

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Analyse der T Zell Klonalitäten in T-LGL Leukämie und anderen
Erkrankungen mit erworbenem Knochenmarkversagen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marcin Wlodarski
aus Szczecin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk

2. Prof. Dr. med. Stephan Ehl

3. PD. Dr. med. Nina Babel

Datum der Promotion: 27.03.2009

I. INHALTSVERZEICHNIS

I. Inhaltsverzeichnis..... Seite 3

II. Zusammenfassung..... Seite 4-14

III. Anteilserklärung.....Seite 15

IV. Liste der ausgewählten Publikationen..... Seite 16
(vollständige Exemplare befinden sich im Anhang)

V. Lebenslauf..... Seite 17

VI. Komplette Publikationsliste..... Seite 18-21

VII. Selbständigkeitserklärung..... Seite 22

VIII. Danksagung..... Seite 23

Anhang: Exemplare der ausgewählten Publikationen

II. ZUSAMMENFASSUNG

ABSTRACT

Die T-Large Granular Lymphocyte (T-LGL) Leukämie ist eine seltene, chronisch verlaufende und häufig indolente lymphoproliferative Erkrankung, die durch klonale Expansion von semiautonomen T-Zellen vom Effektorphänotyp gekennzeichnet ist. Das klinische Bild wird durch Zytopenien und den daraus resultierenden Komplikationen bestimmt, wobei die Neutropenie in der Mehrzahl der Patienten dominiert. In der Ätiologie der klonalen Expansionen von T-LGL werden chronische Stimulation durch Antigene (möglicherweise Hämatopoese - spezifisch) und die dysregulierten apoptotischen Mechanismen als Hauptfaktoren diskutiert.

Unsere Hypothese beruhte auf der Annahme, dass die Evolution des T-LGL Klon nicht zufällig ist, sondern durch ähnliche antigene Strukturen im Zusammenhang mit einem autoimmunologischen Vorgang verursacht wird, und durch weitere Faktoren wie die immunogenetische Konstitution, sowie eine erhöhte Apoptoseresistenz begünstigt werden kann. Wir haben eine effiziente Methode für die sensitive Charakterisierung von individuellen klonotypischen Repertoires entwickelt, und konnten mit unserer Strategie die Sequenzen der immunodominanten T-LGL Klone effizient bestimmen. In longitudinalen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die hämatologische Remission nach einer immunosuppressiven Therapie mit einer Verringerung oder Verlust der expandierten Klone und der Wiederherstellung von TZR Diversität einherging. Es konnten identische oder strukturverwandte immunodominante Klonotypen in Patienten identifiziert, sowie Ähnlichkeiten innerhalb der individuellen klonotypischen Repertoires aufgedeckt werden. Die Ergebnisse sprechen für eine nicht zufällige und am ehesten durch gleiche/ ähnliche Antigene getriggerte klonale Selektion in T-LGL

Weiterführend wurden mit der Methodik die klonotypischen Repertoires in anderen Erkrankungen des Knochenmarks erfolgreich untersucht (MDS, PNH und Knochenmarktransplantation).

In weiteren Versuchen konnten wir ferner nachweisen, dass in den T-LGL Zellen die homöostatische Apoptose dysreguliert ist (Überaktivierung des PI3K-AKT-Weges), und dass bestimmte immunogenetische Faktoren (funktionelle Polymorphismen) mit T-LGL assoziiert sind. Durch beides kann die Expansion und Persistenz der T-LGL Klone begünstigt werden.

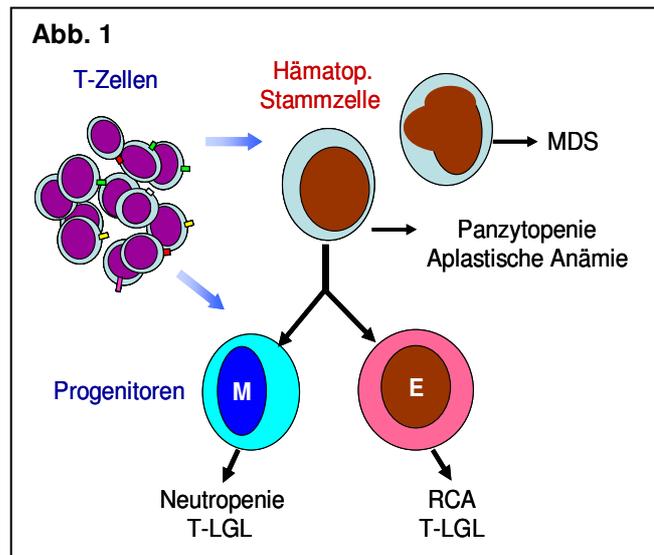
EINLEITUNG

Die klinische Entität Large Granular Lymphocyte (LGL) Leukämie ist eine klonale Lymphoproliferation, die in den meisten Fällen von CD3+CD8+ Effektorzellen (T-LGL) und viel seltener von den natürlichen Killerzellen (NK-LGL) ausgeht.¹ Das Erstmanifestationsalter der T-LGL beträgt typischerweise 55-60 Jahre, ohne Unterschiede in der Geschlechterverteilung.²⁻⁵ Das klinische Bild der T-LGL Leukämie wird durch die Folgen der Zytopenien bestimmt: am häufigsten wird die Neutropenie beobachtet und kann zu bakteriellen Infekten und Fieber führen, jedoch im Gegensatz zu Neutropenie die bei anderen hämatologischen Erkrankungen auftritt, verläuft die Symptomatik bei T-LGL häufig milde. Interessanterweise, trotz der extremen Lymphozyten-Monoklonalität, durch die eine effektive polyklonale Antigenerkennung theoretisch insuffizient wird, treten opportunistische Infektionen in T-LGL Patienten in der Regel nicht auf. Andere Zytopenien wie RCA (red cell aplasia), Thrombozytopenie oder Panzytopenie sind viel seltener und können bei einigen Patienten, im Verlauf der Erkrankung, unabhängig voneinander auftreten. Klinisch verläuft die Erkrankung meist indolent und chronisch, und kann in bis zu 1/3 der Patienten ohne Symptome verlaufen. Der wenig maligne Charakter der T-LGL und die Tatsache, dass die aggressive Chemotherapie keinen Nutzen zeigt, die Patienten aber auf die Immunsuppression ansprechen können, spricht dafür, dass T-LGL eher eine autoimmune Erkrankung, als eine Leukämie im eigentlichen Sinne ist.^{5;6}

Die Diagnosestellung der T-LGL Leukämie erfolgt traditionell anhand des Immunphänotyps (in den meisten Fällen: CD3+CD8+CD27-CD57+ und VB αβ+) und der klonalen TZR-gamma-Restriktion. Zusätzlich kann in vielen Fällen mittels VB-Durchflußzytometrie die klon-spezifische, expandierte TZR-VB Familie identifiziert werden.^{2;7;8}

In T-LGL, ähnlich wie bei anderen Erkrankungen mit erworbenen Knochenmarkversagen (z.B.

Aplastische Anämie oder Myelodysplastisches Syndrom) spielen die Immunmechanismen eine ätiologische Rolle: wenn autoimmune T Zellen knochenmark-spezifische Antigene erkennen, kann es zur Inhibition der Hämatopoese kommen (Abb.1). Es wird angenommen, dass die Linienspezifität der Zytopenien von der T Zell Rezeptor (TZR) Spezifität abhängt, d.h. wenn späte myeloide Progenitoren angegriffen werden, resultiert es in einer Neutropenie, bei Hemmung der Erythroiden

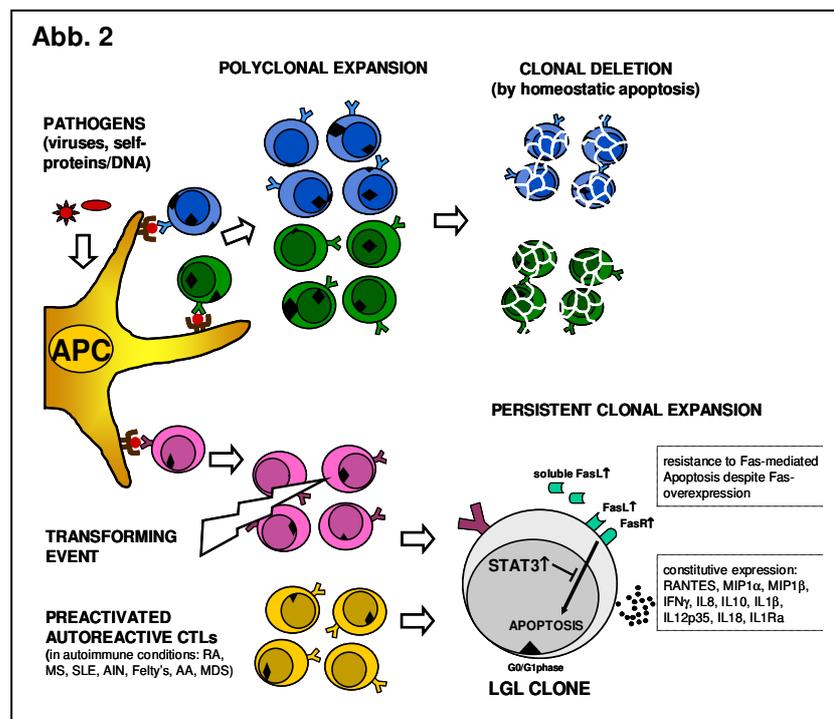


kommt es zur Anämie/Aplasie der roten Zellen (RCA). Analog dazu würde eine Zerstörung der frühen hämatopoietischen Stammzellen zu einer Panzytopenie führen, wie z.B. bei der Aplastischen Anämie. (Siehe Abbildung 1)

Bisher ist die Ätiologie der T-LGL nicht weitgehend geklärt. Phänotypisch sind die T-LGL Klone mit terminal ausdifferenzierten antigen-getriggerten Effektorzellen identisch. Es ist anzunehmen, dass in T-LGL nach der primären polyklonalen T Zell Aktivierung (z.B. gegen Viren oder self-proteine), die monoklonale Expansion von voraktivierten, autoreaktiven Lymphozyten, oder Zellen, die einem exogenen "Hit" ausgesetzt sind, folgt (schematisch erklärt in Abbildung 2). Die Persistenz dieser monoklonal expandierten Klone könnte in solchem Fall durch Apoptoseresistenz oder Zytokin-Überangebot erklärt werden.

T-Zellen können anhand des T Zell Rezeptors (TZR) charakterisiert werden: Die Mehrheit der T-Lymphozyten (ca. 95%), tragen einen TZR des $\alpha\beta$ -Typs, wobei die α durch eine Verknüpfung von $V\alpha$ und $J\alpha$ Genen und die β -Kette durch Rekombination von $V\beta$, $D\beta$ und $J\beta$ Genen gebildet wird.⁹ Als Klonotyp einer T Zelle wird die rekombinierte Region zwischen $V\beta$, $D\beta$ und $J\beta$, (die auch die CDR3 Region beinhaltet) bezeichnet. Eine funktionelle T Zelle exprimiert nur einen Typ von TZR β Kette (im Gegensatz von >1 α -Ketten), somit eignet sich die TZR B-Familie bestens für die Charakterisierung der T-Zell-Klonalitäten/ Klonotypen: mit einer Diversität von über 10^{18} verschiedenen Rekombinationssequenzen ist es äußerst unwahrscheinlich, dass eine klonotypische Sequenz wiederholt vorkommt.^{10;11}

Die genauen Zielstellungen dieser Dissertationsarbeit waren: a) Etablierung einer effizienten Methodik für die präzise Charakterisierung von klonotypischen Repertoires und die Quantifizierung der immunodominanten Klonotypen; b) Identifizierung der immunodominanten, d.h. expandierten Klonotypen und Charakterisierung der Repertoires in Patienten mit T-LGL und anderen KM-Erkrankungen; c) Korrelierung der klonalen Expansionen mit klinischen Parametern; und d) Erschließung von Faktoren für die immunogenetische Prädisposition und für die Apoptoseresistenz in T-LGL.



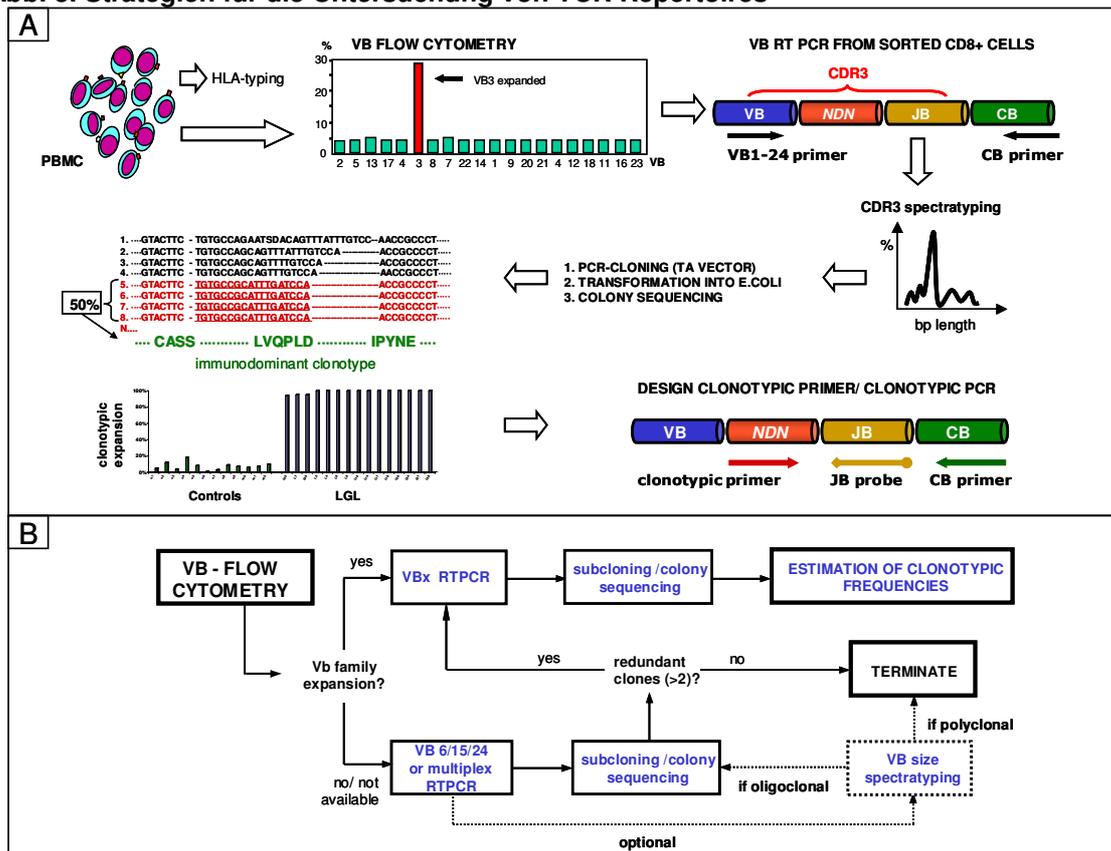
MATERIALIEN UND METHODEN

Das humane TZR VB Repertoire wird gemäß verschiedenen Nomenklaturen in einzelne VB-Familien unterteilt. Für unsere Zwecke haben wir die Nomenklatur von Arden et al verwendet: nach dieser gängigen Klassifizierung existieren 24 vollständig rearrangierte VB Familien, wovon VB 10 und 19 als Pseudogene nicht funktionell sind und für VB Familien 15, 24 (und teilweise VB6) keine FACS Antikörper zur Verfügung stehen, und diese nur mit molekularen Methoden präzise untersucht werden können.^{12;13} Zusammenfassend beinhaltet die Methodik VB FACS Analysen, durchflußzytometrische oder magnetische Zellsortierung, hochauflösende HLA-Analyse, VB-spezifische PCR oder VB-multiplex PCR, TZR VB Spectratyping, Klonierung der TZR VB Ketten in bakterielle Vektoren, Transformation und bakterielle Kultur mit anschließender single Kolonien-PCR und Sequenzierung von einzelnen T Zell Rezeptoren; des weiteren: Design und Etablierung von Taqman - Sonden für alle humane TZR JB Ketten, Quantifizierung und longitudinale Bestimmung von einzelnen T Zell Expansionen mittels Sequenzierung. Im Folgenden werden die methodischen Schritte einzeln erläutert, wobei die detaillierten Versuchsbedingungen und Chemikalien, sowie Richtlinien für die Akquirierung von Patienten den Publikationen [^{14;15}] entnehmen sind.

TZR Repertoire Bestimmung mittels VB-FACS. Die Variabilität des humanen TZR VB Repertoires wird mit einem Standard Zwei-Laser Durchflußzytometer (FACS) durchgeführt. Mit fluoreszierenden Antikörpern, die spezifisch für T-Lymphozyten und einzelne VB Familien/Subfamilien sind, werden die prozentualen Anteile der verschiedenen T-Zell-Populationen bestimmt. T-Zellen werden durch Granularität (SSC) und Größe (FSC), als auch durch CD3 Markierung identifiziert, und die CD4 und CD8 T-Populationen werden auf den Anteil verschiedener VB Familien untersucht. Die VB Expansionen, die weiter als zwei Standardabweichungen von der durchschnittlichen VB Verteilung in gesunden Probanden abweichen, werden als pathologisch expandiert gewertet und weiterführend mit molekularen Methoden untersucht, um die echten klonotypischen Expansionen von Pseudoklonalitäten zu unterscheiden. Mit den zur Verfügung stehenden VB Antikörpern können ca. 70-80% des humanen TZR Repertoires erfasst werden. Vorausgesetzt der Fall, wenn die Summe der TZR VB Familien im FACS nur 30% ergibt, kann davon ausgegangen werden, dass die Expansion für eine der nicht erfassten VB Populationen spezifisch ist (VB15/24/6), was durch Spectratyping oder Sequenzierung dieser VB Familien bestätigt werden kann (siehe Abbildung 3a).

Molekulare Analyse des TZR Repertoires mittels TZR RT-PCR, VB Spectratyping und Sequenzierung (Abb. 3a). Die mononukleäre Zellfraktion wird aus dem peripheren Blut mittels Ficoll separiert, gefolgt von der durchflußzytometrischen oder magnetischen Sortierung auf CD4+ oder CD8+ Populationen, RNA Extraktion und Oligonukleotid-geprimten cDNA Synthese. Mit der Vbeta spezifischen PCR werden die gesamten T-Zellen der entsprechenden Vbeta Familie amplifiziert (VB1-24 sense Primer und ein universeller CB antisense Primer),

Abb. 3. Strategien für die Untersuchung von TCR Repertoires



alternativ kann mit der multiplex BIOMED2 PCR das gesamte humane TZR VB Repertoire amplifiziert werden (alle VB sense und alle JB antisense Primer). Die Verwendung von fluoreszierenden antisense Primer (FAM oder HEX markiert) ermöglicht ein TZR VB Spectratyping, d.h. eine hochauflösende VB Fragmentlängenanalyse mittels Kapillärsequencer. Mit dieser Methode können T Zell Oligo- bis Monoklonalitäten als prominente Peaks visualisiert werden; eine Bestimmung des prozentuellen Anteils, der genauen Länge oder der Sequenz der expandierten T Zellen ist jedoch nicht möglich. Für diese Zwecke müssen die einzelnen TZR sequenziert werden: die amplifizierten TZR Beta-Ketten werden aus einem Agarosegel extrahiert, eluiert, aufgereinigt und in einen bakteriellen TA-Vektor kloniert, gefolgt von Transformation in chemisch-kompetente E.coli, Ausplattieren und Züchten auf Agarplatten. Anschließend werden Einzelkolonien erneut mittels PCR amplifiziert, aufgereinigt, und positive

II. ZUSAMMENFASSUNG

Klone werden sequenziert. Auf diese Weise kann das Verteilungsmuster der von einzelnen T Zellen exprimierten TZR Vbeta CDR3 Regionen bestimmt werden.

Für diese experimentelle Abfolge wurden in zahlreichen Vorversuchen verschiedene Bedingungen getestet um eine radikal hohe Spezifität ohne Verlust der Sensitivität zu erreichen (z.B. empfehlen wir die Reduktion der phänotypischen Expressionszeit post Transformationem auf 45 Min. anstatt der gängigen 60 Min., um auszuschließen, dass durch eine unerwünschte bakterielle Zellteilung, vor dem Ausplattieren und der Trennung in Einzelkolonien, TZR Pseudoklonalitäten entstehen. Für eine gleichmäßige Amplifikation aller VB Familien und klonierter VB Produkte wurden verschiedene PCR Bedingungen etabliert. Eine weitere wichtige methodische Überlegung bezieht sich auf die Anzahl der zu sequenzierenden Klonotypen, um eine solide Aussage über das Ausmaß der T Zell Klonalitäten zu treffen. Anhand unserer Erfahrungen sollten für eine statistisch repräsentative Verteilung die Sequenzen von mindestens ca. 15 Klonotypen pro einzelne VB Familie oder mindestens ca. 60 Klonotypen pro ein Multiplex-VB-Gemisch analysiert werden.

Analyse und Vergleich von Homologien der rearrangierten TZR Klonotypen. Die Sequenzen der rearrangierten Klonotypen wurden entweder mittels IMGT TZR analysis Tool ¹³ (bei VB spezifischen PCRs) oder mittels zu diesem Zweck geschriebenen Word/Excel Makros analysiert und in Proteinsequenzen umgeschrieben. Der Vergleich von Sequenz-Homologien zwischen und innerhalb der einzelnen TZR Repertoires erfolgte ebenfalls mittels Excel Makros, wobei verschiedene Analysecodes unter Berücksichtigung der unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren getestet und eingesetzt wurden.

Quantifizierung von klonotypischen Expansionen mittels Sequenzierung. Die Expansionsrate der T Zell Klonotypen innerhalb einer VB Familie wurde mittels Sequenzierung bei ausgewählten Patienten vor, im Verlauf und nach der immunosuppressiven Therapie quantifiziert. Die Sequenzierung erfolgte, wie oben beschrieben, für entsprechende VB Familien innerhalb der CD8+ Zell Populationen. Anhand der Expansion der immunodominanten Klonotypen sowie der Gesamtzahl der sequenzierten Klonotypen wurde die absolute Klonalität oder Diversität innerhalb einer VB Familie oder (wenn die VB-Expansion mittels FACS Analyse bekannt war) innerhalb des gesamten TZR Repertoires errechnet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Analyse der TZR Repertoires in T-LGL und anderen Erkrankungen des Knochenmarks. Mit der in Abbildung 3b schematisch dargestellter Vorgehensweise konnten wir in mehreren methodischen Schritten, in den meisten T-LGL Patienten immundominante klonotypische Expansionen nachweisen. Bei Patienten, bei denen die VB Expansion mittels vorheriger VB-FACS Analyse bekannt war, wurden die Repertoires der entsprechenden VB Familien durchsequenziert. In Fällen ohne erkennbare Expansion in den bekannten VB Familien oder wenn eine vorhergehende VB-FACS Analyse nicht möglich war, wurden die VB Familien 6, 15 und 24 sequenziert, oder das gesamte TZR Repertoire mittels multiplex Primer-Gemisch (alle VBs und alle JBs) sequenziert. Anhand der Analyse einer Vielzahl von klonotypischen Sequenzen bei Gesunden (57 +/- 25 pro VB Familie bei 26 Kontrollen) wurde eine CDR3 Expansion erst von über 12,5% als pathologisch gewertet. Auf diese Weise konnten in der Hauptveröffentlichung dieser Dissertationsarbeit [¹⁶] in 44/60 T-LGL Patienten VB Expansionen mittels VB-Durchflußzytometrie identifiziert werden, mit molekularen Methoden zur Bestimmung der T-Zell Klonalität waren jedoch bei 56/60 Patienten immundominante Expansionen nachweisbar (insgesamt 86 expandierte Klonotypen); in 21 Patienten wurde mehr als 1 immunodominanter Klon gefunden. Die Verteilung der Klonotypenhäufigkeit betrug 18%-100% innerhalb einer VB Familie oder 1,8%-95% innerhalb des gesamten CD8+ TZR Repertoires. Diese Ergebnisse zeigen, dass die relativ hohe Dunkelziffer an undetektierten klonalen Expansionen mit präzisen molekularen Methoden minimiert werden kann, zusätzlich zeigt sich, dass eine Biklonalität in T-LGL nicht selten ist.

Mit ähnlicher Vorgehensweise wurden in den folgenden Originalarbeiten, an denen der Promovend beteiligt war, die TZR Repertoires untersucht (siehe beiliegende Publikationen):

- a)** bei bekannten oder neu diagnostizierten Patienten mit T-LGL: Schade AE, Blood 2006, O'keefe CL, J.Immunol. 2004, Nearman ZP, Br J Haematol. 2007.¹⁷⁻¹⁹
- b)** bei Patienten mit Graft-versus-host-disease (GVHD): Beck RC, Br J Haematol. 2005 und O'Keefe, Exp Hematol. 2004.^{15;20}
- c)** bei Patienten nach Knochenmark-Transplantation: und McIver Z, Br J Haematol. 2008.²¹
- d)** bei Patienten mit der Paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH): Risitano AM, Leukemia 2005 und Plasilova M, Exp Hematol. 2004.^{22;23}
- e)** bei Patienten mit bekanntem Myelodysplastischen Syndrom: Kordasti SY, Blood 2007.²⁴

Zusammenfassend konnte in diesen Publikationen gezeigt werden, dass die Anwendbarkeit dieser Methode ein breites Spektrum hat, es können z.B. GVHD-assoziierte reaktive Klone nach der Knochenmarktransplantation, „T-LGL-like“ Klone in anderen hämatologischen Erkrankungen wie der PNH identifiziert werden, oder die TZR Repertoires von CD4+ Tregs in Hochrisiko-MDS analysiert werden.

II. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der Fragestellung, ob zwischen den Klonotypen einzelner T-LGL Patienten strukturelle Ähnlichkeiten bestehen, die auf eine Beteiligung von ähnlichen/ identischen Target-Antigenen hinweisen könnten, wurden die Klonotypsequenzen in den Standard-20 AA (amino acid) Code, sowie in mehr redundante 8AA und 7AA Codes umgewandelt und die klonotypischen Sequenzen zwischen und innerhalb von individuellen Repertoires verglichen. In 3 von 60 T-LGL Patienten konnte eine identische CDR3-Sequenz identifiziert werden (in 2 Fällen war der Klonotyp immunodominant, d.h. expandiert und im 3. Patienten minor, d.h. nicht expandiert). Interessanterweise ähneln sich diese Patienten bezüglich ihrer HLA-Antigenität: alle drei exprimieren HLA B7. Ferner wurden in 2 weiteren Patientenpaaren ebenfalls identische Klonotypen gefunden (als immunodominant und minor, oder als minor und minor).

Weiterhin lieferte der Strukturvergleich in 7 und 8AA Codes deutliche Ähnlichkeiten zwischen den individuellen Repertoires von Patienten. Derartige Ähnlichkeiten konnten bei Analyse gesunder Repertoires nicht gefunden werden; als Kontrollen dienten die klonotypischen Repertoires von Gesunden. Da die antigenspezifischen Effektorzellen jedoch - theoretisch denkbar - weniger diverse Repertoires aufweisen als die Gesamt-CD8+ Population, haben wir zusätzlich auch die Repertoires von CD3+CD8+CD57+ in Gesunden untersucht.

Insgesamt weisen die hier genannten Ergebnisse auf die Wahrscheinlichkeit hin, dass die Evolution der T-Zell Klonalitäten in T-LGL nicht per Zufall entsteht. Es kann vielmehr angedeutet werden, dass die expandierten Klone einer, gegen ähnliche antigene Strukturen gerichteten Immunantwort entwachsen. Natürlich sollte nicht ausgeschlossen werden, dass das Auftreten von identischen expandierten Klonen in verschiedenen Patienten zufällig ist, wenn man jedoch die immens hohe TZR Variabilität in Betracht zieht, ist diese Möglichkeit unwahrscheinlich.

Beim Vergleich der Sequenz-Homologien von Klonotypen innerhalb individueller Repertoires konnten bei einigen T-LGL Patienten auffällige Ähnlichkeiten zwischen immunodominantem (expandiertem) und minoren Klonotypen innerhalb desgleichen Repertoires aufgefunden werden. Dieses Ergebnis kann daraufhin deuten, dass im Zuge der Immunantwort primär zahlreiche Klone unterschiedlicher Affinität selektiert werden, wobei sich anschließend der immunodominanter Klon „sich heraushebt“ aus dem Hintergrund der oligoklonalen Proliferation.

Des Weiteren interessierte uns die wichtige Frage nach der klinischen Bedeutung der T-Zell Klonalitäten in T-LGL. Unter der Annahme, dass nach einer immunsuppressiven Therapie die Expansion der pathologischen Klone abnimmt und der physiologische TZR Repertoire wiederhergestellt wird, wurden die individuellen TZR Repertoires vor und im Verlauf der Therapie sequenziert. In allen 6 T-LGL Patienten, die mit Cytosan erfolgreich behandelt wurden, führte die Therapie zu Abnahme oder Verlust des anfänglich immunodominanten Klons, zeitgleich stabilisierten sich die hämatologischen Parameter (z.B. Hämoglobin und Retikulozyten bei Patienten mit RCA); und die klonotypische Diversität (Polyklonalität) innerhalb der betroffenen VB Familie wurde wiederhergestellt. Dieses Ergebnis verdeutlicht die wichtige Rolle der

II. ZUSAMMENFASSUNG

Immunsuppression in T-Zell assoziierten Autoimmunerkrankungen. Durch Immunsuppression können die expandierten autoimmunen Klone beseitigt oder zumindest auf bestimmte Zeit inhibiert werden, parallel dazu wird ein „effizientes“ polyklonales TZR Repertoire wiederhergestellt. Mit der TZR Sequenzierung können sowohl einzelne T-Zell Klone, wie auch gesamte Repertoires longitudinell, auf präzise Weise quantifiziert werden; dieses eröffnet neue Wege für weitere methodische Überlegungen, wie z.B. die Etablierung von T-Zell spezifischen Taqman-Tests bei primär bekannten Klonotypsequenzen.

Zusammenfassend konnte in den Arbeiten zur Untersuchung der TZR Repertoires eine effiziente und sensitive Methode zur Identifizierung von T-Zell Klonalitäten etabliert werden und die TZR Repertoires in T-LGL und anderen hämatologischen Erkrankungen charakterisiert werden. Ferner zeigt sich eine universelle Anwendbarkeit der für die Index-Veröffentlichung etablierten Methodik auch für andere hämatologische Fragestellungen. Allgemeingültig kann dieses experimentelle Vorgehen für die Bestimmung und Charakterisierung von physiologischen und pathologischen immunologischen Vorgängen eingesetzt werden.

Die Rolle von immunogenetischen Faktoren in T-LGL Leukämie. Aufgrund der Assoziation von T-LGL mit zahlreichen Autoimmunerkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Collitis Ulzerosa, Morbus Sjögren, SLE, MS und weiteren)^{3;6;25} ist es denkbar, dass in T-LGL immunogenetische Faktoren, wie z.B. die veränderte Expression von inflammatorischen Zytokinen aufgrund von Polymorphismen, KIR oder HLA Konstitution die Ag-spezifischen T-LGL Zellen zur klonalen Expansion und Persistenz prädisponieren. Für die Veröffentlichung von Nearman ZP, Wlodarski M et al, British J Hematol 2006 wurden in insgesamt 66 T-LGL Patienten funktionelle genetische Polymorphismen (CTLA4, CD16, CD45, TNF α , TGF-b1, IL6, und IL10) und die HLA/KIR Profile molekularbiologisch untersucht. Im Vergleich mit der ethnisch gleichen gesunden Bevölkerung konnten weitgehend keine Assoziationen zwischen HLA-, bzw. KIR-Konstitution und der Erkrankung aufgezeigt werden. Statistisch signifikant waren lediglich Mismatch-Konstellationen zwischen zwei KIR-Gensubtypen und deren Liganden (HLA) und die erhöhte Frequenz von bestimmten Genotypen der TNF α und CTLA4 Polymorphismen in T-LGL. Der KIR/KIR-L Mismatch in T-LGL könnte eine Störung der Balance zwischen „silencing“ und „triggering“ der Zytotoxizität nach sich ziehen und die erhöhte Bereitschaft zur klonalen Expansion und Zytotoxizität der T-LGL Klone erklären. Die biologische Bedeutung dieser Ergebnisse für T-LGL ist unklar und bedarf weiterer funktioneller Untersuchungen.

PI3K-AKT Signaltransduktionsweg erklärt die Resistenz gegenüber homöostatischer Apoptose in T-LGL. Typischerweise exprimieren T-LGL Zellen den Phänotyp einer antigenspezifischen T-Zelle, die terminal differenziert ist und im Normalfall ihre Apoptosemechanismen bereits aktiviert/initiiert hat. Trotz einer erhöhten Expression von Fas und

II. ZUSAMMENFASSUNG

Fas Ligand (FasL) sind die T-LGL Klone jedoch resistent gegenüber Fas/FasL induzierter Apoptose. Der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K)-AKT Signaltransduktionsweg spielt eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Überleben und Apoptose einer Zelle und sichert somit die Homöostase von antigen-getriggerten T-Zellen. In der Publikation von Schade AE, Powers J, Wlodarski MW, et al. Blood 2006, konnte gezeigt werden, dass die T-LGL Klone im Vergleich zu Kontrollen eine konstitutive AKT Phosphorylierung aufweisen. Dies führte zu der Annahme, dass durch die Überexpression von PI3K die T-LGL Klone resistent gegenüber FasL induzierter Apoptose sind, und die Inhibierung dieses Weges würde diese Apoptoseresistenz revertieren. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Inhibierung des PI3K Weges zur Abnahme der AKT Phosphorylierung und zeitgleich zur spontan induzierbaren Apoptose der LGL Klone führte. Diese Ergebnisse weisen auf eine Dysregulation des PI3K-AKT Weges, erklären die Apoptoseresistenz der T-LGL Klone und öffnen neue Möglichkeiten für therapeutische Überlegungen in T-LGL.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Loughran TP, Jr. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood* 1993;82:1-14.
2. Lamy T, Loughran TP, Jr. Clinical features of large granular lymphocyte leukemia. *Semin.Hematol.* 2003;40:185-195.
3. Loughran TP, Jr., Starkebaum G. Large granular lymphocyte leukemia. Report of 38 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1987;66:397-405.
4. Rose MG, Berliner N. T-cell large granular lymphocyte leukemia and related disorders. *Oncologist.* 2004;9:247-258.
5. Dhodapkar MV, Li CY, Lust JA, Tefferi A, Phyllykly RL. Clinical spectrum of clonal proliferations of T-large granular lymphocytes: a T-cell clonopathy of undetermined significance? *Blood* 1994;84:1620-1627.
6. Wlodarski MW, Schade AE, Maciejewski JP. T-large granular lymphocyte leukemia: current molecular concepts. *Hematology.* 2006;11:245-256.
7. Wlodarski MW, Gondek LP, Nearman ZP et al. Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2006;108:2632-2641.
8. Wlodarski MW, O'keefe C, Howe EC et al. Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 2005;106:2769-2780.
9. Arstila TP, Casrouge A, Baron V et al. Diversity of human alpha beta T cell receptors. *Science* 2000;288:1135.
10. Padovan E, Casorati G, Dellabona P et al. Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* 1993;262:422-424.
11. Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol.Today* 1995;16:176-181.
12. Langerak AW, van den BR, Wolvers-Tettero IL et al. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha-beta T-cell proliferations. *Blood* 2001;98:165-173.
13. Céline Protat, Véronique Giudicelli and Marie-Paule Lefranc. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system® <http://imgt.cines.fr>. 7-7-1995. Montpellier, France, ImMunoGeneTics information system.
14. Wlodarski MW, O'keefe C, Howe EC et al. Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 2005;106:2769-2780.
15. Beck RC, Wlodarski M, Gondek L et al. Efficient identification of T-cell clones associated with graft-versus-host disease in target tissue allows for subsequent detection in peripheral blood. *Br.J.Haematol.* 2005;129:411-419.
16. Wlodarski MW, Nearman Z, Jankowska A et al. Phenotypic differences between healthy effector CTL and leukemic LGL cells support the notion of antigen-triggered clonal transformation in T-LGL leukemia. *J.Leukoc.Biol.*2008;83:589-601.
17. Schade AE, Powers JJ, Wlodarski MW, Maciejewski JP. Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase pathway activation protects leukemic large granular lymphocytes from undergoing homeostatic apoptosis. *Blood* 2006;107:4834-4840.
18. O'Keefe CL, Plasilova M, Wlodarski M et al. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J.Immunol.* 2004;172:1960-1969.
19. Nearman ZP, Wlodarski M, Jankowska AM et al. Immunogenetic factors determining the evolution of T-cell large granular lymphocyte leukaemia and associated cytopenias. *Br.J.Haematol.* 2007;136:237-248.
20. O'Keefe CL, Sobecks RM, Wlodarski M et al. Molecular TCR diagnostics can be used to identify shared clonotypes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp.Hematol.* 2004;32:1010-1022.
21. McIver Z, Serio B, Dunbar A et al. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br.J.Haematol.* 2008;141:170-178.
22. Risitano AM, Maciejewski JP, Muranski P et al. Large granular lymphocyte (LGL)-like clonal expansions in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Leukemia* 2005;19:217-222.
23. Plasilova M, Risitano AM, O'Keefe CL et al. Shared and individual specificities of immunodominant cytotoxic T-cell clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as determined by molecular analysis. *Exp.Hematol.* 2004;32:261-269.
24. Kordasti SY, Ingram W, Hayden J et al. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 2007;110:847-850.
25. Starkebaum G. Leukemia of large granular lymphocytes and rheumatoid arthritis. *Am.J.Med.* 2000;108:744-745.

III. ANTEILSERKLÄRUNG

Die Promovend Marcin Wlodarski hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

1) Wlodarski MW, O'Keefe C, Howe EC, Risitano AM, Rodriguez A, Warshawsky I, Loughran TP Jr, Maciejewski JP. Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2769-80. [IF: 10,370]

Anteil, Erstautor, ca. 75-80%

Beitrag im Einzelnen: Vorschlagen des Themas/ Methodik, Etablierung der Methodik, Durchführung der Experimente, Auswertung und Analyse, Schreiben der Publikation

2) Wlodarski MW, Schade AE, Maciejewski JP. T-large granular lymphocyte leukemia: current molecular concepts. *Hematology*. 2006 Aug;11(4):245-56. Review.

Anteil: Erstautor, ca. 80%

Beitrag im Einzelnen: Auswertung und Analyse, Schreiben der Publikation

3) Nearman ZP, Wlodarski MW, Jankowska AM, Howe E, Narvaez Y, Ball E, Maciejewski JP.

Immunogenetic factors determining the evolution of T-cell large granular lymphocyte leukaemia and associated cytopenias. *Br J Haematol*. 2007 Jan;136(2):237-48. [IF: 4,498]

Anteil: Zweitautor, ca. 33%

Beitrag im Einzelnen: Einarbeitung und Betreuung des Erstautors, Etablierung der Methodik, Mithilfe bei der Durchführung der Experimente und Analyse, Ideengebung,

4) Beck RC, Wlodarski M, Gondek L, Theil KS, Tuthill RJ, Sobeck R, Bolwell B, Maciejewski JP.

Efficient identification of T-cell clones associated with graft-versus-host disease in target tissue allows for subsequent detection in peripheral blood. *Br J Haematol*. 2005 May;129(3):411-9. [IF: 4,498]

Anteil: Zweitautor, ca. 20%

Beitrag im Einzelnen: Einarbeitung des Erstautors in die Methodik, Durchführung der Experimente

5) Schade AE, Powers JJ, Wlodarski MW, Maciejewski JP. Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase pathway activation protects leukemic large granular lymphocytes from undergoing homeostatic apoptosis. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4834-40. Epub 2006 Feb 16. [IF: 10,370]

Anteil: ca. 10%

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Experimente

6) O'keefe CL, Sobecks RM, Wlodarski M, Rodriguez A, Bell K, Kuczkowski E,

Bolwell BJ, Maciejewski JP. Molecular TCR diagnostics can be used to identify shared clonotypes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2004 Oct;32(10):1010-22. [IF: 3,408]

Anteil: ca. 10%

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Experimente

7) O'Keefe CL, Plasilova M, Wlodarski M, Risitano AM, Rodriguez AR, Howe E, Young NS, Hsi E, Maciejewski JP. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1960-9. [IF: 6,293]

Anteil: ca. 20%

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Experimente

8) McIver Z, Serio B, Dunbar A, O'Keefe CL, Powers J, Wlodarski M, Jin T, Sobecks R, Bolwell B, Maciejewski JP. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after

allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2008 Apr;141(2):170-8. [IF: 4,498]

Anteil: ca. 5%

Beitrag im Einzelnen: Ideengebung (Research Design), Hilfe bei der Auswertung und Analyse

9) Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, Darling D, Barber L, Afzali B, Lombardi G, Wlodarski MW, Maciejewski JP, Farzaneh F,

Mufti GJ. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):847-50. Epub 2007 Apr 5. [IF: 10,370]

Anteil: ca. 5-10%

Beitrag im Einzelnen: Einarbeitung des Erstautors in die Methodik, Mit-Auswertung der Experimente

10) Risitano AM, Maciejewski JP, Muranski P, Wlodarski M, O'Keefe C, Sloand EM, Young NS.

Large granular lymphocyte (LGL)-like clonal expansions in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Leukemia*. 2005 Feb;19(2):217-22. [IF: 6,146]

Anteil: ca. 5-10%

Beitrag im Einzelnen: Einarbeitung des Erstautors in die Methodik, Mit-Auswertung der Experimente

11) Plasilova M, Risitano AM, O'Keefe CL, Rodriguez A, Wlodarski M, Young NS, Maciejewski J. Shared and individual specificities of immunodominant cytotoxic T-cell clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as determined by molecular analysis. *Exp Hematol*. 2004 Mar;32(3):261-9. [IF: 3,408]

Anteil: ca. 5-10%

Beitrag im Einzelnen: Einarbeitung des Erstautors in die Methodik, Mit-Auswertung der Experimente

Marcin Wlodarski

IV. LISTE DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATIONEN

**(vollständige Exemplare befinden sich in der hier aufgeführten Reihenfolge im Anhang)
Angabe des Impactfaktors [IF]: Stand 2006**

- 1) **Wlodarski MW**, O'Keefe C, Howe EC, Risitano AM, Rodriguez A, Warshawsky I, Loughran TP Jr, Maciejewski JP. Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2769-80. Epub 2005 May 24. [IF: 10,370]
- 2) **Wlodarski MW**, Schade AE, Maciejewski JP. T-large granular lymphocyte leukemia: current molecular concepts. *Hematology*. 2006 Aug;11(4):245-56. Review.
- 3) Nearman ZP, **Wlodarski MW**, Jankowska AM, Howe E, Narvaez Y, Ball E, Maciejewski JP. Immunogenetic factors determining the evolution of T-cell large granular lymphocyte leukaemia and associated cytopenias. *Br J Haematol*. 2007 Jan;136(2):237-48. [IF: 4,498]
- 4) Beck RC, **Wlodarski M**, Gondek L, Theil KS, Tuthill RJ, Sobeck R, Bolwell B, Maciejewski JP. Efficient identification of T-cell clones associated with graft-versus-host disease in target tissue allows for subsequent detection in peripheral blood. *Br J Haematol*. 2005 May;129(3):411-9. [IF: 4,498]
- 5) Schade AE, Powers JJ, **Wlodarski MW**, Maciejewski JP. Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase pathway activation protects leukemic large granular lymphocytes from undergoing homeostatic apoptosis. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4834-40. Epub 2006 Feb 16. [IF: 10,370]
- 6) O'keefe CL, Sobecks RM, **Wlodarski M**, Rodriguez A, Bell K, Kuczkowski E, Bolwell BJ, Maciejewski JP. Molecular TCR diagnostics can be used to identify shared clonotypes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2004 Oct;32(10):1010-22. [IF: 3,408]
- 7) O'Keefe CL, Plasilova M, **Wlodarski M**, Risitano AM, Rodriguez AR, Howe E, Young NS, Hsi E, Maciejewski JP. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1960-9. [IF: 6,293]
- 8) McIver Z, Serio B, Dunbar A, O'Keefe CL, Powers J, **Wlodarski M**, Jin T, Sobecks R, Bolwell B, Maciejewski JP. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2008 Apr;141(2):170-8. [IF: 4,498]
- 9) Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, Darling D, Barber L, Afzali B, Lombardi G, **Wlodarski MW**, Maciejewski JP, Farzaneh F, Mufti GJ. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):847-50. Epub 2007 Apr 5. [IF: 10,370]
- 10) Risitano AM, Maciejewski JP, Muranski P, **Wlodarski M**, O'Keefe C, Sloan EM, Young NS. Large granular lymphocyte (LGL)-like clonal expansions in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Leukemia*. 2005 Feb;19(2):217-22. [IF: 6,146]
- 11) Plasilova M, Risitano AM, O'Keefe CL, Rodriguez A, **Wlodarski M**, Young NS, Maciejewski J. Shared and individual specificities of immunodominant cytotoxic T-cell clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as determined by molecular analysis. *Exp Hematol*. 2004 Mar;32(3):261-9. [IF: 3,40]

V. TABELLARISCHER LEBENSLAUF

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

VI. KOMPLETTE PUBLIKATIONSLISTE

Originalarbeiten

- 1: McIver Z, Serio B, Dunbar A, O'Keefe CL, Powers J, **Wlodarski M**, Jin T, Sobecks R, Bolwell B, Maciejewski JP. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2008 Apr;141(2):170-8. [IF: 4,498]
- 2: **Wlodarski MW**, Nearman Z, Jiang Y, Lichtin A, Maciejewski JP. Clonal predominance of CD8(+) T cells in patients with unexplained neutropenia. *Exp Hematol.* 2008 Mar;36(3):293-300. [IF: 3,408]
- 3: **Wlodarski MW**, Nearman Z, Jankowska A, Babel N, Powers J, Leahy P, Volk HD, Maciejewski JP. Phenotypic differences between healthy effector CTL and leukemic LGL cells support the notion of antigen-triggered clonal transformation in T-LGL leukemia. *J Leukoc Biol.* 2008 Mar;83(3):589-601. [IF: 4,572]
- 4: Gondek LP, Haddad AS, O'Keefe CL, Tiu R, **Wlodarski MW**, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Detection of cryptic chromosomal lesions including acquired segmental uniparental disomy in advanced and low-risk myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol.* 2007 Nov;35(11):1728-38. Epub 2007 Oct 17. [IF: 3,408]
- 5: Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, Darling D, Barber L, Afzali B, Lombardi G, **Wlodarski MW**, Maciejewski JP, Farzaneh F, Mufti GJ. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood.* 2007 Aug 1;110(3):847-50. Epub 2007 Apr 5. [IF: 10,370]
- 6: Nearman ZP, **Wlodarski MW**, Jankowska AM, Howe E, Narvaez Y, Ball E, Maciejewski JP. Immunogenetic factors determining the evolution of T-cell large granular lymphocyte leukaemia and associated cytopenias. *Br J Haematol.* 2007 Jan;136(2):237-48. [IF: 4,498]
- 7: **Wlodarski MW**, Gondek LP, Nearman ZP, Plasilova M, Kalaycio M, Hsi ED, Maciejewski JP. Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2006 Oct 15;108(8):2632-41. [IF: 10,370]
- 8: Schade AE, Powers JJ, **Wlodarski MW**, Maciejewski JP. Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase pathway activation protects leukemic large granular lymphocytes from undergoing homeostatic apoptosis. *Blood.* 2006 Jun 15;107(12):4834-40. Epub 2006 Feb 16. [IF: 10,370]
- 9: **Howe EC**, **Wlodarski M**, Ball EJ, Rybicki L, Maciejewski JP. Killer immunoglobulin-like receptor genotype in immune-mediated bone marrow failure syndromes. *Exp Hematol.* 2005 Nov;33(11):1357-62. [IF: 3,408]
- 10: **Wlodarski MW**, O'Keefe C, Howe EC, Risitano AM, Rodriguez A, Warshawsky I, Loughran TP Jr, Maciejewski JP. Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood.* 2005 Oct 15;106(8):2769-80. Epub 2005 May 24. [IF: 10,370]
- 11: Beck RC, **Wlodarski M**, Gondek L, Theil KS, Tuthill RJ, Sobeck R, Bolwell B, Maciejewski JP. Efficient identification of T-cell clones associated with graft-versus-host disease in target tissue allows for subsequent detection in peripheral blood. *Br J Haematol.* 2005 May;129(3):411-9. [IF: 4,498]

- 12: O'Keefe CL, Sobecks RM, **Wlodarski M**, Rodriguez A, Bell K, Kuczowski E, Bolwell BJ, Maciejewski JP. Molecular TCR diagnostics can be used to identify shared clonotypes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2004 Oct;32(10):1010-22. [IF: 3,408]
- 13: Risitano AM, Maciejewski JP, Muranski P, **Wlodarski M**, O'Keefe C, Sloand EM, Young NS. Large granular lymphocyte (LGL)-like clonal expansions in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Leukemia.* 2005 Feb;19(2):217-22. [IF: 6,146]
- 14: O'Keefe CL, Plasilova M, **Wlodarski M**, Risitano AM, Rodriguez AR, Howe E, Young NS, Hsi E, Maciejewski JP. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol.* 2004 Feb 1;172(3):1960-9. [IF: 6,293]
- 15: Plasilova M, Risitano AM, O'Keefe CL, Rodriguez A, **Wlodarski M**, Young NS, Maciejewski J. Shared and individual specificities of immunodominant cytotoxic T-cell clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as determined by molecular analysis. *Exp Hematol.* 2004 Mar;32(3):261-9. [IF: 3,408]
- 16: Kook H, Risitano AM, Zeng W, **Wlodarski M**, Lottemann C, Nakamura R, Barrett J, Young NS, Maciejewski JP. Changes in T-cell receptor VB repertoire in aplastic anemia: effects of different immunosuppressive regimens. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3668-75. [IF: 10,370]
- 17: Demuth I, **Wlodarski M**, Tipping AJ, Morgan NV, de Winter JP, Thiel M, Graesl S, Schindler D, D'Andrea AD, Altay C, Kayserili H, Zatterale A, Kunze J, Ebell W, Mathew CG, Joenje H, Sperling K, Digweed M. Spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group G gene, FANCG/XRCC9. *Eur J Hum Genet.* 2000 Nov;8(11):861-8. [IF: 3,697]

Übersichtsarbeiten

- Wlodarski MW**, Schade AE, Maciejewski JP. T-large granular lymphocyte leukemia: current molecular concepts. *Hematology.* 2006 Aug;11(4):245-56. Review.
- Schade AE, **Wlodarski MW**, Maciejewski JP. Pathophysiology defined by altered signal transduction pathways: the role of JAK-STAT and PI3K signaling in leukemic large granular lymphocytes. *Cell Cycle.* 2006 Nov;5(22):2571-4. Epub 2006 Nov 15. Review.
- Demuth I, **Wlodarski M**, Digweed M. Fanconi Anämie: Paradigma der genetischen Heterogenität *Medizinische Genetik, Edition Band 2, München 2002*

Konferenzteilnahme (Vorträge und Poster)

49th American Society of Hematology Annual Meeting Dec. 8-11 2007

SNP-Array Karyotyping Reveals the Presence of Previously Cryptic Clonal Chromosomal Aberrations Including Segmental UPD in Patients with Fanconi Anemia. Poster Presentation #832-I
Marcin Wlodarski, Holger Toennies, Andrew Dunbar, Zach Nearman, Marion Nagy, Joern-Sven Kuehl, Heidemarie Neitzel, Wolfram Ebell and Jaroslaw Maciejewski

37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, Sept. 5th-8th 2007:

Strategies For Quantitation And In-Vivo Tracking Of Clonal Cytotoxic T-Cell Responses. Poster Presentation. Marcin W. Wlodarski, Zachary P. Nearman, Hans-Dieter Volk and Jaroslaw P. Maciejewski.

Immunodominant Cytotoxic T Lymphocyte Expansions In Patients With Unexplained Neutropenia. Poster Presentation. Marcin W. Wlodarski, Zachary P. Nearman, Yadira Narvaez, Jaroslaw P. Maciejewski

56. Jahrestagung der Norddeutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Berlin, June 1-3.2007:

Kasuistik: Patient Mit Unklarer Panzytopenie: Diagnostisches Und Therapeutisches Vorgehen. Oral Presentation. Marcin Wlodarski, Jörn-Sven Kühl, Wolfram Ebell, Gerhard Gaedicke und Gabriele Strauss.

48th American Society of Hematology Annual Meeting Dec. 9-12 2006:

High Density SNP Arrays Reveal That Distinct Clonal Lesions Including Uniparental Disomy Can Be Detected in a Proportion of Patients with Aplastic Anemia with Normal Metaphase Cytogenetics. Oral Presentation Marcin Wlodarski, Christine O'Keefe, Lukasz Gondek, Seishi Ogawa, Jaroslaw P. Maciejewski

High-Density SNP Arrays Reveals the Possible Presence of Multi-Loci Genetic Predisposition for Myelodysplastic Syndromes (MDS). Poster Presentation Lukasz P. Gondek, Marcin W. Wlodarski, Zachary P. Nearman, Abdo Haddad, Ramon Tiu, Mikkael A. Sekeres, Jaroslaw P. Maciejewski

Identification of Chromosomal Abnormalities in Healthy Bone Marrow Using 250K SNP Arrays. Poster Presentation. Christine L. O'Keefe, Lukasz P. Gondek, Ramon Tiu, Zachary P. Nearman, Marcin Wlodarski, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa, Jaroslaw P. Maciejewski

Double Negative T Cells Influence TCR VB Variability to Induce Allotolerance. Oral Presentation. Zachariah A. Mclver, Marcin Wlodarski, Jennifer Powers, Christine O'Keefe, Tao Jin, Ronald Sobecks, Brian J. Bolwell, Jaroslaw P. Maciejewski

47th American Society of Hematology Annual Meeting Dec. 10-13 2005:

New Molecular Strategies for Detection and Quantitation of Clonal Cytotoxic T Cell Responses in Myelodysplasia and Aplastic Anemia. Poster Presentation. Marcin W. Wlodarski, Lukasz Gondek, Zachary Nearman, Yadira Narvaez, Anjali Advani, Alan Lichtin, Matt Kalaycio, Jaroslaw P. Maciejewski

Cytokine Proteome of Terminally Differentiated Effector T Cells and Their Malignant Counterparts in T-LGL. Distinct Changes Consistent with Response to a Viral Pathogen. Poster Presentation. Marcin W. Wlodarski, Jennifer Powers, Patrick Leahy, Jaroslaw P. Maciejewski

Immunogenetic Factors Determining Evolution of T-Cell Large Granular Lymphocyte Leukemia and Associated Cytopenias. Poster Presentation. Zachary P. Nearman, Marcin Wlodarski, Chris Hung, Evan Howe, Yadira Narvaez, Edward Ball, Jaroslaw P. Maciejewski

High-Density Genomic Scan with 50K SNP Arrays Reveals Existence of Cryptic Chromosomal Lesions and Germ Line Allelic Polymorphism That Might Determine Predisposition to MDS. Session Poster Presentation. Lukasz P. Gondek, Christine L. O' Keefe, Marcin W. Wlodarski, Mikkael M. Sekeres, Martina L. Veigl, Debora Poruban, Jaroslaw P. Maciejewski

VI. KOMPLETTE PUBLIKATIONSLISTE

High-Density Genomic Scan with 50k SNP Arrays May Reveal Existence of Germline Allelic Polymorphisms That Determine Predisposition to Aplastic Anemia. Poster Presentation. Marcin W. Wlodarski, Lukasz Gondek, Debora Poruban, Martina Veigl, Matt Kalaycio, Jaroslaw P. Maciejewski

Phosphatidylinositol-3-Phosphate Kinase Pathway Activation Protects Leukemic Large Granular Lymphocytes from Undergoing Homeostatic Apoptosis. Oral Presentation. Andrew E. Schade, Jennifer Powers, Marcin W. Wlodarski, Jaroslaw P. Maciejewski

International Bone Marrow Failure Scientific Symposium, Washington, DC, Oct. 17-19, 2005:

Application of High Resolution Genomic Scan in Bone Marrow Failure Syndromes. Jaroslaw P. Maciejewski, Lucas Gondek Christine O'Keefe and Marcin Wlodarski

10th Congress Of The European Hematology Association, Stockholm, June 2–5, 2005

Non-Random Nature Of The T Cell Receptor Restriction In Large Granular Lymphocyte Leukemia Poster Presentation. M.W. Wlodarski, C. O'keefe, A. Risitano, A. Rodriguez, J. Maciejewski

Polarized CTL Responses Detected In Patients With Autoimmune Neutropenia. Poster Presentation M.W. Wlodarski, A.N. Yadira Narvaez, Z. Nearman, J.N. Powers, A. Rodriguez, J. Maciejewski

8th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. Nagasaki, Japan, May 12-15, 2005

Molecular analysis of CTL responses in MDS and other bone marrow failure states. Oral presentation. Marcin Wlodarski and Jaroslaw Maciejewski

10th Congress of the European Hematology Association, Stockholm, Sweden, June 2–5, 2005.

Polarized CTL Responses Detected In Patients With Autoimmune Neutropenia. Poster Presentation. Marcin Wlodarski, Yadira Narvaez, Alexander Rodriguez and Jaroslaw Maciejewski.

46th American Society of Hematology Annual Meeting Dec. 4-7 2004:

Pathologic Clonal CTL Responses - Non Random Nature of the TCR Restriction in LGL Leukemia. Poster Presentation. Marcin W. Wlodarski, Christine O'Keefe, Evan Howe, Alexander Rodriguez, Thomas Loughran, Jaroslaw P. Maciejewski

KIR Gene Distribution in Hematologic Disorders. Poster Presentation. Evan C. Howe, Marcin Wlodarski, Edward J. Ball, Jaroslaw P. Maciejewski

Efficient Identification of T-Cell Clones Associated with Graft-Versus-Host Disease (GvHD) in Target Tissue for Subsequent Detection in Peripheral Blood. Poster Presentation. Rose C. Beck, Marcin Wlodarski, Karl S. Theil, Ralph Tuthill, Brian Bolwell, Ronald Sobecks, Jaroslaw P. Maciejewski

Polarized CTL Responses Detected in Patients with Autoimmune Neutropenia. Poster Presentation. Marcin W. Wlodarski, Yadira Narvaez, Alexander Rodriguez, Jaroslaw P. Maciejewski

45th American Society of Hematology Annual Meeting Dec. 6-9 2003:

Analysis of T Cell Receptor Repertoire in LGL Leukemia Supports a Non-Random Evolution of Immunodominant CTL Clones. Poster Session. Marcin Wlodarski, Christine L. O'Keefe, Magdalena Plasilova, Alexander Rodriguez, Evan Howe, Antonio Risitano, Neal S. Young, Thomas P. Loughran, Josef Karban, Jaroslaw P. Maciejewski

Can Seldi Mass Spectrometry Serum Proteomics Be Applied To Improve Diagnosis of Immune Thrombocytopenic Purpura? Poster Session. Marcin Wlodarski, Rongzhi Wu, Magdalena Plasilova, Tahir Latif, Alan Lichtin, Jaroslaw P. Maciejewski

Molecular T Cell Receptor Repertoire Analysis in Immune Mediated Bone Marrow Failure Syndromes- Implications for the Development of Diagnostic Tests. Poster Session. Magdalena Plasilova, Antonio Risitano, Alexander Rodriguez, Marcin Wlodarski, Evan Howe, Jaroslaw Maciejewski

VII. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Erklärung

„Ich, Marcin Wlodarski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Analyse der T Zell Klonalitäten in T-LGL Leukämie und anderen Erkrankungen mit erworbenem Knochenmarkversagen“** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum:

Marcin Wlodarski

VIII. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. H.D. Volk, Direktor des Instituts für Medizinische Immunologie der Charité, der mir exzellente Arbeitsbedingungen geschaffen hat und mit Großzügigkeit und kontinuierlicher Betreuung diese Dissertationsarbeit ermöglicht hat.

Ich bedanke mich bei meinem langjährigen Mentor, Herrn Prof. Dr. J.P. Maciejewski dessen brillante Persönlichkeit mich immer inspiriert und meine wissenschaftliche Entwicklung stimuliert hat.

Herrn Prof. Dr. M. Digweed und Herrn Dr. I. Demuth am Institut für Humangenetik der Charite Berlin danke ich als meinen großartigen Lehrern, die mir die Prinzipien des molekulargenetischen Handwerks mit Geduld beigebracht haben.

Ein ganz großer Dank gilt natürlich auch meiner Familie, die mir alles Bisherige möglich machte.

PUBLIKATIONEN

Wlodarski MW, O'Keefe C, Howe EC, Risitano AM, Rodriguez A, Warshawsky I, Loughran TP Jr, Maciejewski JP. Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia.
Blood. 2005 Oct 15;106(8):2769-80. Epub 2005 May 24.

Wlodarski MW, Schade AE, Maciejewski JP. T-large granular lymphocyte leukemia: current molecular concepts. *Hematology*. 2006 Aug;11(4):245-56. Review.

Nearman ZP, Wlodarski MW, Jankowska AM, Howe E, Narvaez Y, Ball E, Maciejewski JP.

Immunogenetic factors determining the evolution of T-cell large granular lymphocyte leukaemia and associated cytopenias. *Br J Haematol.* 2007 Jan;136(2):237-48.

Beck RC, Wlodarski M, Gondek L, Theil KS, Tuthill RJ, Sobeck R,
Bolwell B, Maciejewski JP.

Efficient identification of T-cell clones associated with graft-versus-host disease in target tissue allows for subsequent detection in peripheral blood. *Br J Haematol.* 2005 May;129(3):411-9.

Schade AE, Powers JJ, Wlodarski MW, Maciejewski JP.
Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase pathway activation protects
leukemic large granular lymphocytes from undergoing homeostatic
apoptosis. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4834-40. Epub 2006 Feb 16.

O'keefe CL, Sobecks RM, Wlodarski M, Rodriguez A, Bell K, Kuczkowski
E,

Bolwell BJ, Maciejewski JP. Molecular TCR diagnostics can be used to
identify shared clonotypes after allogeneic hematopoietic stem cell
transplantation.

Exp Hematol. 2004 Oct;32(10):1010-22.

O'Keefe CL, Plasilova M, Wlodarski M, Risitano AM, Rodriguez AR, Howe E, Young NS, Hsi E, Maciejewski JP. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol.* 2004 Feb 1;172(3):1960-9.

Mclver Z, Serio B, Dunbar A, O'Keefe CL, Powers J, Wlodarski M, Jin T, Sobecks R, Bolwell B, Maciejewski JP. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2008 Apr;141(2):170-8.

Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, Darling D, Barber L, Afzali B, Lombardi G, Wlodarski MW, Maciejewski JP, Farzaneh F, Mufti GJ. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):847-50. Epub 2007 Apr 5.

Risitano AM, Maciejewski JP, Muranski P, Wlodarski M, O'Keefe C,
Sloand EM, Young NS.
Large granular lymphocyte (LGL)-like clonal expansions in paroxysmal
nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Leukemia*. 2005
Feb;19(2):217-22.

Plasilova M, Risitano AM, O'Keefe CL, Rodriguez A, Wlodarski M, Young NS, Maciejewski J. Shared and individual specificities of immunodominant cytotoxic T-cell clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as determined by molecular analysis. *Exp Hematol.* 2004 Mar;32(3):261-9.