktail 5 konnte per se auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Das demonstriert der Vergleich mit der Negativkontrolle in RPMI + 10 % FBS ohne zusätzliche Zytokine. Dabei kam es insgesamt zu einer stärkeren Expression aller untersuchten Oberflächenmarker um den Faktor 2x in den Medien mit Cocktail 5 und noch verstärkter um den Faktor 2,5x in Cocktail 5 + CD40 Ligand im Vergleich zum Kontrollmedium RPMI + 10 % FBS. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von *Schmidt et al.* und

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, wo es zu einer signifikant erhöhten Expression von DC Oberflächenmarkern unter dieser Zytokinkombination kam (Schmidt et al., 2009). Außerdem konnte in der Studie *Diehl et al.* demonstriert werden, dass CD40 Ligand die Effektivität von Tumorstimmungsimpfungen erhöht (Diehl et al., 1999). Das liegt daran, dass CD40 Ligand bei APCs die MHC Expression hochreguliert, die Zytokinproduktion beschleunigt und die Expression von ko-stimulatorischen Markern wie CD80 erhöht, mit dem Ziel das APCs sich zytotoxischen T-Killerzellen präsentieren und diese aktivieren (Velders et al., 2001).

Trotz der erwiesenen Wirkung von Cocktail 5 scheint es zu einer signifikanten Herabregulation der DC Marker zu kommen. Die Ursache scheint somit primär an der Wirkung des TEL/AML1 Peptids zu liegen. Dies ist umso erstaunlicher, da in den bisherigen Studien von *Yotnda et al.*, *Yun et al.* und *Schmidt et al.* von einer immunstimulierenden Wirkung von TEL/AML1 Fusionspeptid ausgegangen wurde (Schmidt et al., 2009; Yotnda et al., 1998; Yun et al., 1999).

Zur Kontrolle führten wir den Versuch an einer TEL/AML1 negativen CML-Zelllinie durch.

### **5.1.2 TEL/AML1 negative K562-Zelllinie (CML)**

Die TEL/AML1 negative K562 Zelllinie wurde mit  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) oder  $1 \times 10^{-11}$  g/ml (1:100) Konzentrationsstufen TEL/AML1 Peptid versetzt. Einzig am 10. Tag zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der CD83/HLA-DR Expression mit Cocktail 5 + CD40 Ligand von 1,36 % ( $\pm 0,3$  %) auf 2,43 % ( $\pm 0,46$  %) mit TEL/AML1  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10). Diese erhöhte Expression ist signifikant, jedoch liegt der prozentuale Unterschied bei maximal 1 %. Außerdem konnte dieses Resultat für die anderen Marker und in der Konzentrationsstufe 1:100 nicht festgestellt werden, so dass die Relevanz dieses Ergebnisses fraglich ist.

Zusammenfassend konnten unter TEL/AML1 Peptidgabe in Konzentrationsstufen von  $1 \times 10^{-11}$  g/ml TEL/AML1 (1:100) und  $1 \times 10^{-10}$  g/ml TEL/AML1 (1:10) außer der o.g. CD83/HLA-DR Expression keine signifikanten Expressionsunterschiede im Vergleich

zur Negativkontrolle ohne TEL/AML1 bei TEL/AML1 negativen leukämischen Blastenzelllinie (K562) festgestellt werden.

Die bisherigen Versuche an TEL/AML1 positiven und TEL/AML1 negativen leukämischen Zelllinien veranschaulichen eine spezifische Wirkung der Fusionssequenz auf TEL/AML1 positive leukämische Blasten. Dafür spricht auch, dass es zu keinen relevanten signifikanten Expressionsänderungen unter TEL/AML1 Peptid bei TEL/AML1 negativen leukämischen Blasten (K562) kam.

Das TEL/AML1 Fusionspeptid scheint entgegen der bisherigen Studienlage nicht zu einer gesteigerten Umwandlung leukämischer Blasten in leukämische DCs zu führen, sondern die Umwandlung zu arretieren. Bei vielen malignen Erkrankungen ist bekannt, dass sie auf vielfältige Weise dem Immunsystem entgehen und es auch supprimieren (Gabrilovich, 2004). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Tumore Zytokine sezernieren, wie IL-6, Vascular endothelial growth Factor und IL-10, welche über den STAT3-Signalweg DCs supprimieren (Kortylewski et al., 2005). Außerdem sind Malignome in der Lage, DCs in ihrer Umgebung so zu konfigurieren, dass diese immunsupprimierende T-Zellen ausbilden (Ghiringhelli et al., 2005). Diese Kontrolle des Immunsystems geht bei einigen Tumorerkrankungen so weit, dass in der Studie von *Aspord et al.* gezeigt werden konnte, dass Brustkrebszellen DCs dazu verleiten, CD4+ T-Zellen auszubilden, die IL-13 sezernieren und dadurch das Tumorstadium erleichtern (Aspord et al., 2007).

In Anbetracht dieses Hintergrunds legen die bisherigen Ergebnisse die Vermutung nahe, dass das TEL/AML1 Peptid zu einer Hemmung der Ausdifferenzierung von leukämischen DCs führt und in diesem Fall das Erkennen durch das Immunsystem verhindert. Es sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob das TEL/AML1 Peptid überhaupt eine immunogene Wirkung auf APCs ausübt. Um dem nachzugehen, wurden immunphänotypisch die Oberflächenmarker für reife DCs auf Monozyten nach Gabe von TEL/AML1 Peptid untersucht.

### 5.1.3 Humane Monozyten

In der Konzentrationsstufe  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1) sah man am 4. Tag eine signifikant stärkere Expression von CD83/HLA-DR in RPMI 10% unter TEL/AML1 Peptidgabe mit 3,52 % im Vergleich zur Negativkontrolle mit 2,68 % ( $p$ -Wert=0,01). Zusätzlich fiel unter denselben Konditionsbedingungen bei CD80/86 eine signifikant stärkere Expression unter TEL/AML1 Peptid mit 5,33 % im Vergleich zur Negativkontrolle mit 4,7 % auf ( $p$ -Wert = 0,02). Auch unter Cocktail 5 kam es zu einer Hochregulation von CD80/86 am Tag 4 in unter TEL/AML1 Peptid mit 9,2 % im Vergleich zur Negativkontrolle mit 6,5 % ( $p$ -Wert = 0,03).

Zusammenfassend führte die TEL/AML1 Peptidgabe in einer Konzentrationsstufe von  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1) am 4.Tag sowohl zu einer mäßig gesteigerten Expression aller DC Marker bei humanen Spendermonozyten im RPMI 10 % Medium, als auch zu einer Hochregulation von CD80/CD86 unter Cocktail 5. Dies lässt vermuten, dass das TEL/AML1 Peptid wahrscheinlich eine Differenzierung der Monozyten fördern könnte. Die genaue Funktionsweise des TEL/AML1 Peptids ist jedoch dabei noch unbekannt. Man könnte vermuten, dass das Peptid entweder phagozytiert, prozessiert und an MHC Molekülen dem Immunsystem präsentiert wird oder dass dies lediglich eine unspezifische Reaktion der Monozyten auf ein fremdes Antigen ist. Um eine unspezifische Reaktion auszuschließen wären weitere Versuche mit einem Kontrollpeptid als Vergleich sinnvoll. Die bisherige Erkenntnis, dass das TEL/AML1 Peptid die Differenzierung und somit Aktivierung von DCs bremst, konnte sich durch eine teilweise Hochregulation der DC-Marker auf den Monozyten nicht bestätigen. Somit scheint eine spezifische Reaktion der TEL/AML1 Fusionssequenz auf die TEL/AML1 positiven leukämischen Blasten vorzuliegen.

### 5.2 Kritische Einordnung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, dass die TEL/AML1 Fusionssequenz eine immunogene Wirkung hat, wie schon mehrfach in mehreren Studien nachgewiesen wurde (Schmidt et al., 2009; Yotnda et al., 1998; Yun et al., 1999). Entgegen unseren Erwartungen führte die TEL/AML1 Peptidsequenz jedoch nicht zu einer gesteigerten Expression der DC Marker bei leukämischen TEL/AML1

positiven DCs, die für eine Immunreaktion notwendig ist. Das TEL/AML1 Peptid führte im Gegenteil zu einer Herunterregulation der DC Marker.

Eine aktuelle Studie von *Popovic et al.* von 2011 könnte einen Grund für die herabregulierte Immunogenität der TEL/AML1 Fusionssequenz liefern (Popovic et al., 2011). Darin wurde anhand eines Mausmodells untersucht, ob T-Zellen das TEL/AML1 Epitop erkennen. Dafür wurde ein etabliertes transgenes Mausmodell verwendet, welches humane T-Zellrezeptoren und humane MHC I Moleküle auf den Zellen exprimiert. Erstaunlicherweise führte das TEL/AML1 Peptid am Mausmodell zu keiner Immunantwort. *Popovic et al.* vermuten, dass die Ursache in der fehlenden Bindung an MHC I Molekülen liegt. Dies konnten sie dadurch nachweisen, dass erst nach einer Modifikation mit einem zusätzlichen Ankerprotein das Peptid auf MHC I gebunden wurde und erst dann von CD8+ T-Zellen *in vivo* erkannt wurde. Diese spezialisierten CD8+ T-Zellen waren daraufhin auch in der Lage *in vitro* das native TEL/AML1 Peptid zu erkennen, jedoch nur eine verminderte zytotoxische T-Zell-Reaktion im Vergleich zu *in vivo* mit dem ankergebundenen TEL/AML1 Peptid auszulösen (Popovic et al., 2011).

Um auszuschließen, dass das verwendete Mausmodell kompromittiert ist, prüften *Popovic et al.* andere humane Tumor-assoziierte Antigene. Diese lösten im Gegensatz zum TEL/AML1 Peptid spezifische T-Zell-Reaktionen aus. Dies führte zu der Annahme, dass das TEL/AML1 Peptid nicht prozessiert wird. In weiteren Versuchen wurde demonstriert, dass APCs ein weiteres humanes TAA Melan-A/MART-1, ein Antigen präsentiert bei metastasierendem Melanom, prozessierten und CD8+ T-Zellen präsentierten, jedoch das TEL/AML1 Peptid von den CD8+ Zellen nicht erkannt wurde (Busam et al., 1998; Popovic et al., 2011). Letztlich konnten *Popovic et al.* zeigen, dass aus der kompletten TEL/AML1 Fusionssequenz bei der Prozessierung durch Proteasome die bekannte TEL/AML1 Peptidsequenz nicht als Epitop generiert werden kann (Popovic et al., 2011).

Insgesamt stehen die Ergebnisse sowohl dieser Arbeit als auch von *Popovic et al.* im Kontrast zu den Studienergebnissen von *Yotnda et al.* (Popovic et al., 2011; Yotnda et al., 1998). Er beschrieb, dass das TEL/AML1 Peptid von CD8+ T-Zellen erkannt wurde und diese spezifischen CD8+ T-Zellen daraufhin autologe TEL/AML1 positive

leukämische Blasten und die REH Zelllinie identifizierten (Popovic et al., 2011; Yotnda et al., 1998). Die meisten Zytotoxizitätsstests wurden jedoch mit CD8+ T-Zelllinien durchgeführt statt mit isolierten CD8+ T-Zellklonen. Da die T-Zellspezifität grundsätzlich kreuzreaktiv ist, d.h. T-Zellen auf mindestens  $10^6$  MHC-assoziierte Epitope reagieren, ist wahrscheinlich die verwendete T-Zelllinie mit diversen T-Zellklonen unspezifischer als ein isolierter CD8+ T-Zellklon (Mason, 1998; Popovic et al., 2011; Sewell, 2012; Wilson et al., 2004). Außerdem war die Zytotoxizitätsaktivität der TEL/AML1 spezifischen T-Zelllinien in der Studie von *Yotnda et al.* niedrig mit einer hohen Rate an unspezifischer Zellyse im Hintergrund, so dass es schwierig ist festzustellen, ob tatsächlich eine TEL/AML1 Spezifität vorlag (Popovic et al., 2011; Yotnda et al., 1998).

In der Studie von *Schmidt et al.* konnten TEL/AML1 positive leukämische APCs aus leukämischen Blasten zytotoxische T-Zell-Reaktionen durch CD8+ T-Killerzellen auslösen (Schmidt et al., 2009). Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass neben dem spezifischen Tumorantigen TEL/AML1 leukämische DCs dem Immunsystem zusätzlich eine Vielzahl an unbekanntem Tumorantigenen präsentieren (Blair et al., 2001; B. A. Choudhury et al., 1999; Cignetti et al., 1999). Dieses könnte ebenfalls eine Ursache für die zytotoxischen T-Zell-Reaktionen sein.

*Popovic et al.* demonstrierten, dass das TEL/AML1 Fusionspeptid von DCs nicht natürlich als Epitop prozessiert und präsentiert werden kann. Somit ist das TEL/AML1 Peptid für eine DC-Therapie wahrscheinlich nicht geeignet. Dies schließt jedoch eine immunogene Wirkung der TEL/AML1 Fusionssequenz nicht vollständig aus (Popovic et al., 2011). *Popovic et al.* konnten das TEL/AML1 Peptid trotz nicht natürlicher Prozessierung *in vitro* an ein Ankerprotein mit MHC I binden und zytotoxische T-Zell-Reaktionen auslösen (Popovic et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden humane Monozyten ebenfalls durch TEL/AML1 Peptid teilweise zur Expression von DC Markern stimuliert. Daraus kann jedoch nicht eindeutig festgestellt werden, ob das TEL/AML1 Peptid verarbeitet und als Antigen präsentiert wurde oder ob es nur die Differenzierung der Monozyten unspezifisch fördert. Aus diesem Grund bedarf es weiterer Studien, insbesondere mit *in vivo* Modellen, da alle bisherigen Studien außer der von *Popovic et al.* auf *in vitro* Modellen beruhten (Popovic et al., 2011).

### 5.3 Schlussfolgerung

Basierend auf der Studie von *Yotnda et al.* wurde davon ausgegangen, dass das TEL/AML1 Fusionspeptid von den leukämischen DCs aufgrund der nicht natürlichen Peptidsequenz als fremd angesehen wird, prozessiert wird und an MHC Molekülen gebunden und präsentiert wird (Yotnda et al., 1998). Es wurde erwartet, dass es durch die Zugabe des TEL/AML1 Fusionspeptids zu einer verstärkten Expression der reifen DC Marker kommt, die für die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen notwendig ist.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des TEL/AML1 Peptids auf leukämische TEL/AML1 positive Zelllinien-Blasten (REH) untersucht. Es konnte dabei erstmals demonstriert werden, dass allein die Fusionssequenz des TEL/AML1 Peptids die Differenzierung von leukämischen TEL/AML1 positiven Zelllinien zu leukämischen DCs trotz Zytokinstimulation hemmt. Die TEL/AML1 Peptidgabe führte am 7. Tag zu einer signifikanten Herabregulation der DC Marker in den TEL/AML1-Konzentrationen  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) und  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1). Diese Wirkung scheint spezifisch für TEL/AML1 positive Zelllinien (REH) zu sein, da das TEL/AML1 Peptid keine Auswirkung auf TEL/AML1 negative leukämische Zelllinien (K562) hat. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Fusionssequenz von TEL/AML1 wahrscheinlich den leukämischen Blasten-Zustand beibehält. Ein möglicher Mechanismus könnte eine intrazelluläre Kopplung oder Interaktion mit einem weiteren Protein sein, was zur Hemmung der Differenzierung führt. Dies sollte in weiteren Studien z.B. mit TEL/AML1 positiven leukämischen Patienten-Blasten verifiziert werden. Die TEL/AML1 Fusionssequenz ist aus diesen Gründen wahrscheinlich nicht geeignet für eine DC Therapie. Aus diesem Grund sollten weitere tumorassoziierte Antigene bei der Leukämie untersucht werden, die für eine dendritische Zelltherapie ein vielversprechenderes Potenzial haben könnten.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der myeloischen und lymphopoetischen Zelllinien aus den hämatopoetischen Stammzellen (HSZ); (Eigene Abbildung nach Röder, 2003).....	11
Abbildung 2: Blutausstrich bei einem ALL Patienten mit leukämischen Blasten (Schmidt, et al., 2009).....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der ALL-Therapie (Chiaretti et al., 2014) .....	17
Abbildung 4: TEL-Proteinstruktur 452: Anzahl der Aminosäuren; Beschriftung in dunkelblau: Funktion der jeweiligen Domäne (Eigene modifizierte Abbildung nach De Braekeleer et al., 2012) .....	19
Abbildung 5: AML1-Protein und einige Interaktionspartner (Eigene Abbildung nach Zelent et al., 2004). Dunkelblaue Beschreibungen: Funktion der Domänen; Interaktionspartner: Dargestellt sind weitere Co-Faktoren, die mit den jeweiligen Domänen interagieren; GATA1: Globin Transkription Faktor1; ERK: Extrazellulär-signal regulierte Kinase; CCND3: Cyclin D3; TLE: transducin-like Enhancer of split Proteins; 22	
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Transkriptionsaktivierung durch AML1-Protein (eigene modifizierte Abbildung nach Sawyers, 1998) .....	24
Abbildung 7: Anteil von TEL/AML1 an pädiatrischen ALL Erkrankungen (Eigene Abbildung nach Shurtleff et al., 1995).....	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung des TEL-Proteins, AML1-Proteins und des aus der Translokation t(12;21) entstehenden Fusionsproteins TEL/AML1. Der schwarze Pfeil zieht durch die Bruchstellen und zeigt auf die Fusionsstelle von TEL/AML1 Protein. Dunkelblaue Beschreibungen: Funktion der Domänen (Eigene Abbildung nach Zelent et al., 2004).....	26
Abbildung 9: Mögliche Ätiologie, die zum Ausbruch einer TEL/AML1-positiven ALL führen kann. Eigene Abbildung nach (Zelent et al., 2004).....	27
Abbildung 10: Eigene schematische Darstellung vom Ablauf einer dendritischen Zellvakzinierung nach Mody, et al. 2015. Der rote Pfeil verdeutlicht die Gewinnung von Tumormaterial, welches DCs präsentiert, phagozytiert und als Antigene dem Immunsystem präsentiert wird. DC: Dendritische Zellen; APC: Antigenpräsentierende Zellen. ....	32
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus anhand der 6-Well Platte mit den jeweiligen Medien. Die oberen drei Wells bilden die Negativkontrolle, die	

unteren drei Wells enthalten TEL/AML1 als Positivkontrolle. RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium); CD40l: CD40-Ligand .....	47
Abbildung 12: Eigene schematische Darstellung zum Aufbau eines Durchflusszytometers (D. Wang, Hussain A., Sommovilla N., 2006). Erklärung siehe Kapitel 3.2.2.....	49
Abbildung 13: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Wirkung von TEL/AML1 Onkopeptid auf die REH Zelllinie. Der gesamte Versuchsaufbau wurde insgesamt für bis zu 3 verschiedene Konzentrationsstufen von TEL/AML1 (1:1, 1:10,1:100) mehrfach untersucht. Der identische Versuchsaufbau erfolgte auch mit TEL/AML1 negativen leukämischen Zelllinien (K562) und Monozyten. ....	52
Abbildung 14: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 positive REH-Zellen im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse: 1x10-9 g/ml (1:1), 1x10-10 g/ml (1:10) und 1x10-11 g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörenden Werte sind in Tabelle 13 zusammengefasst..	56
Abbildung 15: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 positive REH-Zellen im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse: 1x10-9 g/ml (1:1), 1x10-10 g/ml (1:10) und 1x10-11 g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörenden Werte sind in Tabelle 14 zusammengefasst..	57
Abbildung 16: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 positive REH-Zellen im Medium Cocktail 5 + CD40 Ligand nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse: 1x10-9 g/ml (1:1), 1x10-10 g/ml (1:10) und 1x10-11 g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse	

nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 15 zusammengefasst..

..... 58

Abbildung 17: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse:  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) und  $1 \times 10^{-11}$  g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 18 zusammengefasst..... 64

Abbildung 18: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse:  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) und  $1 \times 10^{-11}$  g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 19 zusammengefasst..... 65

Abbildung 19: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium Cocktail 5 + CD40 Ligand nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen (X-Achse:  $1 \times 10^{-10}$  g/ml (1:10) und  $1 \times 10^{-11}$  g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 20 zusammengefasst..

..... 66

Abbildung 20: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei humanen Monozyten im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 (X-Achse:  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für

CD83/HLA-DR (linke Spalte) und CD 80/86 (rechte Spalte). Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörenden Werte sind in Tabelle 22 zusammengefasst..... 72

Abbildung 21: Häufigkeit der CD1a/CD14-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei humanen Monozyten im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 (X-Achse:  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD1a/CD14. Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörenden Werte sind in Tabelle 22 zusammengefasst..... 73

Abbildung 22: Häufigkeit der CD1a/CD14-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei humanen Monozyten im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 (X-Achse:  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD1a/CD14. Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Medianwertes liegen. Die dazugehörenden Werte sind in Tabelle 23 zusammengefasst..... 74

Abbildung 23: Häufigkeit der CD1a/CD14-Expression (Y-Achse: Expression der Marker zur Gesamtzellpopulation) bei humanen Monozyten im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 (X-Achse:  $1 \times 10^{-9}$  g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen für CD1a/CD14. Mit Sternchen (\*) sind signifikante Unterschiede markiert, die >1% Expression des Mittelwertes liegen. Die dazugehörenden Werte sind in Tabelle 23 zusammengefasst..... 75

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anteile der verschiedenen Leukämieformen an allen Neuerkrankungen nach Geschlecht, Deutschland, 2007– 2008 (Robert Koch-Institut, 2012).....	12
Tabelle 2: FAB-Klassifikation der ALL nach <i>Benett et al.</i> (Bennett et al., 1976). Zytomorphologische und zytochemische Einteilung der ALL-Blasten. ....	14
Tabelle 3: Immunologische Klassifikation der ALL nach dem EGIL-Schema. Ein Antigennachweis gilt nur bei Expression von $\geq 20\%$ der Oberflächenmarker bzw. bei $\geq 10\%$ für CD3, CD79a und Tdt aufgrund der hohen Spezifität als positiv (Bene, et al., 1995, (N. et al., 2005). CD: Cluster of differentiation, cy: zytoplasmatisch, Ig: Immunglobulin, m: membranständig, TdT: terminale Desoxyribonukleotidyltransferase, HLA: humane(s) Lymphozyten-Antigen, m: Membran.....	15
Tabelle 4: Prognostische Faktoren bei der ALL-Therapie (Schrappe et al., 2008b) MTX: Methotrexat, J.:Jahre, MRD: Minimal residual disease - Anzahl leukämischer Blasten nach Therapie als Indikator für eine Rückfallwahrscheinlichkeit (Marshall et al., 2003)	17
Tabelle 5: Auswahl an TEL-Fusionspartner aus chromosomalen Translokationen; MN: Meningeoma; NTRK: Neurotrophische Tyrosinrezeptorkinase; JAK: Januskinase. (Nach Bohlander et al. 2005).....	19
Tabelle 6: Synonyme für Runt-verwandte DNA-bindende Aktivitäten und deren Abkürzungen.....	21
Tabelle 7: Häufigste Translokationen mit AML1 bei akuten Leukämien; ALL: Akute lymphatische Leukämie; AML: Akute myeloische Leukämie; MDS: Myelodysplastisches Syndrom; CML: Chronisch Myeloische Leukämie; ETO: Eight-Twenty One Oncoprotein; EVI: Ecotropic Virus Integration; EAP: Extrazelluläres Adhärenz-Protein; (Abbildung nach Lam et al., 2012).....	24
Tabelle 8: Zusammensetzung des Zellnährmediums RPMI 10 % in 500 ml RPMI 1640 Medium; FBS: fetales Kälberserum; RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium).....	45
Tabelle 9: Zusammensetzung von Cocktail 5 in 2 ml RPMI 10 % Medium; IL: Interleukin; GM-CSF: Granulozyten- Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor; SCF: Stem Cell Factor; FLT-3L: fms-like tyrosine kinase 3 ligand; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor alpha.....	47
Tabelle 10: Vitalität in % ( $\pm$ Standardabweichung) bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen in Konditionen mit und ohne TEL/AML1 $1 \times 10^{-11}$ g/ml.....	53

Tabelle 11: Vitalität in % ( $\pm$ Standardabweichung) bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen in Konditionen mit und ohne TEL/AML1 $1 \times 10^{-10}$ g/ml .....	53
Tabelle 12: Vitalität in % ( $\pm$ Standardabweichung) bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen in Konditionen mit und ohne TEL/AML1 $1 \times 10^{-9}$ g/ml .....	53
Tabelle 13: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-9}$ g/ml (1:1), $1 \times 10^{-10}$ g/ml (1:10) und $1 \times 10^{-11}$ g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1 .....	59
Tabelle 14: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-9}$ g/ml (1:1), $1 \times 10^{-10}$ g/ml (1:10) und $1 \times 10^{-11}$ g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1 .....	60
Tabelle 15: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 positiven REH-Zellen im Medium Cocktail 5+CD40L nach Behandlung mit TEL/AML1 in drei verschiedenen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-9}$ g/ml (1:1), $1 \times 10^{-10}$ g/ml (1:10) und $1 \times 10^{-11}$ g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1 .....	61
Tabelle 16: Vitalität in % ( $\pm$ Standardabweichung) bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen in Konditionen mit und ohne TEL/AML1 $1 \times 10^{-11}$ g/ml .....	62
Tabelle 17: Vitalität in % ( $\pm$ Standardabweichung) bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen in Konditionen mit und ohne TEL/AML1 $1 \times 10^{-10}$ g/ml .....	62
Tabelle 18: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-10}$ g/ml (1:10) und $1 \times 10^{-11}$ g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1 .....	67

Tabelle 19: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen (1x10 <sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10 <sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1 .....	68
Tabelle 20: Häufigkeit der CD83/HLA-DR- und CD80/86-Expression bei TEL/AML1 negativen K562-Zellen im Medium Cocktail 5+CD40L nach Behandlung mit TEL/AML1 in zwei verschiedenen Konzentrationen (1x10 <sup>-10</sup> g/ml (1:10) und 1x10 <sup>-11</sup> g/ml (1:100)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1 .....	69
Tabelle 21: Vitalität in % (± Standardabweichung) bei Monozyten in Konditionen mit und ohne TEL/AML1 1x10 <sup>-9</sup> g/ml .....	70
Tabelle 22: Häufigkeit der CD83/HLA-DR-, CD1a/CD14- und CD80/86-Expression bei humanen Monozyten im Medium RPMI 10 % nach Behandlung mit TEL/AML1 (1x10 <sup>-9</sup> g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1 .....	76
Tabelle 23: Häufigkeit der CD83/HLA-DR-, CD1a/CD14- und CD80/86-Expression bei humanen Monozyten im Medium Cocktail 5 nach Behandlung mit TEL/AML1 (1x10 <sup>-9</sup> g/ml (1:1)) im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 4, 7 und 10 Tagen mit Mittelwert, Standardabweichung (SA), p-Wert und Anzahl der Versuche (N).T/A: TEL/AML1 .....	77

## 8 Literaturverzeichnis

- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4, 499-511.
- Andreasson, P., Schwaller, J., Anastasiadou, E., et al. (2001). The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Cancer Genet Cytogenet*, 130, 93-104.
- Anguille, S., Smits, E. L., Lion, E., et al. (2014). Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol*, 15, e257-267.
- Aronson, B. D., Fisher, A. L., Blechman, K., et al. (1997). Groucho-dependent and -independent repression activities of Runt domain proteins. *Mol Cell Biol*, 17, 5581-5587.
- Aspord, C., Pedroza-Gonzalez, A., Gallegos, M., et al. (2007). Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med*, 204, 1037-1047.
- ATCC. (2014). Reh (ATCC® CRL-8286™)
- Baens, M., Peeters, P., Guo, C., et al. (1996). Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6. *Genome Res*, 6, 404-413.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.
- Banchereau, J., & Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol*, 5, 296-306.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252.
- Bartfeld, D., Shimon, L., Couture, G. C., et al. (2002). DNA recognition by the RUNX1 transcription factor is mediated by an allosteric transition in the RUNT domain and by DNA bending. *Structure*, 10, 1395-1407.
- Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., et al. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9, 1783-1786.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., et al. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 33, 451-458.
- Berger, R., Le Coniat, M., Lacronique, V., et al. (1997). Chromosome abnormalities of the short arm of chromosome 12 in hematopoietic malignancies: a report including three novel translocations involving the TEL/ETV6 gene. *Leukemia*, 11, 1400-1403.
- Bernardin, F., Yang, Y., Cleaves, R., et al. (2002). TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res*, 62, 3904-3908.
- Blair, A., Rowbottom, A. W., Browne, S. J., et al. (2001). An optimised biphasic culture system for the generation of functional dendritic cells from patients with acute lymphoblastic leukaemia at presentation and in clinical remission. *Leukemia*, 15, 1596-1603.
- Blattman, J. N., & Greenberg, P. D. (2004). Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science*, 305, 200-205.

- Bocchia, M., Korontsvit, T., Xu, Q., et al. (1996). Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood*, *87*, 3587-3592.
- Bohlander, S. K. (2005). ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*, *15*, 162-174.
- Bosch, G. J., Joosten, A. M., Kessler, J. H., et al. (1996). Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood*, *88*, 3522-3527.
- Brissot, E., Labopin, M., Beckers, M. M., et al. (2014). Tyrosine kinase inhibitors improve long-term outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*.
- Buijs, A., Sherr, S., van Baal, S., et al. (1995). Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11. *Oncogene*, *10*, 1511-1519.
- Buijs, A., van Rompaey, L., Molijn, A. C., et al. (2000). The MN1-TEL fusion protein, encoded by the translocation (12;22)(p13;q11) in myeloid leukemia, is a transcription factor with transforming activity. *Mol Cell Biol*, *20*, 9281-9293.
- Burmester, G., Pezzutto A. (1998). Taschenatlas der Immunologie. 116-117.
- Busam, K. J., Chen, Y. T., Old, L. J., et al. (1998). Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Surg Pathol*, *22*, 976-982.
- Cave, H., Cacheux, V., Raynaud, S., et al. (1997). ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *11*, 1459-1464.
- Chakrabarti, S. R., & Nucifora, G. (1999). The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun*, *264*, 871-877.
- Chiaretti, S., Zini, G., & Bassan, R. (2014). Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, *6*, e2014073.
- Choudhury, A., Gajewski, J. L., Liang, J. C., et al. (1997). Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood*, *89*, 1133-1142.
- Choudhury, B. A., Liang, J. C., Thomas, E. K., et al. (1999). Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood*, *93*, 780-786.
- Cignetti, A., Bryant, E., Allione, B., et al. (1999). CD34(+) acute myeloid and lymphoid leukemic blasts can be induced to differentiate into dendritic cells. *Blood*, *94*, 2048-2055.
- Classen, D., Kochsiek. (2004). *Innere Medizin, Kapitel 10.5.3.: Akute lymphatische Leukämie*: Urban & Fischer.
- Colby-Graham, M. F., & Chordas, C. (2003). The childhood leukemias. *J Pediatr Nurs*, *18*, 87-95.
- Creutzig, U., & Dworzak, M. (2013). Akute myeloische Leukämie -AML- im Kindesalter. *Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie*.
- De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., Morel, F., et al. (2012). ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review. *Leuk Res*, *36*, 945-961.
- Diehl, L., den Boer, A. T., Schoenberger, S. P., et al. (1999). CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat Med*, *5*, 774-779.

- Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., et al. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 2, 561-566.
- Eguchi, M., Eguchi-Ishimae, M., Tojo, A., et al. (1999). Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood*, 93, 1355-1363.
- El-Sahrigy, S. A., Mohamed, N. A., Talkhan, H. A., et al. (2015). Comparison between magnetic activated cell sorted monocytes and monocyte adherence techniques for in vitro generation of immature dendritic cells: an Egyptian trial. *Cent Eur J Immunol*, 40, 18-24.
- Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., et al. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*, 229, 152-172.
- Fears, S., Vignon, C., Bohlander, S. K., et al. (1996). Correlation between the ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) fusion gene and karyotypic abnormalities in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 17, 127-135.
- Fenrick, R., Amann, J. M., Lutterbach, B., et al. (1999). Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol*, 19, 6566-6574.
- Figdor, C. G., de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J., et al. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med*, 10, 475-480.
- Fletcher, J. A., Lynch, E. A., Kimball, V. M., et al. (1991). Translocation (9;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 77, 435-439.
- Fuka, G., Kauer, M., Kofler, R., et al. (2011). The leukemia-specific fusion gene ETV6/RUNX1 perturbs distinct key biological functions primarily by gene repression. *PLoS One*, 6, e26348.
- Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol*, 4, 941-952.
- Gale, K. B., Ford, A. M., Repp, R., et al. (1997). Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 13950-13954.
- Gambacorti-Passerini, C., Grignani, F., Arienti, F., et al. (1993). Human CD4 lymphocytes specifically recognize a peptide representing the fusion region of the hybrid protein pml/RAR alpha present in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*, 81, 1369-1375.
- Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., et al. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*, 202, 919-929.
- Golub, T. R., Barker, G. F., Bohlander, S. K., et al. (1995). Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4917-4921.
- Golub, T. R., Barker, G. F., Lovett, M., et al. (1994). Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*, 77, 307-316.
- Greaves, M. F., & Wiemels, J. (2003). Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 3, 639-649.
- Grimshaw, S. J., Mott, H. R., Stott, K. M., et al. (2004). Structure of the sterile alpha motif (SAM) domain of the *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein

- kinase pathway-modulating protein STE50 and analysis of its interaction with the STE11 SAM. *J Biol Chem*, 279, 2192-2201.
- Gu, T. L., Goetz, T. L., Graves, B. J., et al. (2000). Auto-inhibition and partner proteins, core-binding factor beta (CBFbeta) and Ets-1, modulate DNA binding by CBFalpha2 (AML1). *Mol Cell Biol*, 20, 91-103.
- Guermonez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., et al. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 20, 621-667.
- Guidez, F., Petrie, K., Ford, A. M., et al. (2000). Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood*, 96, 2557-2561.
- Hagihara, M., Shimakura, Y., Tsuchiya, T., et al. (2001). The efficient generation of CD83 positive immunocompetent dendritic cells from CD14 positive acute myelomonocytic or monocytic leukemia cells in vitro. *Leuk Res*, 25, 249-258.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hiebert, S. W., Lutterbach, B., & Amann, J. (2001). Role of co-repressors in transcriptional repression mediated by the t(8;21), t(16;21), t(12;21), and inv(16) fusion proteins. *Curr Opin Hematol*, 8, 197-200.
- Hiebert, S. W., Sun, W., Davis, J. N., et al. (1996). The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol*, 16, 1349-1355.
- Hoelzer, D. (1994). Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*, 31, 1-15.
- Hong, D., Gupta, R., Ancliff, P., et al. (2008). Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science*, 319, 336-339.
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., et al. (1998). The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*, 188, 2357-2368.
- Ikeda, H., Lethé, B., Lehmann, F., et al. (1997). Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*, 6, 199-208.
- Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., et al. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med*, 191, 927-936.
- Janeway CA Jr, T. P., Walport M, et al. (2001). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science.
- Janeway, C. A., Jr., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- Jego, G., Pascual, V., Palucka, A. K., et al. (2005). Dendritic cells control B cell growth and differentiation. *Curr Dir Autoimmun*, 8, 124-139.
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., et al. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 12, 557-569.
- Johansson, B., Mertens, F., & Mitelman, F. (1993). Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci. *Genes Chromosomes Cancer*, 8, 205-218.
- Joshi, S. S., Vu, U. E., Lovgren, T. R., et al. (2002). Comparison of phenotypic and functional dendritic cells derived from human umbilical cord blood and peripheral blood mononuclear cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 11, 337-347.
- Ju, X., Clark, G., & Hart, D. N. (2010). Review of human DC subtypes. *Methods Mol Biol*, 595, 3-20.
- Kantoff, P., Higano, C., Shore, N., et al. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*, 363, 411-422.

- Klein, E., Ben-Bassat, H., Neumann, H., et al. (1976). Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*, *18*, 421-431.
- Kobayashi, H., Montgomery, K. T., Bohlander, S. K., et al. (1994). Fluorescence in situ hybridization mapping of translocations and deletions involving the short arm of human chromosome 12 in malignant hematologic diseases. *Blood*, *84*, 3473-3482.
- Kohler, T., Plettig, R., Wetzstein, W., et al. (2000). Cytokine-driven differentiation of blasts from patients with acute myelogenous and lymphoblastic leukemia into dendritic cells. *Stem Cells*, *18*, 139-147.
- Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., et al. (2005). Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*, *11*, 1314-1321.
- Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V. D., et al. (1997). A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*, *278*, 1309-1312.
- Lam, K., & Zhang, D. E. (2012). RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci*, *17*, 1120-1139.
- Larsson, M., Fonteneau, J. F., Somersan, S., et al. (2001). Efficiency of cross presentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells. *Eur J Immunol*, *31*, 3432-3442.
- Leonhartsberger, N., Ramoner, R., Falkensammer, C., et al. (2012). Quality of life during dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, *61*, 1407-1413.
- Lestingi, T. M., & Hooberman, A. L. (1993). Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, *7*, 161-175.
- Leung, W. (2009). Immunotherapy in acute leukemia. *Semin Hematol*, *46*, 89-99.
- Li, L., Giannopoulos, K., Reinhardt, P., et al. (2006). Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts. *Int J Oncol*, *28*, 855-861.
- Li, L., Reinhardt, P., Schmitt, A., et al. (2005). Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens. *Cancer Immunol Immunother*, *54*, 685-693.
- Lin, R. J., Sternsdorf, T., Tini, M., et al. (2001). Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, *20*, 7204-7215.
- Lindl. (2002). Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. *Heidelberg; Berlin : Spektrum, Akad. Verl., 5. Auflage*.
- Linggi, B., Muller-Tidow, C., van de Locht, L., et al. (2002). The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med*, *8*, 743-750.
- Litzow, M. R. (2013). Monoclonal antibody-based therapies in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 294-299.
- Lizee, G., Overwijk, W. W., Radvanyi, L., et al. (2013). Harnessing the power of the immune system to target cancer. *Annu Rev Med*, *64*, 71-90.
- Loh, M. L., & Rubnitz, J. E. (2002). TEL/AML1-positive pediatric leukemia: prognostic significance and therapeutic approaches. *Curr Opin Hematol*, *9*, 345-352.
- Look, A. T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, *278*, 1059-1064.
- Lopez, R. G., Carron, C., Oury, C., et al. (1999). TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem*, *274*, 30132-30138.

- Lowell, C. A. (2004). Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol*, 41, 631-643.
- Lowes, M. A., Chamian, F., Abello, M. V., et al. (2005). Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 19057-19062.
- Lozzio, C. B., & Lozzio, B. B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45, 321-334.
- Luttmann W., b. K., Küpper M. (2006). Der Experimentator Immunologie. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage.
- Madan, R. A., & Gulley, J. L. (2010). The current and emerging role of immunotherapy in prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*, 8, 10-16.
- Mainz, F. M.-U. (2013). Durchflusszytometrie.
- Marshall, G. M., Haber, M., Kwan, E., et al. (2003). Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 21, 704-709.
- Mason, D. (1998). A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today*, 19, 395-404.
- Mavrothalassitis, G., & Ghysdael, J. (2000). Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene*, 19, 6524-6532.
- McLean, T. W., Ringold, S., Neuberg, D., et al. (1996). TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 88, 4252-4258.
- McWhirter, J. R., & Wang, J. Y. (1993). An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J*, 12, 1533-1546.
- Medvinsky, A., & Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, 86, 897-906.
- Miyoshi, H., Shimizu, K., & Kozu, T. (1991). t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 10431-10434.
- Mody, N., Dubey, S., Sharma, R., et al. (2015). Dendritic cell-based vaccine research against cancer. *Expert Rev Clin Immunol*, 11, 213-232.
- Moldenhauer, A., Frank, R. C., Pinilla-Ibarz, J., et al. (2004). Histone deacetylase inhibition improves dendritic cell differentiation of leukemic blasts with AML1-containing fusion proteins. *J Leukoc Biol*, 76, 623-633.
- Mori, H., Colman, S. M., Xiao, Z., et al. (2002). Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8242-8247.
- Mullighan, C. G. (2012). Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*, 122, 3407-3415.
- Munz, C., Dao, T., Ferlazzo, G., et al. (2005). Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. *Blood*, 105, 266-273.
- N., G., & A., G. (2005). Akute Leukämien. *Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie*.
- Naik, S. H., Sathe, P., Park, H. Y., et al. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol*, 8, 1217-1226.

- North, T., Gu, T. L., Stacy, T., et al. (1999). Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development*, *126*, 2563-2575.
- Nucifora, G., & Rowley, J. D. (1994). The AML1 gene in the 8;21 and 3;21 translocations in chronic and acute myeloid leukemia. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *59*, 595-605.
- Odero, M. D., Carlson, K., Calasanz, M. J., et al. (2001). Identification of new translocations involving ETV6 in hematologic malignancies by fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping. *Genes Chromosomes Cancer*, *31*, 134-142.
- Oehler, L., Berer, A., Kollars, M., et al. (2000). Culture requirements for induction of dendritic cell differentiation in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*, *79*, 355-362.
- Ogawa, E., Maruyama, M., Kagoshima, H., et al. (1993). PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*, 6859-6863.
- Oikawa, T., & Yamada, T. (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*, *303*, 11-34.
- Oka, Y., Udaka, K., Tsuboi, A., et al. (2000). Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J Immunol*, *164*, 1873-1880.
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., et al. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, *84*, 321-330.
- Osato, M. (2004). Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene*, *23*, 4284-4296.
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., et al. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, *126*, 5073-5084.
- Palucka, K., & Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*, *12*, 265-277.
- Patel, N., Goff, L. K., Clark, T., et al. (2003). Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia. *Br J Haematol*, *122*, 94-98.
- Peeters, P., Raynaud, S. D., Cools, J., et al. (1997). Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood*, *90*, 2535-2540.
- Peggs, K. S., Quezada, S. A., & Allison, J. P. (2008). Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy. *Immunol Rev*, *224*, 141-165.
- Peterson, L. F., Yan, M., & Zhang, D. E. (2007). The p21Waf1 pathway is involved in blocking leukemogenesis by the t(8;21) fusion protein AML1-ETO. *Blood*, *109*, 4392-4398.
- Popovic, J., Li, L. P., Kloetzel, P. M., et al. (2011). The only proposed T-cell epitope derived from the TEL-AML1 translocation is not naturally processed. *Blood*, *118*, 946-954.
- Pospisilova, D., Borovickova, J., Polouckova, A., et al. (2002). Generation of functional dendritic cells for potential use in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*, *51*, 72-78.
- Pui, C. H., Relling, M. V., & Downing, J. R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, *350*, 1535-1548.
- Pui, C. H., Schrappe, M., Ribeiro, R. C., et al. (2004). Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 118-145.

- Raynaud, S., Cave, H., Baens, M., et al. (1996). The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *87*, 2891-2899.
- Riede, U. (2004). Allgemeine und spezielle Pathologie. *Thieme Verlag*, 5. Auflage, 525-535.
- Robert Koch-Institut. (2012). Krebs in Deutschland 2007-2008. *Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.*
- Röder, I. (2003). Dynamical modeling of hematopoietic stem cell organization. *Dissertation*.
- Romana, S. P., Mauchauffe, M., Le Coniat, M., et al. (1995). The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood*, *85*, 3662-3670.
- Rosenfeld, C., Goutner, A., Venuat, A. M., et al. (1977). An effective human leukaemic cell line: Reh. *European Journal of Cancer* (1965), *13*, 377-379.
- Rossetti, S., & Sacchi, N. (2013). RUNX1: A MicroRNA Hub in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Int J Mol Sci*, *14*, 1566-1588.
- Rowley, J. D. (1998). The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet*, *32*, 495-519.
- Rubin, C. M., Larson, R. A., Anastasi, J., et al. (1990). t(3;21)(q26;q22): a recurring chromosomal abnormality in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Blood*, *76*, 2594-2598.
- Rubin, C. M., Larson, R. A., Bitter, M. A., et al. (1987). Association of a chromosomal 3;21 translocation with the blast phase of chronic myelogenous leukemia. *Blood*, *70*, 1338-1342.
- Rubnitz, J. E., Downing, J. R., & Pui, C. H. (1999). Significance of the TEL-AML fusion gene in childhood AML. *Leukemia*, *13*, 1470-1471.
- Sawyers, C. L. (1998). Molecular abnormalities in myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, *22*, 1113-1122.
- Schadendorf, D., Ugurel, S., Schuler-Thurner, B., et al. (2006). Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol*, *17*, 563-570.
- Schmidt, K., Seeger, K., Scheibenbogen, C., et al. (2009). Histone deacetylase inhibition improves differentiation of dendritic cells from leukemic blasts of patients with TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Leukoc Biol*, *85*, 563-573.
- Schrapppe, M., & Creutzig, U. (2008a). Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2008. *Deutsche Krebsgesellschaft*, P. 404.
- Schrapppe, M., & Creutzig, U. (2008b). Leitlinien: Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter *Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)*.
- Sehgal, S., Mujtaba, S., Gupta, D., et al. (2010). High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: a preliminary study. *Indian J Pathol Microbiol*, *53*, 63-67.
- Sewell, A. K. (2012). Why must T cells be cross-reactive? *Nat Rev Immunol*, *12*, 669-677.
- Shibusa, T., Shijubo, N., & Abe, S. (1998). Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, *4*, 1483-1487.

- Shurtleff, S. A., Buijs, A., Behm, F. G., et al. (1995). TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*, *9*, 1985-1989.
- Skoberne, M., Beignon, A. S., & Bhardwaj, N. (2004). Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol Med*, *10*, 251-257.
- Small, E. J., Schellhammer, P. F., Higano, C. S., et al. (2006). Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol*, *24*, 3089-3094.
- Spurk J., A. N. (2005). Strömungslehre: Einführung in die Theorie der Strömungen *Springer Verlag*.
- Steinman, R. M. (2007). Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat Med*, *13*, 1155-1159.
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, *137*, 1142-1162.
- Strati, P., Daver, N., Ravandi, F., et al. (2013). Biological and clinical features of trisomy 21 in adult patients with acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, *13 Suppl 2*, S276-281.
- Tahirov, T. H., Inoue-Bungo, T., Morii, H., et al. (2001). Structural Analyses of DNA Recognition by the AML1/Runx-1 Runt Domain and Its Allosteric Control by CBF $\beta$ . *Cell*, *104*, 755-767.
- Takahashi, Y., Horibe, K., Kiyoi, H., et al. (1998). Prognostic significance of TEL/AML1 fusion transcript in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, *20*, 190-195.
- Tang, L., Hung, C. P., & Schuman, E. M. (1998). A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, *20*, 1165-1175.
- Telfer, J. C., Hedblom, E. E., Anderson, M. K., et al. (2004). Localization of the domains in Runx transcription factors required for the repression of CD4 in thymocytes. *J Immunol*, *172*, 4359-4370.
- Thompson, J. R., Gerald, P. F., Willoughby, M. L., et al. (2001). Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukaemia in childhood: a case-control study. *Lancet*, *358*, 1935-1940.
- Tognon, C., Knezevich, S. R., Huntsman, D., et al. (2002). Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell*, *2*, 367-376.
- Tosi, S., Giudici, G., Mosna, G., et al. (1998). Identification of new partner chromosomes involved in fusions with the ETV6 (TEL) gene in hematologic malignancies. *Genes Chromosomes Cancer*, *21*, 223-229.
- Trumpheller, C., Finke, J. S., Lopez, C. B., et al. (2006). Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med*, *203*, 607-617.
- Tsuchiya, T., Hagihara, M., Shimakura, Y., et al. (2002). The generation of immunocompetent dendritic cells from CD34+ acute myeloid or lymphoid leukemia cells. *Int J Hematol*, *75*, 55-62.
- Tsuzuki, S., & Seto, M. (2012). Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood*, *119*, 727-735.

- Tsuzuki, S., Seto, M., Greaves, M., et al. (2004). Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*, 8443-8448.
- Turley, S. J., Inaba, K., Garrett, W. S., et al. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, *288*, 522-527.
- Uchiyama, T. (1997). Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annu Rev Immunol*, *15*, 15-37.
- van Wijnen, A. J., Stein, G. S., & Gergen, J. P. (2004). Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins. *Oncogene*, *23*, 4209-4210.
- Velders, M. P., ter Horst, S. A., & Kast, W. M. (2001). Prospect for immunotherapy of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, *15*, 701-706.
- Virchow, R. (1856). Die Leukämie. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*.
- Waldmann, T. A. (2003). Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med*, *9*, 269-277.
- Wang, D., Hussain A., Sommovilla N. (2006). Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) *University of California, School of Medicine*.
- Wang, H. L., Xu, H., Lu, W. H., et al. (2014). In vitro and in vivo evaluations of human papillomavirus type 16 (HPV16)-derived peptide-loaded dendritic cells (DCs) with a CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) adjuvant as tumor vaccines for immunotherapy of cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet*, *289*, 155-162.
- Wang, L., & Hiebert, S. W. (2001). TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene*, *20*, 3716-3725.
- Wang, L. C., Swat, W., Fujiwara, Y., et al. (1998). The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev*, *12*, 2392-2402.
- Wang, Q., Stacy, T., Miller, J. D., et al. (1996). The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell*, *87*, 697-708.
- Wang, S., Wang, Q., Crute, B. E., et al. (1993). Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol Cell Biol*, *13*, 3324-3339.
- Warren, A. J., Bravo, J., Williams, R. L., et al. (2000). Structural basis for the heterodimeric interaction between the acute leukaemia-associated transcription factors AML1 and CBFbeta. *EMBO J*, *19*, 3004-3015.
- Wiemels, J. L., Cazzaniga, G., Daniotti, M., et al. (1999). Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*, *354*, 1499-1503.
- Wilson, D. B., Wilson, D. H., Schroder, K., et al. (2004). Specificity and degeneracy of T cells. *Mol Immunol*, *40*, 1047-1055.
- Wlodarska, I., La Starza, R., Baens, M., et al. (1998). Fluorescence in situ hybridization characterization of new translocations involving TEL (ETV6) in a wide spectrum of hematologic malignancies. *Blood*, *91*, 1399-1406.
- Woiciechowsky, A., Regn, S., Kolb, H. J., et al. (2001). Leukemic dendritic cells generated in the presence of FLT3 ligand have the capacity to stimulate an autologous leukemia-specific cytotoxic T cell response from patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *15*, 246-255.
- Wurtzen, P. A., Nissen, M. H., & Claesson, M. H. (2001). Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production. *Scand J Immunol*, *53*, 579-587.

- Yotnda, P., Garcia, F., Peuchmaur, M., et al. (1998). Cytotoxic T cell response against the chimeric ETV6-AML1 protein in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*, 102, 455-462.
- Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., et al. (2001). AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10398-10403.
- Yun, C., Senju, S., Fujita, H., et al. (1999). Augmentation of immune response by altered peptide ligands of the antigenic peptide in a human CD4+ T-cell clone reacting to TEL/AML1 fusion protein. *Tissue Antigens*, 54, 153-161.
- Zelent, A., Greaves, M., & Enver, T. (2004). Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene*, 23, 4275-4283.
- Zeng, C., McNeil, S., Pockwinse, S., et al. (1998). Intranuclear targeting of AML/CBFalpha regulatory factors to nuclear matrix-associated transcriptional domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 1585-1589.
- Zent, C. S., Mathieu, C., Claxton, D. F., et al. (1996). The chimeric genes AML1/MDS1 and AML1/EAP inhibit AML1B activation at the CSF1R promoter, but only AML1/MDS1 has tumor-promoter properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1044-1048.
- Erklärung

## 9 Anhang (Excel-Makro)

```
Sub Auswertung_1_10()
```

```
,
```

```
' Auswertung Makro: überträgt die Daten von der Tabelle in die Auswertung
```

```
' Makro am 17.01.2009 von Amrit Roy aufgezeichnet
```

```
,
```

```
' Tastenkombination: Strg+w
```

```
,
```

```
Dim b(12) As Integer
```

```
b(0) = 0
```

```
b(1) = 2
```

```
b(2) = 3
```

```
b(3) = 4
```

```
b(4) = 5
```

```
b(5) = 6
```

```
b(6) = 8
```

```
b(7) = 10
```

```
b(8) = 11
```

```
b(9) = 12
```

```
b(10) = 14
```

```
b(11) = 15
```

```
For naechste_AK = 0 To 11
```

```
    For x_axis = 0 To 7 ' Variable für nebeneinander
```

```
        For y_axis = 0 To 2 ' Variable für untereinander
```

```
            Sheets("REH+TELAML1-10").Select ' Sheetname eintragen, wo die Tabellen  
            sind
```

```
                Range(Cells(7 + 22 * y_axis, 6 + b(naechste_AK) + 22 * x_axis), Cells(12 +  
                22 * y_axis, 6 + b(naechste_AK) + 22 * x_axis)).Select
```

```

Selection.Copy
Sheets("Auswertung 1-10").Select ' Sheetname des Ziel Sheets eintragen
Range("J7").Select
ActiveSheet.Paste
Range("J7").Select
Application.CutCopyMode = False
Cells(7, 10).Select
Selection.Cut Destination:=Cells(7 + x_axis + 21 * y_axis, 3 + 10 *
naechste_AK)
Cells(8, 10).Select
Selection.Cut Destination:=Cells(7 + x_axis + 21 * y_axis, 4 + 10 *
naechste_AK)
Cells(9, 10).Select
Selection.Cut Destination:=Cells(7 + x_axis + 21 * y_axis, 5 + 10 *
naechste_AK)
Cells(10, 10).Select
Selection.Cut Destination:=Cells(7 + x_axis + 21 * y_axis, 6 + 10 *
naechste_AK)
Cells(11, 10).Select
Selection.Cut Destination:=Cells(7 + x_axis + 21 * y_axis, 7 + 10 *
naechste_AK)
Cells(12, 10).Select
Selection.Cut Destination:=Cells(7 + x_axis + 21 * y_axis, 8 + 10 *
naechste_AK)

Next y_axis

Next x_axis

Next naechste_AK

End Sub

```

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. A. Salama, Leiter des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin, für die Bereitstellung und Ermöglichung dieser Arbeit.

Mein herzlicher dank geht an PD Dr. med. Anja Moldenhauer für die Überlassung dieses interessanten Themas. Besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, insbesondere Kerstin Schmidt für die kompetente Einarbeitung in die Experimente und ihrer ständigen Hilfsbereitschaft. Des Weiteren möchte ich mich insbesondere bei Dr. Gürkan Bal für die immense Unterstützung sowohl bei der Ausarbeitung der Arbeit als auch für die stetige Begleitung und Aufmunterung durch alle Probleme ganz herzlich bedanken.

Außerdem danke ich meinen Freunden Ilona Fleischmann, Rositha Nadarajah, Ravish Paliwal und Medappa Cheranda, die mich während der Arbeit unterstützt und immer wieder neu motiviert haben.

Mein besonderer Dank geht an meine Mutter Jayasree Roy und meinem Vater Sankar Roy, der dieses leider nicht mehr miterleben konnte. Ohne sie wär mein Medizinstudium kaum möglich gewesen und ohne ihre immerwährende Unterstützung wäre ich nicht der, der ich heute bin.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Amrit Roy, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Immunogene Wirkung des TEL/AML1 Onkopeptids auf leukämische Zelllinien] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift