

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/ Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Interleukin 15 Expression in Rezidiven der Akuten
Lymphoblastischen Leukämie des Kindesalters**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadja Züfle-Lemke, geb. Züfle

aus Waiblingen

Datum der Promotion: 01.03.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	3
2	Abstract (English)	4
3	Einleitung.....	5
3.1	Akute lymphoblastische Leukämie des Kindesalters	5
3.1.1	Entstehung und Charakteristika der Akuten lymphoblastischen Leukämie ..	5
3.1.2	Rezidive der ALL.....	7
3.2	Interleukin 15.....	11
3.2.1	Struktur und Expression des <i>IL15</i> -Gens	11
3.2.2	IL-15-Rezeptor	12
3.2.3	Wirkungswege von IL-15.....	13
3.2.4	Regulation von IL-15.....	14
3.2.5	Funktionen von IL-15	14
3.3	IL-15 bei Leukämie und Tumoren.....	16
4	Fragestellungen und Ziele	18
5	Material und Methoden	19
5.1	Material.....	19
5.1.1	Patienten und Proben	19
5.1.2	Zelllinien.....	19
5.1.3	Geräte	20
5.1.4	Verbrauchsmaterialien, Medien und Puffer.....	20
5.2	Methoden	22
5.2.1	Ein- und Ausschlusskriterien der Patienten	22
5.2.2	Zellkultur	23
5.2.3	Präparation und Konzentrationsbestimmung von Ribonukleinsäure.....	23
5.2.4	Gelelektrophorese.....	24
5.2.5	Reverse Transkription.....	25
5.2.6	Qualitative PCR zum Nachweis der erfolgreichen reversen Transkription ..	26
5.2.7	Real-time-PCR zum quantitativen Nachweis von <i>IL15</i>	27
5.2.8	Effizienzkorrigierte Quantifizierung	29
5.2.9	Genexpressionsanalysen mit DNA Mikroarrays.....	30
5.2.10	Statistische Auswertung.....	31
6	Ergebnisse.....	33
6.1	Repräsentativität des untersuchten Patientenkollektivs.....	33
6.1.1	Repräsentativität des gesamten Untersuchungskollektivs	33
6.1.2	Repräsentativität der Untergruppen des Untersuchungskollektivs.....	35

6.2	Qualität des real-time-PCR-Assays	38
6.2.1	Expression von <i>IL15</i> in der Positivkontrolle	38
6.2.2	Intra- und Inter-Assay-Varianzen der real-time-PCR	38
6.2.3	Varianz der Effizienzen der real-time-PCR	39
6.3	Charakterisierung der erhobenen Daten	40
6.4	<i>IL15</i> Expression in Abhängigkeit vom Ort des ersten Rezidivs	42
6.5	<i>IL15</i> Expression im ersten Rezidiv in Abhängigkeit von der Lokalisation der Leukämie im Krankheitsverlauf.....	44
6.5.1	<i>IL15</i> Expression in Patientenproben bei ZNS-Beteiligung während der ALL-Ersterkrankung.....	44
6.5.2	<i>IL15</i> Expression bei unterschiedlicher Lokalisation von Folgerezidiven.....	45
6.6	Charakteristika von Patienten mit sehr hoher <i>IL15</i> Expression	46
6.7	Assoziation klinisch-biologischer Parameter mit der <i>IL15</i> Expression	49
6.7.1	<i>IL15</i> Expression in Abhängigkeit vom Immunphänotyp	49
6.7.2	<i>IL15</i> Expression und andere Parameter	51
6.7.3	<i>IL15</i> Expression und Therapieergebnis	54
7	Diskussion	58
7.1	Charakteristika des Patientenkollektivs	58
7.2	Quantitativer real-time-PCR Nachweis von <i>IL15</i> mRNA.....	59
7.3	Einfluss von IL-15 auf den Ort des Rezidivs.....	60
7.4	<i>IL15</i> Expression in Abhängigkeit klinischer und biologischer Parameter sowie dem Überleben bei ALL-Rezidiv Patienten	64
7.5	Expression von <i>IL15</i> in Abhängigkeit vom Immunphänotyp	66
7.6	IL-15 als therapeutisches Target	69
7.7	Schlussfolgerung.....	71
8	Literaturverzeichnis.....	73
9	Abkürzungsverzeichnis.....	89
10	Lebenslauf	90
11	Danksagung.....	91
12	Eidesstattliche Versicherung.....	92

1 Zusammenfassung

Etwa 20% der an einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) erkrankten Kinder erleiden ein Rezidiv. Diese ALL-Rezidive entstehen meist im Knochenmark, können sich aber auch zusätzlich oder ausschließlich in einem extramedullären Kompartiment wie dem zentralen Nervensystem (ZNS) oder den Testes manifestieren. Die Lokalisation des Rezidivs ist dabei klinisch und prognostisch relevant, doch die Mechanismen der Infiltration eines extramedullären Kompartiments weitestgehend unbekannt. Bei der Ersterkrankung der ALL ist eine ZNS-Beteiligung mit einer signifikant höheren Expression des Interleukin 15 Gens (*IL15*) in den Leukämiezellen assoziiert. Da Interleukin 15 (IL-15) ein potenzielles pharmakologisches Angriffsziel darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit als Pilotstudie die *IL15* Expression hinsichtlich ihres Einflusses auf die Lokalisation sowie auf klinische und biologische Merkmale des ALL-Rezidivs untersucht. Hierfür wurde die *IL15* Expression in Leukämiezellen von Patienten mit erstem ALL-Rezidiv ohne ($n = 25$) bzw. mit ($n = 31$) Beteiligung des ZNS oder der Testes retrospektiv mittels real-time-PCR quantifiziert und mit den klinischen Daten der Patienten statistisch korreliert. Alle Patienten waren in die deutsche Therapieoptimierungsstudie ALL-REZ BFM 2002 eingeschlossen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Leukämiezellproben von 62% (21/34) der Patienten mit kombiniertem ZNS-Rezidiv und 71% (10/14) derer mit kombiniertem Testes-Rezidiv, die zum Untersuchungszeitpunkt durch die Studie ALL-REZ BFM 2002 rekrutiert waren, untersucht. Unter den Proben mit einer stark erhöhten *IL15* Expression im oberen Quartil fanden sich 38% der Proben von Patienten mit kombiniertem ZNS-Rezidiv, was jedoch nicht statistisch signifikant war ($p=0,08$). Signifikant assoziiert hingegen war eine *IL15* Expression im oberen Quartil mit dem Vorliegen eines T-Zell ALL Immunphänotyps ($p=0,038$). Diese Beobachtung wurde durch die Reanalyse einer größeren Patientenkohorte mit erstem ALL-Rezidiv, deren Genexpression in einer früheren Studie mit genomweiten Mikroarrays untersucht worden war, validiert.

Die vorliegende Arbeit zeigte erstmals, dass sich T-ALL-Rezidive durch eine signifikant höhere *IL15* Expression auszeichnen. Die *IL15* Expression in T-ALL-Rezidiven sollte nun in einer größeren Patientenkohorte näher untersucht werden, da IL-15 möglicherweise zur Pathogenese des T-ALL-Rezidivs beiträgt bzw. ein neues pharmakologisches Ziel für T-ALL-Rezidive darstellt.

2 Abstract (English)

Around 20% of all children suffering from acute lymphoblastic leukemia (ALL) will suffer a relapse. Normally these relapses originate from the bone marrow but sometimes they manifest themselves additionally or exclusively in extramedullary compartments, such as the central nervous system (CNS) or the testes. Site of relapse is a relevant factor for clinical outcome and prognosis but the infiltration mechanisms of extramedullary compartments are largely unknown. There is a significant link between CNS infiltration and high Interleukin 15 gene expression (*IL15*) in leukemic cells during the initial manifestation of ALL. Since Interleukin 15 (IL-15) could potentially be a point of pharmacological intervention, this pilot study investigated *IL15* expression and its impact on the site of relapse and on the clinical and biological characteristics of an ALL relapse. The *IL15* expression was quantified using real-time-PCR in the leukemic cells of patients with an initial ALL relapse both with (n=25) and without (n=31) any extramedullary infiltration in the CNS or testes. Experimental results were statistically correlated with clinical data. All patients included in the present study were also included in the ALL-REZ BFM 2002 therapy study.

In the present study, leukemic cell samples were taken from 62% (21/34) of all patients with combined relapse of bone marrow and CNS and from 71% (10/14) of all patients with combined relapse of bone marrow and testes who were included in ALL-REZ BFM 2002 therapy study at time of the experimental investigations. Of the samples with a very high *IL15* expression in the upper quartile, 38% of which were from patients with combined relapse of bone marrow and CNS which was not statistically significant (p=0.08). In contrast, *IL15* expression in the top quartile was associated with the presence of T-cell ALL immunophenotype (p=0.038) and is statistically significant. We were able to validate these findings by reanalyzing a larger cohort of patients with an initial ALL relapse from an earlier microarray gene expression study.

The present study showed, for the first time, that leukemic cells of the T cell immunophenotype in first relapse are characterized by a significantly higher expression of the *IL15* gene. The *IL15* expression of T cell immunophenotype relapses should now be examined in a larger cohort of patients because IL-15 may contribute to pathogenesis of the T ALL relapse and be a new pharmacological target for treating a T ALL relapse.

3 Einleitung

3.1 Akute lymphoblastische Leukämie des Kindesalters

3.1.1 Entstehung und Charakteristika der akuten lymphoblastischen Leukämie

Maligne Erkrankungen im Kindesalter stellen seit jeher besondere Herausforderungen an Therapie und Forschung. Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) stellt mit etwa 30% die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter dar. Etwa 500 Kinder in Deutschland erkranken jährlich daran.¹ Durch die konsequente und flächendeckende Behandlung der Patienten in Therapieoptimierungsstudien konnten die Überlebenschancen herausragend verbessert werden.² Insgesamt hat ein neu erkranktes Kind inzwischen eine Heilungswahrscheinlichkeit von etwa 80%.^{3,4}

Eine akute Leukämie entsteht im Knochenmark durch genetische Veränderungen in einer frühen hämatopoetischen Vorläuferzelle, die zu deren unkontrollierter, monoklonaler Proliferation ohne eine weitere Ausreifung führt.⁵ Die genetischen Veränderungen betreffen daher häufig Prozesse, die in die Steuerung von Differenzierung, Zellproliferation und Apoptose involviert sind.⁶⁻⁸ Durch zunehmende Proliferation des leukämischen Klon werden andere blutbildenden Zellen im Knochenmark verdrängt. Mikroskopisch stellt sich dann ein homogenes Bild identischer Zellen dar.⁹ Die Leukämiezellen können aus dem Knochenmark ins Blut ausgeschwemmt werden und sich als Leukozytose repräsentieren oder sich in andere, extramedulläre Organe absiedeln.⁹

Die ALL ist eine Leukämie der lymphatischen Reihe. Sie beruht auf einer malignen Transformation von Vorläuferzellen in der Entstehungslinie der T- und B-Lymphozyten. Je nach Reifestadium der Vorläuferzelle, aus der die Leukämie entstanden ist, sind die malignen Zellen durch bestimmte Oberflächenmarker charakterisiert. Die Zusammensetzung dieser Oberflächenmoleküle bestimmt den Immunphänotyp der ALL.¹⁰ Der Immunphänotyp spielt bei therapeutischen Entscheidungen eine Rolle, da er prognostische Relevanz besitzt. B-Vorläuferzell- und T-ALLs unterscheiden sich in ihren biologischen und klinischen Eigenschaften.¹¹⁻¹⁴

Neben dem Immunphänotyp sind eine Reihe genetischer Veränderungen bekannt, die zur näheren Subspezifizierung einer ALL herangezogen werden können. Dazu

gehören verschiedene Fusionsgene, die durch chromosomale Translokationen entstehen. Die häufigste Translokation stellt mit etwa 20% die Veränderung $t(12;21)(p13;q22)$ dar, wodurch das Fusionsgen *ETV6-RUNX1* entsteht. Weitere Translokationen sind unter anderem $t(4;11)(q21;q23)$ mit dem Fusionsgen *MLL/AFF1* und $t(9;22)(q34;q11)$ mit dem Fusionsgen *BCR/ABL* sowie seltenere wie die Translokation $t(1;19)(q23;p13)$ mit dem Fusionsgen *E2A-PBX1*. Während *ETV6/RUNX1* mit einer guten Prognose assoziiert ist, geht das Vorhandensein von *BCR/ABL* mit einer schlechteren Prognose einher.⁶ Bei Vorliegen von *E2A/PBX1* ist das Risiko für ein Rezidiv des Zentralen Nervensystems (ZNS) erhöht.^{4, 15}

Weitere genetische Veränderungen sind numerische Chromosomenanomalien. Dazu kann das Vorliegen einer Trisomie 21 (Morbus Down) gezählt werden. Bei diesem Krankheitsbild ist ein um das 20fache erhöhtes Risiko für eine Leukämie bekannt.¹⁶ Auch bei Patienten ohne genetische Vorerkrankungen finden sich in den Leukämiezellen häufig hyper- oder hypoploide Chromosomensätze.⁶ Ein hyperdiploider Chromosomensatz mit über 50 Chromosomen wurde dabei mit einer guten Prognose assoziiert.^{17, 18} Abbildung 3.1 zeigt die prozentuale Häufigkeitsverteilung der genannten Veränderungen.

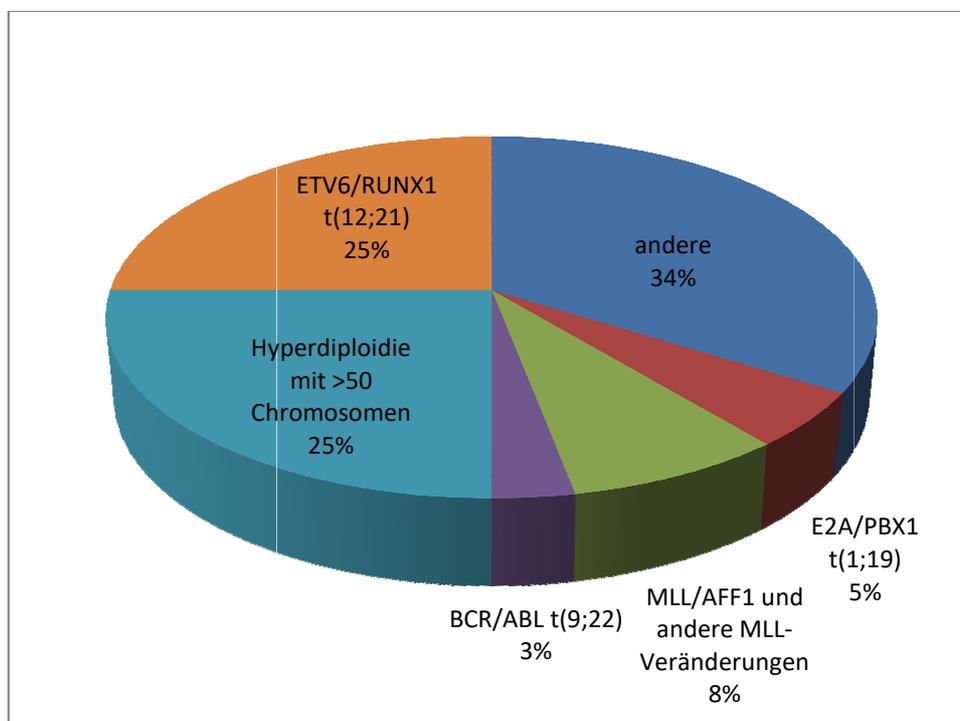


Abbildung 3.1: Genetische Veränderungen bei ALL im Kindesalter (modifiziert nach Pui et al. 2010⁴).

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der genannten genetischen Veränderungen bei Erstdiagnose einer ALL im Kindesalter. Die im Text genannte Trisomie 21 ist selten und hier nicht dargestellt.

Die stetige Verbesserung der Prognose von Kindern mit ALL beruht vor allem auf der konsequenten Therapie der Patienten im Rahmen von Therapieoptimierungsstudien. Diese Studien optimieren die Behandlungsprotokolle im Sinne einer Erhöhung der Überlebensrate bei gleichzeitig einer Verringerung der akuten und Langzeitnebenwirkungen. Dabei fließen die oben genannten prognostisch relevanten Faktoren in die Abschätzung des individuellen Risikos und somit in die Therapie der ALL mit ein.^{4, 19-22}

3.1.2 Rezidive der ALL

Trotz risikoadaptierter Therapie erleiden etwa 20% der Kinder mit ALL ein Rezidiv.^{4, 23} Die Definition eines Rezidivs hängt unter anderem vom prozentualen Anteil der Blasten im Knochenmark und der Beteiligung extramedullärer Organe ab (vgl. Tabelle 3.1). Dabei ist ein isoliertes Knochenmarkrezidiv durch das Vorliegen von mindestens 25%

Tabelle 3.1: Definition des Rezidivorts.

KM-Blasten	keine EMB	EMB
<5%	Remission	isoliert extra-medulläres Rezidiv
≥5% bis <25%	kontrollbedürftiges KM	kombiniertes KM-Rezidiv
≥25%	isoliertes KM-Rezidiv	

KM = Knochenmark. EMB = Extramedulläre Beteiligung.

Blasten im Knochenmark und das Fehlen einer extramedullären Beteiligung definiert. Liegt im Knochenmark ein Blastenanteil von mindestens 5% aber weniger als 25% vor und findet sich keine extramedulläre Beteiligung, wird nicht von einem isolierten Knochenmarkrezidiv gesprochen, der Befund aber als kontrollbedürftig eingestuft. Bei Vorliegen einer extramedullären Beteiligung gilt ein Blastenanteil von

mindestens 5% für die Diagnose eines kombinierten Knochenmarkrezidivs als ausreichend. Als eindeutig negativ gilt der Befall des Knochenmarks bei weniger als 5% Blasten, was der Definition eines Knochenmarks in Remission („Remissionsmark“) entspricht.²⁴ Die am häufigsten betroffenen extramedullären Organe sind bei der ALL das ZNS und die Testes.²⁵ Ein ZNS-Rezidiv liegt vor, wenn in einer nicht blutigen Lumbalpunktion eine Pleozytose von mehr als 5 Zellen pro µl Liquor vorliegt und leukämische Blasten im Zytocentrifugenpräparat nachgewiesen werden.²⁴ Für die Diagnose eines testikulären Rezidivs muss bei mindestens einem Hoden klinisch eine schmerzlose Schwellung und histopathologisch eine nachweisbare Infiltration mit leukämischen Zellen vorliegen.²⁴ Finden sich weniger als 5% Blasten im Knochenmark,

aber ein Befall eines extramedullären Kompartiments, so spricht man von einem isoliert extramedullären Rezidiv.

Leukämiezellen des ALL-Rezidivs zeigen häufig ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapeutika als Leukämiezellen der Ersterkrankung bis hin zum vollständigen Therapieversagen (sogenannte non-response).^{26, 27} Das deutet auf biologische Unterschiede zwischen Ersterkrankung und Rezidiv hin. Es ist daher wichtig und notwendig, Kinder mit einem Rezidiv einer anderen Therapie zuzuführen. Dies wird durch eigene Studien für die Rezidivtherapie realisiert. In Deutschland sind dies die ALL-REZ BFM Studien (ALL = akute lymphoblastische Leukämie, REZ = Rezidiv, BFM = Studiengruppe Berlin-Frankfurt-Münster), in die so gut wie alle Kinder mit ALL-Rezidiv eingeschlossen werden.

Die Therapie des ALL-Rezidivs erfolgt ebenfalls risikoadaptiert. Für die Abschätzung der Prognose bei Kindern mit ALL-Rezidiv haben sich mit der Zeit drei Faktoren als unabhängig prognostisch signifikant heraus kristallisiert: der Immunphänotyp sowie der Zeitpunkt und der Ort des Rezidivs.²⁸ Damit unterscheidet sich das Rezidiv von der Ersterkrankung, in der hauptsächlich andere Parameter prognostische und therapeutische Relevanz besitzen.^{4, 29} Die Risikostratifizierung orientiert sich an diesen drei prognostischen Faktoren und wurde so erstmals in der Studie ALL-REZ-BFM 95 verwendet.^{25, 30} Dabei gelten das Vorliegen einer T-ALL und ein früher Rezidivzeitpunkt als prognostisch ungünstig.^{25, 28, 31} Der Zeitpunkt des Rezidivs wird eingeteilt in sehr früh, früh und spät. Als „sehr früh“ wird ein Rezidiv bezeichnet, das weniger als 18 Monate nach Erstdiagnose und weniger als 6 Monate nach Ende der Ersttherapie auftritt. Ein frühes Rezidiv liegt dann vor, wenn dieses zwar 18 Monate oder später nach Erstdiagnose aber weniger als 6 Monate nach Ende der Ersttherapie auftritt. Ein spätes Rezidiv tritt per definitionem später als 6 Monate nach Ende der Ersttherapie auf.²⁵ Bezüglich des Rezidivorts gilt, dass isolierte Knochenmarkrezidive die schlechteste Prognose aufweisen. Rezidive mit einem kombinierten Befall von Knochenmark und einem extramedullären Organ haben eine intermediäre Prognose, und isoliert extramedulläre Rezidive weisen gute Heilungschancen auf.^{13, 25, 28, 32, 33}

In der Studie ALL-REZ BFM 2002, nach der alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten behandelt wurden, werden die Patienten entsprechend der genannten Risikoparameter in die vier Risiko- bzw. Strategiegruppen „S1“ bis „S4“ eingeteilt.^{34, 35}

Die Risiko- oder Stratifizierungsgruppe 1 (S1) schließt Patienten mit dem im Vergleich niedrigsten Risiko ein, die Gruppe S4 dementsprechend diejenigen Patienten mit der schlechtesten Prognose. Eine Übersicht der sich daraus ergebenden Gruppen ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit keine Patienten mit isoliert extramedullären Rezidiven untersucht wurden.

Tabelle 3.2: Definition der Risikogruppen bei Kindern mit ALL-Rezidiv.

	Immunphänotyp Non-T ^{*1}			Immunphänotyp (prä)-T-ALL ^{*2}		
	isoliert EM ^{*3}	kombiniert KM ^{*4}	isoliert KM ^{*4}	isoliert EM ^{*3}	kombiniert KM ^{*4}	isoliert KM ^{*4}
Zeitpunkt						
sehr früh	S2	S4	S4	S2	S4	S4
früh	S2	S2	S3	S2	S4	S4
spät	S1	S2	S2	S1	S4	S4

Einteilung der Patienten in Risikogruppen wie sie erstmals in der Studie ALL-REZ BFM 95 verwendet wurde³⁰. S=Stratifizierungs- bzw. Risikogruppe. ^{*1}Non-T = akute lymphoblastische Leukämie mit anderem als T-lymphoblastischem Immunphänotyp. ^{*2}T-ALL = T-lymphoblastische akute Leukämie. ^{*3}isoliert EM = isoliert extramedulläres Rezidiv. ^{*4}KM = Knochenmark.

Neben den drei oben genannten prognostisch signifikanten Faktoren erlangt zunehmend die Diagnostik der minimalen Resterkrankung (engl. minimal residual disease, MRD) an Bedeutung. Diese stützt sich auf den molekulargenetischen Nachweis leukämiespezifischer genetischer Veränderungen oder auf den durchflusszytometrischen Nachweis leukämiespezifischer Muster von Zelloberflächenmarkern. Dadurch wird die residuelle Tumorzelllast quantitativ bestimmt. Durch wiederholte Messungen kann auch die Dynamik des Ansprechens auf die Chemotherapie im Krankheitsverlauf eingeschätzt werden. Bei der ALL beruht der MRD-Nachweis meist auf klonspezifischen Veränderungen in den Genen der Immunglobuline oder T-Zell-Rezeptoren, die durch die somatische Rekombination während der Hämatopoese entstehen. Mit den gängigen MRD-Verfahren wird eine Leukämiezelle mit einer Sensitivität von $1:10^4$ bis $1:10^5$ erkannt. Als „MRD positiv“ bezeichnet man dabei einen Befund, bei dem eine oder mehr Leukämiezellen in 10^4 Knochenmarkzellen nachgewiesen werden ($\text{MRD} \geq 10^{-4}$).^{36, 37} Für die heterogene Risikogruppe S2 mit bisher variabler Prognose hat die MRD-Last an Tag 36 der Therapie des Rezidivs eine hohe Aussagekraft.³⁷ Im Rahmen der Studie ALL-REZ BFM 95/96 konnten Eckert *et al.* zeigen, dass eine MRD-Last größer als 10^{-3} an Tag 36 Patienten mit signifikant schlechterer Prognose kennzeichnet.³⁰

Um die Prognose von Kindern mit ALL-Rezidiv zu beschreiben, wird üblicherweise nicht nur das absolute Überleben (engl. overall-survival, OS), sondern auch das ereignisfreie Überleben herangezogen (engl. event-free survival, EFS). Dieses ist definiert als Zeitspanne vom Zeitpunkt des Erreichens einer vollständigen Remission bis zum Auftreten irgendeines neuen leukämieassoziierten Ereignisses. Zu diesen Ereignissen zählen erneute Rezidive, Zweitmalignome oder therapieassoziierte Todesfälle. Da der Beginn des EFS durch das Erreichen der Remission gekennzeichnet ist, haben Patienten, die vorher versterben oder nicht auf die Therapie ansprechen (non-response) ein EFS von Null.³⁸

Die Therapie des ALL-Rezidivs setzt sich aus systemischer Polychemotherapie, Bestrahlung, intrathekaler Chemotherapie und Stammzelltherapie zusammen. Je nach Risikogruppe finden verschiedene dieser Strategien Anwendung.²⁹ Für die beiden Hochrisikogruppen S3 und S4 ist nach dem Protokoll der Studie ALL-REZ-BFM 2002 immer eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) vorgesehen.³⁰ Wie in Tabelle 3.2 gezeigt, betrifft dies vor allem die isolierten Knochenmarkrezidive, die von allen Rezidivlokalisationen am häufigsten vorkommen und eine schlechte Prognose aufweisen.³² Erreicht ein Patient nach vier Therapieblöcken keine komplette Remission, so wird er als Nonresponder bezeichnet.³⁸ Diese Patientengruppe wird zumeist nur noch palliativ oder protokollabweichend in einem experimentellen Therapieansatz behandelt. In der Gruppe S2 mit mittlerem Risiko entscheidet die MRD-Last an Tag 36 über das weitere Vorgehen. Patienten mit einer MRD-Last von 10^{-3} Leukämiezellen oder mehr werden auf Grund ihrer ungünstigen Prognose ebenfalls einer HSZT zugeführt. Für Patienten mit keiner bzw. einer niedrigeren MRD-Last wird ebenso wie für Patienten der günstigen Risikogruppe S1 eine Heilung durch Chemotherapie angestrebt.³⁸ Da sich für eine protektive Schädelbestrahlung im Rahmen der Rezidivbehandlung ein positiver Effekt gezeigt hat, wird diese bei allen Patienten angewandt, die keine HSZT erhalten.³⁹ Außerdem erhalten alle Patienten auch eine intrathekale Chemotherapie. Bei nachgewiesener ZNS-Beteiligung erfolgt diese häufiger.³⁸ Da die Testes nach dem ZNS die zweithäufigste extramedulläre Lokalisation eines ALL-Rezidivs darstellen²⁵, wird bei diesen Kindern der befallene Hoden entfernt. Ist der andere Hoden klinisch nicht befallen, wird er dennoch immer bestrahlt. Eine Radiotherapie erfolgt prophylaktisch auch dann, wenn ein Befall in einer Biopsie nicht nachgewiesen werden konnte, dann jedoch mit einer reduzierten Strahlendosis.^{29, 38}

Durch die systematische Integration fast aller Kinder mit ALL-Rezidiv in eigenen Therapieoptimierungsstudien konnten die Überlebens- und Heilungschancen deutlich verbessert werden.^{13, 25, 30, 33} Dennoch ist die Prognose für diese Kinder im Vergleich zur Ersterkrankung weiterhin ungünstig. Aussicht auf ein EFS nach erstem Rezidiv haben nur knapp ein Drittel. Dabei ist der Ort des Rezidivs ein wichtiger prognostischer Faktor.²⁵ Warum dies jedoch so ist und welche biologischen Mechanismen dieser Beobachtung zugrunde liegen, ist noch weitestgehend unbekannt. So ist beispielsweise unklar, welche biologischen Eigenschaften den Leukämiezellen die Migration in ein extramedulläres Kompartiment ermöglichen oder erleichtern. Ein genaueres Verständnis der leukämischen Infiltration in extramedulläre Kompartimente und dabei insbesondere des ZNS könnte spezifischere Therapieoptionen und damit eine Verbesserung der Heilungschancen eröffnen. Kürzlich wurde gezeigt, dass bei Kindern mit ALL die Expression eines bestimmten Zytokins in den Leukämiezellen mit der Infiltration des ZNS assoziiert ist und möglicherweise einen biologischen Marker sowie ein neues therapeutisches Angriffsziel darstellt.¹² Dieses Zytokin ist Interleukin 15 (IL-15).

3.2 Interleukin 15

3.2.1 Struktur und Expression des *IL15*-Gens

Das humane *IL15*-Gen befindet sich auf Chromosom 4q31 und weist neun Exons und acht Introns auf.^{40, 41} Durch alternatives Splicing entstehen zwei verschiedene mRNA Isoformen (RNA = Ribonukleinsäure; mRNA = engl. messenger RNA = Boten-RNA). Diese beiden mRNA Isoformen unterscheiden sich jedoch lediglich in ihrem Signalpeptid. Das reife Protein, das durch die Exons 5 bis 8 kodiert wird, ist in beiden Fällen identisch.^{41, 42} Wie Abbildung 3.2 zeigt, umfasst das eine Signalpeptid 48 und das andere nur 21 Aminosäuren, weswegen die beiden IL-15 Isoformen üblicherweise als IL-15LSP (LSP = engl. long signal peptide = langes Signalpeptid) und IL-15SSP (SSP= engl. short signal peptide = kurzes Signalpeptid) bezeichnet werden. Beide Signalpeptide haben eine 11 Aminosäuren umfassende Sequenz gemeinsam.⁴²

Die IL-15 Isoform mit dem langen Signalpeptid wird häufiger und in mehr Gewebetypen exprimiert.^{43, 44} Auch die parallele Expression von beiden Isoformen kommt vor und wurde insbesondere für verschiedene Lymphozytenzelllinien beschrieben.^{45, 46} Dabei finden sich Unterschiede zwischen verschiedenen

Zellkompartimenten. Gaggero *et al.* zeigten, dass sich IL-15LSP im Golgi-Apparat, im endoplasmatischen Retikulum, in Endosomen und auch in Zellüberständen findet und somit den sekretorischen Weg der Zelle einschlägt. Dahingegen kann IL-15SSP im Zytosol und im Zellkern nachgewiesen werden.⁴⁷ Für IL-15SSP wird daher eine regulatorische Funktion für die *IL15* Expression vermutet.⁴³

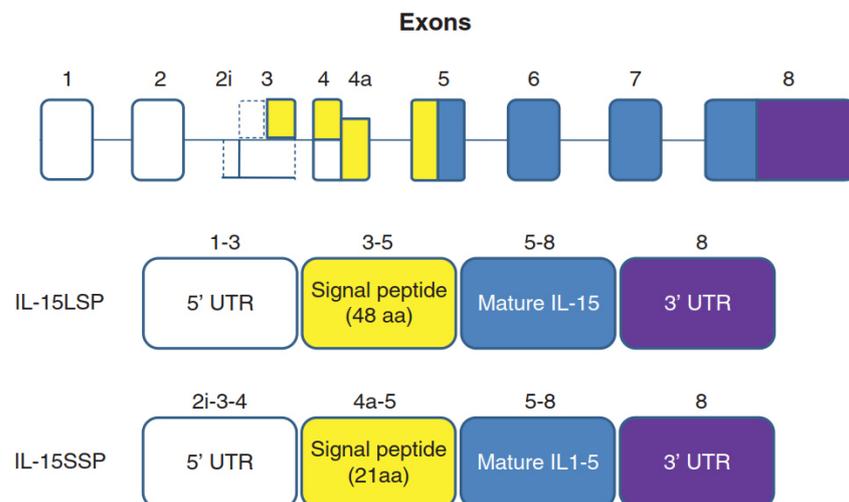


Abbildung 3.2: Struktur des *IL15*-Gens (nach Steel *et al.*⁴⁸)

IL15 besteht aus 9 Exons. Es entstehen im Wesentlichen zwei Splicevarianten, die sich durch verschiedene Signalpeptide am 5'-UTR-Ende unterscheiden. Das längere Signalpeptid der zuerst beschriebenen mRNA wird durch die Exons 3-5 kodiert. Das kürzere Signalpeptid enthält ein alternatives Exon 4a. Den kodierenden Abschnitt für das reife Protein bilden die Exons 5-8.

Übersetzungen: signal peptide = Signalpeptid; Mature IL-15 = reifes IL-15(-Protein). Abkürzungen: LSP= long signal peptid = langes Signalpeptid; SSP= short signal peptid = kurzes Signalpeptid; aa= Aminosäuren; IL-15= Interleukin 15; UTR= untranslated region = nicht translatierter Bereich.

3.2.2 IL-15-Rezeptor

Der transmembrane Rezeptor, an den IL-15 bindet, besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten. Die α -Untereinheit (IL15R α) ist dabei hochspezifisch für IL-15 und bindet dieses mit einer sehr hohen Affinität. IL15R α wird in zahlreichen Zellarten gefunden, was einen der Gründe für die Pleiotropie des Zytokins darstellt.⁴⁹ Die β -Untereinheit (IL2/15R β) wird nicht nur von IL-15, sondern auch von Interleukin 2 (IL-2) verwendet.⁵⁰ Dahingegen dient die γ -Untereinheit des Rezeptors zahlreichen Zytokinen als Rezeptorkomponente und wird daher auch als „common-gamma-chain“ bezeichnet (γ_c). Zu diesen Zytokinen zählt ebenfalls IL-2, aber auch andere Zytokine der gemeinsamen sogenannten 4- α -Helix-Zytokinfamilie gehören dazu.⁵⁰⁻⁵⁴ In einigen Zelltypen, beispielsweise in Mastzellen, entfaltet IL-15 seine Wirkungen über einen alternativen Rezeptor.⁵⁵

3.2.3 Wirkungswege von IL-15

Aufgrund der hochaffinen Bindung von IL-15 an IL15R α kann das Zytokin auch in Abwesenheit der anderen beiden Rezeptorkomponenten IL2/15R β und γ_c an IL15R α gebunden werden.^{49, 56} Dies bildet die Grundlage für eine besondere Form der Signalübertragung, die für IL-15 erstmals beschrieben wurde und als „trans-Präsentation“ bezeichnet wird. Im Gegensatz zu den meisten anderen Zytokinen wird IL-15 kaum als freies Zytokin sezerniert. Stattdessen findet intrazellulär eine Bindung an IL15R α statt. Gebunden an IL15R α wird IL-15 dann auf der Zelloberfläche präsentiert.^{43, 57} Da IL-15LSP, die IL-15 Isoform mit langem Signalpeptid, im Golgi-Apparat, im endoplasmatischen Retikulum und in Endosomen der Zelle gefunden wurde, IL-15SSP aber im Zytosol, wird angenommen, dass nur IL-15LSP in die trans-Präsentation involviert ist.^{43, 47} In der an IL15R α membrangebundenen Form wirkt IL-15 auf Zielzellen, die die anderen beiden Rezeptorkomponenten IL2/15R β und γ_c exprimieren. Es entsteht eine Zell-Zell-Interaktion, die in der Zielzelle ein intrazelluläres Signal auslöst.⁴³ Dieser Weg der Signalübertragung ist in Abbildung 3.3A dargestellt. Der IL-15-IL15R α -Komplex kann in Endosomen internalisiert und später wieder an der Zelloberfläche exprimiert werden.^{43, 57}

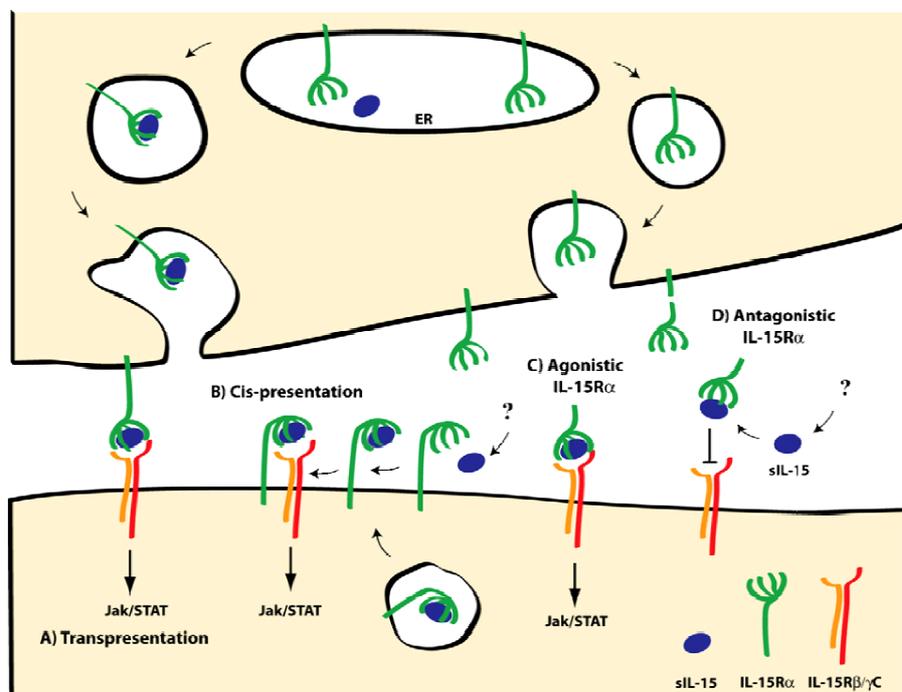


Abbildung 3.3: Wirkmechanismen von IL-15 und seinem Rezeptor (aus Stonier *et al.* 2010⁴³)

IL-15 entfaltet seine Wirkungen vor allem über die Form der trans-Präsentation (A), indem es auf der Zelloberfläche an IL15R α gebunden wird und über direkten Zell-Zell-Kontakt auf die Zielzellen wirkt.

Neben der Wirkungsweise über eine trans-Präsentation von IL-15 werden weitere Arten der IL-15-Signalübertragung postuliert, die physiologisch aber möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle spielen könnten. Dazu gehört eine autokrine Wirkung des auf der Zellmembran gebundenen IL-15-IL15R α -Komplexes. In diesem Modell wird durch IL15R α membrangebundenes IL-15 auf der Oberfläche derselben Zelle den anderen Rezeptorkomponenten IL2/IL15R β und γ_c präsentiert und wirkt so auf die Zelle zurück. Dies wird als „cis-Präsentation“ bezeichnet.⁴³ IL-15 konnte auch im Serum zum Beispiel von Patienten mit malignem Melanom nachgewiesen werden. Dabei scheint es aber immer als Heterodimer mit IL15R α vorzuliegen.⁵⁸ Es wird daher diskutiert, dass ein weiterer Wirkungsweg von IL-15 über lösliche heterodimere Komplexe möglich ist. Für diese Komplexe wird sowohl eine agonistische als auch eine antagonistische Wirkung diskutiert. Im ersteren Fall würde nach Bindung des IL-15-IL15R α -Komplexes an eine Zielzelle eine intrazelluläre Signaltransduktion in Gang gesetzt. Bei einer antagonistischen Wirkung würde IL15R α freies IL-15 binden und so seine Aktivität blockieren (vgl. Abbildung 3.3B-D).⁴³ Die tatsächliche Bedeutung im Serum gelöster IL-15-IL15R α -Komplexe ist derzeit nur unzureichend bekannt.

3.2.4 Regulation von IL-15

Das Zytokin IL-15 ist sehr stark reguliert. Die Regulation findet über multiple Mechanismen auf Gen- und Proteinebene statt. Das *IL15*-Gen weist Bindungsstellen für verschiedenste Transkriptionsfaktoren auf, zu denen unter anderem der wichtige Transkriptionsfaktor NF- κ B gehört.⁵⁹⁻⁶¹ Auf Ebene der IL-15-Translation werden verschiedene hemmende Mechanismen gefunden. Beim Menschen finden sich 12 Startkodons, sogenannte AUGs, im nicht-translatierten Bereich des Gens, durch die die Translationseffizienz des Proteins reduziert wird.⁶¹⁻⁶³ Darüber hinaus scheinen das lange Signalpeptid von IL-15LSP sowie eine bestimmte Region des für das reife Protein kodierenden Bereiches die Effizienz der Translation zu verringern.^{61, 63} Bamford *et al.* zeigten, dass nach Entfernung dieser drei Mechanismen die Produktion von IL-15 um das 250fache ansteigt.⁶³

3.2.5 Funktionen von IL-15

IL-15 ist ein pleiotropes Zytokin, das erstmals 1994 beschrieben wurde. Unabhängig voneinander entdeckten Grabstein *et al.* sowie Burton *et al.* es aufgrund seiner

Fähigkeit, die Proliferation von T-Lymphozyten anzuregen.⁶⁴⁻⁶⁶ IL-15 wird sowohl in Zellen des Immunsystems wie dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen als auch in anderen Zelltypen und Geweben wie Skelettmuskelzellen, Fibroblasten, Mikrogliazellen und Astrozyten exprimiert.^{65, 67-71} Darüber hinaus transkribieren viele Zelllinien wie z. B. die Lungenkarzinomzelllinie A549 das Zytokin.⁴²

Die Funktionen von IL-15 sind vielfältig, jedoch häufig nicht spezifisch für einen Zelltyp. So wird beispielsweise nicht nur die Proliferation von T-Zellen, sondern auch von anderen Immunzellen wie NK-Zellen, aktivierten B-Zellen oder Mastzellen durch IL-15 angeregt.^{55, 60, 65, 72, 73} Das Zytokin hat außerdem unter anderem auf Mastzellen, B-Zellen, dendritische Zellen, Neutrophile und Eosinophile einen antiapoptotischen Effekt.^{60, 74-79} Auch außerhalb des Immunsystems weist IL-15 zahlreiche Funktionen auf. Wie in Abbildung 3.4 dargestellt ist, wirkt es beispielsweise auf Fibroblasten und Endothelzellen antiapoptotisch und trägt außerdem zur Angiogenese bei.⁶⁰ Neben den oben beschriebenen Wirkungen, die den Prozessen der Zellerhaltung und Zellvermehrung untergeordnet werden können, wird IL-15 unter anderem auch eine Rolle als immunmodulatorisches Zytokin bei der Abwehr unterschiedlichster Infektionen zugeschrieben.⁸⁰ Bei der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, der Zöliakie und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen scheint es durch eine proinflammatorische Funktion eine Bedeutung zu haben.⁸¹⁻⁸⁹

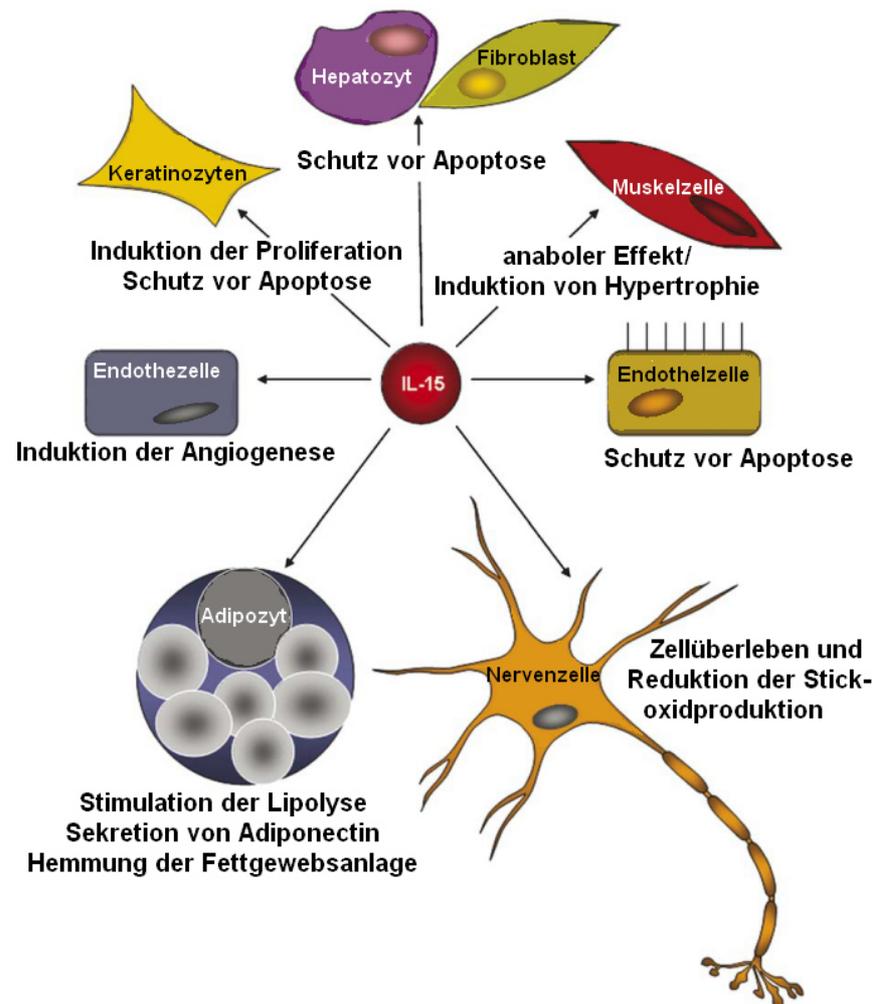


Abbildung 3.4: Pleiotrope Effekte von IL-15 außerhalb des Immunsystems (nach Budagian *et al.*⁶⁰)

Neben verschiedenen Wirkungen auf Zellen des Immunsystems übt IL-15 auch vielfältige Effekte auf andere Gewebe und Zelltypen aus.

3.3 IL-15 bei Leukämie und Tumoren

Der vorangegangene Abschnitt zeigt, dass IL-15 und der zugehörige Rezeptor ubiquitär produziert werden und das Zytokin eine hohe Pleiotropie aufweist. Auch bei onkologischen Erkrankungen spielt IL-15 eine Rolle. Dies wurde für hämatologisch-onkologische Erkrankungen wie das folliculäre Lymphom⁹⁰ oder das nasale NK-T-Zell-Lymphom⁹¹ beschrieben. In T-Zellen führt das humane T-Zell-lymphotrope Virus Typ 1 (HTLV-1), das ein Retrovirus ist, zu einer erhöhten Transkription und Translation von IL-15.⁵⁹ Eine HTLV-1-Infektion wiederum ist ätiologisch mit der adulten T-Zell-Leukämie (ATL) assoziiert.⁹² Für die Hochregulation von *IL15* in diesem Zusammenhang scheint auf Transkriptionsebene die Aktivierung über den Transkriptionsfaktor NF- κ B eine Rolle zu spielen.^{59, 60, 62} Auf Translationsebene findet eine Reduktion der multiplen AUGs

durch Insertion des Retrovirus HTLV-1 mit Deletion eines 200 Basenpaaren großen Abschnittes statt, was die Translationsrate von IL-15 deutlich erhöht.⁶² Neben der Rolle von IL-15 bei der ATL ist eine pathogenetische Funktion auch bei verschiedensten soliden Tumoren wie beispielsweise Melanomen, Nierenkarzinomen oder Kolonkarzinomen beschrieben.^{60, 93-97} In der Tumorforschung gelten IL-15 und sein Rezeptor daher als potenzielle Angriffspunkte für eine pharmakologische Intervention.^{48, 98}

Cario *et al.* untersuchten Kinder, die neu an einer B-Vorläuferzell-Leukämie erkrankt waren. Dabei zeichneten sich Leukämiezellen der Patienten, die eine Beteiligung des ZNS aufwiesen oder die im Verlauf der Erkrankung eine ZNS-Beteiligung entwickelten, durch eine signifikant höhere *IL15* Expression aus.¹² Aufgrund dieses Befundes wurde IL-15 als potenzieller Marker für eine ZNS-Beteiligung bei Kindern mit ALL diskutiert, der die Entscheidung zur ZNS-Therapie in Form einer Bestrahlung steuern könnte. Durch die Einführung einer ZNS-Bestrahlung konnte in den 1960er Jahren erstmals die Rezidivhäufigkeit mit ZNS-Beteiligung drastisch gesenkt und die Überlebensrate deutlich gesteigert werden.⁹⁹⁻¹⁰¹ Diese Verbesserungen wurden aber mit negativen Langzeitnebenwirkungen aufgrund der Strahlendosis erkaufte.^{21, 102} Daher besteht die Bestrebung, die Patienten, die bei der Erstbehandlung wirklich einer Bestrahlung bedürfen, besser zu identifizieren.

4 Fragestellungen und Ziele

Die Rezidivrate von Kindern mit ALL liegt bei 20%.^{4, 23} Beim Rezidiv sind die Heilungschancen im Vergleich zur Ersterkrankung deutlich erniedrigt, was unter anderem auf eine höhere Chemotherapieresistenz der Leukämiezellen beim ALL-Rezidiv und gravierende Nebenwirkungen der Therapie, insbesondere der HSZT, zurückzuführen ist. Ein tieferes Verständnis pathogenetischer Mechanismen im ALL-Rezidiv ist daher notwendig, um die Therapiestratifizierung weiter zu verbessern und neue therapeutische Ziele zu identifizieren. Rezidivstudien haben gezeigt, dass die Leukämiezellen im ALL-Rezidiv bei einem Teil der Kinder extramedulläre Kompartimente, häufig das ZNS oder die Testes, besiedeln und dass dies prognostisch relevant ist.^{13, 25} ALL-Rezidive mit extramedullärer Beteiligung sprechen besser auf die Therapie an. Genomweite Genexpressionsanalysen von ALL-Zellen zum Zeitpunkt der ALL-Erstdiagnose zeichneten sich ALL-Zellen von Kindern mit einer ZNS-Beteiligung durch eine höhere *IL15* Expression aus.¹² Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob IL-15 bei der Besiedlung des ZNS oder auch anderer Extrakompartimente bei der ALL eine Rolle spielen könnte. In diesem Fall könnte IL-15 im ALL-Rezidiv diagnostisch zur präziseren Bestimmung einer prognostisch relevanten ZNS-Beteiligung beitragen und damit zur genaueren Therapiestratifizierung genutzt werden. IL-15 käme darüber hinaus als potenzieller Angriffspunkt einer zielgerichteten antileukämischen ZNS-Therapie in Betracht.

Auf Grund der möglichen diagnostischen und therapeutischen Relevanz von IL-15 bei ALL sollte in der vorliegenden Arbeit eine Pilotstudie zur Bedeutung von IL-15 bei ALL-Rezidiven durchgeführt werden. Hierfür sollte:

1. ein Kollektiv von Rezidivpatienten mit und ohne extramedullärer Beteiligung aus der Biobank der ALL-REZ BFM Studien zusammengestellt werden;
2. die mRNA-Expression von *IL15* in Leukämiezellen des Rezidivs mit real-time-PCR in diesem Kollektiv quantifiziert werden, und
3. die mRNA-Expression von *IL15* mit dem Ort des Rezidivs sowie den klinischen und biologischen Merkmalen der Patienten korreliert werden.

5 Material und Methoden

In dieser Arbeit sollte die Expression der *IL15* mRNA mittels real-time-PCR bei Kindern mit erstem Rezidiv einer ALL quantifiziert und die Messwerte anschließend mit klinischen Parametern der Patienten statistisch korreliert werden (PCR, engl.: polymerase chain reaction = Polymerase Kettenreaktion).

5.1 Material

5.1.1 Patienten und Proben

Alle in dieser Arbeit untersuchten Patienten waren in der Studie ALL-REZ-BFM 2002 (internationale Studiennummer des National Institute of Health, U.S.A.: NCT00114348) eingeschlossen. Die zur Auswertung verwendeten klinischen und molekularbiologischen Daten wurden der zugehörigen Datenbank entnommen. Es wurde der Datenbankauszug vom 24.06.2010 zugrunde gelegt.

Als Ausgangsmaterial für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der *IL15* mRNA Expression wurden bei -80°C gelagerte RNA-Präparationen aus angereicherten Leukämiezellen verwendet. Diese waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des Rezidivs mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmarkaspiraten der Patienten gewonnen worden. Die Präparation der RNA aus den ALL-Zellen im Knochenmark war nach demselben Protokoll erfolgt, wie es auch in dieser Arbeit für die RNA-Präparation aus Zelllinien verwendet wurde (siehe 5.2.3, S. 23). Die nativen Knochenmarkproben der in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten enthielten im Median 89% Blasten.

5.1.2 Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Ursprungsgewebe	Quelle
A549 ^{*1}	Mensch	Lungenkarzinom	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur
HeLa ^{*2}	Mensch	Zervixkarzinom	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur
Reh	Mensch	B-Vorläuferzell-ALL ^{*3}	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur

^{*1}A549: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Andreas Hocke, Labor der Klinik für Infektiologie, Charité, Berlin. ^{*2}HeLa: Henrietta-Lacks-Zellen. ^{*3}ALL: akute lymphoblastische Leukämie.

5.1.3 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
CO ₂ -Brutschrank	Cytoperm 2	Heraeus, Hanau, Frankfurt, Deutschland
Elektrophoresekammer	Wide Mini-Sub Cell GT	Bio Rad, USA
Elektrophorese-Spannungsgerät	Power Pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Feinwaage	SBC 42	Scaltec Instruments GmbH, Deutschland
Lichtmikroskop	473011-9901	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
PCR-Geräte	PTC-200 DNA Engine	Bio Rad, USA
	ABI Prism 7700	Applied Biosystems, USA
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Sterilbänke	Holten Lamin Air	Heto-Holten, Dänemark
	Captair bio PCR workstation	erlab, Frankreich
UV-Transluminator (Agarosegele)	Gene Flash	Syngene, England
Vortex Schüttler	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	Inkubationsbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zellzählkammer	Neubauer (0,0025 mm ²)	W. Schreck, Hofheim, Deutschland
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Rotanta R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
	Galaxy Mini	VWR, USA

5.1.4 Verbrauchsmaterialien, Medien und Puffer

Material	Hersteller
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>ABL 1</i> -PCR, Materialien	
AmpliTaq Gold® Puffer (10x Stock)	Roche, Applied Biosystems, Foster City, USA
	KCl (1 M) 50 ml
	TRIS/HCl (1 M) 10 ml
	MgCl ₂ (1 M) 1,5 ml
	Aqua bidest. ad 100 ml
3'-Primer <i>ABL</i>	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland
5'-Primer <i>ABL</i>	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland
dNTP-Lösung	Invitrogen, Carlsbad, USA
DNA-Polymerase AmpliTaq Gold® (5U/μl)	Roche, Applied Biosystems, Foster City, USA
destilliertes Wasser	Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethanol 70%ig	Merck, Darmstadt, Deutschland

Material	Hersteller
Ethidiumbromid 1%ig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Falcon™ Röhren 50 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gellade-Puffer	
20 g Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,125 g Xylene Cyanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,125 g Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
ad 50 ml H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
HPLC analyzed H ₂ O	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
PBS Dulbecco (10x)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Photometer-Küvetten UVette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
QuantiTect Primer Assay IL-15	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect Primer Assay SDHA	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix	
RNase-freies Wasser	
Reverse Transkription, Materialien	
RNase-freies Wasser	Ambion, Austin, Texas, USA
RT-Puffer (5x Stock)	Invitrogen, Carlsbad, USA
dNTP-Lösung	Invitrogen, Carlsbad, USA
Randomized Hexamers	Invitrogen, Carlsbad, USA
DTT-Lösung	Invitrogen, Carlsbad, USA
SuperScript® reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase-freies DNase-Set für RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNase I	
RDD-Puffer	
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RLT-Puffer	
Schredder Säulen	
Spin Column	
RW1-Puffer	
RPE-Puffer	
RNase-freies Wasser	
TAE-Puffer (50x)	
242 g Tris Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
57,1 ml 100%iger Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
100 ml 0,5 mM EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
ad 1000 ml H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland

Material	Hersteller
Trypanblau	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypsinogen	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkulturflaschen 175cm ² 25 cm ²	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zellkulturmedium DMEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkulturmedium RPMI	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkulturschalen 10 cm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

5.2 Methoden

5.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Patienten

Aus Gründen der wissenschaftlichen Vergleichbarkeit wurden nur solche pädiatrischen Patienten ausgewählt, die mit einem ersten Rezidiv einer ALL in die ALL-REZ BFM 2002 Studie eingeschlossen wurden und nach dem Protokoll der Studie (ab 01.08.2003) oder dem zugehörigen Pilotprotokoll (01.01.2002 bis 31.07.2003) behandelt wurden. Zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit lag Untersuchungsmaterial von Patienten mit einem Diagnosedatum bis einschließlich Januar 2006 vor. Als Untersuchungsmaterial diente Knochenmark. Dabei wurden keine Patienten mit isoliert extramedullären Rezidiven untersucht. Bei diesen Patienten liegt die Blastenzahl im Knochenmark unter 5%. Dieses enthält somit keine oder zu wenig leukämische Blasten für eine Untersuchung. Aus dem betroffenen extramedullären Kompartiment liegt aber nicht systematisch Untersuchungsmaterial vor. Daher wurde diese Gruppe generell ausgeschlossen.

Um einen Zusammenhang zwischen der *IL15* mRNA Expression und der Beteiligung extramedullärer Kompartimente beim Rezidiv prüfen zu können, wurden von den zwischen Januar 2002 und Januar 2006 in die Studie ALL-REZ BFM 2002 aufgenommenen Patienten solche mit kombiniertem Knochenmarkrezidiv selektiert. Dies ergab 34 Patienten mit einem kombinierten Rezidiv mit ZNS-Beteiligung und 14 Patienten mit einem kombinierten Rezidiv mit Testes-Beteiligung. Von dieser Kohorte lag ausreichend RNA von 21 Patienten mit kombiniertem ZNS-Rezidiv und von 10 Patienten mit kombiniertem Testes-Rezidiv vor. Als Kontrollgruppe wurde eine Gruppe von 25 Patienten mit isoliertem Knochenmarkrezidiv bestimmt.

5.2.2 Zellkultur

Für die Etablierung des quantitativen Nachweises der *IL15* mRNA mittels real-time-PCR wurde RNA von *IL15* exprimierenden Zelllinien verwendet. Alle Zelllinien wurden bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer unter Anfärbung nicht vitaler Zellen mit Trypanblau. Die adhärennten Zelllinien A549 und HeLa wurden in flachen Zellkulturschalen gezüchtet. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen vereinzelt und umgesetzt („passagiert“). Dazu wurden sie vom Boden der Zellkulturschale abgelöst, indem das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und dann mit Trypsin inkubiert wurden. Die Trypsin-Behandlung wurde nach 5 Minuten durch die Zugabe von FBS-haltigem Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in neuem Medium in einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro Zellkulturschale von 10 cm Durchmesser neu ausgesät. Die Suspensionszelllinie Reh wurde durch Zentrifugation vom alten Medium getrennt und mit frischem Medium in neuen Zellkulturflaschen ausgesät. Die Kulturbedingungen der verschiedenen Zelllinien zeigt Tabelle 5.1.

5.2.3 Präparation und Konzentrationsbestimmung von Ribonukleinsäure

Für die Gewinnung von RNA aus den Zelllinien wurde der RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Dieser Kit war auch für die RNA-Isolation aus den Knochenmarkproben der Patienten eingesetzt worden (vgl. 5.1.1).

Zur Vorbereitung mussten die Zellen lysiert werden. Dazu wurden die adhärennten Zellen wie zur Passagierung durch eine trypsininduzierte Proteolyse abgelöst (vgl. 5.2.2) und abzentrifugiert. Die Suspensionszellen der Zelllinie Reh wurden direkt durch Zentrifugation vom Medium getrennt. Die jeweiligen Zellpellets wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 350 µl Qiagen RLT-Puffer resuspendiert, um die Zellen zu lysieren und den Zellinhalt freizusetzen.

Die Isolation der RNA aus dieser Suspension erfolgte nach einem modifizierten Herstellerprotokoll. Alle Zentrifugationen wurden mit der Eppendorf Zentrifuge 5415R

Tabelle 5.1: Zellkulturbedingungen

Zelllinie	Wachstumsart	Medium/ FBS
A549	adhärent, Monolayer	DMEM+10%FBS
HeLa	adhärent, Monolayer	DMEM+10%FBS
Reh	einzel in Suspension	RPMI+10%FBS

DMEM und RPMI sind kommerziell erhältliche Zellkulturmedien mit üblicher Zusammensetzung. FBS = Fetal Bovine Serum = Fetales Kälberserum (als Nährzusatz verwendet).

durchgeführt. Zunächst wurde das Zellysat auf Qiagen Shredder Säulen aufgetragen und für 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, um größere Zelltrümmer zu zerkleinern und eine bessere Homogenisierung der Lösung zu erreichen. Der aufgefangene Durchfluss wurde mit 350 µl 70%igem Ethanol gemischt, auf RNeasy Mini Spin Säulen aufgetragen und die RNA durch Zentrifugation für 15 sec bei 10000 rpm an die Matrix dieser Säulen gebunden. Da sich bei diesem Schritt nicht nur RNA, sondern auch Desoxyribonukleinsäure (DNA) an die Säule binden kann, wurden die RNeasy Mini Spin Säulen anschließend mit einer DNase behandelt. Für diesen Vorgang wurde die Säule mit 500 µl RW1-Puffer gewaschen, dann mit einer Mischung aus 10 µl DNase-I-Lösung und 70 µl RDD-Puffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich nochmals mit 500 µl RW1-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die RNA nach zweimaligem Waschen mit RPE-Puffer mit 30 µl oder 50 µl RNase-freiem Wasser von der Matrix der Säule gelöst und eluiert.

Die Konzentrationsbestimmung der präparierten RNA erfolgte photometrisch. Dafür wurde in einer Photometerküvette 1 µl der RNA-Lösung mit 75 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und die Absorptionen bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Ratio der Absorption bei 260 nm zu 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der RNA und sollte bei 1,8 bis 2,0 liegen. Die Konzentration der RNA wurde vom Photometer aus der Absorption bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet.

Da sich durch Lagerung und Ein- und Auftauprozesse die Konzentration von RNA gegebenenfalls verändern kann, wurden auch die Konzentrationen aller eingelagerten Patienten-RNA-Proben direkt vor der Verwendung erneut bestimmt. Dafür wurden die Proben auf Eis aufgetaut, durch Mischen mit einem Vortexer homogenisiert und die Konzentration analog wie die der frisch präparierten RNA mit dem Photometer gemessen.

5.2.4 Gelelektrophorese

Die Kontrolle der Qualität der isolierten RNA erfolgte mittels eines 1%igen Agarosegels, indem eine Probe der präparierten RNA-Lösung aufgetrennt und auf das Vorhandensein der 28S- und 18S-Banden ribosomaler RNA hin überprüft wurde. Die Gelelektrophorese mittels Agarosegelen wurde auch zur Qualitätskontrolle von anderen Nukleinsäuren wie PCR-Produkten (vgl. 5.2.7, S. 27) eingesetzt. Es wurden 1%ige Gele für RNA und 2%ige Gele für DNA verwendet. Zur Herstellung wurden 1 g Agarose für

1%ige bzw. 2 g Agarose für 2%ige Gele durch mehrfaches Aufkochen in 100 ml TAE Puffer gelöst. Zur Anfärbung der RNA- bzw. DNA-Fragmente wurden dem noch flüssigen Gel 5 µl 1%iges Ethidiumbromid zugesetzt. Beim Auftragen auf das Gel wurden 1 µl der DNA- oder RNA-Lösung und 1 µl Ladepuffer gemischt. Bei einer Spannung von 90 mVolt wurden die Nukleinsäuren dann im Vergleich zu einem kommerziellen Größenstandard aufgetrennt. Unter UV-Licht konnte das korrekte Fragmentmuster anschließend überprüft und fotografisch dokumentiert werden.

5.2.5 Reverse Transkription

Die aus den Zelllinien bzw. aus dem Knochenmark der Patienten präparierte Gesamt-RNA diente als Matrize zur Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) mittels reverser Transkription. Die enzymatische Reaktion erfolgte in einem Peltier Thermal Cycler (PTC-200 DNA Engine).

1 µg RNA wurde mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl verdünnt. Um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen, wurde diese RNA-Lösung zunächst für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach rascher Abkühlung auf Eis wurden dann die anderen Reagenzien und schließlich die reverse Transkriptase SuperScript® hinzu pipettiert. Tabelle 5.2 führt die detaillierte Zusammensetzung der Reaktion auf.

Tabelle 5.2: Reagenzien für die Reverse Transkription.

Menge	Reagenz
1 µg	RNA
ad 10 µl	RNase freies Wasser
Inkubationsschritt	
4 µl	5fach konzentrierter RT-Puffer
1 mmol	20fach konzentrierte dNTP-Lösung
2 µl	10fach konzentrierte Lösung randomized Hexamers
2 µl	10fach konzentrierte DTT-Lösung
1 µl	20fach konzentrierte Superscriptlösung

Die Tabelle zeigt die Mengenangaben der Reagenzien pro Ansatz.
 RNA = Ribonukleinsäure; RNase = Ribonukleinsäure spaltende Enzyme; RT-Puffer = Puffer für Reverse Transkription (Qiagen); dNTP = Desoxy-Ribonukleinsäure-Triphosphate; randomized Hexamers = Mischung verschiedener Oligonukleotide aus je sechs Nukleotiden als Universal-Primer-Mischung; DTT = Dithiothreitol.

Für den Vorgang der reversen Transkription wurden die Proben zunächst für 10 Minuten auf 25°C erwärmt. Es erfolgte dann die reverse Transkription für 45 Minuten bei 42°C. Bei dieser Temperatur hat die reverse Transkriptase SuperScript® ihr Aktivitätsoptimum. Durch abschließende Erhitzung auf 99°C für 3 Minuten wurde das Enzym wieder inaktiviert und die reverse Transkription gestoppt.

5.2.6 Qualitative PCR zum Nachweis der erfolgreichen reversen Transkription

Der Erfolg der reversen Transkription wurde durch eine PCR-Amplifikation der cDNA von *ABL1* überprüft. Das *ABL1*-Gen ist aufgrund seiner stabilen Expression in Leukämiezellen gut dafür geeignet.¹⁰³ Die verwendeten Primer für *ABL1* hatten folgende Sequenzen:

Richtung	Sequenz
Vorwärtsprimer	5' - TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T - 3'
Rückwärtsprimer	5' - GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA - 3'

Für die Reaktionslösung wurden AmpliTaq Gold Puffer, 3'-Primer-Lösung, 5'-Primer-Lösung, dNTP-Lösung und AmpliTaq Gold Polymerase Lösung gemischt und mit destilliertem Wasser auf 49 µl verdünnt. Dieser Mischung wurde dann 1 µl der cDNA-Lösung hinzugegeben. Die Mengenangaben zeigt Tabelle 5.3. Die Amplifikation erfolgte in einem Peltier Thermal Cycler (PTC-200 DNA Engine). Vor Ablauf der PCR-Zyklen wurden die Proben einmalig zur Aufschmelzung von Sekundärstrukturen für 2 Minuten auf 95°C erhitzt. Dann erfolgte die Amplifikation in 32 Zyklen mit jeweils einer Denaturierungsphase von 20 sec Dauer bei 95°C, einer Hybridisierungsphase von 30 sec Dauer bei 65°C und einer Polymerisationsphase von 30 sec Dauer bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben für weitere 10 Minuten bei 72°C inkubiert und anschließend durch das Gerät auf 4°C abgekühlt.

Tabelle 5.3: Reagenzien der *ABL1*-PCR.

Menge	Reagenz
5 µl	10fach konzentrierter AmpliTaq Gold Puffer
1 µl	50fach konzentrierte 3'-Primer-Lösung
1 µl	50fach konzentrierte 5'-Primer-Lösung
5 µl	10fach konzentrierte dNTP-Lösung
0,25 µl	200fach konzentrierte AmpliTaq Gold Lösung
ad 49 µl	destilliertes Wasser
1 µl	cDNA

Die erfolgreiche Amplifikation wurde durch den Nachweis der PCR-Produkte in der zu erwartenden Fragmentlänge in einem 2%igen Agarosegel überprüft (vgl. 5.2.4).

5.2.7 Real-time-PCR zum quantitativen Nachweis von *IL15*

Die mRNA Expression des Zielgens *IL15* und die des Referenzgens *SDHA* (Succinat Dehydrogenase Komplex, Untereinheit A) wurde mittels Real-time-PCR (ABI Prism 7700) mit der SYBR-Green Methode untersucht. SYBR-Green interkaliert in doppelsträngiger DNA und sorgt somit für ein zunehmend intensiveres Fluoreszenzsignal bei steigender DNA-Menge. Für unsere Untersuchungen wurden der QuantiTect SYBR Green PCR Kit sowie die QuantiTect Primer Assays für die Zielgene *IL15* und *SDHA* verwendet. Alle Bestimmungen erfolgten dreifach. Die verwendeten Primer waren durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet:

	Interleukin-15	Succinatdehydrogenase (SDH)
Primerbezeichnung	Hs_IL15_1_SG QuantiTect Primer Assay	Hs_SDHA_1_SG QuantiTect Primer Assay
Amplifizierte Exons	1 - 2 [detektiert <i>IL-15 LSP</i> (siehe 3.2.1)]	6 - 7
NCBI Referenz ID (RefSeq)	NR_037840.2 NM_172174	NM_004168
Ensembl Transcript ID	ENST00000296545	ENST00000264932
Länge des PCR-Produkts	131 Basenpaare	147 Basenpaare

IL-15 LSP = Isoform von Interleukin-15 mit langem Signalpeptid. NCBI Referenz ID und Ensembl Reference ID entsprechend der Angaben des Herstellers.

Als Positivkontrolle und zur späteren Bestimmung der Effizienz jedes PCR-Laufes wurde jeweils eine Verdünnungsreihe der aus der Zelllinie A549 gewonnenen cDNA mitgeführt. Diese Zelllinie wurde aufgrund der stärkeren *IL15* Expression im Vergleich zu den oben genannten Zelllinien Hela und Reh ausgewählt (vgl. 6.2.1). Um den präexperimentellen Fehler möglichst gering zu halten, wurde in einem einzigen großen Ansatz eine ausreichende Menge cDNA der A549-Zelllinie gewonnen. Daraus wurde eine größere Charge der Verdünnungsreihen hergestellt und diese für alle real-time-PCR-Läufe aliquotiert und verwendet. Die mitgeführten Verdünnungsstufen waren 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} und 10^0 .

Der QuantiTect SYBR Green PCR Kit enthielt einen vorgemischten Mastermix mit folgenden Komponenten:

Bezeichnung	Funktion
HotStarTaq DNA Polymerase	DNA Polymerase, ursprünglich aus <i>Thermus aquaticus</i> isoliert, modifiziert
QuantiTect SYBR Green PCR Buffer	Pufferlösung (Tris-Cl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 mM MgCl ₂ ; pH 8,7 bei 20°C)
dNTP mix	Nukleotide [dATP, dCTP, dGTP, dTTP/dUTP]
SYBR Green I dye	interkalierender Fluoreszenzfarbstoff
Rox Fluorescent dye	interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (zur Normalisierung, nicht gemessen)
RNAse-free water	RNAse-freies Wasser

Für die real-time-PCR wurde die Mastermixlösung unter Kühlung auf Eis mit der QuantiTect *IL15*- bzw. *SDHA*-Primerlösung und Wasser gemischt und in Mikrotiterplatten vorgelegt. Anschließend wurde jeweils eine Probe der zu untersuchenden cDNA zugegeben. Dabei umfasste das Endvolumen jeweils 25 µl mit folgenden Mengenverhältnissen:

Menge	Reagenz
12,5 µl	2fach konzentrierte Mastermixlösung
2,5 µl	10fach konzentrierte Primerlösung
9 µl	RNAse freies Wasser
1 µl	cDNA der Probe

Mengenangaben pro Probenansatz.
 RNAse = Ribonukleinsäure spaltende Enzyme;
 cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure.

Die Proben wurden im ABI Prism 7700 Detektionssystem initial für 15 Minuten auf 95°C erhitzt, um die verwendete HotStarTaq Polymerase zu aktivieren. Die Amplifikation erfolgte dann in 50 Zyklen, die jeweils aus einer Denaturierungsphase für 15 sec bei 94°C, einer Hybridisierungsphase für 30 sec bei 55°C und einer Polymerisationsphase für 30 sec bei 72°C bestanden. Anschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt. Das Gerät bestimmte am Ende jedes Amplifikationszyklus die Zunahme der Fluoreszenz von SYBR-Green durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 520 nm.

Die Methode einer PCR mit SYBR Green beruht darauf, dass mit der Verdopplung der DNA-Menge pro Amplifikationszyklus auch eine Verdopplung des Fluoreszenzsignals durch SYBR Green einhergeht. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals überschreitet nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen einen

Schwellenwert, der als „Threshold Cycle“ bezeichnet und allgemein mit „CT“ abgekürzt wird. Dieser beschreibt den Punkt der Kurve, an dem das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Dieser CT-Wert repräsentiert die Ausgangsmenge der untersuchten DNA, da er je nach Menge der zu Beginn vorhandenen DNA früher oder später erreicht wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden die gemessenen CT-Werte mittels der Software Sequence Detection System 1.9.1 (ABI) weiter verarbeitet. Mit dieser konnten unter anderem die Zunahme der Fluoreszenz in den einzelnen Proben dargestellt und die Standardkurven erzeugt werden.

5.2.8 Effizienzkorrigierte Quantifizierung

Alle CT-Werte wurden als Triplikate bestimmt und aus diesen der Mittelwert berechnet. Aufgrund technischer Fehler wurde in vereinzelt Proben keine Fluoreszenz gemessen (CT = 50,00). Diese Werte flossen nicht in die Berechnung des jeweiligen Mittelwertes mit ein. Ebenso wurden CT-Werte, deren Mittelwert mehr als 1,5 CTs vom Mittelwert der anderen beiden CT-Werte abwich, aus der Berechnung ausgeschlossen.

Eine PCR hat dann eine optimale Effizienz E von 100%, wenn es bei jedem Amplifikationsschritt zu einer Verdopplung der DNA-Menge kommt ($E = 2$). Eine abweichende Effizienz hat bei einer real-time-PCR aufgrund des kumulativen Effektes deutliche Auswirkungen auf die Ergebnisse. Dies wird insbesondere dann relevant, wenn unterschiedliche PCR-Läufe mit verschiedenen Effizienzen miteinander verglichen werden. Daher wurde für die Quantifizierung der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit die effizienzkorrigierte Berechnungsmethode nach Pfaffl angewendet.¹⁰⁴ Die Effizienz E wurde nach nebenstehender Formel berechnet (Abbildung 5.1).

$$E = 10^{\frac{-1}{Slope}}$$

Abbildung 5.1: Formel zur Berechnung der Effizienz

E = Effizienz; $Slope$ = Steigung der Standardreihe.

Bei einer Effizienz E von 100% ($E = 2$) erreicht man eine Verzehnfachung der Ausgangsmenge nach rechnerisch 3,32 Amplifikationsschritten bzw. PCR-Zyklen. Trägt man die CT-Werte der Verdünnungsreihe in einem logarithmischen Koordinatensystem auf, so spiegelt die Steigung der Geraden („Slope“) die Effizienz der PCR wider. Bei einer Effizienz von 100% wäre die Steigung -3,32. In dieser Arbeit wurden die

Steigungen mit der Auswertungssoftware Sequence Detection System 1.9.1 (ABI) ermittelt und daraus die Effizienzen eines jeden PCR-Laufes berechnet. Zur Ermittlung der Effizienzen wurden die Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-2} herangezogen, weil in diesem Bereich sämtliche Messwerte von *SDHA* sowie der größte Teil der *IL15* Messwerte der Patienten lagen. Bei höheren Verdünnungen kam es zu stärkeren Schwankungen innerhalb des PCR-Assays und damit zu Ungenauigkeiten bei der Effizienz-Bestimmung des für die Messwerte relevanten Bereiches (vergl. Ergebnisse, Kapitel 6.2.2).

Die relative Quantifizierung erfolgte analog der effizienzkorrigierten Formel nach Pfaffl *et al.* wie folgt:

$$Ratio = \frac{E_{Interleukin-15}^{CT_{Interleukin-15}}}{E_{Succinatdehydrogenase}^{CT_{Succinatdehydrogenase}}}$$

Dabei entspricht E der Effizienz des jeweiligen PCR-Laufes und CT den Mittelwerten der CT-Messwerte der Proben. Durch diese Berechnung ergaben sich relative Mengenzahlen der *IL15* Expression, die zur statistischen Auswertung verwendet werden konnten. Dafür notwendige Berechnungen erfolgten mit Excel 2007 (Microsoft).

5.2.9 Genexpressionsanalysen mit DNA Mikroarrays

Im Rahmen von vorangegangenen Arbeiten wurden Patienten mit einem ersten Rezidiv einer ALL aus der Studie ALL-REZ BFM 2002 mittels Mikroarray-basierter Genexpressionsanalyse genomweit untersucht. Dabei wurde cDNA von 60 Patienten auf den humanen GeneChip® HG-U133A von Affymetrix (Santa Clara, U.S.A.) hybridisiert. In der Patientenkohorte waren hauptsächlich Patienten mit B-Vorläuferzell-ALL-Rezidiv, aber auch 6 Patienten mit T-ALL-Rezidiv enthalten.¹⁰⁵ Einer dieser sechs Patienten mit T-ALL-Rezidiv wurde auch in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die anderen fünf Patienten stellten somit eine ergänzende Untersuchungskohorte dar.

Anhand der vorhandenen Mikroarray-basierten Genexpressionsdaten wurden bestimmte Beobachtungen bezüglich der *IL15* Expression der vorliegenden Studie validiert. Dafür wurden die mit dem GeneChip® HG-U133A ermittelten Expressionswerte von *IL15* anhand der internetbasierten Software Genevestigator

(www.genevestigator.com) zwischen den Patientengruppen verglichen. Tabelle 5.4 zeigt die zugehörigen *IL15* Affymetrix Probe Sets.

Tabelle 5.4: Affymetrix Probe Sets

Gen	Bezeichnung	Probe Sets	Design basiert auf (RefSeq ID)
IL15	Interleukin 15	205992_s_at	NM_000585
		217371_s_at	Y09908

Die Angaben beruhen auf den Informationen des Herstellers (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA.), die im Internet unter www.affymetrix.com/analysis/netaffx bereitgestellt werden.

RefSeq ID = Referenznummer des National Center for Biotechnology Information (USA).

5.2.10 Statistische Auswertung

Für die meisten statistischen Auswertungen wurde die Software PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, USA) und für Bildbearbeitungen das Grafikprogramm Paint.net eingesetzt. Um zu überprüfen, ob es sich bei den untersuchten Patienten um eine repräsentative Stichprobe aus der Studie ALL-REZ BFM 2002 handelt, wurde der χ^2 -Test verwendet. In Fällen, in denen die erwartete Wahrscheinlichkeit für einen der Parameter kleiner fünf war, fand statt des χ^2 -Testes der exakte Test nach Fisher Anwendung. Zur Prüfung ob Unterschiede in der *IL15* Expression zwischen verschiedenen Patientengruppen bestehen, wurden parametrische und nicht-parametrische Testverfahren angewendet. Für parametrische Verfahren wurden die rechtsschief verteilten Daten mit Hilfe des Logarithmus zur Basis 2 transformiert. Dadurch wurde eine log-Normalverteilung erreicht. Die log-Normalverteilung wurde anhand des visuellen Aspekts des Histogramms, der Lagemaße sowie des Shapiro-Wilk- und des Kolmogorov-Smirnov-Testes überprüft. Parallel wurden mit den nicht transformierten Daten nicht-parametrische Testungen durchgeführt. Bei dichotomen Merkmalen wurden die transformierten Daten mit dem t-Test und die nicht-transformierten Werte mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede überprüft. Bei Merkmalen mit drei oder mehr Ausprägungen wurde als parametrisches Verfahren für die transformierten Werte eine ANOVA durchgeführt und als nicht-parametrisches Verfahren der Kruskal-Wallis-Test. Korrelationen mit der Höhe der *IL15* Expression wurden bei dichotomen Merkmalen mittels der punktbiserialen Korrelation (entsprechend Pearson Korrelationskoeffizient) berechnet. Bei nominalen Merkmalen mit drei oder mehr Ausprägungen und bei ordinal skalierten Merkmalen wurde der

Korrelationskoeffizient nach Spearman verwendet. Überlebenszeitanalysen wurden mit Hilfe der Software PASW Statistics 18 mit der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt. Dafür wurden die 56 Patienten entsprechend ihrer *IL15* Expression in Quartile eingeteilt und verglichen. Für eine statistische Überprüfung auf signifikante Unterschiede fand dann der Log-Rank-Test Anwendung. Die kumulative Rezidivinzidenz wurde nach Kalbfleisch und Prentice analysiert, und Unterschiede wurden mittels Grey Statistik ermittelt. Für diese Berechnung wurde nicht die Software PASW Statistics 18, sondern die cmprsk Software des Statistikprogramms R v2.10.1 verwendet.¹⁰⁶

6 Ergebnisse

6.1 Repräsentativität des untersuchten Patientenkollektivs

In dieser Arbeit wurden Knochenmarkproben von insgesamt 56 Patienten untersucht, die im Zeitraum Januar 2002 bis Januar 2006 mit einem ersten isolierten oder kombinierten Knochenmarkrezidiv in die Studie ALL-REZ-BFM 2002 aufgenommen wurden. Davon hatten 21 Patienten eine ZNS-Beteiligung, 10 Patienten eine Testes-Beteiligung und 25 Patienten ein isoliertes Knochenmarkrezidiv. Keiner der in die Arbeit aufgenommenen Patienten mit kombiniertem Knochenmarkrezidiv hatte sowohl eine Testes- als auch eine ZNS-Beteiligung. Zunächst wurde geprüft, ob das Untersuchungskollektiv insgesamt eine repräsentative Stichprobe aus dem Gesamtpatientenkollektiv der Studie ALL-REZ-BFM 2002 darstellt. Anschließend wurden die drei oben genannten, an Hand der Rezidivlokalisierung gebildeten Untergruppen mit den entsprechenden Untergruppen des Vergleichskollektivs verglichen. Damit sollte geprüft werden, ob auch die einzelnen Untergruppen jeweils eine repräsentative Stichprobe darstellen. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden zwei Abschnitten beschrieben.

6.1.1 Repräsentativität des gesamten Untersuchungskollektivs

Die in diese Arbeit eingeschlossenen 56 Patienten wurden mit allen Patienten aus der Studie ALL-REZ-BFM 2002 verglichen, die im selben Zeitraum in die Studie eingeschlossen wurden. Für dieses Vergleichskollektiv wurden dieselben Einschlusskriterien wie für die untersuchten Patienten angewendet. (Erstrezidive mit Knochenmarkbeteiligung, protokollgerechte Behandlung; vgl. Kapitel 5.2.1). Das auf diese Weise generierte Vergleichskollektiv umfasste 259 Patienten mit einem ersten isolierten oder kombinierten Knochenmarkrezidiv.

Untersuchungs- und Vergleichskollektiv unterschieden sich signifikant hinsichtlich des Rezidivorts. Durch die vorgenommene Selektion des Untersuchungskollektivs (vgl. Kapitel 3.2.1) enthielt dieses einen größeren Anteil an Patienten mit kombiniertem Knochenmarkrezidiv als das Vergleichskollektiv (55,4% versus 22,4%, $p < 0,001$). Des Weiteren fand sich im Untersuchungskollektiv ein geringerer Anteil an Patienten, die eine HSZT erhielten, als im Vergleichskollektiv (30,4% versus 47,9%; $p = 0,015$). Bezüglich der anderen getesteten klinischen oder genetisch-biologischen Parameter

war der p-Wert deutlich höher als 0,05, so dass sich die Kollektive in diesen nicht unterschieden. Die Ergebnisse fassen Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2 zusammen.

Tabelle 6.1: Repräsentativität der Studienpopulation bezüglich klinischer und therapeutischer Parameter.

Merkmal		Untersuchungskollektiv		Vergleichskollektiv		p-Wert ^{*1}
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	
Geschlecht	männlich	37	66,1%	151	58,3%	0,282
	weiblich	19	33,9%	108	41,7%	
Alter bei EK	<5 Jahre	26	46,4%	120	46,3%	0,908
	>=5 - <10 Jahre	14	25,0%	71	27,4%	
	>= 10 Jahre	16	28,6%	68	26,3%	
Rezidivzeitpunkt ^{*2}	sehr früh	17	30,4%	69	26,6%	0,700
	früh	15	26,8%	63	24,8%	
	spät	24	42,9%	127	49,0%	
Rezidivort	isoliert KM	25	44,6%	201	77,6%	<0,001
	kombiniert KM	31	55,4%	58	22,4%	
Risikogruppe ^{*3}	S2	31	55,4%	134	51,7%	0,583
	S3	6	10,7%	42	16,2%	
	S4	19	33,9%	83	32,0%	
ZNS-Befall EK	nein	43	93,5%	215	94,7%	0,478 [#]
	ja	3	6,5%	12	5,3%	
	Angabe fehlt	10		32		
Therapie EK	keine/ Non-BFM	15	26,8%	81	31,3%	0,508
	BFM	41	73,2%	178	68,7%	
ZNS-Bestrahlung	nein	45	80,4%	208	80,6%	0,964
	ja	11	19,6%	50	19,4%	
	Angabe fehlt	0		1		
HSZT	nein	39	69,6%	133	51,8	0,015
	ja	17	30,4%	124	48,2%	
	Angabe fehlt	0		2		

^{*1}Die mit dem Fisher-Exakt-Test (zweiseitig) ermittelten p-Werte sind mit # gekennzeichnet.

^{*2}Rezidivzeitpunkt: sehr früh = innerhalb von 18 Monaten nach Erstdiagnose; früh = ab 18 Monate nach Erstdiagnose bis 6 Monate nach Abschluss der Vortherapie; spät = ab 6 Monate nach Abschluss der Vortherapie.

^{*3}Risikogruppe (siehe Tabelle 3.2, S. 9): S 2 = Intermediärrisiko bei spätem isoliertem Knochenmark-Rezidiv bzw. spätem oder frühem kombinierten Knochenmark-Rezidiv einer B-Vorläuferzell-ALL. S3 = hohes Risiko bei frühem isoliertem Knochenmark-Rezidiv. S4 = hohes Risiko bei sehr frühem isoliertem oder kombiniertem Knochenmark-Rezidiv einer B-Vorläuferzell-ALL oder bei T-ALL.

Abkürzungen: Alter bei EK = Alter bei Diagnose der Ersterkrankung. KM = Knochenmarkrezidiv. ZNS-Befall EK = ZNS-Beteiligung bei der Ersterkrankung. Therapie EK = Therapie der Ersterkrankung. Keine/Non-BFM = keine Therapie bei Ersterkrankung oder nach einem anderen Therapieprotokoll als Berlin-Frankfurt-Münster. BFM = Therapie bei Ersterkrankung nach Berlin-Frankfurt-Münster-Protokoll. ZNS-Bestrahlung: Bestrahlung des ZNS bei Ersterkrankung. HSZT: Hämatopoetische Stammzelltransplantation.

Tabelle 6.2: Repräsentativität der Studienpopulation bezüglich biologischer und genetischer Parameter.

Merkmal		Untersuchungskollektiv		Vergleichskollektiv		p-Wert* ¹
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	
Immunphänotyp* ¹	B-Vorläuferzell-ALL	47	92,2%	210	84,3%	0,442 [#]
	T-ALL	4	7,8%	34	13,7%	
	Biphänotypisch* ²	0	0,0%	5	2,0%	
	nicht bekannt	5		10		
FAB-Klassifikation	L1	46	90,2%	215	92,3%	0,578 [#]
	L2	5	9,8%	18	7,7%	
	Angabe fehlt	5		26		
Down-Syndrom	nein	55	98,2%	250	96,5%	1,0 [#]
	ja	1	1,8%	9	3,5%	
BCR/ABL* ³	negativ	54	96,4%	224	98,2%	0,338 [#]
	positiv	2	3,6%	4	1,8%	
	Angabe fehlt	0		31		
ETV6/RUNX1* ³	negativ	47	83,9%	198	86,5%	0,625
	positiv	9	16,1%	31	13,5%	
	Angabe fehlt	0		30		
MLL/AFF1* ³	negativ	54	96,4%	222	96,1%	1,0 [#]
	positiv	2	3,6%	9	3,9%	
	Angabe fehlt	0		28		

*¹Die mit dem Fisher-Exakt-Test (zweiseitig) ermittelten p-Werte sind mit # gekennzeichnet.

*²Biphänotypisch: nicht eindeutig zuzuordnende akute Leukämie.

*³BCR/ABL, ETV6/RUNX1 und MLL/AFF1 sind Leukämie-spezifische Fusionsgene aufgrund von chromosomalen Translokationen (siehe Abbildung 3.1, Seite 6).

Abkürzungen: B-Vorläuferzell-ALL = B-Vorläuferzell akute lymphoblastische Leukämie. T-ALL = T-Lymphoblastische akute Leukämie. FAB-Klassifikation: French-American-British-Klassifikation für Leukämien.

6.1.2 Repräsentativität der Untergruppen des Untersuchungskollektivs

Die in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten wurden entsprechend ihrer Rezidivlokalisierung in die Gruppen „kombiniert ZNS“, „kombiniert Testes“ und „isoliert Knochenmark“, eingeteilt. Es wurde geprüft, ob diese Untergruppen eine repräsentative Stichprobe aus den entsprechenden Untergruppen des Vergleichskollektivs darstellen. Überprüft wurden dieselben Parameter wie für den Vergleich des Gesamtkollektivs (vgl. Kapitel 6.1.1). In jeder der Untergruppen war der p-Wert für alle Parameter größer als 0,05. Somit stellten die einzelnen Untergruppen jeweils eine repräsentative Stichprobe dar. Die detaillierten Ergebnisse sind in und Tabelle 6.4 dargestellt.

Tabelle 6.3: Repräsentativität der Untergruppen der Studienpopulation bezüglich klinischer und therapeutischer Parameter

Merkmal		kombinierte Rezidive ZNS			kombinierte Rezidive Testes			isolierte Rezidive KM								
		U-Kollektiv	V-Kollektiv	p-Wert* ¹	U-Kollektiv	V-Kollektiv	p-Wert* ¹	U-Kollektiv	V-Kollektiv	p-Wert* ¹						
Geschlecht	männlich	12	57,1%	21	63,6%	0,633	10	100,0%	13	100,0%	entfällt	15	60,0%	111	55,2%	0,650
	weiblich	9	42,9%	12	36,4%		0	0,0%	0	0,0%		10	40,0%	90	44,8%	
Alter bei EK	<5 Jahre	10	47,6%	17	51,5%	0,873 [#]	4	40,0%	5	38,5%	1,0 [#]	12	48,0%	92	45,8%	0,708
	>=5 - <10 Jahre	6	28,6%	10	30,3%		3	30,0%	5	38,5%		5	20,0%	55	27,4%	
	>= 10 Jahre	5	23,8%	6	18,2%		3	30,0%	3	23,1%		8	32,0%	54	26,9%	
Rezidivzeitpunkt* ²	sehr früh	7	33,3%	9	27,3%	0,879	1	10,0%	1	7,7%	1,0 [#]	9	36,0%	56	27,9%	0,597
	früh	6	28,6%	11	33,3%		3	30,0%	5	38,5%		6	24,0%	44	21,9%	
	spät	8	38,1%	13	39,4%		6	60,0%	7	53,8%		10	40,0%	101	50,2%	
Risikogruppe* ³	S2	14	66,7%	23	69,7%	0,815	8	80,0%	11	84,6%	1,0 [#]	9	36,0%	94	46,8%	0,589
	S3	0	0,0%	0	0,0%		0	0,0%	0	0,0%		6	24,0%	42	20,9%	
	S4	7	33,3%	10	30,3%		2	20,0%	2	15,4%		10	40,0%	65	32,3%	
ZNS-Befall EK	nein	16	88,9%	26	89,7%	1,0 [#]	8	100,0%	11	100,0%	entfällt	19	95,0%	169	94,9%	1,0 [#]
	ja	2	11,1%	3	10,3%		0	0,0%	0	0,0%		1	5,0%	9	5,1%	
	Angabe fehlt	3		4			2		2			5		23		
Therapie EK	keine/ Non-BFM	8	38,1%	9	27,3%	0,404	3	30,0%	4	30,8%	1,0 [#]	4	16,0%	65	32,3%	0,094
	BFM	13	61,9%	24	72,7%		7	70,0%	9	69,2%		21	84,0%	136	67,7%	
ZNS-Bestrahlung	nein	18	85,7%	29	87,9%	1,0 [#]	7	70,0%	9	69,2%	1,0 [#]	20	80,0%	162	81,0%	1,0 [#]
	ja	3	14,3%	4	12,1%		3	30,0%	4	30,8%		5	20,0%	38	19,0%	
	unbekannt	0		0			0		0			0		1		
HSZT	nein	17	81,0%	22	66,7%	0,253	7	70,0%	10	76,9%	1,0 [#]	15	60,0%	94	47,2%	0,229
	ja	4	19,0%	11	33,3%		3	30,0%	3	23,1%		10	40,0%	105	52,8%	
	Angabe fehlt	0		0			0		0			0		2		

*¹Die mit dem Fisher-Exakt-Test (zweiseitig) ermittelten p-Werte sind mit # gekennzeichnet.

*²Rezidivzeitpunkt: sehr früh = innerhalb von 18 Monaten nach Erstdiagnose; früh = ab 18 Monate nach Erstdiagnose bis 6 Monate nach Abschluss der Vortherapie; spät = ab 6 Monate nach Abschluss der Vortherapie.

*³Risikogruppe (siehe Tabelle 3.2, S. 9): S 2 = Intermediärrisiko bei spätem isoliertem KM-Rezidiv bzw. spätem oder frühem kombinierten KM-Rezidiv einer B-Vorläuferzell-ALL. S3 = hohes Risiko bei frühem isoliertem KM-Rezidiv. S4 = hohes Risiko bei sehr frühem isoliertem oder kombiniertem KM-Rezidiv einer B-Vorläuferzell-ALL oder bei T-ALL.

Abkürzungen: KM = Knochenmark. U-Kollektiv = Untersuchungskollektiv. V-Kollektiv = Vergleichskollektiv. Alter bei EK = Alter bei Diagnose der Ersterkrankung. ZNS-Befall EK = ZNS-Beteiligung bei der Ersterkrankung. Therapie EK = Therapie der Ersterkrankung. Keine/Non-BFM = keine Therapie bei Ersterkrankung oder nach einem anderen Therapieprotokoll als Berlin-Frankfurt-Münster. BFM = Therapie bei Ersterkrankung nach Berlin-Frankfurt-Münster-Protokoll. *⁹ZNS-Bestrahlung = Bestrahlung des ZNS bei Ersterkrankung. *¹⁰ HSZT: Hämatopoetische Stammzelltransplantation bei aktuellem erstem Rezidiv.

Tabelle 6.4: Repräsentativität der Untergruppen der Studienpopulation bezüglich biologischer und genetischer Parameter

Merkmal		kombinierte Rezidive ZNS			kombinierte Rezidive Testes			isolierte Rezidive KM								
		U-Kollektiv	V-Kollektiv	p-Wert* ¹	U-Kollektiv	V-Kollektiv	p-Wert* ¹	U-Kollektiv	V-Kollektiv	p-Wert* ¹						
Immunphänotyp	B-Vorläuferzell-ALL	18	94,7%	29	93,5%	1,0 [#]	8	80,0%	11	84,6%	1,0 [#]	21	95,5%	164	85,0%	0,391 [#]
	T-ALL	1	5,3%	2	6,5%		2	20,0%	2	15,4%		1	4,5%	24	12,4%	
	Biphänotypisch* ²	0	0,0%	0	0,0%		0	0,0%	0	0,0%		0	0,0%	5	2,6%	
	nicht bekannt	0		0			0		0			3		8		
FAB	L1	16	88,9%	28	93,3%	0,624 [#]	10	100,0%	13	100,0%	entfällt	20	87,0%	162	91,0%	0,462 [#]
	L2	2	11,1%	2	6,7%		0	0,0%	0	0,0%		3	13,0%	16	9,0%	
	Angabe fehlt	3		3			0		0			2		23		
Down-Syndrom	nein	21	100,0%	32	97,0%	1,0 [#]	10	100,0%	13	100,0%	entfällt	24	96,0%	194	96,5%	1,0 [#]
	ja	0	0,0%	1	3,0%		0	0,0%	0	0,0%		1	4,0%	7	3,5%	
BCR/ABL* ³	negativ	20	95,2%	30	96,8%	1,0 [#]	10	100,0%	12	100,0%	entfällt	24	96,0%	173	98,3%	0,415 [#]
	positiv	1	4,8%	1	3,2%		0	0,0%	0	0,0%		1	4,0%	3	1,7%	
	Angabe fehlt	0		2			0		1			0		25		
ETV6/RUNX1* ³	negativ	20	95,2%	30	96,8%	1,0 [#]	6	60,0%	7	58,3%	1,0 [#]	21	84,0%	152	85,9%	0,764 [#]
	positiv	1	4,8%	1	3,2%		4	40,0%	5	41,7%		4	16,0%	25	14,1%	
	Angabe fehlt	0		2			0		1			0		24		
MLL/AFF1* ³	negativ	20	95,2%	29	93,5%	1,0 [#]	10	100,0%	12	100,0%	entfällt	24	96,0%	172	96,1%	1,0 [#]
	positiv	1	4,8%	2	6,5%		0	0,0%	0	0,0%		1	4,0%	7	3,9%	
	Angabe fehlt	0		2			0		1			0		22		

*¹Die mit dem Fisher-Exakt-Test (zweiseitig) ermittelten p-Werte sind mit # gekennzeichnet.

*²Biphänotypisch: nicht eindeutig zuzuordnende akute Leukämie.

*³BCR/ABL, ETV6/RUNX1 und MLL/AFF1 sind Leukämie-spezifische Fusionsgene aufgrund von chromosomalen Translokationen (siehe Abbildung 3.1, S. 6).

Abkürzungen: KM = Knochenmark. U-Kollektiv = Untersuchungskollektiv. V-Kollektiv = Vergleichskollektiv. B-Vorläuferzell-ALL = B-Vorläuferzell akute lymphoblastische Leukämie. T-ALL = T-Lymphoblastische akute lymphoblastische Leukämie. FAB-Klassifikation: French-American-British-Klassifikation für Leukämien.

6.2 Qualität des real-time-PCR-Assays

6.2.1 Expression von *IL15* in der Positivkontrolle

Als Positivkontrolle und zur Erstellung von Verdünnungsreihen sollte eine Zelllinie

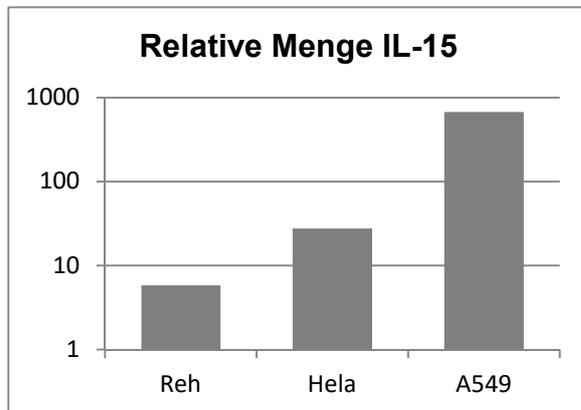


Abbildung 6.1: Expression von *IL15* in verschiedenen Zelllinien.

Dargestellt ist die relativ zur internen Kontrolle Succinatdehydrogenase exprimierte Menge *IL15*, berechnet anhand der Differenz der CT-Werte.

gefunden werden, die *IL15* möglichst hoch exprimiert. Verschiedene im Labor bzw. in der Forschungseinrichtung verfügbare Zelllinien wurden daher auf die Expression dieses Interleukins mittels quantitativer real-time-PCR untersucht. Getestet wurden die Zelllinien A549 (Lungenkarzinom), Reh (B-Vorläuferzell-ALL) und HeLa (Henriette-Lacks-Zellen, Zervixkarzinom). Die Zelllinien Reh und HeLa traten erst bei CT-Werten von 30 (Reh) bzw. 28 (HeLa) in die exponentielle Phase der Amplifikation ein. Dies geschah

bei der Zelllinie A549 bereits bei einem CT-Wert um 22. Somit zeigte die Zelllinie A549 die stärkste Expression von *IL15* und wurde daher als Positivkontrolle ausgewählt (vgl. Abbildung 6.1).

6.2.2 Intra- und Inter-Assay-Varianzen der real-time-PCR

Um das Ausmaß der Messwertschwankungen zu erfassen, wurden die in jeder PCR mitgeführten Verdünnungsreihen der *IL15* positiven Zelllinie A549 herangezogen. Für jede Verdünnungsstufe lagen in jeder PCR jeweils drei Messwerte vor. Dabei stellt die Streuung der einzelnen Werte einer Verdünnungsstufe innerhalb desselben PCR-Laufes ein Maß für die intraexperimentelle Varianz der Messungen dar („Intra-Assay-Varianz“). Die Abweichungen der Mittelwerte dieser Dreifachbestimmungen zwischen den einzelnen PCR-Läufen spiegelt die interexperimentelle Varianz („Inter-Assay-Varianz“) wider. Abbildung 6.2a stellt die Streuung der Messwerte für *IL15* und Abbildung 6.2b für das Referenzgen *SDHA* dar.

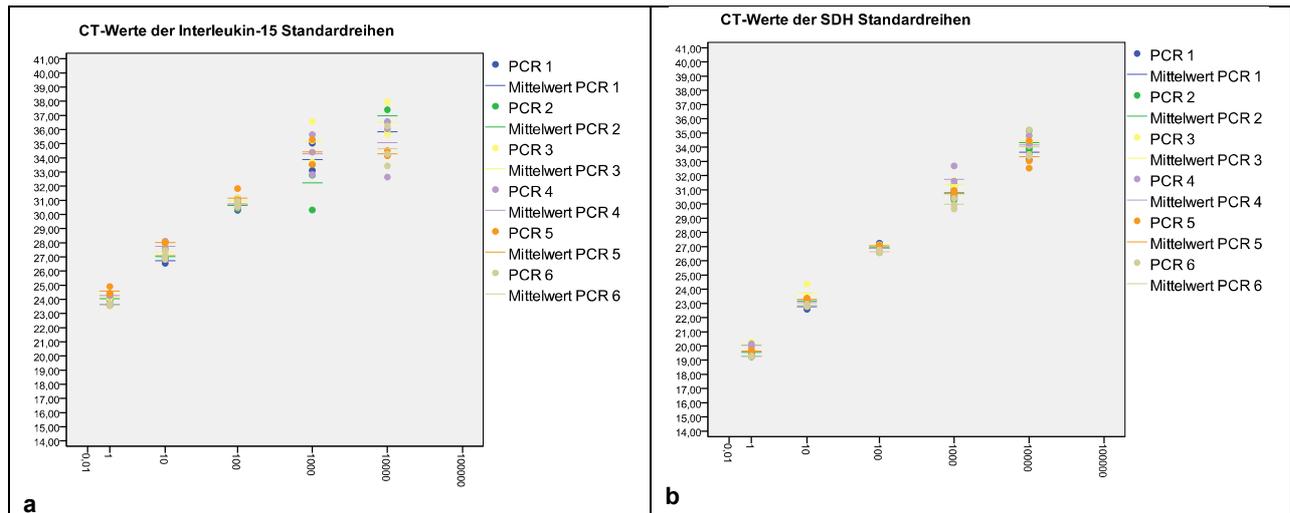


Abbildung 6.2: Streuung der CT-Messwerte in den einzelnen Verdünnungsstufen der Positivkontrolle

Die Abbildungen zeigen die Streuung der CT-Messwerte der real-time-PCR-Läufe für a) *IL15* und b) *SDHA*. Die gemessenen CT-Werte sind auf der Ordinate und die logarithmisch aufgetragene x-fache Verdünnung der Positivkontrolle auf der Abszisse aufgetragen. Die CT-Werte und die zugehörigen Mittelwerte eines PCR-Laufes sind jeweils in derselben Farbe dargestellt.

Aus den beiden Diagrammen geht hervor, dass sowohl die Intra- sowie auch die Inter-Assay-Varianzen mit stärkerer Verdünnung größer werden, da sich aus der zunehmenden Verdünnung eine geringere Genauigkeit ergibt. Ab einer Verdünnung von 10^{-3} zeigt sich eine sprunghafte Zunahme der Schwankungsbreite. Bei der *IL15*-PCR bedingt die insgesamt niedrigere Expression des *IL15*-Gens gegenüber der des *SDHA*-Gens eine generell stärkere Intra- und Inter-Assay-Varianz.

6.2.3 Varianz der Effizienzen der real-time-PCR

Für jeden einzelnen PCR-Lauf wurde, jeweils getrennt für die Zielgene *IL15* und *SDHA*, die Effizienz anhand der Standardreihe ermittelt (vgl. Kapitel 5.2.8). Die unterschiedlichen Effizienzen und die daraus resultierende unterschiedliche Zunahme der DNA-Menge im Verlauf der Amplifikation visualisiert Abbildung 6.3. Aus dem Diagramm geht hervor, dass sich die Effizienzen für die beiden Zielgene unterscheiden. Die Effizienzen E der *IL15*-PCR-Läufe streuten um den Mittelwert von 1,96 bei einem Median von 1,96, die der *SDHA*-PCR-Läufe um den Mittelwert 1,88 bei einem Median von 1,87. Innerhalb der Gene waren die PCR-Effizienzen in den verschiedenen PCR-Läufen dagegen recht konstant. Da eine Effizienz von 100% (entsprechend einer Verdopplung der DNA-Ausgangsmenge pro Amplifikationszyklus) bei einer Effizienz E gleich 2 vorliegt (vgl. 5.2.8), errechnete sich für die PCR-Läufe von *IL15* eine mittlere Effizienz von 96%, während sich für die *SDHA*-PCR-Läufe eine mittlere Effizienz von 88% ergab.

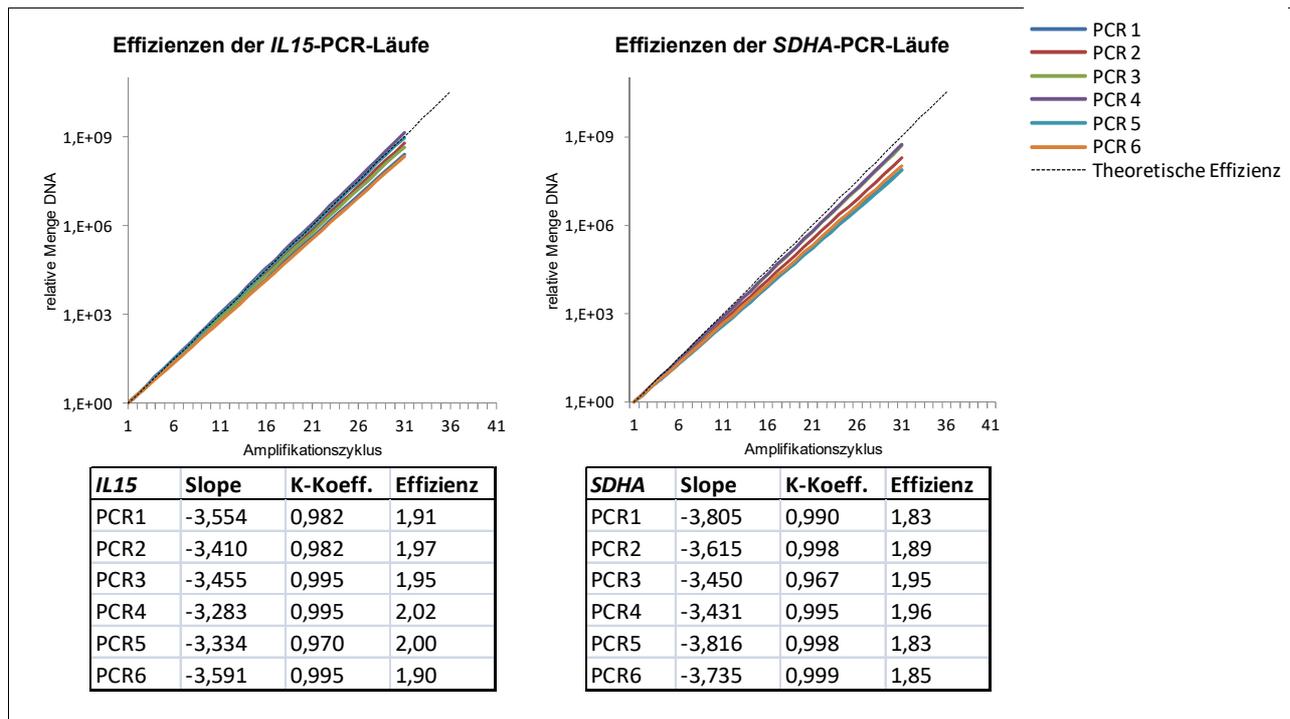


Abbildung 6.3: Effizienzen der real-time-PCR Läufe

In der Abbildung dargestellt ist für beide Zielgene die Zunahme der DNA-Gesamtmenge im jeweiligen PCR-Lauf in Abhängigkeit von den Amplifikationszyklen im Vergleich zur theoretischen Effizienz von $E = 2$ (entsprechend 100%, gestrichelt dargestellt). Die unten stehenden Tabellen geben ergänzend die jeweiligen Steigungen der Standardgeraden („Slope“), den Korrelationskoeffizienten („K.-Koeff.“) und die Effizienzen der jeweiligen PCR-Läufe an.

6.3 Charakterisierung der erhobenen Daten

Um die Art der Verteilung der erhobenen Messwerte zu analysieren, wurden diese der Größe nach geordnet graphisch dargestellt. Wie Abbildung 6.4 zeigt, folgte die Zunahme der *IL15* Expression dabei einem exponentiellen Muster. Während der größte Anteil der Patientenproben eine vergleichsweise geringe Expression aufwies, stachen einige durch eine sehr starke Expression hervor. Dieses Muster spiegelte sich auch in der Häufigkeitsverteilung der erhobenen Messwerte wider, das eine rechtsschiefe Verteilung zeigte (vergl. Histogramm in Abbildung 6.7).

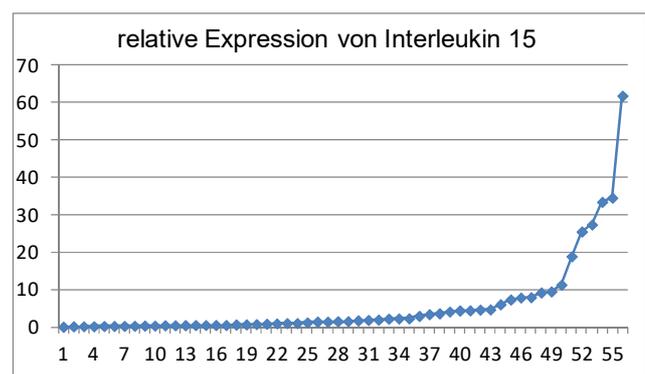


Abbildung 6.4: Exponentielle Verteilung der Messwerte der IL-15-Expression

Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte der relativen IL-15-Expression (Ordinate) aller Patienten, die auf der Abszisse der Größe nach sortiert angeordnet sind.

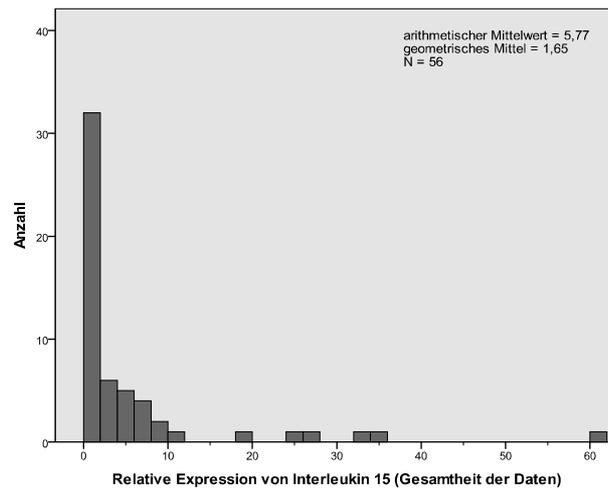


Abbildung 6.5: Häufigkeitsverteilung der *IL15* Expressionswerte aller Patientenproben.

Die Abbildung zeigt ein Histogramm der erhobenen Daten für die relative Expression von *IL15* bei allen untersuchten Patienten.

Im Hinblick auf nachfolgende statistische Auswertungen wurde überprüft, ob die Messwerte nach logarithmischer Transformation zur Basis 2 einer Normalverteilung folgten. Das visuelle Erscheinungsbild des Histogramms ließ eine Log-Normalverteilung der so transformierten Werte vermuten (vergl. Abbildung 6.6).

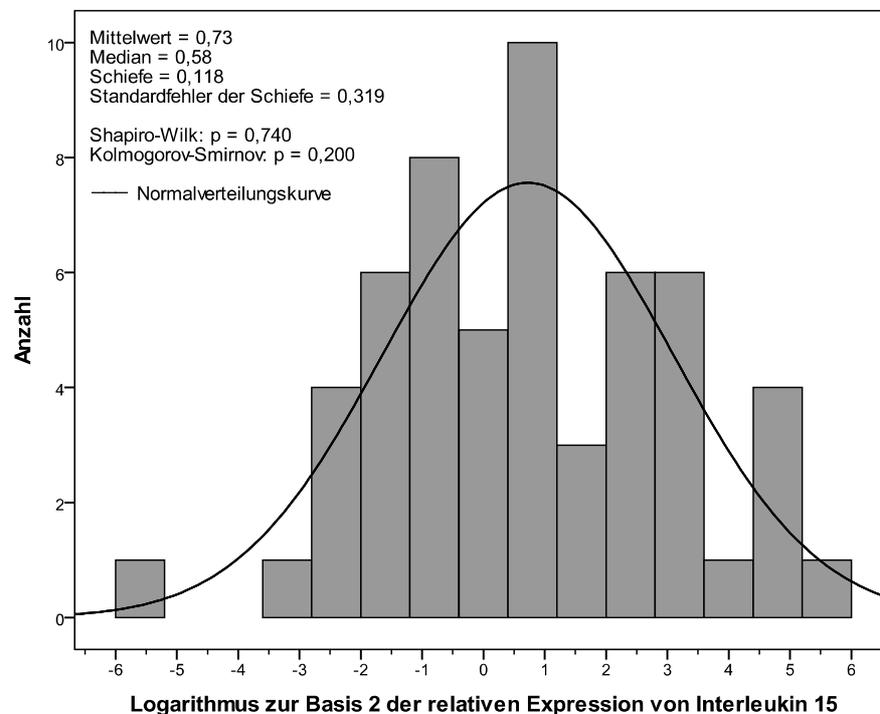


Abbildung 6.6: Log-Normalverteilung zur Basis 2 der Datengesamtheit.

Nach Logarithmierung der erhobenen Daten zur Basis 2 folgten diese einer Normalverteilung. Diese Annahme kann aufgrund der ungefähren Übereinstimmung von Median und Mittelwert, der Schiefe sowie der Ergebnisse der Lagetests nach Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov gemacht werden.

Die Annahme einer Log-Normalverteilung wurde durch die Lagemaße der logarithmisch transformierten Werte gestützt (siehe Angaben in Abbildung 6.6). Wir zogen dann zur Testung auf Normalverteilung den Kolmogorov-Smirnov- und den Shapiro-Wilk-Test hinzu. Die beiden mit diesen Tests ermittelten p-Werte lagen deutlich über 0,05 und untermauerten daher die Annahme auf log-Normalverteilung der erhobenen Daten. Aufgrund dessen wurden im Verlauf auch parametrische Test auf die transformierten Daten angewendet.

6.4 *IL15* Expression in Abhängigkeit vom Ort des ersten Rezidivs

Um einen Überblick über die *IL15* Expression innerhalb der drei Patientengruppen mit unterschiedlicher Lokalisation des Rezidivs zu erhalten, wurde die Häufigkeitsverteilung der Messwerte auch jeweils innerhalb dieser Gruppen betrachtet (siehe Histogramme in Abbildung 6.7).

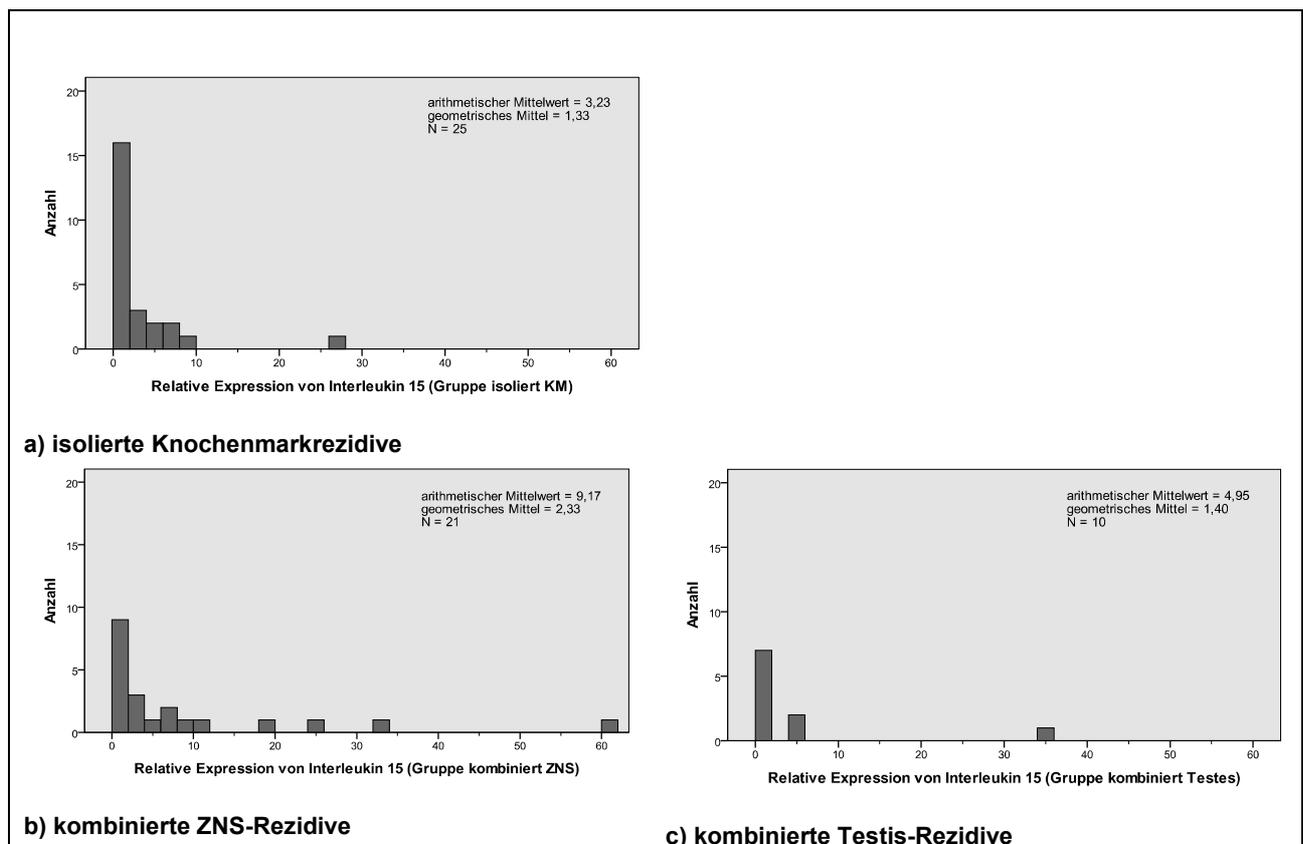


Abbildung 6.7: *IL15* Expression in Patientengruppen mit unterschiedlicher Rezidivlokalisierung.

Die Abbildungen zeigen Histogramme mit der Häufigkeitsverteilung der Messwerte für die relative Expression von *IL15* innerhalb der jeweiligen Subgruppen der Patienten. In allen Subgruppen fand sich eine rechtsschiefe Verteilung und einige Patienten mit hoher *IL15* Expression. Abbildung a) stellt die Messwertverteilung der isolierten Knochenmarkrezidive, b) der kombinierten ZNS-Rezidive und c) der kombinierten Testis-Rezidive dar.

Aus den Histogrammen geht hervor, dass auch alle Subgruppen durch eine rechtsschiefe Datenverteilung charakterisiert waren. In jeder der drei Gruppen fanden sich einige Patientenproben mit sehr hoher *IL15* Expression. Dabei lässt sich erkennen, dass tendenziell in der Gruppe mit ZNS-Beteiligung mehr Patientenproben mit hoher *IL15* Expression zu finden waren. Der Median der Subgruppe mit Infiltration des ZNS lag leicht oberhalb der Mediane der beiden anderen Gruppen. Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in der Boxplot-Darstellung in Abbildung 6.8 wider.

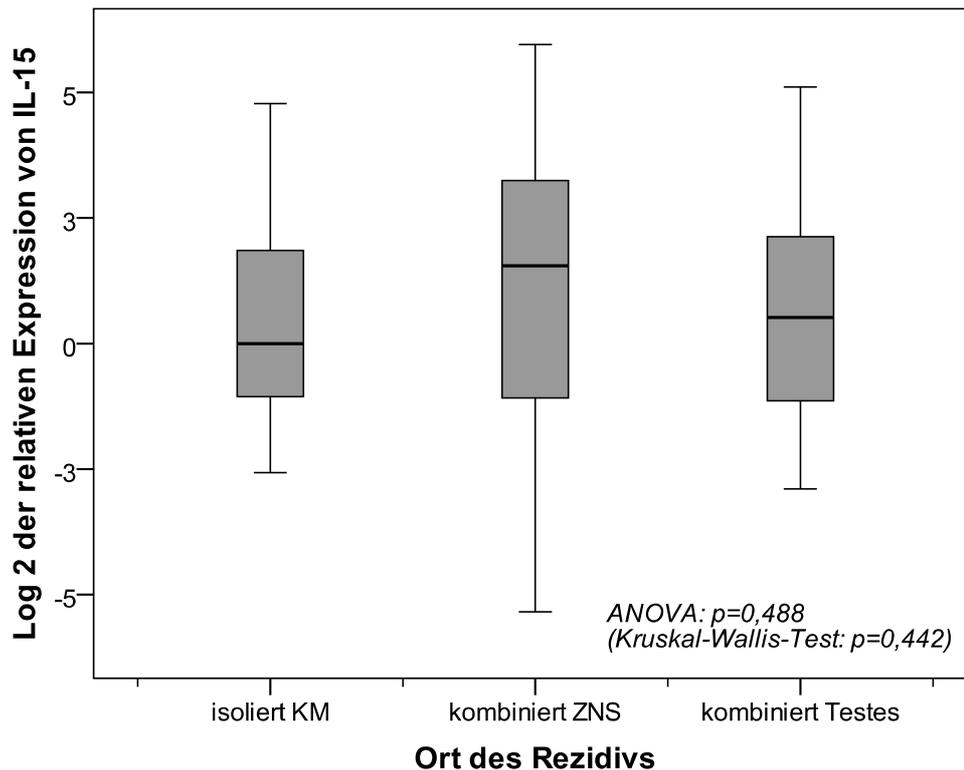


Abbildung 6.8: *IL15* Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation des Rezidivs

Insgesamt zeigen die Boxplots, dass in allen drei Patientengruppen eine hohe Varianz der Messwerte vorliegt. Die Gruppe mit kombiniertem ZNS-Rezidiv weist eine 2,8fach höhere mittlere *IL15* Expression auf als die Gruppe der isolierten Knochenmarkrezidive, was jedoch keinen statistischen Unterschied darstellt. KM = Knochenmark.

Die mittlere relative *IL15* Expression betrug bei kombinierten ZNS-Rezidiven $2^{\Delta CT} = 9,17$, während sie in der Gruppe isolierter Knochenmarkrezidive bei $2^{\Delta CT} = 3,23$ lag. Die Expression betrug somit bei kombinierten ZNS-Rezidiven das 2,8fache. Dabei war die Streuung der Messwerte in allen drei Subgruppen sehr hoch und die erhöhte mittlere *IL15* Expression innerhalb der Gruppe der kombinierten ZNS-Rezidive statistisch nicht signifikant (ANOVA der log-transformierten Daten: $p=0,488$; Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben: $p = 0,442$). In der untersuchten

Patientenkohorte konnte somit kein statistisch signifikanter, allgemeiner Zusammenhang zwischen der *IL15*-mRNA-Expression und der Lokalisation des Rezidivs nachgewiesen werden.

6.5 *IL15* Expression im ersten Rezidiv in Abhängigkeit von der Lokalisation der Leukämie im Krankheitsverlauf

In der vorliegenden Arbeit wurde die *IL15* Expression in Leukämiezellen von Patienten mit erstem Rezidiv einer ALL gemessen. Publierte Arbeiten hatten zuvor einen Zusammenhang zwischen der *IL15* Expression und der Lokalisation der Leukämie sowohl bei der Ersterkrankung als auch bei einem späteren Rezidiv der Patienten gezeigt.¹² In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch überprüft, ob bei den untersuchten Patienten mit erstem ALL-Rezidiv Zusammenhänge zwischen der *IL15* Expression im ersten Rezidiv und der Lokalisation der Leukämie bei der Ersterkrankung bzw. bei Folgerezidiven bestanden.

6.5.1 *IL15* Expression in Patientenproben bei ZNS-Beteiligung während der ALL-Ersterkrankung

Von den in diese Arbeit eingeschlossenen 56 Patienten mit erstem ALL-Rezidiv hatten 3 Patienten bei der Ersterkrankung eine ZNS-Beteiligung. Davon wiesen zwei Patienten zum Zeitpunkt des ersten Rezidivs ebenfalls eine ZNS-Beteiligung auf, der dritte Patient hatte ein isoliertes Knochenmarkrezidiv. Keiner der Patienten erlitt innerhalb des Beobachtungszeitraumes ein Folgerezidiv. Einer der beiden Patienten, die zum jetzigen Zeitpunkt des ersten Rezidivs eine ZNS-Beteiligung aufwiesen, verstarb jedoch bereits etwa 4 Wochen nach der Rezidivdiagnose.

Die drei Patienten mit ZNS-Beteiligung bei der Ersterkrankung wiesen eine mittlere relative *IL15* Expression in den Leukämiezellen von $2^{\Delta\text{CT}} = 22,3$ auf, während die Leukämiezellen der Patienten ohne initiale ZNS-Beteiligung nur eine mittlere *IL15* Expression von $2^{\Delta\text{CT}} = 5,2$ zeigten. Dies entspricht einer 4,3fach höheren *IL15* Expression in den Leukämiezellen bei Patienten mit initialer ZNS-Beteiligung. Der Zusammenhang war auf Grund der kleinen Anzahl der Patienten nicht statistisch signifikant. Dabei ist jedoch interessant, dass sich der Patient mit der höchsten überhaupt gemessenen *IL15* Expression in der Gruppe der Patienten mit initialer ZNS-Beteiligung fand. Die Ergebnisse visualisiert Abbildung 6.9.

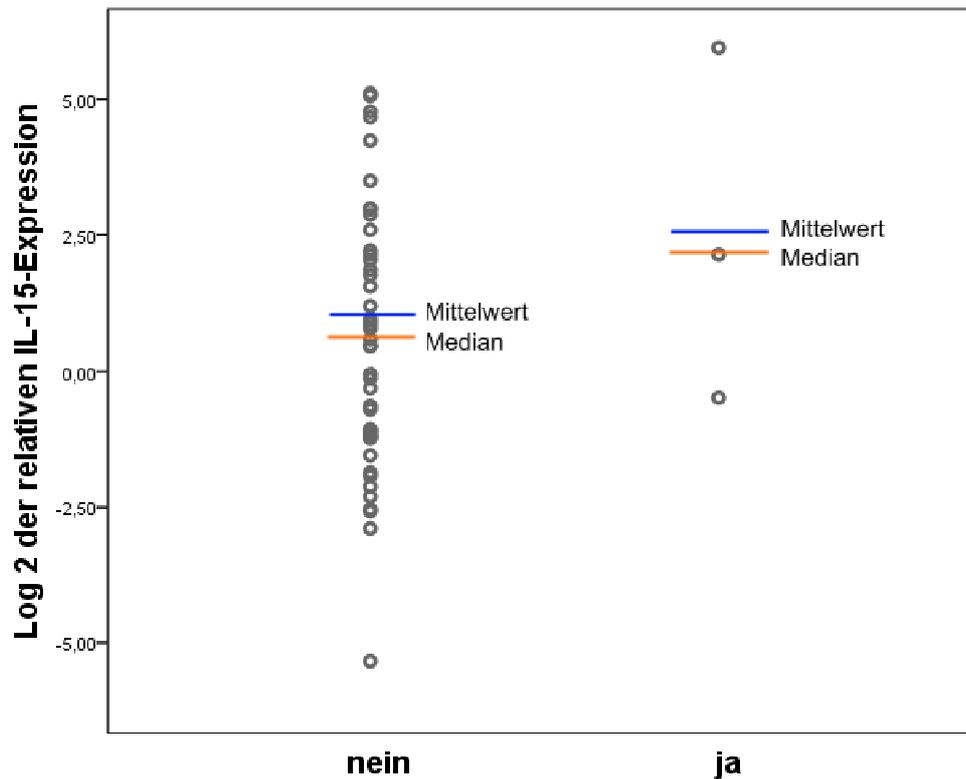


Abbildung 6.9: *IL15* Expression in Abhängigkeit von einer ZNS-Beteiligung bei Ersterkrankung

Die Boxplots zeigen eine um 4,3fach höhere mittlere *IL15* Expression in den Knochenmarkproben der drei Patienten mit initialer ZNS-Beteiligung. Bei 10 Patienten war unbekannt, ob bei der Ersterkrankung eine ZNS-Beteiligung vorlag. Die Proben dieser Patienten wurden in dieser Darstellung ausgeschlossen.

6.5.2 *IL15* Expression bei unterschiedlicher Lokalisation von Folgerezidiven

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes erlitten 19 der 56 Patienten ein Folgerezidiv. Dabei traten isolierte Knochenmarkrezidive am häufigsten auf. Alle anderen Arten von Rezidiven waren Einzelfälle (vergl. Tabelle 6.5). Innerhalb der Patientengruppe mit isoliertem Knochenmark-Folgerezidiv war die *IL15* Expression in den Leukämiezellen daher ähnlich verteilt wie in der Gesamtheit der Patienten mit Folgerezidiven. Insgesamt bestand zwischen Patienten mit isolierten Knochenmark-Folgerezidiven und Patienten ohne Folgerezidiv kein signifikanter Unterschied in der *IL15* Expression in den Leukämiezellen (vgl. Abbildung 6.10).

Tabelle 6.5: Häufigkeit von Folgerezidiven im Untersuchungskollektiv

Lokalisation Folgerezidiv	Häufigkeit
kein Folgerezidiv	37 (66,1%)
isoliert Knochenmark	15 (26,8%)
kombiniert ZNS	1 (1,8%)
kombiniert Testes	1 (1,8%)
kombiniert sonstige Lokalisation	1 (1,8%)
isoliert extramedullär ZNS	1 (1,8%)

Neben isolierten Knochenmarkrezidiven traten jeweils ein kombiniertes ZNS- und ein kombiniertes Testis-Folgerezidiv auf. Diese beiden Patienten wiesen eine eher hohe *IL15* Expression in den Leukämiezellen auf. Zwei weitere Patienten erlitten ein kombiniertes Rezidiv mit einer sonstigen extramedullären Beteiligung (nicht ZNS oder Testis). Diese beiden Patienten exprimierten *IL15* eher niedrig. In Abbildung 6.10 ist die *IL15* Expression entsprechend der Lokalisation dieser Folgerezidive mit dargestellt. Es handelt sich hierbei jedoch um Einzelfallbetrachtungen, aus denen allgemeine Zusammenhänge nicht unbedingt abgeleitet werden können.

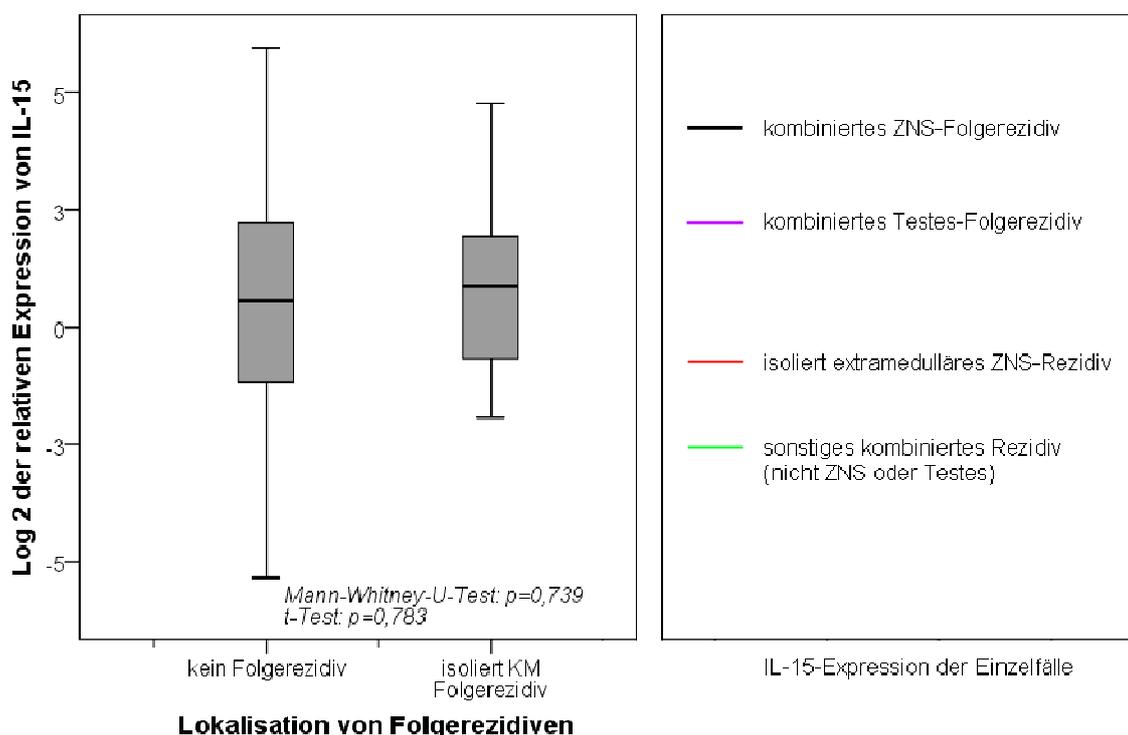


Abbildung 6.10: *IL15* Expression in Abhängigkeit verschiedener Lokalisation von Folgerezidiven

Die Boxplots linksseitig zeigen, dass die *IL15* Expression in der Patientengruppe mit isolierten Knochenmark-Folgerezidiven gegenüber Patienten ohne Folgerezidiv gleich war. Die farbigen Linien im rechten Teil der Abbildung spiegeln die relative Höhe der *IL15* Expression der Einzelfälle mit Folgerezidiv und extramedullärer Beteiligung mit Bezug auf die Ordinate der linken Abbildung wider.

6.6 Charakteristika von Patienten mit sehr hoher *IL15* Expression

Aus den Häufigkeitsverteilungen der *IL15*-Messwerte (vgl. Abbildung 6.5, S. 41), geht hervor, dass einige Patienten durch eine sehr hohe *IL15* Expression in den Leukämiezellen im Vergleich zur Mehrheit der Patienten gekennzeichnet sind. Um mögliche Zusammenhänge mit klinischen oder biologischen Parametern der Patienten

bzw. der Rezidive zu identifizieren, wurden die Charakteristika der Patienten mit *IL15* Expression im oberen Quartil (HE-Gruppe, hoch exprimierende Gruppe) systematisch mit denen der Patienten mit *IL15* Expression in den unteren drei Quartilen (NE-Gruppe, niedrig exprimierende Gruppe) verglichen.

Unter den 14 Patienten der HE-Gruppe fanden sich anteilig relativ viele Patienten mit kombiniertem ZNS-Rezidiv. Die Leukämiezellen von acht der insgesamt 21 Patienten mit kombiniertem ZNS-Rezidiv wiesen eine *IL15* Expression im oberen Quartil auf (38%). Dies spiegelt den höheren Anteil stark *IL15* exprimierender Leukämiezellen in der Subgruppe der Patienten mit kombiniertem ZNS-Rezidiv wider, der sich bereits in den Histogrammen in Kapitel 6.4 (siehe S. 42) und in der Auswertung der metrischen Daten mittels parametrischer und nicht-parametrischer Testverfahren in Kapitel 6.4, Abbildung 4.9 andeutete, aber nicht statistisch signifikant war. Mit einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $p=0,08$ zeigt sich hier nun eine Tendenz zu einem statistisch signifikanten Zusammenhang. Tabelle 6.6. fasst die Ergebnisse bezüglich der Rezidivlokalisierung bei Patienten mit sehr hoher *IL15* Expression zusammen.

Tabelle 6.6: Rezidivlokalisierung bei Patienten mit sehr hoher *IL15* Expression in den Leukämiezellen

Charakteristikum		NE	HE	p-Wert* ¹
Rezidivort (Subgruppe)	isoliert KM	20 80%	5 20%	0,192 [#]
	kombiniert ZNS	13 62%	8 38%	
	kombiniert Testes	9 90%	1 10%	
ZNS-Beteiligung*²	ja	13 62%	8 38%	0,080
	nein	29 83%	6 17%	
ZNS-Befall EK	ja	2 67%	1 33%	1,0 [#]
	nein	33 77%	10 23%	
	Angabe fehlt	7	3	

*¹Die mit dem Fisher-Exakt-Test (zweiseitig) ermittelten p-Werte sind mit # gekennzeichnet.

*²ZNS-Beteiligung im aktuellen ersten Rezidiv.

Abkürzungen: NE = Patientengruppe mit niedriger Expression. HE = Patientengruppe mit sehr hoher Expression im oberen Quartil. KM = Knochenmark. ZNS-Befall EK = ZNS-Beteiligung bei der Ersterkrankung.

Eine wesentliche Beobachtung hinsichtlich der HE-Gruppe betraf den Immunphänotyp. In der untersuchten Patientenkohorte der vorliegenden Arbeit waren vier Patienten mit T-ALL-Rezidiv enthalten. Drei dieser vier Patienten fanden sich unter den 14 Patienten der HE-Gruppe und nur einer unter den 42 Patienten der NE-Gruppe. Diese Unterschiede in der Verteilung waren auf dem Niveau von $p=0,047$ statistisch signifikant. Darüber hinaus fanden sich in der HE-Gruppe mit sehr hoher *IL15*

Expression anteilig deutlich mehr Mädchen als Jungen. Acht der elf insgesamt untersuchten Mädchen wiesen eine sehr hohe *IL15* Expression auf. Mit einem ermittelten p-Wert von 0,051 zeigte sich hier eine Tendenz zu einem statistisch signifikanten Zusammenhang. Für alle weiteren genetischen und klinischen Parameter fanden sich keine Häufigkeitsunterschiede bei Patienten der HE-Gruppe im Vergleich zu Patienten der NE-Gruppe. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.7 dargestellt.

Tabelle 6.7: Charakteristika der Patienten mit sehr hoher *IL15* Expression in den Leukämiezellen

Charakteristikum		NE	HE	p-Wert* ¹
Immunphänotyp	B-Vorläuferzell-ALL	40 78%	11 22%	0,047[#]
	T-ALL	1 25%	3 75%	
	nicht bekannt	1		
Alter bei EK	< 5 Jahre	20 77%	6 23%	0,925 [#]
	≥ 5 und < 10 Jahre	10 71%	4 29%	
	≥ 10 Jahre	12 75%	4 25%	
Geschlecht	männlich	31 86%	6 14%	0,051[#]
	weiblich	11 58%	8 42%	
Rezidivzeitpunkt* ²	sehr früh	13 76,5%	4 23,5%	0,678 [#]
	früh	10 67%	5 33%	
	spät	19 79%	5 21%	
Risikogruppe* ³	S2	23 74%	8 26%	0,367 [#]
	S3	6 100%	0 0%	
	S4	13 68%	6 32%	
periphere Blasten* ⁴	< 1/μl	5 56%	4 44%	0,289 [#]
	1-10.000/μl	29 81%	7 19%	
	>10.000/μl	8 80%	2 20%	
	Angabe fehlt	0	1	
Chromosomensatz	diploid	22 76%	7 24%	0,655 [#]
	hyper-/hypodiploid	7 87,5%	1 12,5%	
	Angabe fehlt	13	6	
ETV6/RUNX1* ⁵	negativ	34 72%	13 28%	0,424 [#]
	positiv	8 89%	1 11%	

*¹Alle p-Werte wurden mit dem Fisher-Exakt-Test (zweiseitig) ermittelt.

*²Rezidivzeitpunkt: sehr früh = innerhalb von 18 Monaten nach Erstdiagnose; früh = ab 18 Monate nach Erstdiagnose bis 6 Monate nach Abschluss der Vortherapie; spät = ab 6 Monate nach Abschluss der Vortherapie.

*³Risikogruppe (siehe Tabelle 3.2, S. 9): S 2 = Intermediärrisiko bei spätem isoliertem Knochenmark-Rezidiv bzw. spätem oder frühem kombinierten Knochenmark-Rezidiv einer B-Vorläuferzell-ALL. S3 = hohes Risiko bei frühem isoliertem Knochenmark-Rezidiv. S4 = hohes Risiko bei sehr frühem isoliertem oder kombiniertem Knochenmark-Rezidiv einer B-Vorläuferzell-ALL oder bei T-ALL.

*⁴periphere Blasten = leukämische Blasten/ μl Blut bei Rezidivdiagnose.

*⁵ETV6/RUNX1: Fusionsgen aufgrund der chromosomalen Translokation t(12;21)(p13;q22). Andere Fusionsgene und genetische Parameter (vgl. Kapitel 3.1.1) wurden aufgrund zu kleiner Häufigkeiten nicht statistisch ausgewertet.

Abkürzungen: NE = niedrige Expression. HE = hohe Expression. B-Vorläuferzell-ALL = B-Vorläuferzell akute Lymphoblastische Leukämie. T-ALL = T-Lymphoblastische akute Leukämie. Alter bei EK = Alter bei Diagnose der Ersterkrankung.

6.7 Assoziation klinisch-biologischer Parameter mit der *IL15* Expression

6.7.1 *IL15* Expression in Abhängigkeit vom Immunphänotyp

Wie in Kapitel 6.6 dargestellt, ergaben sich aus der Charakterisierung der Patientenproben mit sehr hoher *IL15* Expression in den Leukämiezellen Hinweise darauf, dass T-ALL-Rezidive durch eine höhere *IL15* Expression gekennzeichnet sein könnten. Diesem Sachverhalt wurde daher weiter nachgegangen. In unserem Untersuchungskollektiv waren vier Patienten mit erstem T-ALL-Rezidiv enthalten, 51 Patienten mit erstem Rezidiv einer B-Vorläuferzell-ALL und ein Patient mit nicht klassifiziertem Immunphänotyp. Unter den vier untersuchten Patienten mit T-ALL-Rezidiv wies ein Patient eine ZNS-Beteiligung auf, zwei Patienten zeigten eine Testes-Beteiligung, und der vierte Patient hatte ein isoliertes Knochenmarkrezidiv.

Bei der Betrachtung der *IL15* Expression in den B-Vorläuferzell-ALL-Rezidiven und T-ALL-Rezidiven zeigte sich eine insgesamt deutlich höhere *IL15* Expression in T-ALL-Zellen. Selbst die Leukämiezellen des Patienten mit der niedrigsten Expression innerhalb der T-Zell-Gruppe zeigten noch ein Expressionsniveau, das etwa dem Median der Expression der B-Vorläuferzell-ALL-Rezidive entsprach (vgl. Abbildung 6.11).

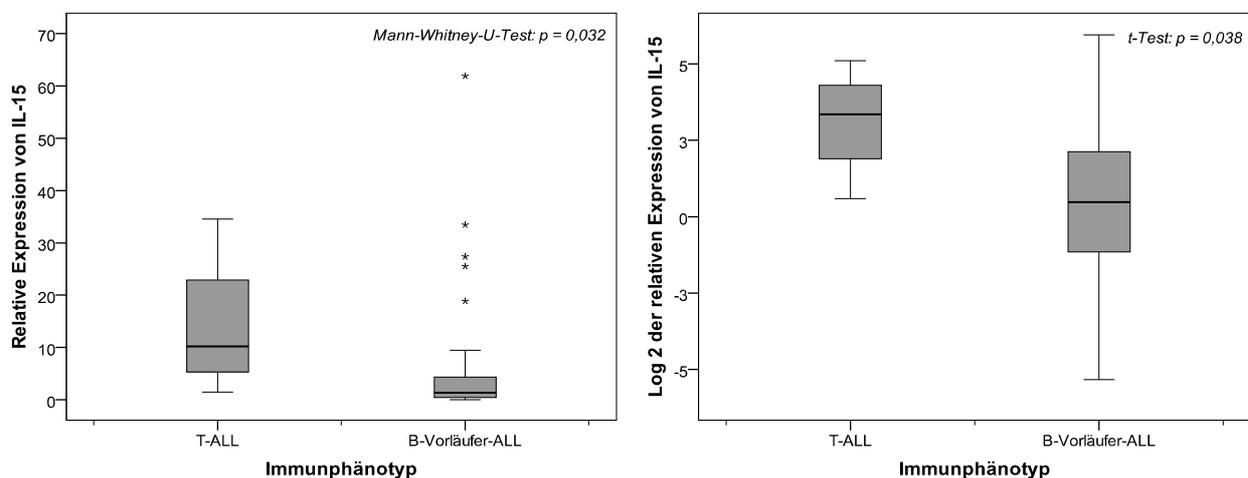


Abbildung 6.11: Expression von *IL15* in B-Vorläuferzell- und T-ALL-Rezidiven.

Die Boxplots zeigen, dass die Expression von *IL15* in den vier Patienten mit T-ALL-Rezidiv deutlich oberhalb der Expression der Patienten mit B-Vorläuferzell-ALL-Rezidiv liegt, obwohl sich auch in dieser Gruppe einige Patienten mit auffallend hoher *IL15* Expression finden. Ein Patient mit nicht klassifiziertem Immunphänotyp wurde in dieser Darstellung ausgeschlossen.

Dieser Unterschied der *IL15* Expression zwischen B-Vorläuferzell- und T-ALL-Rezidiven erwies sich als statistisch signifikant. Im t-Test errechnete sich für die

log-transformierten Daten ein p-Wert von 0,038 (Mann-Whitney-U-Test $p=0,032$). Aufgrund der geringen Fallzahl von nur vier Patienten mit T-ALL-Rezidiv ist die Interpretation dieses Ergebnisses limitiert. Die Beobachtungen wurden daher an einer weiteren Patientenkohorte validiert. Im Rahmen einer früheren Untersuchung waren Patienten der Studie ALL-REZ BFM 2002 mit erstem Rezidiv mittels des DNA Mikroarray Chips HG-U133A untersucht worden.¹⁰⁵ Bei der Reanalyse dieser Daten konnte die Beobachtung der höheren *IL15* Expression in T-ALL-Rezidiven auch in dieser Kohorte dargestellt werden (siehe Abbildung 6.12).

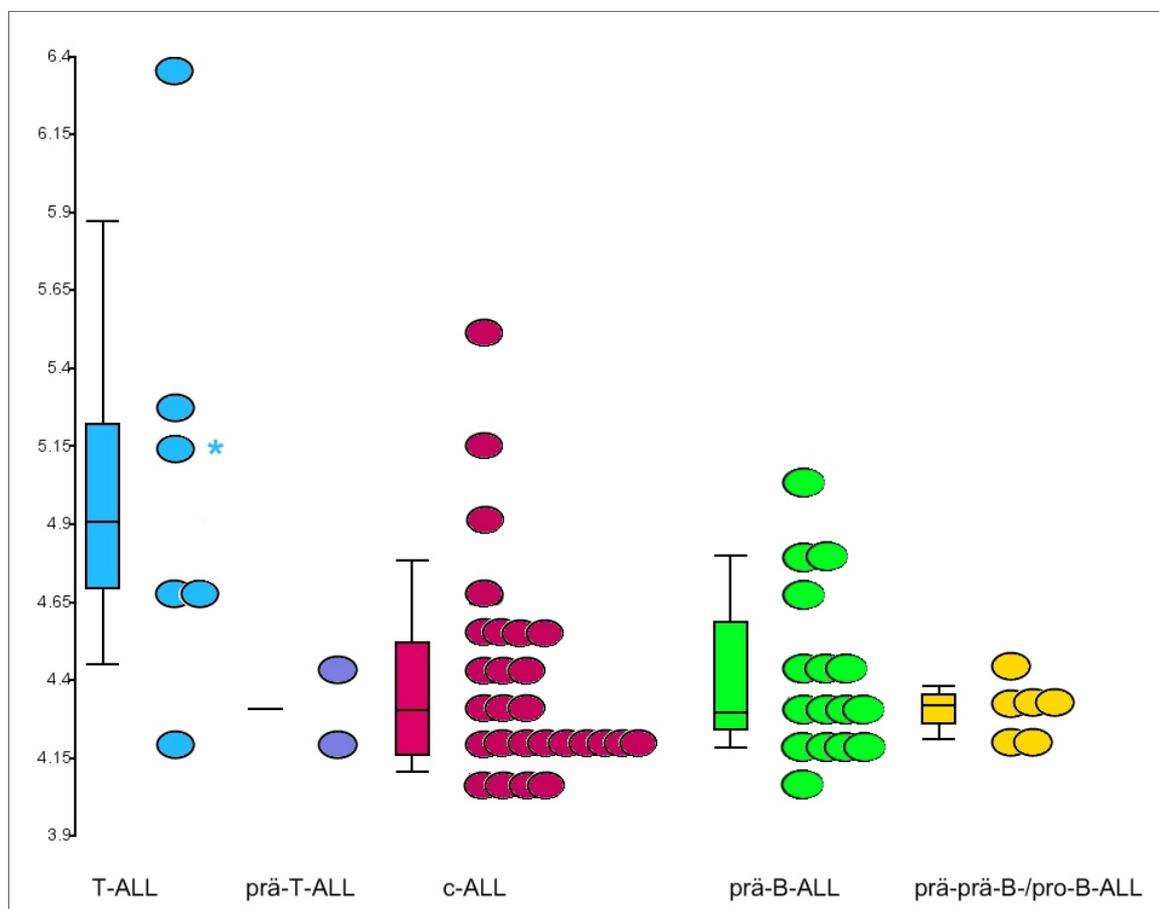


Abbildung 6.12: *IL15* Expression in B-Vorläuferzell- und T-ALL-Rezidiven mittels Affymetrix HG-U133A Analyse

Die Abbildung zeigt die Genexpression von *IL15* in einer Patientenkohorte, die mittels des Affymetrix GeneChips HG-U133A untersucht wurden¹⁰⁵. Die auf der Ordinate dargestellten Werte entsprechen der zur Basis 2 logarithmierten relativen Expression. Eine der Patienten mit T-ALL wurde auch in die vorliegende Arbeit eingeschlossen (mit * gekennzeichnet) und zeigt eine *IL15* Expression in den Leukämiezellen etwa im mittleren Bereich der T-ALL-Rezidive. Vier Patienten aus der ursprünglichen Kohorte¹⁰⁵, bei denen keine Information zum Immunphänotyp vorhanden war, wurden in dieser Darstellung ausgeschlossen. Insgesamt zeigt sich eine höhere *IL15* Expression in T-ALL-Rezidiven.

Die beiden Patienten mit prä-T-ALL-Rezidiv grenzten sich in dieser Patientenkohorte gegenüber Patienten mit Rezidiv einer reiferen T-ALL-Form durch eine niedrige *IL15* Expression in den Leukämiezellen ab. In den vier Patientenproben der von uns eingeschlossenen Patienten mit T-ALL-Rezidiv lag bei dem Patienten mit niedriger *IL15* Expression in den Leukämiezellen ebenfalls ein prä-T-ALL-Rezidiv vor. Interessant ist außerdem die relative *IL15* Expression in den Leukämiezellen des Patienten, der mit beiden Methoden untersucht wurde. Während die Leukämiezellen dieses Patienten in der vorliegenden Arbeit die höchste Expression der vier T-ALL-Rezidive aufwiesen, lag deren Expression bei den Mikroarray-basierten Genexpressionsanalysen nur etwa im mittleren Bereich. Bei der Untersuchung einer größeren Patientenkohorte wären daher wahrscheinlich noch T-ALL-Rezidiv-Patienten mit deutlich höherer Expression in den Leukämiezellen zu erwarten, als sie in der vorliegenden Arbeit gemessen wurden.

6.7.2 *IL15* Expression und andere Parameter

Wie in Kapitel 6.6 ausgeführt, ließen sich keine klinischen oder genetisch-biologischen Parameter identifizieren, die Patienten mit einer sehr hohen *IL15* Expression in den Leukämiezellen statistisch signifikant charakterisierten. Da dies mit dem willkürlich festgelegten Grenzwert oder der Reduktion auf ein nominales Skalenniveau zusammenhängen kann, wurde der Zusammenhang der *IL15* Expression mit diesen Parametern mittels parametrischer und nicht-parametrischer Tests nochmals überprüft. Tabelle 6.8 (S. 52) zeigt, dass sich dabei keine signifikanten Unterschiede bei ALL mit dem Fusionsgen *ETV6/RUNX1* oder mit numerischen Veränderungen des Chromosomensatzes im Vergleich zu ALL ohne diese genetischen Veränderungen fanden.

Die Fusionsgene *MLL/AFF1* und *BCR/ABL* wurden nur jeweils bei zwei ALL-Patienten und eine Trisomie 21 nur bei einem der untersuchten Patienten gefunden. Daher wurde für diese Gruppen keine statistische Analyse vorgenommen, sondern nur eine Einzelfallanalyse durchgeführt. Die Leukämiezellen des Patienten mit Trisomie 21 sowie die der beiden *MLL/AFF1*-positiven ALL-Patienten wiesen eher niedrige *IL15* Expressionen auf, während die Leukämiezellen der beiden *BCR/ABL*-positiven Patienten eher eine hohe *IL15* Expression zeigten.

Tabelle 6.8: *IL-15-Expression im Zusammenhang mit genetisch-biologischen Parametern.*

Parameter	Häufigkeit	Boxplots der transformierten Werte* ¹	Korrelation* ²	Signifikanz
Chromosomensatz diploid hyper-/ hypoploid Angabe fehlt	29 (78,4%) 8 (21,6%) 19		punktbiseriale Korrelation/ Pearson -0,140	t-Test: p=0,409 (MWU: p=0,631)
ETV6/RUNX1* ³ negativ positiv	47 (83,9%) 9 (16,1%)		punktbiseriale Korrelation/ Pearson -0,176	t-Test: p=0,194 (MWU: p=0,174)

*¹Die Verteilung der nicht-logarithmierten Werte ist nicht graphisch dargestellt.

*²Für die Berechnung der punktbiserialen Korrelation wurde beim Chromosomensatz „hyper-/hypodiploid“ = 1 und bei ETV6/RUNX1 „positiv“ = 1 gesetzt.

*³ETV6/RUNX1: Fusionsgen aufgrund der chromosomalen Translokation t(12;21)(p13;q22).

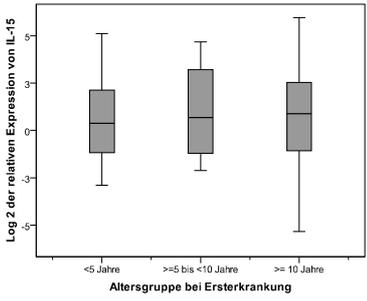
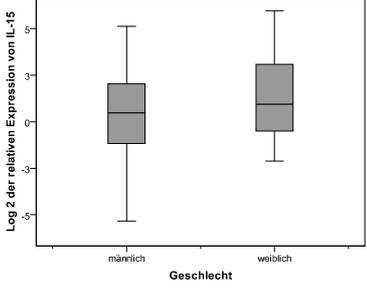
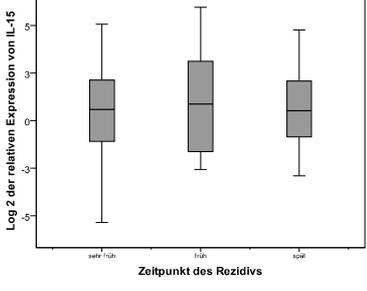
Abkürzungen: MWU = Mann-Whitney-U-Test.

Die untersuchten klinischen Parameter Alter bei Diagnose der Ersterkrankung, Geschlecht, Rezidivzeitpunkt, Risikogruppe und Anzahl der peripheren Blasten im Blut bei Diagnose des Rezidivs zeigten insgesamt keine statistisch signifikanten Assoziationen mit der *IL15* Expression (vgl. Tabelle 6.9, S. 53), zum Teil waren jedoch Tendenzen erkennbar. Bei der Betrachtung der *IL15* Expression in den verschiedenen Risikogruppen zeigte sich eine niedrigere Expression in der Gruppe S3, die in der vorliegenden Arbeit ausschließlich frühe isolierte Knochenmarkrezidive beinhaltete. In der Risikogruppe S2 betrug die mittlere relative *IL15* Expression $2^{\Delta CT} = 6,37$, in der Gruppe S3 war $2^{\Delta CT} = 0,67$ und in der Gruppe S4 errechnete sich $2^{\Delta CT} = 6,39$. Bei Einschränkung durch die kleinen Fallzahlen ergab sich somit in der Risikogruppe S3 eine 9,5fach niedrigere mittlere relative Expression gegenüber S2 und S4. Dieser Zusammenhang zwischen den drei Gruppen war nicht statistisch signifikant, zeigte jedoch eine Tendenz (ANOVA: p=0,121; Kruskal-Wallis: p=0,079). Da die vier Patienten mit T-ALL-Rezidiv und relativ hoher *IL15* Expression alle in die Risikogruppe S4 fielen, wurde die Analyse unter Ausschluss dieser vier Patienten überprüft. Dabei errechnete

sich zwar ein niedrigerer Mittelwert für die relative *IL15* Expression in der S3 Gruppe ($2^{\Delta\text{CT}} = 4,57$), wesentliche Unterschiede in der statistischen Signifikanz zeigten sich zwischen den drei Gruppen aber nicht (ANOVA: $p=0,119$; Kruskal-Wallis: $p=0,091$).

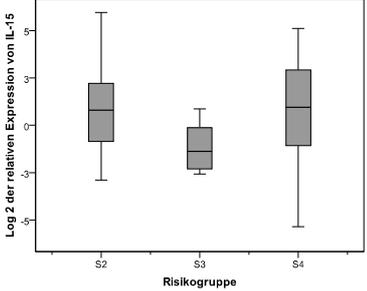
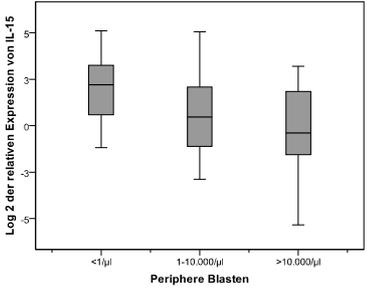
Bei Patientenproben, bei denen bei Diagnosestellung des Rezidivs keine Blasten im Blut nachgewiesen werden konnten, war die mittlere *IL15* Expression höher als bei Proben mit peripher nachweisbaren Blasten. Bei stärkerer Lymphoblastozytose zeigte sich eine Tendenz zu einer niedrigeren *IL15* Expression. Die Unterschiede waren auf dem Niveau $p=0,103$ (Kruskal-Wallis-Test) bzw. $p=0,079$ (ANOVA der transformierten Werte) jedoch nicht statistisch signifikant. Ebenso bestätigte sich eine tendenzielle Assoziation einer hohen *IL15* Expression mit dem weiblichen Geschlecht in diesen Analysen nicht (vgl. Kapitel 6.6 und Tabelle 6.7, S. 46ff).

Tabelle 6.9: *IL15* Expression im Zusammenhang mit klinischen Parametern.

Parameter	Häufigkeit	Boxplots der transformierten Werte* ¹	Korrelation	Signifikanz
Alter bei EK < 5 Jahre ≥ 5 bis < 10 Jahre ≥ 10 Jahre	26 (46,4%) 14 (25,0%) 16 (28,6%)		Spearman 0,119	ANOVA: $p=0,663$ (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,674$)
Geschlecht männlich weiblich	37 (66,1%) 19 (33,9%)		punktbiseriale Korrelation/ Pearson* ² 0,217	t-Test: $p=0,108$ (MWU: $p=0,153$)
Rezidivzeitpunkt* ³ sehr früh früh spät	17 30,4% 15 26,8% 24 42,9%		Spearman 0,001	ANOVA: $p=0,889$ (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,981$)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 6.9: *IL15 Expression im Zusammenhang mit klinischen Parametern. (Fortsetzung)*

Parameter	Häufigkeit	Boxplots der transformierten Werte* ¹	Korrelation	Signifikanz
Risikogruppe* ⁴			Spearman -0,026	ANOVA: p=0,121 (Kruskal-Wallis- Test: p=0,079)
periphere Blasten* ⁵			Spearman -0,264	ANOVA: p=0,079 (Kruskal-Wallis- Test: p=0,103)

*¹Verteilung der nicht-logarithmierten Werte nicht graphisch dargestellt.

*²männlich = 1, weiblich = 2 gesetzt.

*³Rezidivzeitpunkt: sehr früh = innerhalb von 18 Monaten nach Erstdiagnose; früh = > 18 Monate nach Erstdiagnose bis innerhalb von 6 Monaten nach Abschluss der Vortherapie; spät = 6 Monate oder später nach Abschluss der Vortherapie.

*⁴Risikogruppe: S 2 = Intermediärrisiko, spätes isoliertes oder kombiniertes KM-Rezidiv oder frühes kombiniertes Rezidiv einer B-Vorläufer-ALL. S3 = hohes Risiko bei frühem isoliertem KM-Rezidiv. S4 = hohes Risiko bei sehr frühem isoliertem oder kombiniertem KM-Rezidiv einer B-Vorläufer-ALL.

*⁵periphere Blasten = leukämische Blasten/ µl Blut bei Rezidivdiagnose.

Abkürzungen: Alter bei EK: Alter bei Diagnose der Ersterkrankung. ANOVA = engl. „analysis of variance“ = Varianzanalyse. MWU = Mann-Whitney-U-Test.

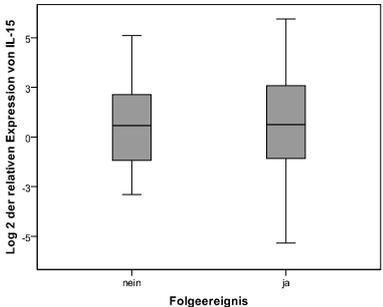
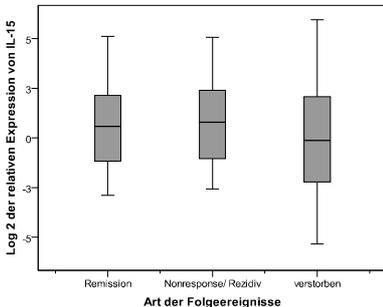
6.7.3 *IL15* Expression und Therapieergebnis

Abschließend wurde geprüft, ob Assoziationen zwischen der Expression von *IL15* und dem Therapieergebnis bestanden. Betrachtet wurde dabei zunächst das Auftreten irgendeines Folgeereignisses im Vergleich zur anhaltenden Remission. Dabei zeigte sich am Ende des Beobachtungszeitraumes der untersuchten Patienten kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der *IL15* Expression und dem Auftreten oder Nichtauftreten von Folgeereignissen. Es ergab sich ein p-Wert von 0,973 (Mann-Whitney-U-Test) bzw. p=0,635 (t-Test der transformierten Werte). Es erfolgte dann die weitere Differenzierung nach der Art der Folgeereignisse wie therapiebedingte Todesfälle, Sekundärmalignome, Folgerezidive und Nichtansprechen auf die Therapie („Nonresponse“). Beim Auftreten mehrerer dieser Ereignisse im weiteren Verlauf wurde jeweils das zeitlich zuerst aufgetretene Ereignis berücksichtigt. Von den 56

untersuchten Patienten befanden sich am Ende der Beobachtungszeit 22 in Remission, sieben waren verstorben und 27 hatten entweder ein erneutes Rezidiv erlitten oder nicht auf die Therapie angesprochen („Nonresponse“). Sekundärmalignome waren bei keinem der Patienten aufgetreten. Auch nach dieser weiteren Differenzierung der Folgeereignisse fanden sich keine Unterschiede in der *IL15* Expression.

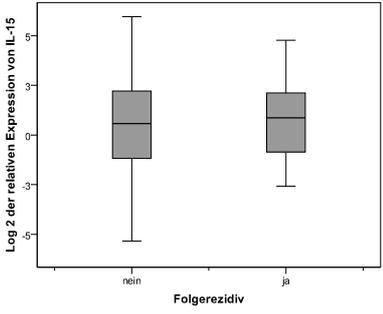
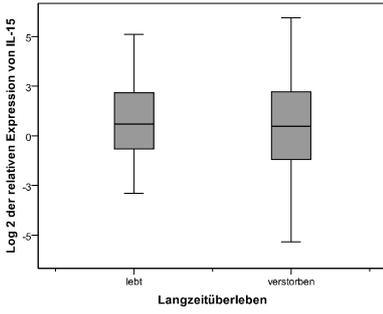
Insgesamt erlitten 19 Patienten im Verlauf ein zweites Rezidiv („Folge Rezidiv“). In dieser Gruppe von Patienten waren sowohl einige mit hoher, als auch mit relativ niedriger *IL15* Expression in den Leukämiezellen enthalten. Dies unterschied sich nicht von der Gruppe ohne Folge Rezidiv. Im gesamten Beobachtungszeitraum verstarben insgesamt 28 der 56 untersuchten Patienten, was einer Überlebensrate von 50% entspricht. In beiden Gruppen war die Verteilung der *IL15* Expression in etwa gleich. Die Ergebnisse der untersuchten Zusammenhänge von *IL15* Expression und Therapieergebnis bzw. Überleben sind in Tabelle 6.10 zusammengefasst.

Tabelle 6.10: Einfluss von *IL15* auf das Therapieergebnis

Parameter	Häufigkeit	Boxplots der transformierten Werte* ¹	Korrelation* ²	Signifikanz
Folgeereignis nein ja	22 (39,3%) 34 (60,7%)		punktbiseriale Korrelation/ Pearson 0,003	t-Test: p=0,985 (MWU: p=0,973)
Art Folgeereignisse in Remission FR/ NR verstorben	22 39,3% 27 48,2% 7 12,5%		Spearman -0,034	ANOVA: p=0,685 (Kruskal-Wallis- Test: p=0,739)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 6.10: Einfluss von IL15 auf das Therapieergebnis (Fortsetzung)

Parameter	Häufigkeit	Boxplots der transformierten Werte* ¹	Korrelation* ²	Signifikanz
Folgerezidiv			punktbiseriale Korrelation/ Pearson 0,038	t-Test: p=0,775 (MWU: p=0,973)
OS			punktbiseriale Korrelation/ Pearson -0,095	t-Test: p=0,492 (MWU: p=0,479)

*¹Die Verteilung der nicht-logarithmierten Werte ist nicht graphisch dargestellt.

*²Für die Berechnung der punktbiserialen Korrelation wurde bei „Folgeereignis“ und „Folgerezidiv“ jeweils „ja“ = 1 und bei „OS“ „verstorben“ = 1 gesetzt.

Abkürzungen: MWU = Mann-Whitney-U-Test. FR = Folgerezidiv. NR = Nonresponse. ANOVA = engl. „analysis of variance“ = Varianzanalyse. OS = engl.: overall survival = absolutes Überleben.

Für die Überlebenszeitanalyse mittels von Kaplan-Meier-Verfahren wurden die Patienten anhand der Quartile der *IL15* Expression in vier Gruppen eingeteilt. Zwischen diesen vier Gruppen mit jeweils 14 Patienten zeigten sich keine Unterschiede bezüglich des EFS oder des OS. In Bezug auf das OS lagen drei der vier Quartil-Kurven sogar beinahe exakt übereinander. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 6.13 (S. 57). Ebenso fanden sich bei Analyse des zeitlichen Auftretens von Folgerezidiven anhand der kumulativen Rezidivinzidenz (CIR, engl. cumulative recidive incidence) nach Kalbfleisch und Prentice keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen (siehe Abbildung 6.14, S. 57). Es errechnete sich mittels Grey Statistik ein p-Wert von 0,5796. Es fiel jedoch auf, dass sich die Patienten mit einer sehr hohen *IL15* Expression in den Leukämiezellen im obersten Quartil durch eine höhere CIR auszeichneten. Die CIR betrug bei Patientenproben mit einer Expression im obersten Quartil 50% gegenüber einer CIR von 28,71% bei der Gesamtheit der übrigen Patientenproben. Mit einem p-Wert von 0,1652 war diese Unterschied nicht statistisch signifikant (nicht separat graphisch dargestellt).

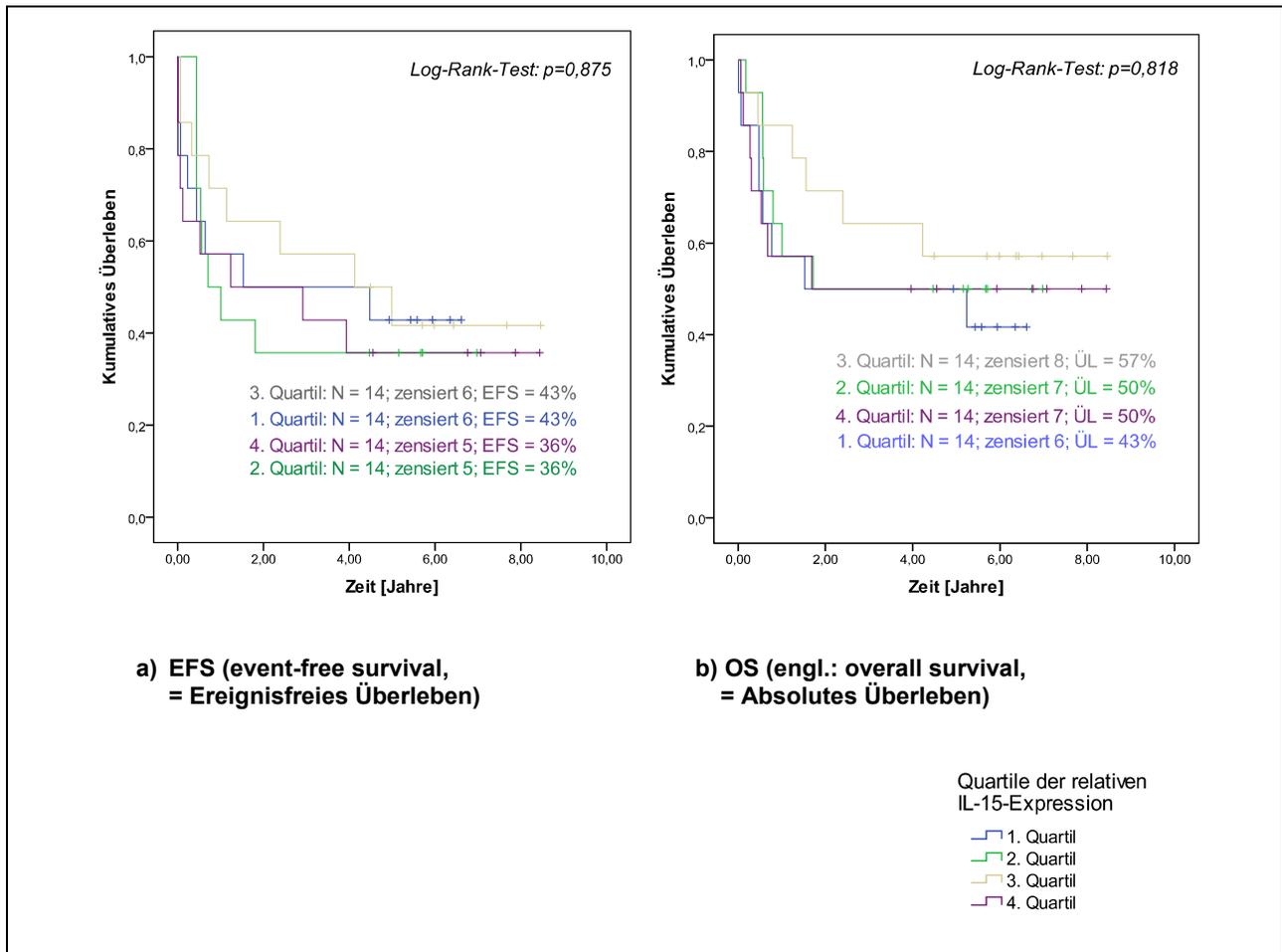


Abbildung 6.13: Einfluss der IL15 Expressionshöhe auf das ereignisfreie und absolute Überleben

Die Abbildung zeigt die Kurven der Kaplan-Meier-Analysen bezüglich der IL15 Expression und a) dem EFS bzw. b) OS. Zensierte Daten sind durch einen senkrechten Strich (|) gekennzeichnet.
 Abkürzungen: EFS = engl. „event-free survival“ = Ereignisfreies Überleben. FR = Folgerezidiv. OS = engl. „overall survival“ = Absolutes Überleben.

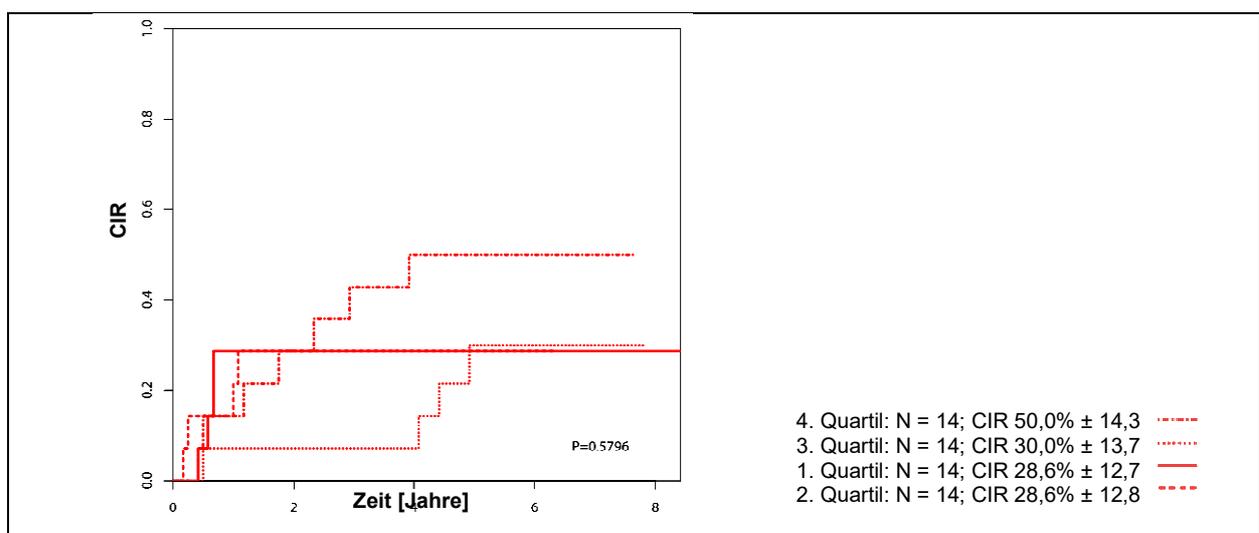


Abbildung 6.14: Kumulative Inzidenz (CIR) von Folgerezidiven

Die Abbildung zeigt die kumulative Inzidenz von Folgerezidiven je nach Höhe der IL15 Expression.

7 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte Kinder mit einem ersten isolierten oder kombinierten Knochenmark-Rezidiv einer ALL anhand einer repräsentativen Patientenstichprobe der Studie ALL-REZ BFM 2002. Es wurde geprüft, inwieweit Zusammenhänge zwischen der *IL15* mRNA Expression der Leukämiezellen und der Lokalisation des Rezidivs bestehen. Dazu wurde mittels real-time-PCR die *IL15* mRNA Expression in Leukämiezellen der Patienten gemessen. Des Weiteren wurden Assoziationen zwischen der *IL15* Expression und weiteren klinischen und biologischen Parametern betrachtet.

7.1 Charakteristika des Patientenkollektivs

In diese Arbeit wurden 56 Patienten mit erstem ALL-Rezidiv eingeschlossen. Diese beinhalteten 21 Patienten mit kombiniertem ZNS-Rezidiv und 10 Patienten mit kombiniertem Testes-Rezidiv sowie 25 Patienten mit isoliertem Knochenmarkrezidiv als Kontrollgruppe. Diese vergleichsweise kleinen Patientenzahlen erklären sich daraus, dass ein ALL-Rezidiv insgesamt eine seltene Erkrankung ist.^{1, 4, 23} Kombinierte Knochenmarkrezidive machen darüber hinaus nur einen kleineren Teil der Rezidive aus (knapp 25%).^{13, 25} Zum Zeitpunkt unserer Untersuchung, vier Jahre nach Beginn der Studienlaufzeit, waren in die ALL-REZ BFM 2002 Studie deutschlandweit 290 Kinder mit einem ersten isolierten oder kombinierten Knochenmarkrezidiv eingeschlossen. Beim überwiegenden Teil der Patienten (201 Patienten) lag dabei ein isoliertes Knochenmarkrezidiv vor. Nur 34 Patienten hatten innerhalb des Untersuchungszeitraumes ein kombiniertes ZNS-Rezidiv und nur 14 Patienten ein kombiniertes Testes-Rezidiv erlitten. Von diesen Patienten wurden alle, bei denen keine methodischen Limitationen vorlagen, in die vorliegende Arbeit eingeschlossen. Somit konnten 62% (21/34) aller kombinierten ZNS-Rezidive und 71% (10/14) der kombinierten Testes-Rezidive in dieser Studie erfasst werden.

Das untersuchte Patientenkollektiv stellte eine repräsentative Stichprobe dar, es fanden sich keine Unterschiede für die meisten der geprüften klinischen und biologischen Parameter zwischen dem Untersuchungskollektiv und der Gesamtheit der Patienten. Insbesondere traf dies auch für die prognostisch relevanten Parameter Immunphänotyp und Zeitpunkt des Rezidivs zu (vergl. Tabelle 6.1, S. 34 und Tabelle

6.2, S. 35).²⁵ Somit ist eine Verzerrung der Ergebnisse durch diese Parameter anhand der Patientenauswahl unwahrscheinlich. Eine Ausnahme bezüglich der Repräsentativität der Stichprobe bildete die Häufigkeit von Patienten, die eine HSZT erhielten. Sie waren im Untersuchungskollektiv seltener (vergl. Abschnitt 4.1.1, S. 33). Dies begründet sich in der eigenen Selektion der untersuchten Patienten auf extramedulläre Beteiligung. Dadurch waren Patienten mit isolierten Knochenmarkrezidiven im Untersuchungskollektiv unterrepräsentiert. Da isolierte Knochenmarkrezidive eine schlechtere Prognose aufweisen, erhalten sie häufiger eine HSZT,^{32, 38, 107} wodurch sich der oben genannte Unterschied ergibt.

7.2 Quantitativer real-time-PCR Nachweis von *IL15* mRNA

Um die Expression von *IL15* zu quantifizieren, wurde die Methode der real-time-PCR mit SYBR Green angewandt. Die Effizienzen der einzelnen real-time-PCR-Läufe unterschieden sich zwischen den beiden Zielgenen *IL15* und *SDHA*. Darüber hinaus traten auch Schwankungen der Effizienzen zwischen verschiedenen PCR-Läufen desselben Zielgens auf (vergl. Abbildung 6.3, S. 40). Die mittlere Effizienz für *IL15* PCR-Läufe betrug $E = 1,96$ und für *SDHA* PCR-Läufe $E = 1,88$. Sie lag damit niedriger als die theoretische Effizienz E einer PCR von $E = 2$, die einer Verdopplung der Transkripte in jedem PCR-Zyklus entspricht. Abweichungen dieser Größenordnung und Unterschiede zwischen verschiedenen PCR-Läufen sowie Zielgenen und Reagenzien einer PCR sind übliche, bekannte Phänomene.^{104, 108} Um diese inter- und intraexperimentellen Schwankungen auszugleichen, wurden bestimmte mathematische Auswertungsmethoden entwickelt.^{104, 108} Dazu gehört beispielsweise die effizienzkorrigierte Methode nach Pfaffl, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.¹⁰⁸ Neuere Verfahren streben die mathematische Bestimmung der Effizienz individuell für jede Probe an, da die Effizienz wahrscheinlich bei jeder einzelnen abweichend ist.¹⁰⁹ Zu diesen Verfahren gehört die von Ruijter *et al.* beschriebene LinRegPCR-Methode.¹¹⁰ In der Literatur sind beide Methoden, die Effizienzkorrektur nach Pfaffl und die LinRegPCR-Methode, gleichsam akzeptiert und bei beiden kann eine hohe Verlässlichkeit angenommen werden.¹⁰⁹ Eine ältere, weit verbreitete Methode der Auswertung von real-time-PCR Messdaten ist die Delta-Delta-CT-Methode. Diese Methode basiert lediglich auf der relativen Expression des Zielgens im Vergleich zu einem Referenzgen ohne Berücksichtigung von Effizienzunterschieden. Aufgrund des

kumulativen Fehlers nach mehreren PCR-Zyklen können unterschiedliche Effizienzen die tatsächlichen Expressionsunterschiede jedoch mitunter deutlich verzerren. Diese Unterschiede wurden durch Anwendung der effizienzkorrigierten Methode nach Pfaffl in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt und somit ein realitätsnäheres Ergebnis abgebildet.

Für die Bestimmung der Effizienzen wurde eine Verdünnungsreihe der Positivkontrolle in jedem PCR-Lauf mitgeführt. Obwohl die eingesetzten Verdünnungsstufen jeweils für alle Experimente aus einer Charge stammten, traten Schwankungen zwischen den Messwerten auf. Mit zunehmender Verdünnung nahmen die Messwertschwankungen zu. Ab einer Verdünnung von 10^{-3} stiegen diese sprunghaft an (vergl. Abbildung 6.2, S. 39), was dem Grenzbereich der Detektionsmöglichkeiten einer PCR nahe kommt.¹¹¹ Daher waren auch die Mittelwerte der Verdünnungsstufe ab 10^{-3} stärkeren Schwankungen unterworfen. Die Ausgleichsgeraden, aus denen sich die Effizienzen bestimmen, können durch schwankende Messwerte bei stärkerer Verdünnung erheblich verändert werden. Die lineare Effizienzkorrektur, auf der die Methode von Pfaffl basiert, kann jedoch nur eine durchschnittliche Effizienz über die gesamte Verdünnungsreihe berücksichtigen¹⁰⁸. In unseren Experimenten lagen fast alle Messwerte der Patientenproben im Bereich der Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-2} (vergl. Abschnitt 5.2.8). Für die Bestimmung der Effizienzen anhand der Pfaffl-Formel wurden daher nur diese Verdünnungsstufen herangezogen.

7.3 Einfluss von IL-15 auf den Ort des Rezidivs

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Leukämiezellproben war *IL15* zwar generell nachweisbar, wurde aber in den meisten Proben nur sehr niedrig exprimiert. Teilweise trat ein Fluoreszenzsignal als Beginn der logarithmischen Phase durch SYBR Green erst nach 32 Amplifikationszyklen auf (Rohdaten nicht gezeigt). Dies stimmt mit den Beobachtungen von Wu und Seeger *et al.* überein, die ebenfalls die Expression verschiedener Zytokine und Zytokinrezeptoren einschließlich *IL15* in Knochenmark-Leukämiezellproben von Kindern mit erstem ALL-Rezidiv untersuchten.¹¹² Auch für zahlreiche andere Gewebe wurde gezeigt, dass *IL15* in diesen zwar exprimiert wird, jedoch nur in geringer Menge.⁶⁰ Die *IL15* Expression kann aber durch verschiedene Faktoren induziert werden. Beispielsweise exprimieren aus Blut frisch isolierte Monozyten *IL15* nur gering.^{61, 62, 65} Werden diese jedoch durch Lipopolysaccharid und

Interferon- γ (LPS/IFN- γ) aktiviert oder mit verschiedensten bakteriellen, viralen oder mykotischen Pathogenen in Kontakt gebracht, dann steigt die *IL15* Expression deutlich an.^{61, 62} Andererseits wird die Produktion des IL-15 Proteins auch posttranskriptionell auf Ebene der Translation stark reguliert. Bamford *et al.* postulierten, dass *IL15* mRNA möglicherweise in geringer Menge in Zellen vorgehalten wird, um bei Bedarf, wie beispielsweise bei Infektionen, eine schnelle Bereitstellung des Proteins zu ermöglichen.⁶³ Somit könnte eine sehr geringe Expression von *IL15* in den von uns untersuchten Patientenproben einer physiologischen, konstitutionellen Basisexpression entsprechen. Demgegenüber könnte bei Leukämiezellen mit sehr hoher *IL15* Expression eine Veränderung der Regulationsmechanismen zugrunde liegen und IL-15 eine pathogenetische Rolle spielen.

Einige der von uns untersuchten Patientenproben zeichneten sich durch eine exponentiell erhöhte *IL15* Expression aus (bis zu 10-50fach, vergl. Abschnitt 6.3, S. 40). Dabei fanden sich unter den Patienten mit einer *IL15* Expression in den Leukämiezellen im oberen Quartil überdurchschnittlich viele Patienten mit kombiniertem ZNS-Rezidiv. Diese Häufigkeitsverteilung zeigte mit einem p-Wert von 0,080 eine Tendenz zu einem statistischen Zusammenhang (vergl. Tabelle 6.6. S. 47). Auch die mittlere *IL15* Expression in Leukämiezellen von Patienten mit kombiniertem ZNS-Rezidiv war höher als in Leukämiezellen von Patienten mit isoliertem Knochenmarkrezidiv oder kombiniertem Testes-Rezidiv. In den untersuchten Patientenproben insgesamt zeigten sich mittels parametrischen Testverfahren jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der mittleren *IL15* Expression zwischen den drei Gruppen.

Unsere Beobachtungen stehen im Einklang mit denen von Wu und Seeger *et al.*, die ALL-Knochenmarkproben von 60 Kindern mit erstem Rezidiv einer B-Vorläuferzell-ALL und 8 Kindern mit T-ALL-Rezidiv aus der Studie ALL-REZ BFM 95 untersuchten.¹¹² Wie in der vorliegenden Arbeit wurde von Wu und Seeger *et al.* mittels real-time-PCR unter anderem die Höhe der *IL15* Expression in aus Knochenmark gewonnenen Leukämiezellen der Patienten gemessen. Wu und Seeger *et al.* fanden in der Gesamtheit der Patienten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der *IL15* Expression zwischen Patienten mit kombiniertem oder isoliertem Knochenmarkrezidiv.¹¹² Andere Arbeiten analysierten die Höhe der *IL15* Expression in Leukämiezellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Cario *et al.* untersuchten Leukämiezellen von Kindern mit Ersterkrankung einer B-Vorläuferzell-ALL. Die

Leukämiezellen wiesen eine signifikant höhere *IL15* Expression auf, wenn die Patienten eine ZNS-Beteiligung hatten oder später ein ZNS-Rezidiv entwickelten. Patienten mit Testes Rezidiv wurden in diese Studie nicht eingeschlossen.¹² Zum anderen zeigte sich in einer späteren Untersuchung von Wu und Thiel *et al.* an erwachsenen ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine signifikant höhere *IL15* Expression der Leukämiezellen bei vorliegender Infiltration ins Mediastinum.¹¹³ Dabei setzte sich diese Patientenkohorte zu etwa 25% aus T-ALLs und zu etwa 75% aus B-Vorläuferzell-ALLs zusammen, was die Häufigkeiten im Erwachsenenalter repräsentiert.¹¹⁴ Ein mediastinaler Befall kommt auch im Kindesalter bei T-ALL im Vergleich zur B-Vorläuferzell-ALL deutlich häufiger vor und tritt in mehr als 50% der Fälle mit T-ALL auf^{115, 116}. Ein Vergleich der *IL15* Expression in Abhängigkeit von der ZNS-Beteiligung wurde von Wu und Thiel *et al.* nicht durchgeführt.¹¹³ Diese beiden Studien weisen auf eine stärkere Abhängigkeit der *IL15* Expression vom Ort bei der Ersterkrankung einer ALL hin.

Während sich bei der Ersterkrankung somit Hinweise für einen Einfluss von IL-15 auf den Ort der Leukämie ergeben, scheint dies im Rezidiv nicht signifikant zu sein. Diesen Beobachtungen könnten biologische Unterschiede zwischen Ersterkrankung und Rezidiv zugrunde liegen. Eine Ursache für solche Unterschiede könnte damit zusammenhängen, dass ein Teil der Rezidive im Gegensatz zur Ersterkrankung ursprünglich im ZNS und durch Rückbesiedlung des Knochenmarks entsteht. Bei der Ersterkrankung entwickelt sich eine Leukämie zunächst im Knochenmark und metastasiert dann sekundär in extramedulläre Organe.⁵ Im Rezidiv scheint diese Situation vielschichtiger zu sein. Isoliert extramedulläre Rezidive finden sich fast ausschließlich im ZNS oder den Testes und somit in den Organen mit Blut-Gewebe-Schranke.²³ Ein Folgerezidiv nach isoliert extramedullärem ZNS-Rezidiv ist hingegen häufig ein isoliertes Knochenmarkrezidiv.¹¹⁷ Schon 1962 zeigten Thomas *et al.*, dass bei Mäusen, denen intracerebellär Leukämiezellen injiziert wurden, die Tumorzellen im Verlauf auch im peripheren Blut und im Knochenmark nachweisbar waren.¹¹⁸ Diese Beobachtungen können als Hinweise dafür angesehen werden, dass ein Rezidiv auch aus einem extramedullären Organ hervorgehen und das Knochenmark rückbesiedeln kann. Eckert *et al.* veröffentlichten einen interessanten Fallbericht, in dem sie ein isoliertes ZNS-Folgerezidiv charakterisierten, das mehr als 7 Jahre nach dem ersten Rezidiv aufgetreten war. Dabei zeigte dieses kaum genetische Veränderungen im

Vergleich zur Ersterkrankung.¹¹⁹ Für solche Phänomene könnte das ZNS aufgrund der dichten Blut-Gewebe-Schranke in seiner Funktion als Zufluchtsort eine besondere Rolle spielen.²⁹ Für diese Funktion des ZNS spricht auch, dass durch Verbesserungen einer zielgerichteten ZNS-Therapie die Rate an isoliert extramedullären ZNS-Rezidiven absolut und relativ deutlich gesenkt werden konnte.²³ Im Vergleich zur Ersterkrankung stellt das Rezidiv daher vermutlich eine heterogene Gruppe dar, was Ursprung und Migrationsrichtung der Leukämiezellen betrifft. Bei physiologischen Vorgängen der Migration von Lymphozyten ist die Expression eines bestimmten Zytokin- und Zytokinrezeptormusters auf Lymphozyten und in Zielgeweben notwendig, damit die Zellen in einer bestimmten Migrationsrichtung in ein bestimmtes Zielgewebe wandern können.^{120, 121} Möglicherweise zeigen in vergleichbarer Weise Leukämiezellen, die aus dem ZNS emigrieren, andere Zytokin- oder Zytokinrezeptor-Expressionsmuster als solche, die in das ZNS immigrieren. Die kombinierten Knochenmarkrezidive in der vorliegenden Arbeit könnten daher im Gegensatz zur Ersterkrankung eine Mischpopulation darstellen, so dass Assoziationen mit dem klinisch definierten Ort des Rezidivs und der *IL15* Expression nicht mehr nachgewiesen werden. Dafür spricht auch die hohe biologische Varianz der in den Gruppen gemessenen *IL15* Expression.

In der Literatur finden sich für andere Erkrankungen Hinweise dafür, dass IL-15 eine Rolle bei der Migration von Lymphozyten in das ZNS spielen kann. Physiologisch können Lymphozyten nicht in das ZNS einwandern, da die Blut-Hirn-Schranke einen Ort der strengen Invasionskontrolle darstellt.^{122, 123} In die Diapedese durch die Blut-Hirn-Schranke des ZNS sind vielmehr zahlreiche Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Rezeptoren involviert.^{124, 125} Eine Erkrankung, bei der die Invasion von Lymphozyten in das ZNS pathophysiologisch ist, stellt die Multiple Sklerose (MS) dar. Bei der MS ist die Konzentration von IL-15 im Serum signifikant erhöht,¹²⁴⁻¹²⁹ und es wird eine Schlüsselrolle von IL-15 in der Pathogenese der MS diskutiert.¹³⁰ Huang *et al.* lieferten ebenfalls Hinweise dafür, dass IL-15 bzw. $IL15R\alpha$ wichtige Faktoren bei der Immigration von Lymphozyten in das ZNS sein könnten. Sie zeigten in einem Mausmodell, dass die Einwanderung von Entzündungszellen, insbesondere T-Zellen, über die intakte Blut-Hirn-Schranke nach einem entzündlichen Stimulus sowohl bei IL-15- als auch bei $IL15R\alpha$ -defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp deutlich erniedrigt war.¹³¹ Für Leukämien und insbesondere für ALL-Rezidive des Kindesalters sind bisher keine weiterführenden Untersuchungen bezüglich einer möglichen

Bedeutung von IL-15 bei der Infiltration extramedullärer Organe und insbesondere des ZNS durchgeführt worden. Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals den Zusammenhang zwischen der *IL15* Expression und der extramedullären Beteiligung im ALL-Rezidiv des Kindesalters. Die Hinweise auf die Rolle von IL-15 bei anderen ZNS-Erkrankungen lassen die ermutigenden Vermutungen zu, dass eine weiterführende Untersuchung in einem größeren Patientenkollektiv mit ALL-Rezidiv-Patienten ein besseres Verständnis aufzeigen könnte.

7.4 *IL15* Expression in Abhängigkeit klinischer und biologischer Parameter sowie dem Überleben bei ALL-Rezidiv Patienten

Neben dem Ort des Rezidivs wurde die Assoziation der *IL15* Expression in den Leukämiezellen mit verschiedenen weiteren Parametern überprüft, die prognostische Relevanz besitzen oder Patienten mit ALL-Rezidiv näher charakterisieren. Dabei zeigte die *IL15* Expression der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenproben keine signifikante Assoziation mit dem Alter der Patienten bei Ersterkrankung, dem Geschlecht, der Risikogruppe im Rezidiv, numerischen Veränderungen des Chromosomensatzes oder der Anzahl der peripheren Blasten bei Diagnose des Rezidivs. Darüber hinaus bestand keine Assoziation zwischen der *IL15* Expression und dem Zeitpunkt des Rezidivs, der eine hohe prognostische Relevanz besitzt und in die Risikostratifizierung des ALL-Rezidivs mit eingeht (vgl. Tabelle 3.2, S. 9).²⁵

Die *IL15* Expression war ebenfalls nicht mit dem Vorliegen von bekannten leukämieassoziierten Fusionsgenen assoziiert. Das häufigste Fusionsgen *ETV6/RUNX1* lag bei neun ALL-Patienten vor. Es ist mit einer besseren Prognose assoziiert.¹³² Die *IL15* Expression der Leukämiezellen dieser Patienten unterschied sich nicht von der Leukämiezellen ohne diese Translokation (vergl. Tabelle 6.8, S. 52). Die Translokationen t(9;22) mit dem Fusionsgen *BCR/ABL* bzw. t(4;11) mit dem Fusionsgen *MLL/AFF1* wurden nur in den Leukämiezellen von jeweils 2 Patienten gefunden. Für beide Translokationen ist ein negativer Effekt auf die Prognose bekannt.⁶ In der Untersuchung von Wu *et al.* an erwachsenen Patienten mit Ersterkrankung einer T- oder B-Vorläuferzell-ALL war die *IL15* Expression bei Vorliegen einer *BCR/ABL*-positiven Leukämie signifikant vermindert.¹¹³ In unserer Arbeit hatten die zwei *BCR/ABL*-positiven Patienten hingegen eine eher hohe *IL15* Expression. Eine Aussage

darüber, ob und in welcher Weise sich die *IL15* Expression bei BCR/ABL-positiven ALL-Rezidiven unterscheidet, ist jedoch aufgrund der kleinen Zahlen in der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

Ein Unterschied in der *IL15* Expression fand sich beim Vergleich der verschiedenen Risikogruppen. Patienten der Risikogruppe S3 zeigten eine deutlich niedrigere *IL15* Expression in den Leukämiezellen im Vergleich zu den Risikogruppen S2 und S4 (vgl. Tabelle 6.9, S. 53). Die Risikogruppe S3 beinhaltet ausschließlich frühe isolierte Knochenmarkrezidive, während die Gruppen S2 und S4 Mischgruppen aus isolierten und kombinierten Knochenmarkrezidiven darstellen (vgl. Tabelle 3.2, Seite 9). Da isolierte Knochenmarkrezidive tendenziell eine niedrigere *IL15* Expression zeigten (vgl. Abschnitt 6.4, Seite 42 und Tabelle 6.6, Seite 47), beruhen die Unterschiede in der *IL15* Expression der verschiedenen Risikogruppen am ehesten auf den Einteilungskriterien dieser Gruppen.

In der vorliegenden Arbeit bestanden keine Assoziationen zwischen der *IL15* Expression in den Leukämiezellen und Unterschieden bezüglich des OS, des EFS, der Art der Folgeereignisse oder dem Auftreten von Folgerezidiven. Somit zeigte sich kein Einfluss der *IL15* Expression auf wesentliche Parameter des weiteren klinischen Verlaufs nach erstem ALL-Rezidiv. Zwei andere Studien, die die *IL15* Expression in Leukämiezellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose untersuchten, beschrieben hingegen signifikante Unterschiede in der Prognose in Abhängigkeit von der *IL15* Expression. In der Studie von Cario *et al.* an Leukämiezellen von Kindern mit B-Vorläuferzell-ALL war eine hohe *IL15* Expression mit einem höheren Risiko für eine ZNS-Beteiligung im ersten Rezidiv verbunden.¹² Wu *et al.* beschrieben bei Erwachsenen mit akuter Leukämie und Leukämiezellen mit hoher *IL15* Expression ein tendenziell kürzeres sowie innerhalb der B-Vorläuferzell-ALLs ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben. Das OS hingegen war unabhängig von der *IL15* Expression.¹¹³ Somit scheint die *IL15* Expression Einfluss auf die Prognose der Ersterkrankung einer ALL zu haben. Unsere Daten weisen darauf hin, dass IL-15 jedoch für die Prognose des kindlichen ALL-Rezidivs insgesamt keine oder eine untergeordnete Rolle spielt. Diskrepante Beobachtungen zwischen Ersterkrankung und ALL-Rezidiv könnten dabei Hinweise für unterschiedliche Mechanismen von IL-15 in Ersterkrankung und Rezidiv sein.

7.5 Expression von *IL15* in Abhängigkeit vom Immunphänotyp

Eine interessante Beobachtung wurde in der vorliegenden Studie bezüglich der *IL15* Expression und dem Immunphänotyp gemacht: T-ALL-Rezidive zeigten eine signifikant höhere *IL15* Expression als B-Vorläuferzell-ALL-Rezidive. Unter den Patienten mit sehr hoher *IL15* Expression in den Leukämiezellen im oberen Quartil fanden sich drei der vier Patienten mit T-ALL-Rezidiv ($p=0,047$, vergl. Tabelle 6.7, S. 48). Mit einem p -Wert von 0,032 zeigte sich auch in der parametrischen Testung der Daten eine signifikant höhere *IL15* Expression in T-ALL-Rezidiven als in B-Vorläuferzell-Rezidiven (vergl. Boxplots in Abbildung 6.11, S. 49). Diese Beobachtung bestätigte sich darüber hinaus in der Reanalyse von Genexpressionsdaten einer zweiten Patientenkohorte mit sieben anderen Patienten mit T-ALL-Rezidiv (vergl. Abbildung 6.12, S. 50). Unsere Ergebnisse weisen Parallelen auf zu den Untersuchungen von Wu *et al.* an erwachsenen Patienten mit Erstdiagnose einer ALL, bei denen T-ALLs ebenfalls eine signifikant höhere *IL15* Expression aufwiesen.¹¹³ T-ALLs unterscheiden sich auch in ihrem klinischen Verlauf von B-ALLs. Sie haben generell eine schlechtere Prognose, weisen eine höhere Proliferationsrate sowie eine höhere Rezidivrate auf und zeigen häufiger einen ZNS-Befall oder eine andere extramedulläre Beteiligung.^{4, 25, 31, 133-135} Diese Aspekte weisen auf biologische Unterschiede der Leukämiezellen verschiedenen Immunphänotyps hin. Möglicherweise könnte dabei auch IL-15 eine Rolle spielen.

Während sich normale periphere T-Zellen nur durch eine sehr geringe *IL15* Expression auszeichnen, wurde eine hohe *IL15* Expression schon bei anderen Arten von T-Zell-Leukämien beschrieben. In gesunden, frisch isolierten peripheren T-Zellen konnten verschiedene Autoren keine oder nur sehr geringe Mengen an *IL15* mRNA nachweisen.^{62, 65, 59} Auch in CD3+ T-Lymphoblasten aus peripherem Blut gesunder Spender besteht nur eine niedrige konstitutionelle *IL15* Expression.¹³⁶ Demgegenüber liegt bei der ATL eine starke Überexpression von IL-15 vor. Dies wurde zunächst von Burton und Bamford *et al.* für die ATL Zelllinie HuT102 beschrieben^{62, 64} und später von Azimi *et al.* auch an Patienten mit ATL bestätigt.⁵⁹ Die ATL stellt eine Sonderform der T-Zell-Leukämien dar. Ihr liegt eine Infektion mit HTLV-1 zugrunde.⁹² Dieses Retrovirus kann in der Promotorregion des *IL15*-Gens inserieren. Dabei geht ein Abschnitt von etwa 200 Basenpaaren verloren, der die meisten der multiplen Startkodons von *IL15* enthält.⁶² Dadurch wird ein wichtiger Teil der posttranskriptionellen Regulationsmechanismen von IL-15 ausgeschaltet, und in der Folge steigt die

Expression des Proteins deutlich an.⁶³ Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass die hohe *IL15* Expression bei der ATL einen pathologischen Zustand der Leukämiezellen im Vergleich zu gesunden T-Zellen darstellt. Untersuchungen mit *IL15*-transgenen Mäusen haben ebenfalls Assoziationen zwischen einer hohen *IL15* Expression und der Entstehung von Leukämien aufgezeigt. *IL15*-transgene Mäusen mit einer starken Überexpression des murinen IL-15 entwickeln eine Leukämie vom NK-/T-Zell-LGL-Typ (LGL = engl. large granular lymphocyte = große granulierte Lymphozyten).^{137, 138} Während für andere Entitäten der Leukämien somit bereits Hinweise auf eine Rolle von IL-15 bekannt sind, ist die in der vorliegenden Arbeit beobachtete hohe *IL15* Expression in T-ALL-Rezidiven des Kindesalters neu. Möglicherweise könnte die Überexpression von *IL15* in T-ALL-Rezidiven eine bisher nicht bekannte pathogenetische Bedeutung haben.

Im physiologischen Kontext produzieren T-Zellen zwar selbst kaum IL-15, sind jedoch wichtige Zielzellen: IL-15 wirkt sowohl auf T-Lymphozyten als auch auf T-Lymphoblasten proliferationsfördernd.^{65, 136, 139} Für NK/T-Zellen scheint IL-15 sogar essenziell zu sein, da *IL15* defiziente Mäuse einen Mangel an diesen Zellen aufweisen, der durch exogene *IL15* Zufuhr wieder aufgehoben werden kann.¹⁴⁰ Wie sich eine gesteigerte *IL15* Expression auf T-Zellen auswirkt, wurde von Hsu *et al.* untersucht. Sie transfizierten normale T-Zellen mit einem modifizierten *IL15*-Gen. Es kam es zu einer stark gesteigerten IL-15-Produktion und dadurch zu einer erhöhten Proliferations- und einer geringeren Apoptoserate der T-Zellen. Während die Proliferation von T-Zellen im physiologischen Zusammenhang zytokinabhängig ist, konnten die transfizierten T-Zellen autark ohne externen Zytokineinfluss überleben und proliferieren.¹⁴¹ Diese Arbeit lässt darauf schließen, dass eine Überexpression von *IL15* in T-Zellen womöglich deren Homöostase stört. Auch für andere Tumorarten wurde eine gesteigerte *IL15* Expression mit einer hohen Proliferationsrate bzw. Metastasierung in Verbindung gebracht. Beispielsweise haben Kolon-Karzinomzellen, die *IL15* exprimieren, eine höhere Proliferationsrate⁹⁵ und im Mausmodell eine stärkere Metastasierung.⁹⁴ Bei Nierenkarzinomen scheint eine hohe *IL15* Expression mit einer ausgeprägten Proliferation und einer verstärkten epithelial-mesenchymalen Transition im Zusammenhang zu stehen.⁹⁷ Auch T-Zell-Leukämien des Kindesalters zeichnen sich gegenüber B-Vorläuferzell-Leukämien durch eine höhere Proliferationsrate aus.⁴

Möglicherweise könnte dabei die von uns beobachtete signifikant erhöhte *IL15* Expression eine Rolle spielen.

Als zu Grunde liegender pathogenetischer Mechanismus für eine hohe Proliferation wurde bei anderen hämatoonkologischen Erkrankungen mehrfach eine autokrine oder parakrine Wirkung von IL-15 postuliert.^{93, 142-145} Beispielsweise untersuchten Sato *et al.* mehr als 150 *IL15*-transgene Mäuse über einen Zeitraum von 2 Jahren. Die Mäuse entwickelten zunächst eine benigne Lymphoproliferation und später eine leukämische Transformation vom NK-/T-Zell-LGL-Typ. Die leukämischen Mäuse zeichneten sich zusätzlich zu einer gesteigerten *IL15* Expression durch eine permanent erhöhte Expression von IL-15R α auf den leukämischen T-Zellen aus, während bei benigner Lymphoproliferation IL-15R α nur vorübergehend nach Aktivierung auf den T-Zellen exprimiert wurde. IL-15R α -defiziente-*IL15*-transgene Mäuse entwickelten keine leukämische Transformation, während IL-15R α -/*IL15*-transgene Mäuse eine rasch zum Tode führende Leukämie entwickelten. Nur Zellen, die sich sowohl durch eine erhöhte *IL15* Expression als auch durch eine permanente Expression von IL-15R α auszeichneten, konnten somit leukämisch entarten.¹⁴⁴ Aus diesem Modell leiteten Sato *et al.* ab, dass IL-15 anhand eines autokrinen Loops auf die Tumorzellen selbst wirkt und dieser zur Tumorgenese beiträgt, dafür jedoch gleichzeitig eine permanente Expression von IL-15R α notwendig sei. Ein zweiter autokriner oder parakriner Wirkmechanismus von IL-15 wurde von Kukita *et al.* erstmals 2002 für die ATL postuliert. Kukita *et al.* untersuchten Leukämiezellen von Patienten mit ATL. In der Zellkultur zeigten diese Zellen auch ohne Zugabe von Zytokinen ein autonomes Wachstum. Dieses konnte durch die Zugabe von IL-15 konzentrationsabhängig gesteigert werden. Gleichzeitig wiesen Kukita *et al.* die Expression von IL-15-mRNA und von IL-15-Protein nach.¹⁴³ Bereits einige Jahre zuvor konnten Bamford *et al.* anhand der ATL-Zelllinie HuT102 zeigen, dass die pathologisch hohe *IL15* Expression bei ATL auf einem partiellen Verlust der physiologischerweise starken Regulationsmechanismen der Expression beruht (näher ausgeführt auf S. 66).⁶² Kukita *et al.* schlossen aus ihren Beobachtungen, dass IL-15 in autokriner oder parakriner Form an der Tumorprogression beteiligt ist.¹⁴³ Tinhofer *et al.* postulierten einen autokrinen Loop für eine dritte Entität: das multiple Myelom, das eine maligne Entartung der aus reifen B-Zellen entstehenden Plasmazellen darstellt.¹⁴⁵ Der IL-15-Rezeptor verfügt über drei Untereinheiten: IL-15R α , IL2/15R β und γ_c (näher erläutert in Kapitel

3.2.2).^{49, 50, 146} Tinhofer *et al.* untersuchten Zelllinien und Patienten mit multiplem Myelom und wiesen in allen Zelllinien sowie Patientenproben die Expression aller drei IL-15-Rezeptorkomponenten nach.¹⁴⁵ Interessanterweise wurde die Expression von IL15R α nicht durch Zugabe von IL-15 gehemmt, wie es für normale Lymphozyten beschrieben wurde.^{145, 147} Darüber hinaus zeigten die meisten Zellen eine Expression von IL-15-mRNA bzw. IL-15-Protein. Tinhofer *et al.* wiesen auch einen antiapoptotischen Effekt von IL-15 auf die Myeloma-Zellen nach. Nach Zugabe von IL-15 wurde die Apoptose der Tumorzellen gehemmt, während sie bei Inkubation mit einem IL-15-Antikörper anstieg. Die Autoren kamen daher zu dem Schluss, dass IL-15 in Form einer autokrinen Wirkung an der Tumorprogression des Multiplen Myeloms beteiligt ist.¹⁴⁵ Diese Beobachtungen anderer Autoren geben Hinweise darauf, dass eine pathologisch erhöhte *IL15* Expression in verschiedenen anderen hämatoonkologischen Tumorentitäten möglicherweise über eine autokrine Stimulation zur Tumorprogression beiträgt. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals zeigen, dass auch maligne entartete T-Zellen im T-ALL-Rezidiv des Kindesalters eine signifikant erhöhte *IL15* Expression aufweisen. Möglicherweise könnte auch beim T-ALL-Rezidiv des Kindesalters eine autokrine Wirkung von IL-15 zur Tumorprogression beitragen. Um diese Frage zu beantworten, sollte die Expression von IL-15 sowie seiner Rezeptorkomponenten in einer größeren Patientenkohorte mit T-ALL-Rezidiv untersucht werden. Da Wu *et al.* bei erwachsenen Patienten auch eine erhöhte *IL15* Expression in T-ALL-Zellen der Ersterkrankung beschrieben, könnten die Nachforschungen auch Patienten mit Ersterkrankung einer T-ALL mit einbeziehen.¹¹³ Eine experimentelle Hemmung von IL-15 bzw. seiner Rezeptorkomponenten könnte untersuchen, inwieweit sich dies auf die Tumorproliferation auswirkt. Da IL-15 ungewöhnlich starken Regulationsmechanismen unterliegt (vergl. 3.2.4, S. 14), könnte eine Untersuchung dieser Mechanismen mögliche pathogenetische Veränderungen in den Tumorzellen aufzeigen, ähnlich wie es für die ATL bereits gelungen ist.⁶²

7.6 IL-15 als therapeutisches Target

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sich einige ALL-Rezidive durch eine sehr hohe *IL15* Expression auszeichnen. Auch wenn sich aufgrund kleiner Patientenzahlen keine Assoziationen mit klinischen, genetischen oder prognostischen Parametern zeigen ließen, könnte IL-15 in dieser Subgruppe eine pathogenetische

Bedeutung haben und somit eine neue therapeutische Interventionsmöglichkeit darstellen. Darüber hinaus konnte die vorliegende Arbeit erstmals zeigen, dass sich T-ALL-Rezidive des Kindesalters durch eine signifikant höhere *IL15* Expression auszeichnen. Insbesondere für T-ALL-Rezidive, die bisher eine schlechte Prognose aufweisen, könnten daraus neue therapeutische Ansätze entwickelt werden.

Um in die Wirkung von IL-15 einzugreifen, kommen prinzipiell therapeutische Interventionen in Betracht, die IL-15 selbst, den IL-15-Rezeptor oder dessen intrazelluläre Signalkaskade hemmen.¹⁴⁸ Bisher sind keine solcher Medikamente zugelassen, befinden sich aber im Rahmen verschiedener anderer Erkrankungen in der Entwicklung oder Erprobung. Ein monoklonaler Antikörper gegen IL-15 ist HuMax-IL-15 (AMG714). Dabei handelt es sich um einen monoklonalen humanen IgG1-anti-IL-15-Antikörper, der an membrangebundenes IL-15 bindet und die weitere Signalkaskade blockiert.¹⁴⁹ Ein Antagonist des IL2/15R β steht mit dem Antikörper Hu-Mik- β -1 zur Verfügung. Hu-Mik- β -1 blockiert die Wirkung von IL-15, wenn dieses im Rahmen einer Zell-Zell-Interaktion trans-präsentiert wird, nicht aber bei einer Wirkung von IL-15 über cis-Präsentation (vergl.3.2.313).⁹⁸ Ein weiterer IL-15 Antagonist steht in Form eines Fusionsproteins aus einem veränderten IL-15-Protein und IgG1 zur Verfügung (MutIL15/Fc). Dieses Protein bindet an IL15R α , ohne eine intrinsische Aktivität zu haben. Aufgrund der Selektivität von IL15R α , der spezifisch nur IL-15 bindet, unterbricht dieser Antikörper selektiv nur Wirkungen von IL-15.¹⁵⁰ Darüber hinaus kommen prinzipiell auch Hemmstoffe des JAK/STAT Signalweges in Frage, über den die Signalkaskade intrazellulär weiter vermittelt wird. Hemmstoffe des JAK/STAT Signalweges befinden sich für die Anwendung bei anderen Erkrankungen bereits in fortgeschrittenen Entwicklungsstufen.¹⁵¹ Da IL-15 in Lymphozyten JAK1 und JAK 3 sowie STAT3 und STAT5 aktiviert, könnten für die Therapie des ALL-Rezidivs Substanzen wie der JAK 1/3 Inhibitor Ruxolitinib interessant sein, der sich für eine Anwendung bei anderen Erkrankungen bereits in einer Phase III Studie befindet.^{148, 151}

Um mögliche therapeutische Ansätze anhand einer Intervention am IL-15-Signalweg im ALL-Rezidiv des Kindesalters abzuleiten, ist ein tieferes Verständnis der Wirkungsweise von IL-15 im ALL-Rezidiv notwendig. Dabei spielt es auch eine Rolle, ob IL-15 insbesondere beim T-ALL-Rezidiv möglicherweise über einen autokrinen Loop wirkt, wie dies unter anderem für die LGL beschrieben wurde.¹⁴⁴ In dieser Tumor-Entität

hatte der IL2/IL15R β -Antagonist Hu-Mik- β -1 keinen klinischen Erfolg, da er nur bei trans-Präsentation von IL-15 hemmend wirken kann.⁹⁸ Andere der oben beschriebenen Substanzen könnten möglicherweise jedoch neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen. Daher sollte die pathogenetische Bedeutung und Wirkungsweise von IL-15 im ALL-Rezidiv in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Insbesondere für Patienten mit T-ALL-Rezidiv, die eine signifikant erhöhte *IL15* Expression charakterisiert, könnte dann möglicherweise die bisher schlechte Prognose positiv beeinflusst werden.

7.7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die *IL15* Expression in Knochenmark-Leukämiezellproben von einem wesentlichen Teil der Kinder mit extramedullärer Beteiligung bei erstem ALL-Rezidiv, die zwischen Januar 2002 und Januar 2006 in die Therapieoptimierungsstudie ALL-REZ BFM 2002 aufgenommen wurden, untersucht. Der Zusammenhang zwischen dem Ort des Rezidivs und der *IL15* Expression war dabei nur schwach. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen bei Kindern mit Ersterkrankung einer ALL, bei der eine hohe *IL15* Expression in den Leukämiezellen mit einer ZNS-Beteiligung zusammenhing.¹² Diese Diskrepanz könnte darin begründet sein, dass das Rezidiv bezüglich der Migrationsrichtung der Leukämiezellen anders als bei der Ersterkrankung eine heterogene Gruppe darstellt. Ein Teil der kombinierten Rezidive entsteht vermutlich nicht im Knochenmark, sondern in den extramedullären Organen, besiedelt dann sekundär das Knochenmark und benötigt somit vermutlich andere Zytokinmuster.¹¹⁷⁻¹²⁰

Die vorliegende Studie konnte jedoch erstmals zeigen, dass T-ALL-Rezidive eine signifikant erhöhte *IL15* Expression zeigen. Da T-Zellen im physiologischen Kontext kaum selbst IL-15 produzieren, aber unter dessen Einfluss vermehrt proliferieren, könnte die erhöhte *IL15* Expression möglicherweise im Rahmen eines autokrinen Loops zur Pathogenese der T-ALL-Rezidive beitragen.^{59, 62, 64-66} Ein solcher Mechanismus wurde bereits für andere Entitäten beschrieben.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Unsere Daten deuten dies jedoch erstmals für das T-ALL-Rezidiv des Kindesalters an. Damit eröffnen sich möglicherweise neue therapeutische Ansatzpunkte in Form einer Hemmung von IL-15 oder dessen Signalweg. Dazu könnten verschiedene Formen von IL-15- und IL-15-Rezeptor-Antagonisten sowie Hemmstoffe des JAK/STAT-Signalweges genutzt

werden, die sich im Rahmen von anderen Erkrankungen in Entwicklung befinden.^{98, 148-151} Um neue therapeutische Ansätze zu entwickeln, ist ein tieferes Verständnis der pathogenetischen Bedeutung und Wirkungsweise von IL-15 beim ALL-Rezidiv notwendig. Um dies zu erreichen, sollten die Untersuchungen an einer größeren Patientenkohorte validiert und vertieft werden. Auf diese Weise könnten sich neue Möglichkeiten eröffnen, die Prognose von Kindern mit ALL-Rezidiv weiter zu verbessern.

8 Literaturverzeichnis

1. Jahresbericht 2011 des Deutschen Kinderkrebsregisters.
www.kinderkrebsregister.de (2011).
2. Smith MA, Seibel NL, Altekruse SF, Ries LA, Melbert DL, O'Leary M, Smith FO & Reaman GH. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol* 28, 2625-34 (2010).
3. Moricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dordelmann M, Loning L, Beier R, Ludwig WD, Ratei R, Harbott J, Boos J, Mann G, Niggli F, Feldges A, Henze G, Welte K, Beck JD, Klingebiel T, Niemeyer C, Zintl F, Bode U, Urban C, Wehinger H, Niethammer D, Riehm H & Schrappe M. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 111, 4477-89 (2008).
4. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S & Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 29, 551-65 (2010).
5. Pui CH, Robison LL & Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371, 1030-43 (2008).
6. Pui CH, Relling MV & Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350, 1535-48 (2004).
7. Pane F, Intrieri M, Quintarelli C, Izzo B, Muccioli GC & Salvatore F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene* 21, 8652-67 (2002).
8. Buske C & Humphries RK. Homeobox genes in leukemogenesis. *Int J Hematol* 71, 301-8 (2000).
9. Rössig C & Jürgens H. Akute Leukämien bei Kindern und Jugendlichen. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 157, 695–705 (2009).
10. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A & van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9, 1783-6 (1995).
11. Buonamici S, Trimarchi T, Ruocco MG, Reavie L, Cathelin S, Mar BG, Klinakis A, Lukyanov Y, Tseng JC, Sen F, Gehrie E, Li M, Newcomb E, Zavadil J, Meruelo

- D, Lipp M, Ibrahim S, Efstratiadis A, Zagzag D, Bromberg JS, Dustin ML & Aifantis I. CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature* 459, 1000-4 (2009).
12. Cario G, Izraeli S, Teichert A, Rhein P, Skokowa J, Moricke A, Zimmermann M, Schrauder A, Karawajew L, Ludwig W-D, Welte K, Schunemann HJ, Schlegelberger B, Schrappe M & Stanulla M. High Interleukin-15 Expression Characterizes Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia With Involvement of the CNS. *J Clin Oncol* 25, 4813-4820 (2007).
 13. Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R, Fengler R, Schrappe M, Janka-Schaub G, Mann G, Hahlen K, Gobel U, Klingebiel T, Ludwig WD & Henze G. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87. *J Clin Oncol* 23, 7942-50 (2005).
 14. Uckun FM, Gaynon PS, Sensel MG, Nachman J, Trigg ME, Steinherz PG, Hutchinson R, Bostrom BC, Sather HN & Reaman GH. Clinical features and treatment outcome of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T-lineage leukemic blasts: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 15, 2214-21 (1997).
 15. Jeha S, Pei D, Raimondi SC, Onciu M, Campana D, Cheng C, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Howard SC, Downing JR, Evans WE, Relling MV & Pui CH. Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia* 23, 1406-9 (2009).
 16. Hasle H, Clemmensen IH & Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet* 355, 165-9 (2000).
 17. Chessels JM, Swansbury GJ, Reeves B, Bailey CC & Richards SM. Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukaemia: results of MRC UKALL X. Medical Research Council Working Party in Childhood Leukaemia. *Br J Haematol* 99, 93-100 (1997).
 18. Jackson JF, Boyett J, Pullen J, Brock B, Patterson R, Land V, Borowitz M, Head D & Crist W. Favorable prognosis associated with hyperdiploidy in children with acute lymphocytic leukemia correlates with extra chromosome 6. A Pediatric Oncology Group study. *Cancer* 66, 1183-9 (1990).

19. Gaynon PS, Trigg ME, Heerema NA, Sensel MG, Sather HN, Hammond GD & Bleyer WA. Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. *Leukemia* 14, 2223-33 (2000).
20. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, Gadner H, Odenwald E & Riehm H. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia* 14, 2205-22 (2000).
21. Loning L, Zimmermann M, Reiter A, Kaatsch P, Henze G, Riehm H & Schrappe M. Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy. *Blood* 95, 2770-5 (2000).
22. Escherich G, Horstmann MA, Zimmermann M & Janka-Schaub GE. Cooperative study group for childhood acute lymphoblastic leukaemia (COALL): long-term results of trials 82,85,89,92 and 97. *Leukemia* 24, 298-308 (2010).
23. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, Ludwig WD, Ritter J, Harbott J, Mann G, Klingebiel T, Zintl F, Niemeyer C, Kremens B, Niggli F, Niethammer D, Welte K, Stanulla M, Odenwald E, Riehm H & Schrappe M. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 24, 265-84 (2010).
24. van der Does-van den Berg A, Bartram CR, Basso G, Benoit YC, Biondi A, Debatin KM, Haas OA, Harbott J, Kamps WA, Koller U & et al. Minimal requirements for the diagnosis, classification, and evaluation of the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) in the "BFM Family" Cooperative Group. *Med Pediatr Oncol* 20, 497-505 (1992).
25. Tallen G, Ratei R, Mann G, Kaspers G, Niggli F, Karachunsky A, Ebell W, Escherich G, Schrappe M, Klingebiel T, Fengler R, Henze G & von Stackelberg A. Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. *J Clin Oncol* 28, 2339-47 (2010).
26. Stackelberg A & Henze G. Rezidive der akuten lymphoblastischen Leukämie. in: *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, S. 680-689 (2006).

27. Klumper E, Pieters R, Veerman AJ, Huismans DR, Loonen AH, Hahlen K, Kaspers GJ, van Wering ER, Hartmann R & Henze G. In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 86, 3861-8 (1995).
28. Gaynon PS, Qu RP, Chappell RJ, Willoughby ML, Tubergen DG, Steinherz PG & Trigg ME. Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse--the Children's Cancer Group Experience. *Cancer* 82, 1387-95 (1998).
29. Stackelberg A & Henze G. Relapsed acute lymphoblastic leukemia. in: *Childhood Leukemias*, ed. Ching-Hong Pui. Cambridge University Press (2006).
30. Eckert C, von Stackelberg A, Seeger K, Groeneveld TW, Peters C, Klingebiel T, Borkhardt A, Schrappe M, Escherich G & Henze G. Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia - Long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96. *Eur J Cancer* (2013).
31. Henze G, Fengler R, Hartmann R, Dopfer R, Gobel U, Graf N, Jurgens H, Niethammer D, Ritter J, Schellong G & et al. Chemotherapy for bone marrow relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 24 Suppl 1, S16-9 (1989).
32. Buhner C, Hartmann R, Fengler R, Dopfer R, Gadner H, Gerein V, Gobel U, Reiter A, Ritter J & Henze G. Superior prognosis in combined compared to isolated bone marrow relapses in salvage therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 21, 470-6 (1993).
33. Henze G, Fengler R, Hartmann R, Kornhuber B, Janka-Schaub G, Niethammer D & Riehm H. Six-year experience with a comprehensive approach to the treatment of recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL-REZ BFM 85). A relapse study of the BFM group. *Blood* 78, 1166-72 (1991).
34. (<http://paedonko.charite.de/forschung/>, Zugriff am 24.01.2013).
35. Dobke J. (www.kinderkrebsinfo.de, 21.11.2012 (Zugriff am 24.01.2013)).
36. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, San Miguel JF & van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2, 409-17 (2001).
37. Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyermann B, Pogodda M, Proba J & Henze G. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 358, 1239-41 (2001).

38. Henze G, Fengler R, Stackelberg A & Klingebiel T. Protokoll zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie. Therapieprotokoll zur Studie ALL-REZ BFM 2002 (2003).
39. Buhner C, Hartmann R, Fengler R, Schober S, Arlt I, Loewke M & Henze G. Importance of effective central nervous system therapy in isolated bone marrow relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) Relapse Study Group. *Blood* 83, 3468-72 (1994).
40. Anderson DM, Johnson L, Glaccum MB, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Valentine V, Kirstein MN, Shapiro DN, Morris SW & et al. Chromosomal assignment and genomic structure of IL15. *Genomics* 25, 701-6 (1995).
41. Krause H, Jandrig B, Wernicke C, Bulfone-Paus S, Pohl T & Diamantstein T. Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15). *Cytokine* 8, 667-74 (1996).
42. Meazza R, Verdiani S, Biassoni R, Coppolecchia M, Gaggero A, Orengo AM, Colombo MP, Azzarone B & Ferrini S. Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene* 12, 2187-92 (1996).
43. Stonier SW & Schluns KS. Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol Lett* 127, 85-92 (2010).
44. Tagaya Y, Kurys G, Thies TA, Losi JM, Azimi N, Hanover JA, Bamford RN & Waldmann TA. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14444-9 (1997).
45. Bergamaschi C, Jalah R, Kulkarni V, Rosati M, Zhang GM, Alicea C, Zolotukhin AS, Felber BK & Pavlakis GN. Secretion and biological activity of short signal peptide IL-15 is chaperoned by IL-15 receptor alpha in vivo. *J Immunol* 183, 3064-72 (2009).
46. Onu A, Pohl T, Krause H & Bulfone-Paus S. Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms. *J Immunol* 158, 255-62 (1997).
47. Gaggero A, Azzarone B, Andrei C, Mishal Z, Meazza R, Zappia E, Rubartelli A & Ferrini S. Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms. *Eur J Immunol* 29, 1265-74 (1999).
48. Steel JC, Waldmann TA & Morris JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 33, 35-41 (2012).

49. Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M, Bertles J, Tometsko M, Loomis A, Giri J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA & et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem* 270, 29862-9 (1995).
50. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D & Anderson D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J* 13, 2822-30 (1994).
51. Asao H, Okuyama C, Kumaki S, Ishii N, Tsuchiya S, Foster D & Sugamura K. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 167, 1-5 (2001).
52. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X & Leonard WJ. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 262, 1877-80 (1993).
53. Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedmann MC, Miyajima A, Puri RK, Paul WE & et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 262, 1880-3 (1993).
54. Kimura Y, Takeshita T, Kondo M, Ishii N, Nakamura M, Van Snick J & Sugamura K. Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex. *Int Immunol* 7, 115-20 (1995).
55. Tagaya Y, Burton JD, Miyamoto Y & Waldmann TA. Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. *Embo J* 15, 4928-39 (1996).
56. Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, DuBose R, Cosman D, Park LS & Anderson DM. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *Embo J* 14, 3654-63 (1995).
57. Dubois S, Mariner J, Waldmann TA & Tagaya Y. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* 17, 537-47 (2002).
58. Bergamaschi C, Bear J, Rosati M, Beach RK, Alicea C, Sowder R, Chertova E, Rosenberg SA, Felber BK & Pavlakis GN. Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15Ralpha in human and mouse serum. *Blood* 120, e1-8 (2012).

59. Azimi N, Brown K, Bamford RN, Tagaya Y, Siebenlist U & Waldmann TA. Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2452-7 (1998).
60. Budagian V, Bulanova E, Paus R & Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 259-80 (2006).
61. Waldmann TA & Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* 17, 19-49 (1999).
62. Bamford RN, Battiata AP, Burton JD, Sharma H & Waldmann TA. Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2897-902 (1996).
63. Bamford RN, DeFilippis AP, Azimi N, Kurys G & Waldmann TA. The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control. *J Immunol* 160, 4418-26 (1998).
64. Burton JD, Bamford RN, Peters C, Grant AJ, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E & Waldmann TA. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4935-9 (1994).
65. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M & et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264, 965-8 (1994).
66. Fehniger TA & Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97, 14-32 (2001).
67. Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Ravarino D, Giovarelli M, Malavasi F, Ponzi AN, Paus R & Bulfone-Paus S. Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood* 93, 3531-9 (1999).

68. Doherty TM, Seder RA & Sher A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* 156, 735-41 (1996).
69. Rappl G, Kapsokefalou A, Heuser C, Rossler M, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U & Abken H. Dermal fibroblasts sustain proliferation of activated T cells via membrane-bound interleukin-15 upon long-term stimulation with tumor necrosis factor-alpha. *J Invest Dermatol* 116, 102-9 (2001).
70. Lee YB, Satoh J, Walker DG & Kim SU. Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. *Neuroreport* 7, 1062-6 (1996).
71. Satoh J, Kurohara K, Yukitake M & Kuroda Y. Interleukin-15, a T-cell growth factor, is expressed in human neural cell lines and tissues. *J Neurol Sci* 155, 170-7 (1998).
72. Armitage RJ, Macduff BM, Eisenman J, Paxton R & Grabstein KH. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J Immunol* 154, 483-90 (1995).
73. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, Anderson D, Eisenmann J, Grabstein K & Caligiuri MA. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 180, 1395-403 (1994).
74. Masuda A, Matsuguchi T, Yamaki K, Hayakawa T & Yoshikai Y. Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression. *J Biol Chem* 276, 26107-13 (2001).
75. Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T, Lindner G, Paus R, Ruckert R, Krause H & Kundendorf U. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat Med* 3, 1124-8 (1997).
76. Demirci G & Li XC. IL-2 and IL-15 exhibit opposing effects on Fas mediated apoptosis. *Cell Mol Immunol* 1, 123-8 (2004).
77. Dubois SP, Waldmann TA & Muller JR. Survival adjustment of mature dendritic cells by IL-15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8662-7 (2005).
78. Girard D, Paquet ME, Paquin R & Beaulieu AD. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 88, 3176-84 (1996).
79. Hoontrakoon R, Chu HW, Gardai SJ, Wenzel SE, McDonald P, Fadok VA, Henson PM & Bratton DL. Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in

- human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and nuclear factor-kappaB activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 404-12 (2002).
80. Perera PY, Lichy JH, Waldmann TA & Perera LP. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect* 14, 247-61 (2011).
 81. Gonzalez-Alvaro I, Ortiz AM, Garcia-Vicuna R, Balsa A, Pascual-Salcedo D & Laffon A. Increased serum levels of interleukin-15 in rheumatoid arthritis with long- term disease. *Clin Exp Rheumatol* 21, 639-42 (2003).
 82. Andersson AK, Feldmann M & Brennan FM. Neutralizing IL-21 and IL-15 inhibits pro-inflammatory cytokine production in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 68, 103-11 (2008).
 83. Waldmann TA. Targeting the interleukin-15/interleukin-15 receptor system in inflammatory autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 6, 174-7 (2004).
 84. Oppenheimer-Marks N, Brezinschek RI, Mohamadzadeh M, Vita R & Lipsky PE. Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells In vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model In vivo. *J Clin Invest* 101, 1261-72 (1998).
 85. McInnes IB & Liew FY. Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol Today* 19, 75-9 (1998).
 86. McInnes IB, al-Mughales J, Field M, Leung BP, Huang FP, Dixon R, Sturrock RD, Wilkinson PC & Liew FY. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 2, 175-82 (1996).
 87. Schulthess J, Meresse B, Ramiro-Puig E, Montcuquet N, Darce S, Begue B, Ruellemele F, Combadiere C, Di Santo JP, Buzoni-Gatel D & Cerf-Bensussan N. Interleukin-15-dependent NKp46+ innate lymphoid cells control intestinal inflammation by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity* 37, 108-21 (2012).
 88. Brandtzaeg P. The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Lett* 105, 127-39 (2006).
 89. Meresse B, Malamut G & Cerf-Bensussan N. Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity* 36, 907-19 (2012).
 90. Epron G, Ame-Thomas P, Le Priol J, Pangault C, Dulong J, Lamy T, Fest T & Tarte K. Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular

- lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia* 26, 139-48.
91. Ishii H, Takahara M, Nagato T, Kis LL, Nagy N, Kishibe K, Harabuchi Y & Klein E. Monocytes enhance cell proliferation and LMP1 expression of nasal natural killer/T-cell lymphoma cells by cell contact-dependent interaction through membrane-bound IL-15. *Int J Cancer* 130, 48-58.
 92. Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). *Retrovirology* 2, 27 (2005).
 93. Barzegar C, Meazza R, Pereno R, Pottin-Clemenceau C, Scudeletti M, Brouty-Boye D, Doucet C, Taoufik Y, Ritz J, Musselli C, Mishal Z, Jasmin C, Indiveri F, Ferrini S & Azzarone B. IL-15 is produced by a subset of human melanomas, and is involved in the regulation of markers of melanoma progression through juxtacrine loops. *Oncogene* 16, 2503-12 (1998).
 94. Kuniyasu H, Ohmori H, Sasaki T, Sasahira T, Yoshida K, Kitadai Y & Fidler IJ. Production of interleukin 15 by human colon cancer cells is associated with induction of mucosal hyperplasia, angiogenesis, and metastasis. *Clin Cancer Res* 9, 4802-10 (2003).
 95. Kuniyasu H, Oue N, Nakae D, Tsutsumi M, Denda A, Tsujiuchi T, Yokozaki H & Yasui W. Interleukin-15 expression is associated with malignant potential in colon cancer cells. *Pathobiology* 69, 86-95 (2001).
 96. Trinder P, Seitzer U, Gerdes J, Seliger B & Maeurer M. Constitutive and IFN-gamma regulated expression of IL-7 and IL-15 in human renal cell cancer. *Int J Oncol* 14, 23-31 (1999).
 97. Khawam K, Giron-Michel J, Gu Y, Perier A, Giuliani M, Caignard A, Devocelle A, Ferrini S, Fabbi M, Charpentier B, Ludwig A, Chouaib S, Azzarone B & Eid P. Human renal cancer cells express a novel membrane-bound interleukin-15 that induces, in response to the soluble interleukin-15 receptor alpha chain, epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res* 69, 1561-9 (2009).
 98. Waldmann TA, Conlon KC, Stewart DM, Worthy TA, Janik JE, Fleisher TA, Albert PS, Figg WD, Spencer SD, Raffeld M, Decker JR, Goldman CK, Bryant BR, Petrus MN, Creekmore SP & Morris JC. Phase 1 trial of IL-15 trans presentation blockade using humanized Mikbeta1 mAb in patients with T-cell large granular lymphocytic leukemia. *Blood* 121, 476-84 (2013).

99. Hawkins MM, Kingston JE & Kinnier Wilson LM. Late deaths after treatment for childhood cancer. *Arch Dis Child* 65, 1356-63 (1990).
100. Evans AE, Gilbert ES & Zandstra R. The increasing incidence of central nervous system leukemia in children. (Children's Cancer Study Group A). *Cancer* 26, 404-9 (1970).
101. Hustu HO, Aur RJ, Verzosa MS, Simone JV & Pinkel D. Prevention of central nervous system leukemia by irradiation. *Cancer* 32, 585-97 (1973).
102. Buizer AI, de Sonnevile LM, van den Heuvel-Eibrink MM & Veerman AJ. Chemotherapy and attentional dysfunction in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: effect of treatment intensity. *Pediatr Blood Cancer* 45, 281-90 (2005).
103. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P & Gabert J. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 17, 2474-86 (2003).
104. Pfaffl M. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1/04 10. Jahrgang (2004).
105. Kirschner-Schwabe R, Lottaz C, Todling J, Rhein P, Karawajew L, Eckert C, von Stackelberg A, Ungethum U, Kostka D, Kulozik AE, Ludwig WD, Henze G, Spang R, Hagemeyer C & Seeger K. Expression of late cell cycle genes and an increased proliferative capacity characterize very early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 12, 4553-61 (2006).
106. Scrucca L, Santucci A & Aversa F. Competing risk analysis using R: an easy guide for clinicians. *Bone Marrow Transplant* 40, 381-7 (2007).
107. Schrauder A, von Stackelberg A, Schrappe M, Cornish J & Peters C. Allogeneic hematopoietic SCT in children with ALL: current concepts of ongoing prospective SCT trials. *Bone Marrow Transplant* 41 Suppl 2, S71-4 (2008).
108. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45 (2001).
109. Regier N & Frey B. Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Mol Biol* 11, 57 (2010).

110. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ & Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37, e45 (2009).
111. van der Velden VH & van Dongen JJ. MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol* 538, 115-50 (2009).
112. Wu S, Gessner R, von Stackelberg A, Kirchner R, Henze G & Seeger K. Cytokine/cytokine receptor gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: correlation of expression and clinical outcome at first disease recurrence. *Cancer* 103, 1054-63 (2005).
113. Wu S, Fischer L, Gokbuget N, Schwartz S, Burmeister T, Notter M, Hoelzer D, Fuchs H, Blau IW, Hofmann WK & Thiel E. Expression of interleukin 15 in primary adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 116, 387-92 (2010).
114. Ludwig WD, Reiter A, Loffler H, Gokbuget, Hoelzer D, Riehm H & Thiel E. Immunophenotypic features of childhood and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): experience of the German Multicentre Trials ALL-BFM and GMALL. *Leuk Lymphoma* 13 Suppl 1, 71-6 (1994).
115. Karrman K, Forestier E, Heyman M, Andersen MK, Autio K, Blennow E, Borgstrom G, Ehrencrona H, Golovleva I, Heim S, Heinonen K, Hovland R, Johannsson JH, Kerndrup G, Nordgren A, Palmqvist L & Johannsson B. Clinical and cytogenetic features of a population-based consecutive series of 285 pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias: rare T-cell receptor gene rearrangements are associated with poor outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 48, 795-805 (2009).
116. Mathew PM, Prangnell DR, Cole AJ, Hill FG, Shah KJ, Jones PH, Martin J, Palmer MK, Thompson EN, Eden OB, Mott MG & Mann JR. Clinical, haematological, and radiological features of children presenting with lymphoblastic mediastinal masses. *Med Pediatr Oncol* 8, 193-204 (1980).
117. Behrendt H, van Leeuwen EF, Schuwirth C, Verkes RJ, Hermans J, van der Does-van den Berg A & van Wering ER. The significance of an isolated central nervous system relapse, occurring as first relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 63, 2066-72 (1989).

118. Thomas LB, Chirigos MA, Humphreys SR & Goldin A. Pathology of the spread of L1210 leukemia in the central nervous system of mice and effect of treatment with Cytosan. *J Natl Cancer Inst* 28, 1355-89 (1962).
119. Eckert C, Einsiedel HG, Hartmann R, von Stackelberg A, Volpel S, Guggemos A, Hanzsch N, Kawan L, Seeger K & Henze G. Clonal stability of initial leukemia in a child with central nervous system relapse 7.4 years after bone marrow relapse of common acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 89, ECR23 (2004).
120. Luster AD, Alon R & von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6, 1182-90 (2005).
121. DeVries ME, Ran L & Kelvin DJ. On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. *Semin Immunol* 11, 95-104 (1999).
122. Ferguson TA & Griffith TS. A vision of cell death: insights into immune privilege. *Immunol Rev* 156, 167-84 (1997).
123. Pachter JS, de Vries HE & Fabry Z. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 593-604 (2003).
124. Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 113, 477-85 (2006).
125. Engelhardt B. The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system. *Curr Pharm Des* 14, 1555-65 (2008).
126. Correale J & Villa A. The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity* 40, 148-60 (2007).
127. Losy J, Niezgoda A & Zaremba J. IL-15 is elevated in sera of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Folia Neuropathol* 40, 151-3 (2002).
128. Rentzos M, Cambouri C, Rombos A, Nikolaou C, Anagnostouli M, Tsoutsou A, Dimitrakopoulos A, Triantafyllou N & Vassilopoulos D. IL-15 is elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 241, 25-9 (2006).
129. Rentzos M, Nikolaou C, Rombos A, Evangelopoulos ME, Dimitrakopoulos A, Kararizou E, Koutsis G, Zoga M, Tsoutsou A & Sfingos K. Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in MS patients: effect of treatment with methylprednisolone in patients with relapse. *Neurol Res* 32, 684-9 (2010).

130. Schneider R, Mohebiany AN, Ifergan I, Beauseigle D, Duquette P, Prat A & Arbour N. B cell-derived IL-15 enhances CD8 T cell cytotoxicity and is increased in multiple sclerosis patients. *J Immunol* 187, 4119-28 (2011).
131. Huang Z, Ha GK & Petitto JM. IL-15 and IL-15R alpha gene deletion: effects on T lymphocyte trafficking and the microglial and neuronal responses to facial nerve axotomy. *Neurosci Lett* 417, 160-4 (2007).
132. Seeger K, von Stackelberg A, Taube T, Buchwald D, Korner G, Suttorp M, Dorffel W, Tausch W & Henze G. Relapse of TEL-AML1--positive acute lymphoblastic leukemia in childhood: a matched-pair analysis. *J Clin Oncol* 19, 3188-93 (2001).
133. Attarbaschi A, Mann G, Dworzak M, Wiesbauer P, Schrappe M & Gadner H. Mediastinal mass in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: significance and therapy response. *Med Pediatr Oncol* 39, 558-65 (2002).
134. Lilleyman JS & Sugden PJ. T lymphoblastic leukaemia and the central nervous system. *Br J Cancer* 43, 320-3 (1981).
135. Pui CH. Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 142-6 (2006).
136. Bulfone-Paus S, Durkop H, Paus R, Krause H, Pohl T & Onu A. Differential regulation of human T lymphoblast functions by IL-2 and IL-15. *Cytokine* 9, 507-13 (1997).
137. Fehniger TA, Suzuki K, VanDeusen JB, Cooper MA, Freud AG & Caligiuri MA. Fatal leukemia in interleukin-15 transgenic mice. *Blood Cells Mol Dis* 27, 223-30 (2001).
138. Yokohama A, Mishra A, Mitsui T, Becknell B, Johns J, Curphey D, Blaser BW, Vandeusen JB, Mao H, Yu J & Caligiuri MA. A novel mouse model for the aggressive variant of NK cell and T cell large granular lymphocyte leukemia. *Leuk Res* 34, 203-9 (2010).
139. Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E & Waldmann TA. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4940-4 (1994).

140. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S & Peschon JJ. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191, 771-80 (2000).
141. Hsu C, Hughes MS, Zheng Z, Bray RB, Rosenberg SA & Morgan RA. Primary human T lymphocytes engineered with a codon-optimized IL-15 gene resist cytokine withdrawal-induced apoptosis and persist long-term in the absence of exogenous cytokine. *J Immunol* 175, 7226-34 (2005).
142. Chen J, Petrus M, Bryant BR, Nguyen VP, Goldman CK, Bamford R, Morris JC, Janik JE & Waldmann TA. Autocrine/paracrine cytokine stimulation of leukemic cell proliferation in smoldering and chronic adult T-cell leukemia. *Blood* 116, 5948-56 (2010).
143. Kukita T, Arima N, Matsushita K, Arimura K, Ohtsubo H, Sakaki Y, Fujiwara H, Ozaki A, Matsumoto T & Tei C. Autocrine and/or paracrine growth of adult T-cell leukaemia tumour cells by interleukin 15. *Br J Haematol* 119, 467-74 (2002).
144. Sato N, Sabzevari H, Fu S, Ju W, Petrus MN, Bamford RN, Waldmann TA & Tagaya Y. Development of an IL-15-autocrine CD8 T-cell leukemia in IL-15-transgenic mice requires the cis expression of IL-15Ralpha. *Blood* 117, 4032-40 (2011).
145. Tinhofer I, Marschitz I, Henn T, Egle A & Greil R. Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma. *Blood* 95, 610-8 (2000).
146. Giri JG, Anderson DM, Kumaki S, Park LS, Grabstein KH & Cosman D. IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J Leukoc Biol* 57, 763-6 (1995).
147. Kumaki S, Armitage R, Ahdieh M, Park L & Cosman D. Interleukin-15 up-regulates interleukin-2 receptor alpha chain but down-regulates its own high-affinity binding sites on human T and B cells. *Eur J Immunol* 26, 1235-9 (1996).
148. Mishra A, Sullivan L & Caligiuri MA. Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. *Clin Cancer Res* 20, 2044-50 (2014).
149. Baslund B, Tvede N, Danneskiold-Samsoe B, Larsson P, Panayi G, Petersen J, Petersen LJ, Beurskens FJ, Schuurman J, van de Winkel JG, Parren PW, Gracie JA, Jongbloed S, Liew FY & McInnes IB. Targeting interleukin-15 in patients with

- rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study. *Arthritis Rheum* 52, 2686-92 (2005).
150. Yang X, Kallarakal A, Saptharishi N, Jiang H, Yang Z, Xie Y, Mitra G, Zheng XX, Strom TB & Soman G. Molecular characterization and functional activity of an IL-15 antagonist MutIL-15/Fc human fusion protein. *Mol Pharm* 10, 717-27 (2013).
151. Sonbol MB, Firwana B, Zarzour A, Morad M, Rana V & Tiu RV. Comprehensive review of JAK inhibitors in myeloproliferative neoplasms. *Ther Adv Hematol* 4, 15-35 (2013).

9 Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (engl.: analysis of variance)
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
ATL	Adulte T-Zell-Leukämie
AUGs	Starkodons
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
EFS	Ereignisfreies Überleben (engl.: event-free survival)
engl.	englisch
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HTLV-1	Humanes T-lymphotropes Virus 1
IL2/IL15R β	gemeinsamer Interleukin 2 und Interleukin 15 Rezeptor β
<i>IL15</i>	Interleukin 15 (Gen)
IL-15	Interleukin 15 (Protein)
IL-15LSP	IL-15 Isoform mit langem Signalpeptid (engl.: LSP = long signal peptide)
IL15R α	Interleukin 15 Rezeptor α
IL-15SSP	IL-15 Isoform mit kurzem Signalpeptid (engl.: SSP = short signal peptide)
IL-2	Interleukin 2
LGL	große granuläre Lymphozyten (engl.: large granular lymphocyte)
MRD	Minimale Resterkrankung (engl.: minimal residual disease)
mRNA	Boten Ribonukleinsäure (engl.: messenger ribonucleic acid)
MS	Multiple Sklerose
OS	Absolutes Überleben (engl.: overall survival)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
S.	Seite
<i>SDHA</i>	Succinatdehydrogenase A (Gen)
UTR	nicht-translatierter Bereich (engl.: untranslated region)
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 Lebenslauf

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

11 Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas und die damit verbundene Möglichkeit, in die pädiatrische Onkologie hineinzublicken und mich mit einem Teil davon intensiv zu beschäftigen, danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Karl Seeger ebenso wie auch für seine kritische Durchsicht der Arbeit und seine guten Anmerkungen dazu.

Herrn Prof. Dr. Dr. Günter Henze und Frau Prof. Dr. Angelika Eggert danke ich für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in ihrer Klinik durchführen zu können.

Mein herzlicher und besonderer Dank gilt Frau Dr. Renate Kirschner-Schwabe für Ihre fachlich und menschlich so wunderbare Betreuung auf allen Ebenen und während all der langen Zeit, für die exzellente wissenschaftliche Begleitung und die sehr gute praktische Anleitung, für das stets für Besprechungen, Fragen und Diskussionen offene Ohr, für Verständnis sowie Hilfestellung in kleinen Krisenzeiten und vor allem auch für die Zeit, die sie trotz vielfältiger anderer Verpflichtungen stets und immer für mich hatte.

Ein Dankeschön möchte ich auch Frau Dr. Cornelia Eckert aussprechen, die mir durch zahlreiche Tipps und Anregungen wertvolle Hilfestellung gegeben und der Arbeit so an der ein oder anderen Stelle zum Voranschreiten verholfen hat.

Da ich im Rahmen dieser Arbeit einige Zeit im Labor verbracht habe, darf auch ein Dank an all die Menschen dort nicht fehlen, die mit vielen kleinen und großen Tipps und ihrer praktischen Erfahrung sowie auch all ihrer positiven menschlichen Art zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben. Daher möchte ich Gabriele Körner, Claudia Hanel, Jutta Proba, Wilhelmine Keune, Sabine Bobbe und Ute Schwiem an dieser Stelle herzlich danken.

Für die Überprüfung der Arbeit auf ihre allgemeine Verständlichkeit hin und die Einhaltung der deutschen Rechtschreibung und Grammatik danke ich Solveig Sachau sowie meinem Mann Sebastian, die mir noch einige Hinweise aus einer ganz anderen Perspektive geben konnten.

Meinem Mann Sebastian möchte ich aber außerdem danken für seine Geduld, seine vielen aufbauenden Worte und die Zeit, die er mich mit dieser Arbeit geteilt hat.

12 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nadja Züfle-Lemke, geb. Züfle, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Interleukin 15 Expression in Rezidiven der Akuten lymphoblastischen Leukämie des Kindesalters“ 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) 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.“

Berlin, den 13.09.2016

Nadja Züfle-Lemke