

**Aus der Klinik für Innere Medizin  
Abteilung für Hämatologie und Onkologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin**

**DISSERTATION**

**DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR  
EXPRESSION VON ZYTOKINREZEPTOREN UND  
APOPTOSERELEVANTER ANTIGENE BEI DER B-CLL**

**Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin**

**von**

**Georgios Kokinogenis  
aus Stuttgart**

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. K. Possinger

2. Prof. Dr. med. M. Matthias

3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Brockmann

Datum der Promotion: 15.12.2006

*Meinen Eltern, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben*

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>	
1.0.	Einleitung	3
1.1.	Die chronische lymphatische Leukämie (CLL)	4
1.1.1.	Epidemiologie	4
1.1.2.	Ätiologie und pathogenetische Bedeutung genetischer Aberrationen	4
1.1.3.	Pathophysiologie und klinisches Erscheinungsbild	6
1.1.4.	Diagnostik	7
1.1.5.	Stadieneinteilung und Prognose	8
1.1.6.	Therapie	11
1.2.0.	Apoptoserelevante Moleküle und Oberflächenantigene bei der B-CLL	12
1.2.1.	Interleukin-4 und sein Rezeptor (CD124)	13
1.2.2.	Interferon-gamma und sein Rezeptor (CD119)	15
1.2.3.	Apo-1/Fas und sein Rezeptor (CD95)	16
1.2.4.	CD52	17
1.3.	Aufgabenstellung	18
2.0.	Patienten, Methoden und Materialien	20
2.1.	Gruppeneinteilung	20
2.2.	Methoden	20
2.2.1.	Probengewinnung	20
2.2.2.	Zählverfahren	21
2.2.3.	Markierung von Oberflächenantigenen mit Hilfe monoklonaler Antikörper	21
2.2.4.	Erythrozytolyse	24
2.2.5.0.	Messung mit dem Durchflußzytometer	24
2.2.5.1.	Messprinzip	25
2.2.5.2.	Messung	26
2.2.6.	Auswertung	27
2.2.7.	Statistik	28
2.3.	Arbeitsanleitung und Auflistung der Materialien	31
3.0.	Ergebnisse	35
3.1.0.	Expressionsmuster der untersuchten Oberflächenantigene	35
3.1.1.	CD5	39

3.1.2.	CD19	41
3.1.3.	CD5/CD19	43
3.1.4.	CD52/CD19	45
3.1.5.	CD95/CD19 in der Dot-Plot-Auswertung	47
3.1.6.	CD95/CD19 in der Histogramm-Auswertung	50
3.1.7.	CD119/CD19 in der Dot-Plot-Auswertung	52
3.1.8.	CD119/CD19 in der Histogramm-Auswertung	54
3.1.9.	CD124/CD19 in der Dot-Plot-Auswertung	56
3.1.10.	CD124/CD19 in der Histogramm-Auswertung	59
3.2.	Korrelationsanalyse der Oberflächenexpressionen von CD95 und CD124	62
4.0.	Diskussion	63
4.1.	Diskussion der Methode	63
4.2.	Diskussion der Messergebnisse	66
4.3.	Schlussfolgerung	72
5.0.	Zusammenfassung	74
6.0.	Literatur	76
7.0.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	82
7.1.	Abbildungsverzeichnis	82
7.2.	Tabellenverzeichnis	84
8.0.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	85
9.0.	Lebenslauf	86
10.0.	Danksagung	88
11.0.	Erklärung	89

## 1.0. Einleitung

Die chronische lymphatische Leukämie der B-Zell-Reihe stellt das klassische Beispiel eines Tumors dar, bei dem die Zunahme maligner Zellen in erster Linie aus einem verzögerten Zelltod resultiert. Die Proliferationsrate des initialen malignen Zellklons ist in der Regel nur gering und kann somit für die Akkumulation reif erscheinender, jedoch immuninkompetenter Lymphozyten nicht hauptsächlich verantwortlich gemacht werden.

Aus diesem Grund steht die Fehlregulation der Apoptose im Mittelpunkt der CLL-Forschung und eine Vielzahl an Mechanismen der Apoptosehemmung konnte dargestellt werden.

So konnten auf molekularer Ebene eine Überexpression von Proteinen der bcl-2-Familie und Aberrationen des p53-Tumor-Suppressor-Gens gezeigt werden. Ebenso erfolgte die Darstellung einer Reihe chromosomaler Abnormalitäten. Dazu gehören Deletionen in Bereichen der Chromosomen 11, 13 und 17, Translokationen in Bereichen des Chromosoms 17 sowie die Trisomie 12.

Des Weiteren konnte die wichtige Rolle von immunregulatorischen Molekülen und Oberflächenadhäsionsmolekülen in der Regulation der Apoptose der malignen B-Zellen nachgewiesen werden. Neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet ermöglichten vor einigen Jahren bereits neue immuntherapeutische Strategien mit Immunmodulatoren und monoklonalen Antikörpern.

Dabei lag der Schwerpunkt immunphänotypischer Untersuchungen zur Rolle von Zytokinen und anderen immunregulatorischen Molekülen bei der CLL bisher überwiegend im Nachweis einzelner Antigenstrukturen auf B-CLL-Zellen und der Prüfung der Expression dieser Antigene auf ihre klinische Signifikanz. Untersuchungen zur Erstellung eines breiteren Profils von Oberflächenantigenen, die bezüglich der Regulierung der Zellapoptose von Bedeutung sein könnten, fehlen dagegen weitgehend.

In diesem Zusammenhang ergab sich die Fragestellung nach umfassenderen Expressionsmustern apoptoserelevanter Oberflächenantigene bei der B-CLL.

Ein tiefer greifendes Verständnis der Expressionsmuster dieser teils apoptoseinduzierenden, teils vor Apoptose schützenden Oberflächenantigene, könnte neue, zusätzliche Ansätze zur Behandlung dieser Krankheit liefern.

## **1.1. Die chronische lymphatische Leukämie (CLL)**

### **1.1.1. Epidemiologie**

Die CLL ist in der sogenannten westlichen Welt mit einem Anteil von etwa 25% an allen Leukämien die am häufigsten diagnostizierte, maligne hämatologische Erkrankung (Rozman and Montserrat 1995). In der östlichen Hemisphäre hingegen ist sie mit einem Anteil von unter 5% an allen Leukämien die seltenste Leukämieform des Erwachsenen (Tamura, Sawada et al. 2001). In den USA und in Europa handelt es sich in über 95% der Fälle um eine CLL vom B-Zell-Typ. Chronische lymphatische Leukämien vom T-Zell-Typ sind seltene Varianten (Rozman and Montserrat 1995). Im Gegensatz hierzu ist in Japan die CLL vom T-Zell-Typ vorherrschend (Tamura, Sawada et al. 2001).

Die Gesamtinzidenz in Deutschland liegt bei etwa 3:100.000/Jahr und die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit steigendem Lebensalter zu (Possinger K 1999). Während die CLL bei den unter 30jährigen so gut wie gar nicht diagnostiziert wird, erreicht sie bei den über 80jährigen eine Inzidenz von nahezu 40:100.000/Jahr (Knauf W 1999).

Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt bei 65 Jahren. Männer sind fast doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Possinger K 1999).

### **1.1.2. Ätiologie und pathogenetische Bedeutung genetischer Aberrationen**

Die Ätiologie der CLL ist noch nicht geklärt. Sie ist die einzige maligne Bluterkrankung, welche ätiologisch nicht mit Chemikalien oder ionisierender Strahlung assoziiert ist (Caligaris-Cappio and Hamblin 1999). Mehrere Beobachtungen aus epidemiologischen Studien weisen jedoch darauf hin, dass hereditäre und erworbene genetische Faktoren bei ihrer Pathogenese eine wichtige Rolle spielen (Fegan C 2001):

- Rassenunterschiede: Die niedrige Prävalenz in Japan und der ganzen östlichen Hemisphäre (Tamura, Sawada et al. 2001)
- Altersverteilung: Die stark ansteigende Inzidenzrate mit zunehmendem Lebensalter (Knauf W 1999)

- Geschlechtsverteilung: Männer erkranken häufiger als Frauen (M:F=1.7:1) (Possinger K 1999)
- Dreifach erhöhtes Erkrankungsrisiko für CLL bei Kindern von CLL-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung (Possinger K 1999)

Bis vor einigen Jahren war nur wenig über die Bedeutung genetischer Aberrationen für die Pathogenese der CLL bekannt. Die Hauptursache hierfür war die niedrige in-vitro Mitoserate der CLL-Zellen, die eine Analyse mittels der klassischen Chromosomenbänderung schwierig machte.

Andererseits sind für die meisten der genetischen Aberrationen der CLL die betroffenen Gene noch nicht identifiziert, wodurch Untersuchungen mit Hilfe molekulargenetischer Methoden erschwert werden (Stilgenbauer, Lichter et al. 2000).

Neue Techniken wie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) haben jedoch sehr zu unserem Wissen über die Bedeutung genetischer Aberrationen beigetragen (Fegan C 2001).

So hat sich vor allem die FISH als hilfreiche Methode erwiesen, sowohl die niedrige Mitoserate als auch den Mangel an Kandidatengen zu umgehen. Mittels dieser Technik ist es gelungen, in 82% der CLL-Fälle genetische Aberrationen nachzuweisen (Dohner, Stilgenbauer et al. 2000).

Der häufigste Typ genomischer Veränderungen bei der CLL sind Deletionen, wobei meist die Bande 13q14 am langen Arm von Chromosom 13, gefolgt von 11q22-q23 am langen Arm von Chromosom 11, 17p13 auf Chromosom 17 und 6q21 am langen Arm von Chromosom 6 betroffen sind. Trisomien finden sich häufig in den Banden 12q, 8q und 3q. Gene, die an der Pathogenese der CLL im Sinne einer Inaktivierung von Tumor-Supressor-Genen beteiligt sind, konnten bislang in der Bande 17p13 mit p53 und in einem Teil der Fälle mit 11q22-q23-Deletion mit ATM (ataxia teleangiectasia mutated) identifiziert werden.

Für die überwiegende Mehrheit der häufig betroffenen chromosomalen Regionen steht die Isolierung von Kandidatengen jedoch noch aus. Dies gilt insbesondere für die am häufigsten betroffene Region in der Bande 13q14 (Stilgenbauer, Lichter et al. 2000).

Durch die Identifizierung dieses Gens könnten grundlegende Erkenntnisse über die molekulare Pathogenese der CLL geliefert werden.



### **1.1.3. Pathophysiologie und klinisches Erscheinungsbild**

Die CLL ist durch eine Akkumulation reif erscheinender Lymphozyten gekennzeichnet. In 95% der Fälle handelt es sich um monoklonale B-Zellen, die immuninkompetent sind und durch eine niedrige Proliferationsrate mit einer verlängerten Überlebenszeit gekennzeichnet sind. Sie befinden sich zumeist in der G0- oder G1-Phase (Dighiero, Kipps et al. 1996).

Hinsichtlich des Reifungsgrades sind die CLL-Zellen zwischen den Prä-B-Zellen und den reifen B-Zellen einzuordnen.

Die Akkumulation dieser Zellen in peripherem Blut, Knochenmark und lymphatischen Organen ist für die CLL charakteristisch. Sie führt im Laufe der Erkrankung durch Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark zu einer Knochenmarkinsuffizienz mit zunehmender Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie.

Bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung wird zusätzlich ein Antikörpermangelsyndrom beobachtet, welches zusammen mit der Neutropenie den Hauptgrund für die gesteigerte Infektanfälligkeit mit oft tödlich verlaufenden Infektionen darstellt (Rummel M 2002).

Heutzutage wird die Diagnose CLL aufgrund der zunehmenden Häufigkeit von Routineuntersuchungen in über 60% der Fälle bei Fehlen jeglicher spezifischer Krankheitssymptome gestellt (Rozman and Montserrat 1995).

Seltener als bei anderen Lymphomerkkrankungen klagen die Patienten über B-Symptome wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust. Eher verläuft die subjektive Symptomatik uncharakteristisch und schleichend. Es überwiegen unspezifische Allgemeinsymptome wie rasche Ermüdbarkeit, körperliche Abgeschlagenheit und Leistungsminderung. Auf näheres Befragen wird von einem Teil der Patienten eine gehäufte Infektanfälligkeit oder die Reaktivierung einer Gürtelrose als Zeichen der Immunschwäche angegeben.

Im Verlauf der Erkrankung können sich die Lymphomzellen des malignen Klons im gesamten Körper ausbreiten. Aus dem disseminierten Organbefall (Gastrointestinaltrakt, Knochenmark, Haut und weitere Organe) resultiert ein sehr vielschichtiges klinisches Erscheinungsbild. Bei der körperlichen Untersuchung lassen sich bei 70-80% der Patienten Lymphknotenschwellungen feststellen, welche prall-elastisch tastbar und gut verschieblich sind. In etwa der gleichen Häufigkeit liegen Milz- und Lebervergrößerungen vor (de Lima, O'Brien et al. 1998).

Weiter können neben metabolischen Entgleisungen (z.B. Hyperurikämie) auch Kompressionserscheinungen wie eine Atemwegsobstruktion vorliegen, welche durch ausgeprägte mediastinale und hiläre Lymphknotenvergrößerungen hervorgerufen werden. In

seltenen Fällen können auch ein Hautbefall mit einem subjektiv unstillbarem Hautjucken oder eine Infiltration der Meningen auftreten (Rai R 1995).

Neben den beschriebenen Organmanifestationen stehen die klinischen Symptome eines Immundefektes im Vordergrund und beherrschen Morbidität und Mortalität der CLL-Patienten. So erleiden 60-80% der Patienten infektiöse Komplikationen, die wiederum in über der Hälfte der Fälle zum Tode führen. Dabei handelt es sich meistens um Infektionen des Respirationstraktes (Morrison VA 1998).

Eine weitere Komplikation stellen die Autoimmunzytopenien dar. Hierzu zählen autoimmunhämolytische Anämien, Thrombozytopenien und „pure red cell“-Aplasien.

Außerdem besitzen Patienten mit CLL gegenüber der Normalbevölkerung ein erhöhtes Risiko, an einem Zweitmalignom zu erkranken.

#### **1.1.4. Diagnostik**

Wie bereits erwähnt, wird bei immer mehr Patienten die Diagnose einer CLL als Zufallsbefund im Rahmen einer Blutbildkontrolle oder bei einer körperlichen Routineuntersuchung gestellt (Rozman and Montserrat 1995). Zur Erfassung der typischen, schmerzlosen Lymphknotenvergrößerungen ist bei der körperlichen Untersuchung die Palpation aller Lymphknotenstationen obligatorisch. Außerdem ist eine Bestimmung von Leber- und Milzgröße erforderlich, um eine häufig vorhandene Hepatosplenomegalie zu erkennen (Armitage JO, Longo DL 2005).

Nach den Richtlinien des NCI-WG (National Cancer Institute Sponsored Working Group on CLL) von 1996 müssen zur Diagnosestellung folgende Kriterien erfüllt sein:

- eine anhaltende Lymphozytose im peripheren Blut von  $>5000/\mu\text{l}$
- bei der Immunphänotypisierung neben der Expression der B-Zell-Antigene CD19 und CD20 die Koexpression von CD5 und CD23
- eine Leichtkettenrestriktion der Oberflächenimmunglobuline

Demnach stellen für die Diagnosestellung CLL lediglich ein Blutbild und ein Differentialblutbild sowie eine Immunphänotypisierung der peripheren Blutlymphozyten mittels Durchflußzytometrie obligatorische Untersuchungen dar (Cheson, Bennett et al. 1996).

Des Weiteren wird die Untersuchung der Lymphozytenmorphologie hinzugezogen. Als Zeichen besonderer mechanischer Verletzlichkeit leukämisch-lymphatischer Zellen finden sich häufig neben den intakten Zellen auch Zelltrümmer, so genannte Gumprechtsche Kernschatten. Diese kommen jedoch auch bei anderen Non-Hodgkin-Lymphomen vor und sind daher für die CLL nicht spezifisch (Löffler H 1999).

Fakultativ können noch folgende diagnostische Maßnahmen durchgeführt werden:

- Thorax-Röntgen in 2 Ebenen
- Bestimmung des Serum-beta-2-Mikroglobulins und der Serum-Thymidinkinase, was nach den Studien der Deutschen CLL-Studiengruppe obligatorisch ist
- Zytogenetische Untersuchung der Tumorzellen
- Histologische Untersuchung eines befallenen Lymphknotens (Possinger K 1999)

### **1.1.5. Stadieneinteilung und Prognose**

Durch Bestimmung des Hämoglobins und der Thrombozytenwerte sowie mithilfe der körperlichen Untersuchung (Lymphknotenstatus, Milz- und Leberpalpation) lassen sich verschiedene Krankheitsstadien festlegen, welche sich in der Prognose erheblich unterscheiden und deshalb unterschiedlich behandelt werden. Dabei haben sich, vor allem wegen der einfachen Handhabung, die beiden Stadieneinteilungen nach Rai und nach Binet durchgesetzt.

Die Stadieneinteilung nach Rai von 1975 (*Tabelle 1*) war die erste allgemein anerkannte und findet heute besonders in den USA Anwendung (Rai, Sawitsky et al. 1975). In Europa hingegen ist die Einteilung nach Binet aus dem Jahre 1981 (*Tabelle 2*) die am weitesten verbreitete (Binet, Auquier et al. 1981).

Die Rai-Klassifikation aus dem Jahre 1975 unterteilt die CLL-Patienten in 5 Gruppen mit unterschiedlicher Prognose beziehungsweise drei Gruppen nach Modifikation von 1987. Dabei entspricht die Niedrigrisikogruppe der Gruppe 0 mit einem medianen Überleben von >10 Jahren. Zum Zeitpunkt der Diagnose werden 30% der Patienten dieser Gruppe zugeordnet. 60% der Patienten werden der Intermediärrisikogruppe zugeordnet, welche mit einem medianen Überleben von 7 Jahren die Gruppen I und II zusammenfasst. Die Hochrisikogruppe mit einem

medianen Überleben von 1.5 Jahren entspricht den Gruppen III und IV mit 10% der Neuerkrankungen.

Die Binet-Klassifikation unterscheidet 3 verschiedene Prognosegruppen. Sie bezieht sowohl die Anzahl der betroffenen Lymphknotenregionen als auch die Ausprägung der Anämie und Thrombozytopenie mit ein. Hiernach befinden sich ca. 60% der Neuerkrankten im Stadium A, 30% im Stadium B und 10% im Stadium C.

In Bezug auf ihre prognostische Relevanz stimmen nach Überprüfung in mehreren Studien die beiden Systeme gut überein (Rummel M 2002).

*Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Rai von 1975 aus (Possinger K 1999)*

Stadium	Definition	Medianes Überleben
Niedriges Risiko <b>0</b>	Lymphozytose >15000/mm <sup>3</sup> Knochenmarkinfiltration >40%	>10 Jahre
Intermediäres Risiko <b>I</b> <b>II</b>	Lymphozytose und Lymphadenopathie Lymphozytose und Hepatomegalie und/oder Splenomegalie (mit oder ohne Lymphadenopathie)	7 Jahre
Hochrisiko <b>III</b> <b>IV</b>	Lymphozytose und Anämie (Hb <11.0 g%) (mit oder ohne Lymphadenopathie und/oder Organomegalie) Lymphozytose und Thrombozytopenie (<100000/mm <sup>3</sup> ) (mit oder ohne Anämie, Lymphadenopathie, Organomegalie)	1.5 Jahre

Table 2: Stadieneinteilung nach Binet von 1981 aus (Possinger K 1999)

Stadium	Definition	Medianes Überleben
<b>A</b>	Hb >10.0 g/dl Thrombozytenzahl normal <3 vergrößerte Lymphknotenregionen	>10 Jahre
<b>B</b>	Hb >10.0 g/dl Thrombozytenzahl normal ≥3 vergrößerte Lymphknotenregionen	7 Jahre
<b>C</b>	Hb ≤10.0 g/dl und/oder Thrombozytenzahl <100000/mm <sup>3</sup> Unabhängig von der Zahl der befallenen Regionen	2 Jahre

Zervikale, axilläre und inguinale Lymphknotenvergrößerungen unilateral oder bilateral sowie Leber- und Milzvergrößerungen gelten als je eine Region

Der Krankheitsverlauf hängt jedoch nicht nur vom Krankheitsstadium ab. Insbesondere in den frühen Stadien, in welchen heute Patienten zunehmend diagnostiziert werden, ist die Prognose relativ inhomogen.

Deshalb wird versucht, mithilfe zusätzlicher Prognosefaktoren indolente Frühformen von solchen mit rascher Progression zu unterscheiden. Hilfreiche und zuverlässige Faktoren stellen dabei die histomorphologische Infiltration des Knochenmarks, die absolute Lymphozytenzahl, die Lymphozytenverdopplungszeit, die Morphologie der Lymphozyten und zytogenetische Aberrationen dar (Rummel M 2002), (Possinger K 1999).

### 1.1.6. Therapie

In der Regel ist der therapeutische Ansatz palliativ ausgerichtet und orientiert sich damit an Symptomen. Daher ist die Indikation zu einer therapeutischen Intervention nicht nur vom Krankheitsstadium abhängig sondern auch von individuellen Gegebenheiten des jeweiligen Patienten (Knauf W 1999).

Eine Heilungschance existiert wahrscheinlich nur für wenige Patienten, bei denen eine Stammzell- oder Knochenmarktransplantation durchgeführt wird. Diese Therapieverfahren sind jedoch derzeit als experimentell anzusehen (Possinger K 1999).

Die Grundlage der medikamentösen Therapie stellen Zytostatika aus den Substanzklassen der Alkylanzien, Nukleosidanaloga und Anthrazykline dar (Knauf W 1999).

Bis jetzt bestand die Standardtherapie in der Gabe von Chlorambucil allein oder in Kombination mit Prednison. Unter dieser Therapie erfolgt jedoch keine Verlängerung der Überlebenszeit (Byrd, Rai et al. 1998). Ebenso führen der Zusatz von Prednison, die Behandlung in frühen Stadien oder die Anwendung anderer Chemotherapie-Regime wie CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison) oder COP (Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison) zu keiner verlängerten Überlebenszeit (Possinger K 1999), (Raphael, Andersen et al. 1991).

In den letzten Jahren haben sich die Purinanaloga angesichts hoher Ansprechraten als wirksam erwiesen, hierunter insbesondere Fludarabin. Das Gesamtüberleben konnte jedoch nicht signifikant verbessert werden (Keating, O'Brien et al. 1998).

Einen ersten möglichen kurativen Ansatz zur Behandlung der CLL stellen Hochdosis-Chemotherapien mit allogener oder autologer Knochenmark- bzw. Blutstammzelltransplantation dar. So können mit einer allogenen Transplantation hohe Remissionsraten bis hin zu einer kompletten Remission erzielt werden. Die Therapie-assoziierte Mortalitätsrate ist jedoch hoch. Unter einer autologen Transplantation ist die Therapie-assoziierte Mortalitätsrate sehr viel geringer. Der Nachteil dieser Methode besteht in einer möglichen Verunreinigung des autologen Transplantats mit Leukämiezellen. Die Langzeituntersuchungen der Transplantationsstudien hinsichtlich einer signifikanten Lebensverlängerung bis hin zur Heilung stehen noch aus (Hallek, Schmitt et al. 2001), (Flinn and Vogelsang 1998).

Neue Möglichkeiten, eine anhaltende Remission zu erreichen, eröffnet der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen CD52 (Alemtuzumab) oder gegen CD20 (Rituximab) in Kombination mit Zytostatika (Immun-Chemotherapie). Als Monotherapie ist Rituximab bei der CLL zwar weniger effektiv, bewirkt aber eine Hemmung antiapoptotischer Proteine wie bcl-2. Dadurch kann die

zytotoxische Aktivität von Fludarabin, Cyclophosphamid, Doxorubicin und Cisplatin erhöht werden.

Die Splenektomie findet als einzige chirurgische Maßnahme bei der Behandlung der CLL Anwendung. Indikationen hierfür stellen neben einer Splenomegalie vor allem eine autoimmunhämolytische Anämie oder Thrombozytopenie dar, welche mit Steroiden nicht behandelbar sind.

Gelegentlich kommt bei symptomatischer Splenomegalie und bei sehr großen Lymphknotenschwellungen die Strahlentherapie zum Einsatz (Possinger K 1999), (Hallek, Schmitt et al. 2001).

### **1.2.0. Apoptoserelevante Moleküle und Oberflächenantigene bei der B-CLL**

Die Apoptose stellt einen essentiellen Prozess für die Homöostase und die Integrität des ganzen Organismus dar, indem sie insbesondere vor einem exzessiven Zellwachstum und vor strukturellen und metabolischen Störungen schützt. Vor allem in der Tumorentstehung sind die katastrophalen Folgen einer Fehlregulation des natürlichen Zelltodes erkennbar.

Eine ganze Reihe an Mechanismen der Apoptoseregulierung konnte bisher aufgezeigt werden. Nachfolgend beschäftigt sich diese Arbeit hauptsächlich mit Antigenen auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten, denen bei der B-CLL wichtige Rollen in der Apoptose und deren Umgehung zugesprochen werden.

Außerdem wird mit CD52 auf ein Oberflächenantigen eingegangen, welches als Zielmolekül monoklonaler Antikörper einen viel versprechenden Angriffspunkt neuer immuntherapeutischer Strategien darstellt.

### 1.2.1. Interleukin-4 und sein Rezeptor (CD124)

1982 wurde Interleukin-4, ein Protein bestehend aus 129 Aminosäuren, als T-Zell-vermittelter Wachstumsfaktor identifiziert. Es handelt sich dabei um ein typisches immunregulatorisches Zytokin, welches vor allem von Th2-Zellen und Mastzellen produziert wird. Früher noch als B-Zell-Wachstumsfaktor 1 bezeichnet, sind heute vielfältige Wirkungen von IL-4 bekannt (Howard M 1982), (Yokota T 1986).

So steigert IL-4 auf B-Zellen die Expression einer Reihe von Membranproteinen wie MHC Klasse II Antigene, CD23 Moleküle und des eigenen IL-4 Rezeptors (Noelle R 1984), (Defrance T 1987), (Ohara J 1988).

Als sogenannter Switch-Faktor ist IL-4 auch in der Synthese von Immunglobulinen mit einbezogen, wobei es einen Klassensprung von IgM zu IgE und IgG1 bewirkt. Außerdem ist es ein bedeutender Regulator der Produktion von IgE (Pene J 1988), (Bergstedt LS 1988).

Weiter trägt IL-4 mittels seiner Eigenschaft, als Faktor für die Differenzierung von T-Helfer-(Th)-0-Vorläuferzellen zu Th2-Zellen zu fungieren, zur Entwicklung einer humoralen Antwort bei (Maggi E 1992). Bei immunkompetenten, antigenaktivierten B-Zellen verstärkt IL-4 Proliferation und Differenzierung (Howard M 1982).

Bei der CLL schützt IL-4 die B-Zellen vor der Apoptose, ohne dabei einen signifikanten Effekt auf die Proliferation auszuüben. Diese Wirkung darf wohl auf eine höhere Expression von IL-4-Rezeptoren bei CLL-Zellen als auf normalen Zellen zurückzuführen sein (Douglas, Capocasale et al. 1997). Interessanterweise ist dieser protektive Effekt von IL-4 vor Apoptose nur bei zuvor behandelten CLL-Patienten signifikant festzustellen, wohingegen er bei noch unbehandelten Patienten kaum zu beobachten ist (Frankfurt, Byrnes et al. 1997). Des Weiteren wurde gezeigt, dass IL-4 durch Hochregulierung des antiapoptotisch wirkenden Proteins bcl-2 die Zellen vor dem programmierten Zelltod schützt (Aronica MA 2000).

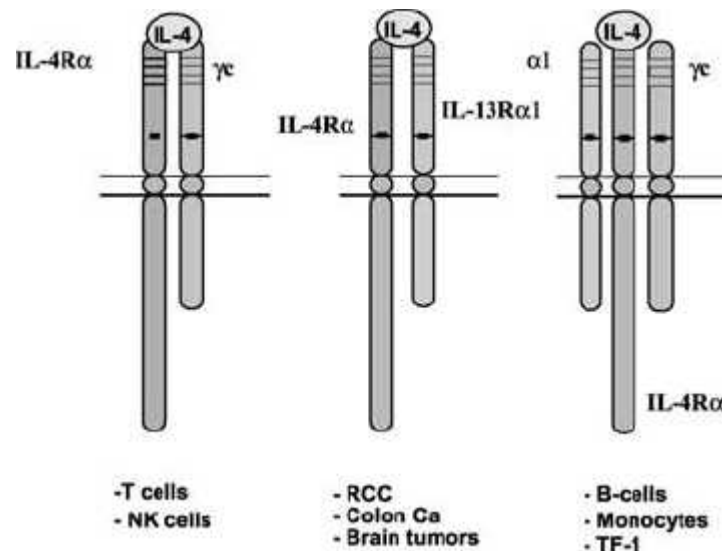
Der Interleukin-4-Rezeptor gehört zur Familie der hämatopoetischen Rezeptoren. Es handelt sich dabei um ein aus ca. 800 Aminosäuren bestehendes Membranprotein, welches auf einer Reihe von Zelltypen nachgewiesen werden konnte (Beckmann MP 1992).

Dieser Interleukin-4-Rezeptor-Komplex existiert in drei unterschiedlichen Konformationen (*Abbildung 1*). Bei T- und NK-Zellen besteht er aus zwei Ketten, der 140-kDa IL-4R $\alpha$ -Kette und der gamma-Kette  $\gamma$ . Bei Kolonkarzinomen, Gehirntumoren und Nierenzelltumoren setzt sich der Komplex aus einer IL-4R $\alpha$ -Kette und einer IL-13R $\alpha$ 1-Kette zusammen (Debinski W 1996). Bei B-Zellen und Monozyten schließlich können alle dieser drei Ketten in trimerischer Form



existieren (Kawakami, Kawakami et al. 2001). Bei den B-Lymphozyten von CLL-Patienten ist die Existenz letzterer Form anzunehmen (Kay NE 2002).

Abbildung 1: Mögliche Konformationen des IL-4-Rezeptors aus (Kay and Pittner 2003)



Bindet IL-4 an die  $\alpha$ -Untereinheit eines IL-4-Rezeptors, so kommt es zu einer Assoziation mit einer allgemeinen gamma-Kette  $\gamma_c$ . In der weiteren Signaltransduktionskette kommt es zu einer Thyrosin-abhängigen Phosphorylierung mehrerer Proteine, insbesondere des Proteins 4PS, welches seinerseits mit einer Phosphoinositol-3-Kinase assoziiert ist (Achsah K 1994).

Ein zweiter Signaltransduktionsweg läuft über die Aktivierung dreier Vertreter der Janus-Kinasen, Jak-1, -2 und -3. Diese sind mit verschiedenen Komponenten des IL-4-Rezeptor-Komplexes assoziiert. Über eine Thyrosin-abhängige Phosphorylierung bewirken sie die Aktivierung des Faktors STAT6 (signal transducer and activator of transcription), worüber es zur Signalweiterleitung in den Zellkern kommt.

Schließlich ist der IL-4-Rezeptor an einer Phospholipase C gekoppelt, welche ihrerseits mit einer Adenylatzyklase assoziiert ist. Bei Aktivierung durch Bindung eines Liganden kommt es zu einem Anstieg von cAMP (Nelms K 1999).

### 1.2.2. Interferon-gamma und sein Rezeptor (CD119)

Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), welches auch Immun-Interferon genannt wird, wurde erstmals 1965 von Wheelock als antivirale Substanz im Überstand lektinstimulierter Lymphozyten beschrieben (Wheelock EF 1965).

Hinsichtlich Struktur und Funktion wird IFN- $\gamma$  von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  abgegrenzt und wird aufgrund seiner vielfältigen immunmodulatorischen Wirkungen eher den Lymphokinen als den antiviralen Proteinen zugeordnet. Mit den übrigen Vertretern der Interferongruppe ist IFN- $\gamma$  nur entfernt verwandt.

Es wird ausschließlich von aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen produziert und sezerniert (Trinchieri G 1985). Dabei unterliegt die Expression von IFN- $\gamma$  verschiedenen regulativen Einflüssen und wird unter anderem von IL-2 und IFN- $\gamma$  selbst induziert (Grabstein K 1986).

Wichtige immunmodulatorische Eigenschaften von IFN- $\gamma$  stellen die Aktivierung von Makrophagen sowie die Modulation unterschiedlicher Zellmembranantigene dar (Trinchieri G 1985). Seine antivirale Wirkung und Resistenz gegenüber vielen unterschiedlichen Viren entfaltet IFN- $\gamma$  durch Hemmung des viralen Replikationszyklus an mehreren Stellen (Ulker N 1985). Die antiproliferative Wirkung konnte durch die Reaktion von Zellen unterschiedlichen Ursprungs auf IFN- $\gamma$  mit einer Wachstumshemmung gezeigt werden (Pfizenmaier K 1985).

Hinsichtlich der CLL konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  die B-Zellen von CLL-Patienten vor der Apoptose schützt (Buschle, Campana et al. 1993), (Zaki, Douglas et al. 2000). Dabei korreliert das Ausmaß der hemmenden Wirkung auf die Apoptose direkt mit der Schwere der Erkrankung (Rojas, Roman et al. 1996).

Der genaue Pathomechanismus, durch welchen IFN- $\gamma$  die vergrößerte Überlebensfähigkeit der leukämischen B-Zellen bewirkt, ist jedoch noch unbekannt. Als ein möglicher Pfad wird eine durch IFN- $\gamma$  vermittelte, verstärkte Expression der NO-Synthetase NOS2 diskutiert (Levesque, Misukonis et al. 2003). Eine auf diesem Weg erzielte, erhöhte Konzentration von Stickstoffmonoxid (NO) könnte als Erklärung der Apoptosehemmung dienen, da NO als ein wichtiger Regulator des natürlichen Zelltodes angesehen wird.

Der 1988 klonierte und auf Chromosom 6 kodierte IFN- $\gamma$ -Rezeptor weist eine ausgesprochene Spezifität auf (Aguet M 1988). Im Gegensatz zu den anderen Zytokinrezeptoren, welche gewisse strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen und dadurch in drei große Gruppen eingeteilt werden können, lässt sich der IFN- $\gamma$ -Rezeptor aufgrund fehlender Ähnlichkeit und Sequenzhomologie zu anderen klonierten Zytokinrezeptoren keiner dieser Gruppen zuordnen

(Benton H 1991). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der IFN- $\gamma$ -Rezeptor für die Signalübermittlung nicht ausreichend ist. Ein nicht näher definierter essentieller Faktor (transducer) scheint sich auf Chromosom 21 zu befinden (Langer JA 1988).

Bindet IFN- $\gamma$  an seinen Rezeptor, so kommt es zu einer Phosphorylierung des Rezeptormoleküls. Des Weiteren verändern sich die Konzentrationen des intrazellulären Kalziums und der second messenger cAMP und cGMP (Langer JA 1988).

### **1.2.3. APO-1/Fas und sein Rezeptor (CD95)**

Das Antigen CD95 stellt den Fas-Rezeptor dar, welcher auch als APO-1 bezeichnet wird. Es handelt sich dabei um ein 48 kDalton schweres Glykoprotein, das zur Superfamilie der TNF/NGF-Rezeptoren gehört.

APO-1 vermittelt Signale des natürlichen Zelltodes ins Zellinnere. Es ist auf der Oberfläche vieler Zelllinien der myeloischen und lymphatischen Zellreihe, den normalen B-Zellen miteingeschlossen, exprimiert.

Im Gegensatz hierzu ist auf der Oberfläche von CLL-Zellen eine verringerte oder gänzlich fehlende Expression von CD95 feststellbar (Robertson MJ 1995). Demzufolge könnten die CLL-Zellen mittels einer Down-Regulation des Fas-Antigens eine Resistenz gegenüber der durch den Fas-Liganden vermittelten Apoptose erlangen.

#### 1.2.4. CD52

Das Antigen CD52 ist auf der Oberfläche von mehr als 95% aller Lymphozyten und Monozyten sowie auf den meisten B- und T-Zell-Lymphomen nachweisbar. Granulozyten-Subpopulationen exprimieren das Antigen nur in geringen Mengen. Erythrozyten, Thrombozyten und Stammzellen exprimieren CD52 überhaupt nicht.

Auf B-Zell-Neoplasien scheint das Antigen in höherem Maße nachweisbar zu sein als auf T-Zell-Neoplasien, was vor allem für die CLL und die lymphoblastischen Leukämien gilt (Hale G 1988).

Die Funktion des CD52 auf Lymphozyten ist noch weitestgehend unbekannt.

Die Tatsache, dass dieses Antigen weder auf Erythrozyten und Thrombozyten noch auf Stammzellen des Knochenmarks exprimiert wird, ermöglicht den Einsatz von Antikörpern gegen CD52 ohne eine negative Beeinflussung der normalen Hämatopoese (Hale G 1988).

In diesem Zusammenhang findet der monoklonale Antikörper Campath-1H (Alemtuzumab) Anwendung. Es handelt sich dabei um einen humanisierten IgG1-Antikörper, der an das Antigen CD52 bindet.

Basierend auf einer komplementabhängigen und antikörpervermittelten Zytotoxizität nutzt Campath-1H körpereigene Effektorfunktionen zur Lyse der Zielzelle (Schriever and Huhn 2003).

### 1.3. Aufgabenstellung

Die CLL ist durch eine Akkumulation maligner B-Zellen in peripherem Blut, Knochenmark und anderen Organen gekennzeichnet. Die Proliferationsrate des initialen malignen Zellklons ist in der Regel jedoch nur gering und kann somit für die Akkumulation nicht allein verantwortlich gemacht werden. Deshalb wird angenommen, dass eine Fehlfunktion in der Apoptose der B-Zellen eine wichtige mitwirkende Ursache für die Expansion von CLL-Zellen sein könnte.

Aus diesem Grund fokussiert sich ein großer Teil der gegenwärtigen CLL-Forschung auf die Induktion und Regulation des natürlichen Zelltodes der neoplastischen B-Zellen.

Unter verschiedenen Mechanismen der B-CLL-Zellen zur Umgehung der Apoptose spielen Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche und immunregulatorische Moleküle eine wichtige Rolle.

In diesem Zusammenhang ergab sich die Fragestellung nach Expressionsmustern apoptoserelevanter Moleküle der B-CLL. Wie schon dargelegt, gibt es Hinweise, dass veränderte Expressionen der Rezeptoren von Interleukin-4, Interferon-gamma und des Fas-Liganden für die gestörte Apoptose bei der CLL verantwortlich sein könnten. Deshalb fanden die folgenden Antigene besondere Berücksichtigung:

- CD124 (Interleukin-4-Rezeptor)
- CD119 (Interferon-gamma-Rezeptor)
- CD95 (Fas-Ligand-Rezeptor)

Zusätzlich wurde die Expression des Oberflächenantigens CD52 untersucht, welches als Zielmolekül für den monoklonalen Antikörper Campath-1H (Alemtuzumab) einen viel versprechenden Angriffspunkt neuer immuntherapeutischer Strategien darstellt.

Hierzu wurde peripheres Blut von CLL-Patienten und von gesunden Spendern mit Hilfe durchflußzytometrischer Untersuchungen analysiert.

Des Weiteren ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Welcher Anteil der Zellen exprimiert die verschiedenen Oberflächenantigene bei CLL-Patienten und bei gesunden Probanden?

- Unterscheiden sich die Anteile der ermittelten Antigenexpressionen zwischen Patienten und Probanden?
- Kann ein Schwellenwert festgelegt werden, mit Hilfe dessen eine Überexpression der relevanten Oberflächenantigene von einer normalen Expression, die charakteristischerweise bei gesunden Probanden zu finden ist, getrennt werden kann?
- Besteht eine Korrelation zwischen der Expression der Oberflächenantigene CD95 und CD124?

## **2.0. Patienten, Methoden und Materialien**

Der Einsatz aller in dieser Arbeit verwendeten Materialien erfolgte entsprechend den jeweiligen Herstellerangaben. Die Untersuchungen am Durchflußzytometer und die anschließende Datenanalyse stützten sich auf den Grundzügen des „Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies“ (Rothe G 1996) und an den „U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunphenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures“ (Stelzer GT 1997).

### **2.1. Gruppeneinteilung**

Über einen Zeitraum von 7 Monaten wurde peripheres Blut von 27 B-CLL-Patienten der Klinik für Innere Medizin, Abteilung Hämatologie/Onkologie der Medizinischen Fakultät Charité Campus Mitte, Universitätsmedizin Berlin, durchflußzytometrisch untersucht.

Es wurden Patienten erfasst, bei denen die Diagnose „Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp“ schon bestätigt worden war. Ihre Einordnung erfolgte in die Gruppe 1.

Zusätzlich wurde peripheres Blut von 9 gesunden Personen entnommen. Diese gesunden Blutspender wurden der Kontrollgruppe (Gruppe 2) zugeordnet.

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Probengewinnung**

Es wurde peripheres, venöses Blut aus den Kubitalvenen mit Hilfe gewöhnlicher Kanülen in EDTA-Röhrchen entnommen. Das Blut wurde möglichst unmittelbar, spätestens aber 24 Stunden nach Abnahme entsprechend der dargestellten Methoden bearbeitet, da danach die Vitalität der Zellen rasch abnahm.

### **2.2.2. Zählverfahren**

Da bei höheren Zellzahlen keine optimalen Antigen-Antikörper-Bindungen mehr vorliegen, war die Zellzählung von Bedeutung. Dazu wurden 10 µl des Probematerials mit 90 µl Türks-Lösung versetzt. Die Zellzählung des dann im Verhältnis 1:9 verdünnten Probematerials erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zell-Zählkammer. Es wurden alle Zellen in den vier Großquadranten ausgezählt und die Zellanzahl pro µl berechnet.

Bei stark erhöhten Zellkonzentrationen wurde die Probe so lange mit Phosphate-Buffered-Salt-Solution (PBS) versetzt, bis eine Zellkonzentration von ca.  $1000 \cdot 10^3$  pro ml vorlag.

### **2.2.3. Markierung von Oberflächenantigenen mit Hilfe monoklonaler Antikörper**

Die Markierung von Antigenstrukturen mittels monoklonaler Antikörper erlaubt die Analyse von Expressionsmustern der interessierenden Oberflächenmoleküle.

Dabei werden die verschiedenen Antigenstrukturen in Cluster von Differenzierungsantigenen (Cluster of Differentiation) eingeteilt und bestimmten Nummern zugeordnet, welche auf internationalen Workshops bestimmt werden. So werden diejenigen Antikörper, die das selbe Antigen erkennen, unter einer Clusternummer zusammengefasst. Diese Systematik ermöglicht das Erstellen einer international gültigen Nomenklatur.

Die Auswahl der Antikörper muss sorgfältig erfolgen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

In dieser Arbeit fand die Mehrfarben-Immunfluoreszenz mit FITC-, PE- und PC5-konjugierten Antikörpern Anwendung. Diese Kombination erfüllte dabei sowohl das Kriterium der deutlich voneinander abweichenden Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe als auch der gemeinsamen Anregbarkeit durch die Wellenlänge der Argon-Laserstrahlen.

Das Probematerial wurde mit einem Screening-Panel bestehend aus 13 unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern analysiert (*Tabelle 3*). Die gleichzeitige Markierung mit mehreren Oberflächenantigenen war dabei zur Identifizierung bestimmter Zellen unerlässlich.



Es wurde vorausgesetzt, dass Antigenstrukturen und Antikörperbindungen sich während der Untersuchung nicht ändern.

Entsprechend den Herstellerangaben wurden 10 µl vom jeweiligen Antikörper bzw. 20 µl bei Kombinationspräparaten in die Proberöhrchen einpipettiert. Danach erfolgte das Einpipettieren von 100 µl des Probematerials. Nach dem Mischvorgang mit Hilfe des „Vortex“-Mischers folgte eine 15minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln.

*Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper*

Antikörper	CD-Klassifikation	Klon	Fluorochrom	Hersteller des Antikörpers
IgG1	nicht geclustert	X.40	FITC	Becton Dickinson
IgG1	nicht geclustert	X.40	PE	Becton Dickinson
IgG1	nicht geclustert	X.40	PC5	Bender Med Systems
Anti-(T3)	CD3	UCHT1	PC5	Immunotech
Anti-(Leu-3a) Anti-(Leu-2a)	CD4 CD8	13B.8.2/B9.11	FITC PE	Immunotech Kombinationspräparat
Anti-(Leu-1)	CD5	L17F12	FITC	Becton Dickinson
Anti-(Leu-1)	CD5	L17F12	PE	Immunotech
Anti-(Leu12)	CD19	J4.119	PC5	Immunotech
Anti-(CAMPATH-1)	CD52	YTH66.9	PE	Serotec
Anti-(APO-1)	CD95	DX2	PE	Becton Dickinson
Anti-(IFN-γR)	CD119	BB1E2	FITC	Serotec
Anti-(IL-4R)	CD124	S4-56C9	PE	Immunotech

Unter Berücksichtigung der Beschreibungen der benutzten Antikörper von den jeweiligen Herstellern folgt eine kurze Charakterisierung der getesteten Antigenstrukturen:

**CD3:** CD3 ist Teil eines größeren Komplexes, zu dem auch der T-Zell-Rezeptor gehört. Es wird von reifen T-Zellen und Thymozyten exprimiert. Die T-Zell-Aktivierung kann ausgelöst werden, indem einem T-Zell-Rezeptor durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) ein Fremdanigen präsentiert wird. In Kombination mit CD4 und CD8 eignet es sich als Marker für die Kompensation.

**CD4:** Das Antigen CD4 besitzt ein Molekulargewicht von 55 kDalton und stellt ein T-Zellantigen dar. Es wird von Helferzellen, Monozyten und transformierten B-Lymphozyten exprimiert. In Kombination mit CD3 und CD8 eignet es sich als Marker für die Kompensation.

**CD5:** CD5 ist ein Pan-T-Zell-Marker, der zusätzlich von aktivierten B-Lymphozyten exprimiert wird. Außerdem kann CD5 auf malignen Zellen von B-CLL-Patienten nachgewiesen werden. Sein Molekulargewicht beträgt 67 kDalton.

**CD8:** CD8 ist ein T-Zell-Antigen, das von zytotoxischen T-Lymphozyten und Suppressorzellen exprimiert wird. In Kombination mit CD3 und CD4 eignet sich das 32 kDalton schwere Antigen als Marker für die Kompensation.

**CD19:** CD19 ist ein Pan-B-Zell-Marker mit einem Molekulargewicht von 95 kDalton. Unter anderem wird es zur Unterscheidung von Lymphomen der B- und T-Zell-Reihe herangezogen. CD19 besitzt eine wichtige Rolle in der B-Zell-Aktivierung (Doody GM 1996).

**CD52:** CD52 stellt ein Ziel von Campath-1H-Antikörpern dar, welche die Zielzellen über verschiedene Mechanismen lysieren. Die genaue Funktion von CD52 ist noch unbekannt.

**CD95:** Das 48 kDalton schwere Antigen stellt das Rezeptor-Molekül für den Fas-Liganden dar. CD95 wird der TNF/NGF-Familie zugerechnet.

**CD119:** CD119 stellt das Fusionsprotein des extrazellulären Teils des Interferon- $\gamma$ -Rezeptors dar.

**CD124:** Das Antigen CD124 stellt die  $\alpha$ -Kette des IL-4-Rezeptors dar (Idzerda RL 1990). Exprimiert wird es von reifen B- und T-Zellen, Fibroblasten, hämatopoetischen Vorläuferzellen und Endothelzellen. Sein Molekulargewicht beträgt 140 kDalton.

#### **2.2.4. Erythrozytolyse**

Um eine Behinderung der durchflußzytometrischen Messungen durch die hohe Erythrozytenzahl in den Proben zu vermeiden, musste vor der jeweiligen Analyse eine Elimination der roten Blutkörperchen durchgeführt werden. Dazu wurde nach Markierung des Probematerials mit den entsprechenden Antikörpern die Erythrozytenlyse-Methode angewandt.

Zunächst wurde die FACS-Lysing-Solution (Becton Dickinson, San Jose, Calif) im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Von dieser Lysis-Gebrauchslösung wurden 2 ml dem Probematerial hinzugegeben und mit Hilfe des „Vortex“-Gerätes gemischt.

Aufgrund der geringen osmotischen Resistenz der kernlosen roten Blutkörperchen lysieren diese bei Raumtemperatur im Dunkeln innerhalb einer Zeitspanne von 10 Minuten vor den kernhaltigen Zellen. Die Entfernung der Lysis-Gebrauchslösung erfolgte danach durch zweimaliges Waschen mit PBS.

#### **2.2.5.0. Messung mit dem Durchflußzytometer**

Die Messungen mit dem Durchflußzytometer (FACSsort, Fluorescence Activated Cell Sorter, Becton Dickinson) wurden im FACS-Labor der Klinik für Innere Medizin, Abteilung Hämatologie/Onkologie der Charité Campus Mitte, Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt.

### 2.2.5.1. Messprinzip

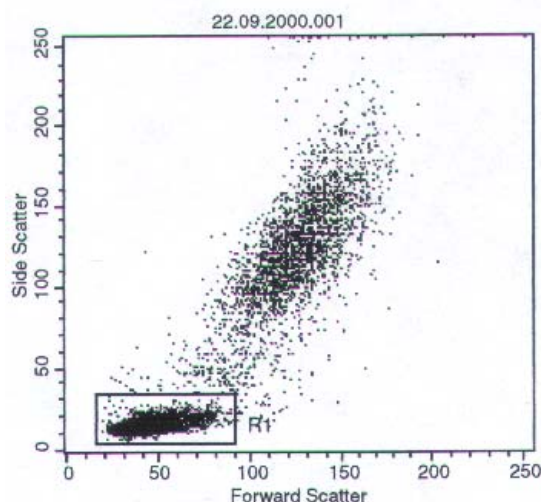
Mithilfe des Durchflußzytometers ist eine Zelltypisierung von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften möglich.

Die Zellen werden mittels einer Kapillare in einen coaxialen Hüllstrom eingestreut, der sich in der Messkammer so verjüngt, dass die Zellen sequentiell im Kreuzungspunkt von Laserstrahl und Flüssigkeitsstrom fokussiert werden (hydrodynamische Fokussierung). Sobald eine Zelle den Analysepunkt, den Schnittpunkt zwischen Flüssigkeits- und Laserstrahl, erreicht, kommt es zu einer Streuung des Laserstrahls.

Gemessen wird einerseits die Intensität des Lichtes, welches in Vorwärtsrichtung (Forward Scatter) entlang des einfallenden Lichtstrahls mit einem kleinen Ablenkungswinkel von 0.5-2° streut. Diese sogenannte Vorwärtslichtstreuung ist in erster Linie ein Maß für die Zellgröße. Andererseits wird noch die Intensität des Lichtes, welches in Seitwärtsrichtung (Side Scatter) mit einem Ablenkungswinkel von 90° streut, gemessen. Dieses sogenannte Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Zellgranularität.

Mittels dieser beiden Komponenten lassen sich die drei Leukozytengruppen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten voneinander abgrenzen. Dabei können die Lymphozyten mithilfe des „Gating“ (Abbildung 2), also der Selektion einer spezifischen Zellpopulation, eingegrenzt werden (Borowitz MJ 1997).

Abbildung 2: Lymphozyten-Gating



Zusätzlich zur Lichtstreuung wurde parallel die Fluoreszenz von markierten Antikörpern gemessen. Besitzt eine Zelle eine Fluoreszenzmarkierung, so kommt es zu einer Absorption von Lichtenergie in einem für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenbereich. Dadurch werden Elektronen in ein höheres Energieniveau gehoben, fallen dann in das Ausgangsniveau zurück und emittieren dabei Licht höherer Wellenlänge. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet.

#### **2.2.5.2. Messung**

Bevor mit dem Durchflußzytometer gemessen werden konnte, musste zunächst die Geräteempfindlichkeit optimiert und kalibriert werden.

Hierfür wurden FITC- (Fluoreszeinisothiocyanat), PE- (Phycoerythrin) und PC5- (Konjugation von Phycoerythrin mit Cyanin 5.1) markierte Beads zusammen mit isotoner Kochsalzlösung in ein Analyseröhrchen gegeben. Dadurch konnte die Justierung der optischen Bank zur Optimierung der Parameter Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzintensität erfolgen.

Um ein durch das breite Emissionsspektrum der Fluorochrome bedingte „Überstrahlen“ in den Fluoreszenzbereich anderer Fluorochrome zu vermeiden, wurde eine Kompensation mit Anti-CD4-FITC, Anti-CD8-PE und Anti-CD3-PC5 durchgeführt.

In der Vorwärts-Seitwärts-Streulicht-Darstellung wurde ein Schwellenwert (Diskriminator) gesetzt, welcher alle Impulse darunter ausschließt, damit Verunreinigungen oder nicht erwünschte Partikel wie tote Zellen vermieden werden.

Zur Bestimmung der Autofluoreszenz der Zellen und der unspezifischen Bindungen wurde eine Isotypenkontrolle herangezogen. Die Autofluoreszenz entspricht dabei dem Fluoreszenzlicht, welches die Zellen mittels zytoplasmatischer Fluorochrome emittieren.

Nach dem Durchführen dieser Voreinstellungen am Durchflußzytometer wurden pro Proberöhrchen bei den Patienten 10000 Zellen bzw. 50000 bei den Kontrollpersonen gemessen. Die Durchflussrate betrug hierbei zwischen 300 und 700 Zellen pro Sekunde.

Speicherung und Auswertung der Messergebnisse erfolgten schließlich am Power Macintosh Computer 7600/132 mit Hilfe der Software „Cellquest“ von Becton Dickinson.

## 2.2.6. Auswertung

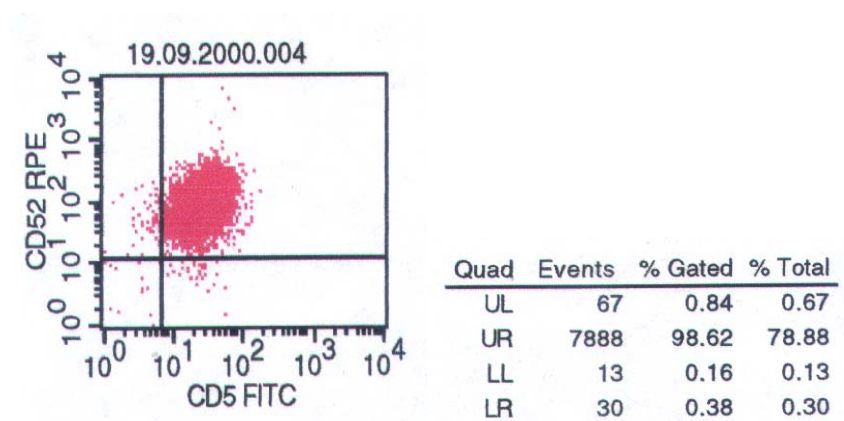
Mit Hilfe der Messwerte für Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht konnte durch das Setzen von „Gates“ die Lymphozytenpopulation eingegrenzt werden. So fanden in der weiteren Auswertung und Bestimmung der Antigenexpression ausschließlich die in dieser Analysenregion eingeschlossenen Lymphozyten Berücksichtigung.

Des Weiteren konnte durch ein zusätzliches „Gating“ der das B-Zell-Antigen CD19 exprimierenden Zellen die B-Zell-Population ermittelt werden.

Die Software „Cellquest“ von Becton Dickinson wurde zur weitergehenden quantitativen Auswertung herangezogen. „Cellquest“ ermöglicht das Erstellen von Quadranten- und Histogrammstatistiken. Dies erlaubt die optimale Differenzierung einzelner Zellpopulationen und die Berechnung der entsprechenden prozentualen Verteilung von Subpopulationen.

An folgender Abbildung (*Abbildung 3*) wird deutlich, dass mit 98.62 % die überwiegende Mehrheit der Zellen am Beispiel einer CD5/CD52-Messung sich im oberen rechten Quadranten (UR) befindet und somit für beide Markierungen positiv ist.

*Abbildung 3*: Beispiel der Verteilung von Zellpopulationen



## 2.2.7. Statistik

Die statistische Auswertung der experimentell erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 9.0 im Institut für Medizinische Biometrie der Medizinischen Fakultät Charité, Universitätsmedizin Berlin.

Es wurde der Unterschied zwischen den beiden Gruppen der CLL-Patienten und der Kontrollpersonen (*Tabelle 4*) hinsichtlich der Oberflächenantigenexpressionen untersucht.

*Tabelle 4:* Einteilung der untersuchten Gruppen

Gruppe 1	Gruppe 2
Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ	Kontrollgruppe Gesunde Blutspender
n = 27	n = 9

Legende: n = Anzahl der analysierten Proben

Zur vergleichenden Betrachtung der beiden Untersuchungsgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Dieser kann auch bei kleinen Stichproben ohne Vorhandensein einer Normalverteilung benutzt werden.

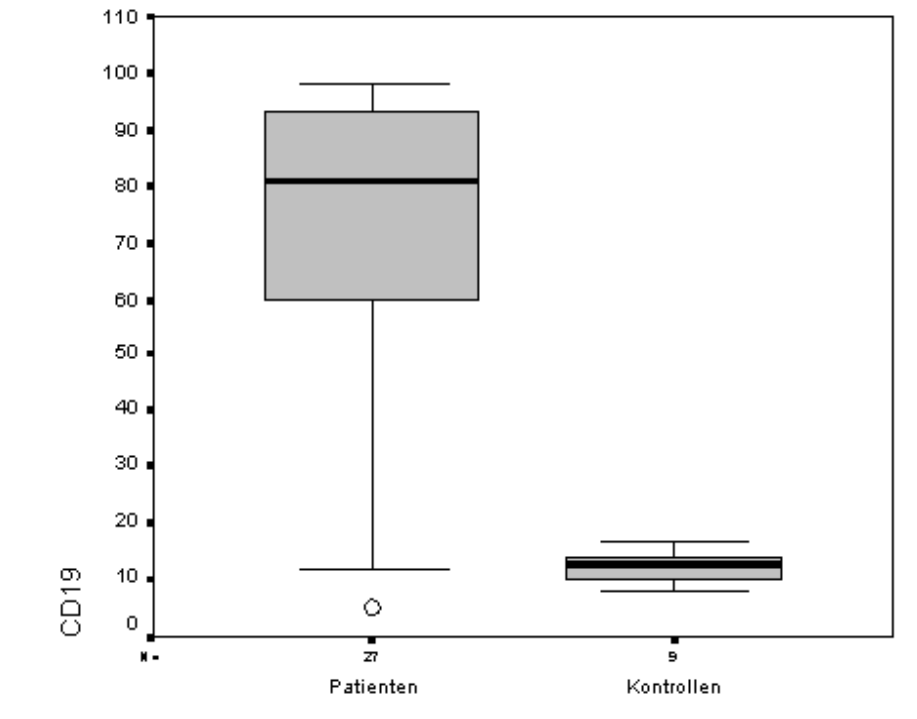
Der Test untersucht, ob zwei Stichproben vom Umfang n aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Hierfür werden die Messwerte der beiden Stichproben zusammengefasst, der Größe nach geordnet und dann Rangzahlen verteilt. Anschließend erfolgt mit den Rangzahlen der Werte, die einer Stichprobe zugehörig sind, die Bestimmung der Rangsumme. Aus dieser wird eine entsprechende Prüfgröße ermittelt (Guggenmoos-Holzmann I 1995), (KD 1995).

In dieser Arbeit wurde für die Annahme, dass zwei Stichproben aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen, als Signifikanzniveau eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  festgesetzt.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Box-Plots (*Abbildung 4*). Dabei wurde die Box als Rechteck so gezeichnet, dass oberhalb und unterhalb derselben jeweils 25% der Werte liegen und die Box dementsprechend 50% der Werte beinhaltet. Der Median wurde durch eine waagerechte Linie gekennzeichnet. Eine obere und untere horizontale Linie

kennzeichnen zusätzlich eine als „innere Eingrenzung“ bezeichnete Messwertspanne. Außerhalb dieser „inneren Eingrenzung“ gelegene Messwerte sind als „o“ gekennzeichnet.

Abbildung 4: Box-Plot-Graphik am Beispiel einer CD19 Messreihe

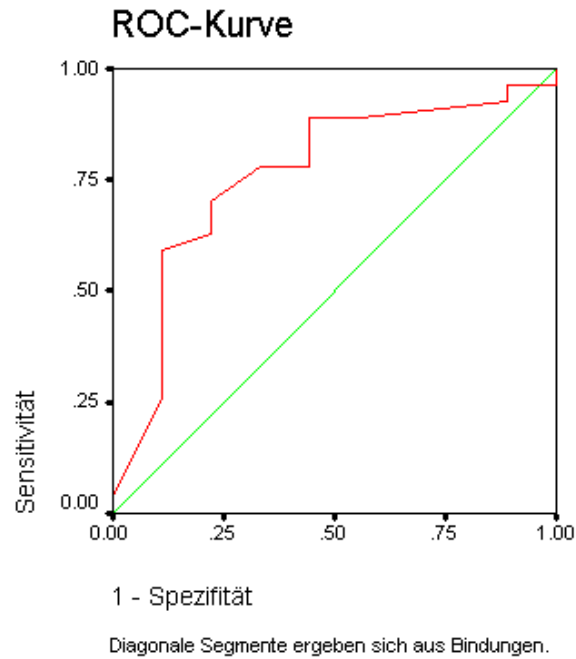


Für einige Antikörperkombinationen, die im Mann-Whitney-U-Test signifikante Unterschiede zeigten, wurden Schwellenwerte bestimmt, welche die pathologischen Werte von den Werten bei gesunden Personen trennen. Die Bestimmung des Schwellenwertes erfolgte sowohl anhand der ermittelten Ergebnisse als auch mit Hilfe von Receiver-Operating-Kurven (ROC-Kurven).

Für die Erstellung der ROC-Kurven erfolgte zunächst die Bestimmung von Spezifität und Sensitivität für verschiedene Messwerte bzw. Schwellenwerte, welche im Messwertbereich der jeweiligen Messreihe lagen. In einem Diagramm wurden dann die zugehörigen Wertepaare Sensitivität und 1-Spezifität gegeneinander aufgetragen und miteinander verbunden (Abbildung 5).



Abbildung 5: Receiver-Operating-Kurve am Beispiel der CD95/CD19 Messreihe



Bei fehlender Überlappung von Messwerten der Patientengruppe mit Messwerten der Kontrollgruppe erhält die ROC-Kurve eine Rechteck-Form. Im Gegensatz hierzu nimmt die ROC-Kurve bei völliger Übereinstimmung der Werte die Form einer Winkelhalbierenden an. Die in dieser Arbeit erstellte ROC-Kurve stellt sich zwischen der rechtwinkligen Form und der Form einer Winkelhalbierenden dar.

Zusätzlich zur ROC-Kurve wurde zur Bestimmung des Schwellenwertes ein Vergleich der Wertepaare Sensitivität und 1-Spezifität für verschiedene Schwellenwerte hinzugezogen (Abbildung 6).

Abbildung 6: Die Wertepaare Sensitivität und 1-Spezifität für verschiedene Schwellenwerte am Beispiel einer CD95/CD19 Messreihe

Positiv, wenn kleiner oder gleich <sup>a</sup>	Sensitivität	1 - Spezifität
-1.0000	.000	.000
.5000	.037	.000
1.5000	.259	.111
2.5000	.407	.111
3.5000	.593	.111
4.5000	.630	.222
5.5000	.704	.222
6.5000	.778	.333
7.5000	.778	.444
8.5000	.852	.444
10.0000	.889	.444
12.0000	.889	.556
14.5000	.926	.889
16.5000	.963	.889
19.5000	.963	1.000
23.0000	1.000	1.000

In den sich anschließenden Vierfeldertests wurde zur Analyse einer eventuellen Zufälligkeit der unterschiedlichen Häufigkeiten der Merkmalsausprägungen der  $\chi^2$ -Test angewandt.

### 2.3. Arbeitsanleitung und Auflistung der Materialien

Nachfolgend sind in *Tabelle 5* die Arbeitsschritte im Sinne einer Arbeitsanleitung zusammengestellt.

In der *Tabelle 6* sind die in den Untersuchungen verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Geräte und Zusatzmaterialien aufgeführt. Die verwendeten Antikörper sind in der *Tabelle 3* zusammengefasst.

Regelmäßig wurde eine Überprüfung und Qualitätssicherung des Durchflußzytometers durchgeführt.

*Tabelle 5: Arbeitsanleitung*

<b>Probenentnahme</b>	Abnahme von peripherem, venösem Blut in ein EDTA-Röhrchen
<b>Lagerung</b>	Aufbewahrung der Probe bei Raumtemperatur (+22°C bis -2°C) bis zur Weiterverarbeitung; die maximale Lagerungszeit der Proben sollte 24 Stunden nicht überschreiten
<b>Zellzählung</b>	10 µl der Probe mit 90 µl Türks-Lösung (Essigsäure-Genitiava-Violett-Lösung, Diagnostica Merck) versetzen. Mit der Neubauer-Zell-Zählkammer die Zellen in allen 4 Eckquadranten zählen und danach die Zellanzahl pro µl berechnen
<b>Einstellen der Zellzahl</b>	Bei stark erhöhten Zellkonzentrationen Probe mit PBS versetzen, bis eine Zellkonzentration von ca. $1000 \cdot 10^3$ Zellen pro ml vorliegt
<b>Markierung der Lymphozyten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Entsprechend den Herstellerangaben 10 µl vom jeweiligen Antikörper bzw. 20 µl bei Kombinationspräparaten in die Probenröhrchen einpipettieren.</li> <li>•Einpipettieren von 100 µl der Probe</li> <li>•Mischen mit Hilfe des „Vortex“-Mischers</li> <li>•Probe 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren</li> </ul>
<b>Lyse der Erythrozyten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Entsprechend den Herstellerangaben wird die FACS-Lysing-Solution, Becton Dickinson, 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt</li> <li>•2 ml dieser Lysis-Gebrauchslösung in jedes Probenröhrchen einpipettieren</li> <li>•Mischen mit „Vortex“-Mischer</li> <li>•10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln lysieren lassen</li> </ul>

<b>Waschen (zweimal)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Mit der „Hettich universal 30F“-Zentrifuge bei 1200 U/min 5 min zentrifugieren</li> <li>•Zellfreien Überstand abkippen</li> <li>•Resuspension des Zellpellets durch Einpipettieren von 2 ml PBS</li> </ul>
<b>Lagerung der aufbereiteten Probe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Zellfreien Überstand abkippen</li> <li>•Resuspension des Zellpellets durch Einpipettieren von 500 µl PBS</li> <li>•Zum Schutz vor Verunreinigungen die Probenröhrchen mit Aluminiumfolie abdecken</li> <li>•Aufbewahren der Zellsuspension im Kühlschrank bei einer Temperatur von ca. 4°C bis zur Messung</li> </ul>
<b>Probenanalyse</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aufrufen des Cellquest-Programms am Power Macintosh 7600/132 Computer</li> <li>•Probenröhrchen mit „Vortex“-Mischer mischen</li> <li>•Setzen des Schwellenwertes in der Vorwärts-/Seitwärts-Streulichtdarstellung</li> <li>•Kompensation</li> <li>•Datenaufnahme von 10000 Zellen bei Patientenproben bzw. 50000 Zellen bei Kontrollproben von Gesunden</li> </ul>
<b>Datenauswertung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Die ermittelten Messwerte werden mit dem Cellquest-Programm der Firma Becton Dickinson ausgewertet</li> <li>•Quadrantenstatistik</li> <li>•Histogrammstatistik</li> <li>•Vergleich der ermittelten Zellpopulationen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests</li> <li>•Erstellen von Kreuztabellen für bestimmte Antigenkombinationen und statistische Analyse mithilfe des Chi-Quadrat-Tests</li> </ul>

*Tabelle 5 (Fortsetzung)*

Tabelle 6: Materialien und Geräte

	Hersteller
Chemikalien und Reagenzien	
<b>Aqua dest</b>	B. Braun, Melsungen
<b>Phosphat-Buffered-Salt-Solution</b>	Bibco Europe Ltd., Paisley
<b>Türks-Lösung (Essigsäure-Geniativa-Violett-Lösung)</b>	Diagnostica Merck
<b>Facs-Lysingsolution</b>	Becton Dickinson, San Jose
Geräte	
<b>Lichtmikroskop Leitz</b>	Leica
<b>Vortex-Mischer</b>	Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik
<b>Hettich universal 30 F-Zentrifuge</b>	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
<b>FACSort</b>	Becton Dickinson
<b>Power Macintosh 7600/132 Computer</b>	Macintosh
Zusätzlich verwendete Materialien	
<b>Software Cellquest</b>	Becton Dickinson
<b>Neubauer Zellzählkammer</b>	Assistent, Germany
<b>Pipetten verschiedener Größen</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Pipettenspitzen: 0.5-10 µl; 10-100 µl; 250-500 µl; 500-2000 µl</b>	Eppendorf Hamburg
<b>Messröhrchen Falcon 2052</b>	Becton Dickinson
<b>Messröhrchen klein zum Verschließen</b>	Becton Dickinson

### **3.0. Ergebnisse**

Zur Bestimmung der Expression verschiedener Antigene fanden im experimentellen Teil der Arbeit durchflußzytometrische Analysen statt.

Dabei wurde peripheres Blut von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie der B-Zell-Reihe und von gesunden Blutspendern untersucht.

Nach Zusammenfassung der erhaltenen Messwerte in die jeweiligen Gruppen erfolgte die weitergehende Auswertung. Zur Verdeutlichung der resultierenden unterschiedlichen Immunmarkerbefunde zwischen gesunden Spendern und Patienten wurden graphische Darstellungen in Form von Box-Plot-Graphiken angewandt.

Für ausgewählte Antigenkombinationen wurden Vierfelder-Tests durchgeführt. Die Bestimmung des jeweils optimalen Schwellenwertes erfolgte auch mit Hilfe von Receiver-Operating-Kurven (ROC-Kurven).

Außerdem wurde eine mögliche Korrelation zwischen der Oberflächenexpression zweier Antigene mittels eines Punktwolken-Diagramms untersucht.

#### **3.1.0. Expressionsmuster der untersuchten Oberflächenantigene**

Zur durchflußzytometrischen Analyse der Lymphozyten hinsichtlich der Expression von Oberflächenantigenen wurde ein aus 13 monoklonalen Antikörpern bestehendes Screening-Panel (*Tabelle 3*) herangezogen.

*Tabelle 7* und *Tabelle 8* fassen die ermittelten prozentualen Anteile antigenexprimierender Lymphozyten von gesunden Spendern und Patienten zusammen.

Für jegliche Messwertreihe ist jeweils eine Box-Plot-Darstellung zur graphischen Hervorhebung der unterschiedlichen Verteilung der Antigenexpressionen angeführt. Außerdem werden für alle Messwertreihen der Maximalwert, Minimalwert und der Mittelwert angegeben.

Des Weiteren sind für jede immunphänotypische Untersuchungsreihe beispielhaft jeweils Dot-Plots aus der Patientengruppe wie auch aus der Kontrollgruppe dargestellt. Bei einigen ausgewählten Oberflächenmarkern wurde zusätzlich die sensitivere Darstellung in Histogrammen angewandt.

Zum Vergleich der beiden Untersuchungsgruppen hinsichtlich signifikanter Unterschiede wurde der Mann-Whitney-U-Test hinzugezogen.

*Tabelle 7: Anteile antigenexprimierender Lyphozyten bei CLL-Patienten*

Antigen (%)	Pat.1	Pat.2	Pat.3	Pat.4	Pat.5	Pat.6	Pat.7
CD5	95.56	83.24	95.88	97.76	98.7	90.94	96.29
CD19	80.03	63.3	93.24	94.22	96.41	63.28	93.33
CD5/19	79.38	60.18	92.22	93.46	96.16	63.05	91.46
CD52/19	99.91	99.94	98.88	99.46	97.01	99.92	99.98
CD95/19 (D)	3.05	1.91	1.26	1.83	1.14	6.47	2.67
CD95/19 (H)	41.56	17.1	3.93	26.57	35.49	38.53	34.06
CD119/19 (D)	0.25	1.62	0.7	2.21	1.71	2.04	4.74
CD119/19 (H)	29.46	33.87	13.42	24.12	27.17	44.17	15.99
CD124/19 (D)	83.46	65.27	45.16	31.06	64.67	67.19	69.46
CD124/19 (H)	88.66	78.86	50.63	62.28	92.97	86.99	88.05

*Tabelle 7 (Fortsetzung)*

Antigen (%)	Pat.8	Pat.9	Pat.10	Pat.11	Pat.12	Pat.13	Pat.14
CD5	95.65	70.11	98.85	90.21	70.58	46.39	73.99
CD19	92.15	19.31	84.37	56.81	66.14	11.84	5.45
CD5/19	90.93	4.71	83.97	56.59	65.21	1.54	1.87
CD52/19	99.78	99.84	99.84	99.58	100	99.48	100
CD95/19 (D)	0.63	3.96	7.84	22.02	0.55	15.93	13.25
CD95/19 (H)	13.94	21.97	38.43	42.88	24.76	41.14	53.85
CD119/19 (D)	1.03	1.31	4.06	2	1.37	2.67	2.5
CD119/19 (H)	25.76	56.44	21.69	6.4	37.67	95.77	75.18
CD124/19 (D)	87.56	65.27	60.5	32.07	91.99	40.99	27.35
CD124/19 (H)	94.66	87.39	74.68	43.84	94.3	77.5	66.41

*Tabelle 7 (Fortsetzung)*

Antigen (%)	Pat.15	Pat.16	Pat.17	Pat.18	Pat.19	Pat.20	Pat.21
CD5	97.75	72.42	94.71	94.6	77.22	99.25	99.25
CD19	81.3	32.61	67.68	82.45	75.24	98.33	96.84
CD5/19	81.12	26.27	66.59	82.42	63.82	98.26	96.76
CD52/19	99.82	100	99.92	99.98	99.98	99.78	99.93
CD95/19 (D)	7.68	6.26	3.4	1.71	1.37	8.82	4.83
CD95/19 (H)	43.03	39.7	35.56	14.48	9.11	15.99	26.64
CD119/19 (D)	0.4	1.19	0.3	0.76	0.4	5.34	0.08
CD119/19 (H)	29.29	43.29	16.07	37.02	16.44	14	16.3
CD124/19 (D)	83.61	84.77	3.98	73.1	62.84	82.84	80.56
CD124/19 (H)	91.56	92.18	52	91.82	78.13	86.39	80.55

*Tabelle 7 (Fortsetzung)*

Antigen (%)	Pat.22	Pat.23	Pat.24	Pat.25	Pat.26	Pat.27
CD5	92.05	98.61	71.35	96.47	69.59	94.47
CD19	93.7	97.9	14.42	86.81	51.61	82.66
CD5/19	88.21	97.03	9.86	85.83	41.44	81.95
CD52/19	96.59	99.8	100	99.25	99.88	99.98
CD95/19 (D)	2.92	0.89	2.46	5.2	1.36	3.17
CD95/19 (H)	20.79	7.12	61.36	51.22	21	99.98
CD119/19 (D)	0.58	0.3	16.08	2.12	16.16	1.4
CD119/19 (H)	22.02	7.77	88.97	40.87	41.8	24.99
CD124/19 (D)	93.71	93.43	74.51	94.8	87.54	90.61
CD124/19 (H)	96.24	93.81	90.85	97.56	92.69	97.82

Legende: D: Dot-Plot-Auswertung H: Histogramm-Auswertung



*Tabelle 8: Anteile antigenexprimierender Lymphozyten bei Kontrollpersonen*

Antigen (%)	K1	K2	K3	K4	K5
CD5	65.8	76.02	68.53	74.82	56.57
CD19	12.59	9.52	13.4	10.48	8.4
CD5/19	1.31	0.64	1.3	1.02	2.16
CD52/19	99.82	99.88	99.95	99.72	99.43
CD95/19 (D)	6.09	23.44	4.32	11.42	12.54
CD95/19 (H)	17.13	31.61	20.74	24.64	39.87
CD119/19 (D)	0.65	0.96	0.9	0.79	9.55
CD119/19 (H)	32.44	34.09	30.33	33.6	40.44
CD124/19 (D)	2.56	19.52	4.16	9.14	11.66
CD124/19 (H)	28.61	37.19	24.79	43.8	51.92

*Tabelle 8 (Fortsetzung)*

Antigen (%)	K6	K7	K8	K9
CD5	63.4	73.27	70.81	72.6
CD19	17.46	11.83	14	15.99
CD5/19	0.39	3.36	1.75	4.27
CD52/19	97.9	100	99.6	99.9
CD95/19 (D)	0.55	6.79	12.86	13.3
CD95/19 (H)	31.09	19.51	29.55	30.4
CD119/19 (D)	0.08	3.31	2.03	2.46
CD119/19 (H)	0.61	22.63	35.64	30.53
CD124/19 (D)	0.51	58.18	14.2	52.48
CD124/19 (H)	28.76	71.07	35.22	72.8

Legende: D: Dot-Plot-Auswertung H: Histogramm-Auswertung

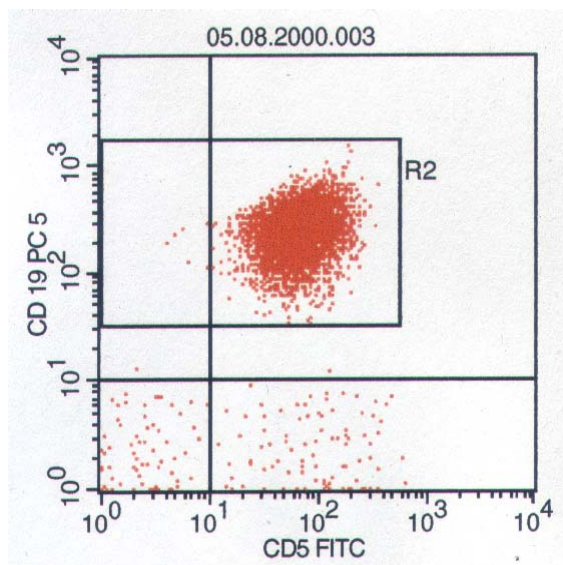
### 3.1.1. CD5

Die Markierung der Lymphozyten mit dem T-Zell-Marker CD 5, der auch von aktivierten B-Lymphozyten und malignen Zellen von B-CLL-Patienten exprimiert wird, ergab einen erhöhten Anteil CD5 positiver Zellen in der Gruppe der CLL-Patienten.

Der statistische Vergleich mit der Kontrollgruppe ergab mithilfe des Mann-Whitney-Tests einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von  $p=0.001$ .

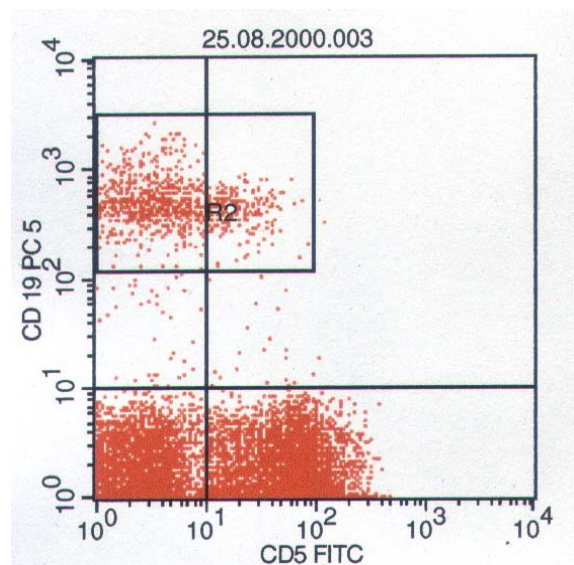
Ob dabei ein erhöhter Anteil CD5 positiver B-Lymphozyten vorlag, konnte durch eine zusätzliche Betrachtung der Koexpression mit CD19 beurteilt werden.

Abbildung 7: Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD5 Messwertreihe



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	7	0.07	0.07
UR	9414	98.26	94.14
LL	65	0.68	0.65
LR	95	0.99	0.95

Abbildung 8: Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD5 Messwertreihe

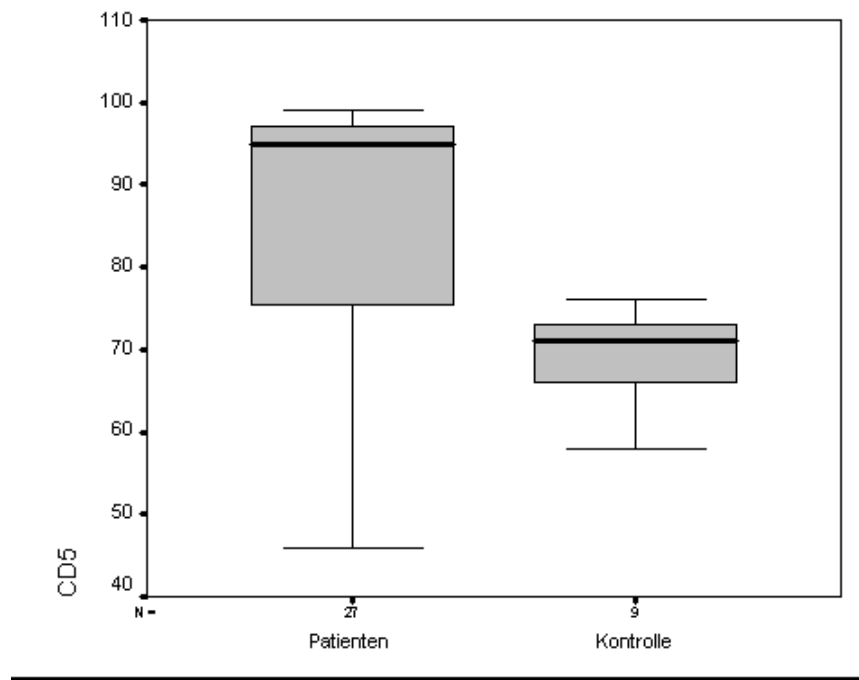


Quad	Events	% Gated	% Total
UL	715	6.24	1.43
UR	248	2.16	0.50
LL	4262	37.19	8.52
LR	6235	54.41	12.47

Tabelle 9: Ergebnisse der Messwertverteilung für den Marker CD5

	CLL-Patienten	Kontrollgruppe
Minimum (%)	46.39	56.57
Maximum (%)	99.25	76.02
Mittelwert (%)	87.48	69.33

Abbildung 9: Anteile CD5 positiver Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen



Ergebnis des Mann-Whitney-Tests:  $p=0.001$

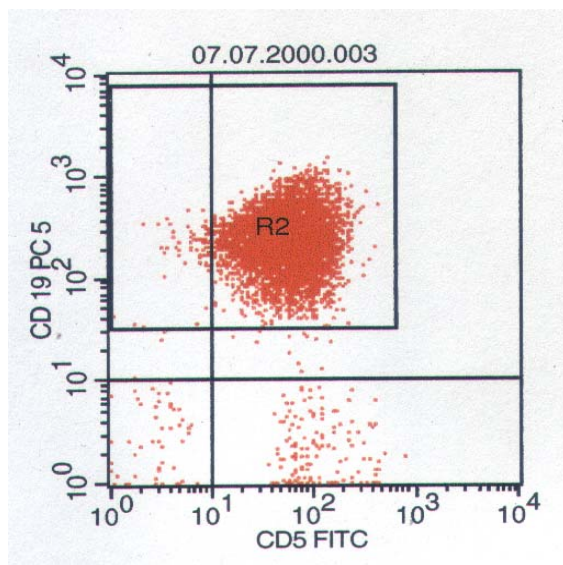
### 3.1.2. CD19

Abbildung 12 zeigt die Anteile CD19 positiver Lymphozytenpopulationen an der Gesamtheit der Lymphozyten.

Erwartungsgemäß wurden Lymphozyten, welche das Pan-B-Zell-Antigen exprimieren, wesentlich häufiger in Blutproben von CLL-Patienten nachgewiesen als in den Proben der Kontrollgruppe.

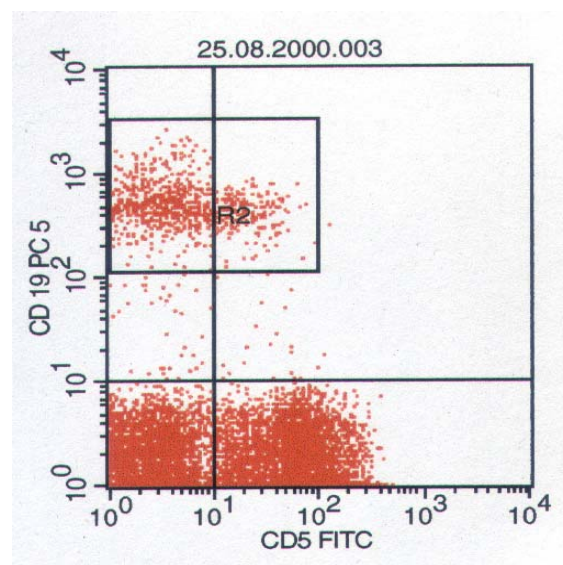
Der Unterschied zur Kontrollgruppe war mit einem p-Wert von  $p < 0.001$  hoch signifikant.

Abbildung 10: Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD19 Messwertreihe



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	80	0.87	0.80
UR	8946	97.03	89.46
LL	48	0.52	0.48
LR	146	1.58	1.46

Abbildung 11: Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD19 Messwertreihe

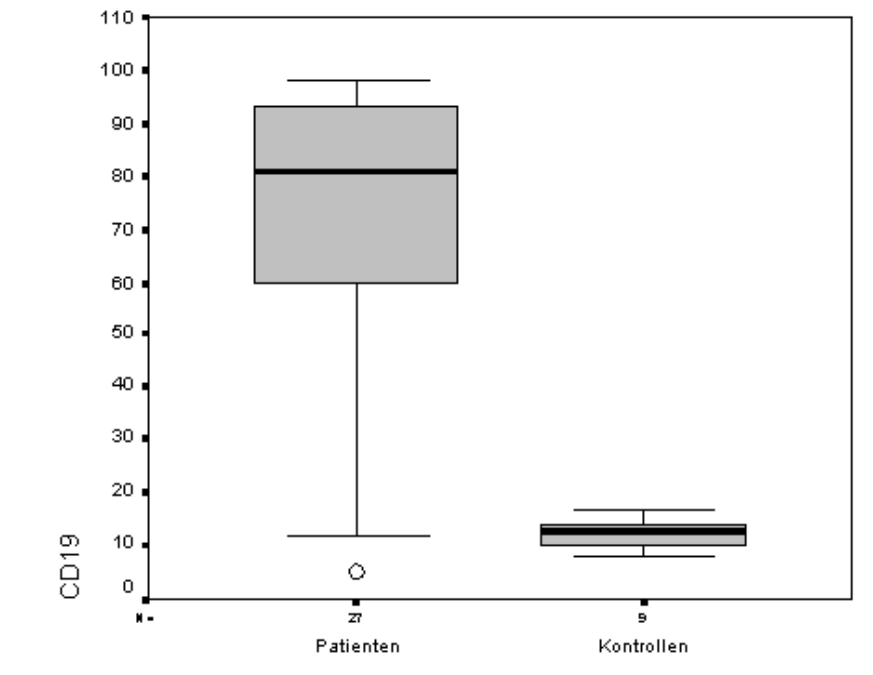


Quad	Events	% Gated	% Total
UL	710	6.20	1.42
UR	253	2.21	0.51
LL	4234	36.95	8.47
LR	6263	54.65	12.53

Tabelle 10: Ergebnisse der Messwertverteilung für den Marker CD 19

	CLL-Patienten	Kontrollgruppe
Minimum (%)	5.45	8.4
Maximum (%)	98.33	17.46
Mittelwert (%)	69.48	12.44

Abbildung 12: Anteile CD19 positiver Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen



Ergebnis des Mann-Whitney-Tests:  $p=0.000$

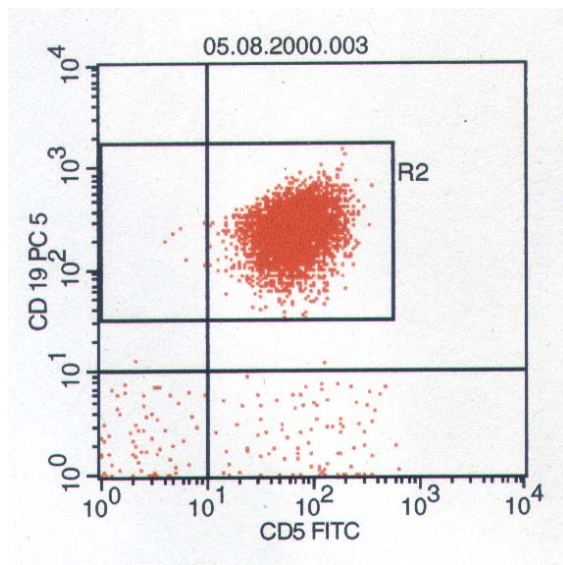
### 3.1.3. CD5/CD19

Abbildung 15 zeigt die Anteile der B-Lymphozyten, welche den Marker CD5 koexprimieren.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte für die Gruppe der CLL-Patienten eine deutliche Erhöhung CD5 positiver B-Zellen nachgewiesen werden, welche mit einem p-Wert von  $p < 0.001$  hoch signifikant war.

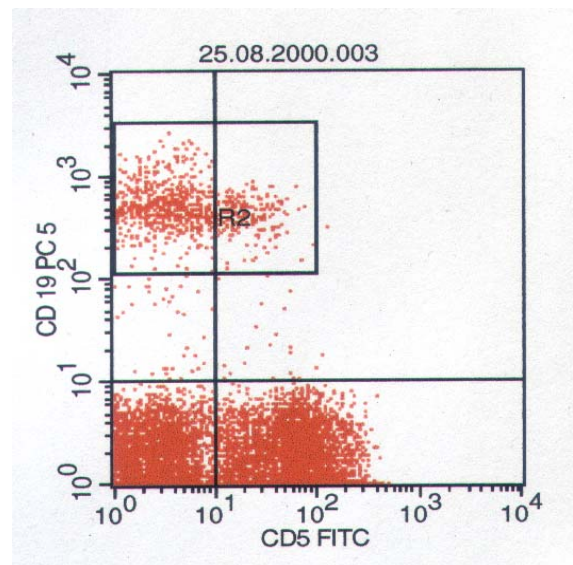
Die Messwerte in der Kontrollgruppe weisen dabei eine bemerkenswert geringe Streuung auf.

Abbildung 13: Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD5/CD19 Messwertreihe



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	7	0.07	0.07
UR	9414	98.26	94.14
LL	65	0.68	0.65
LR	95	0.99	0.95

Abbildung 14: Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD5/CD19 Messwertreihe

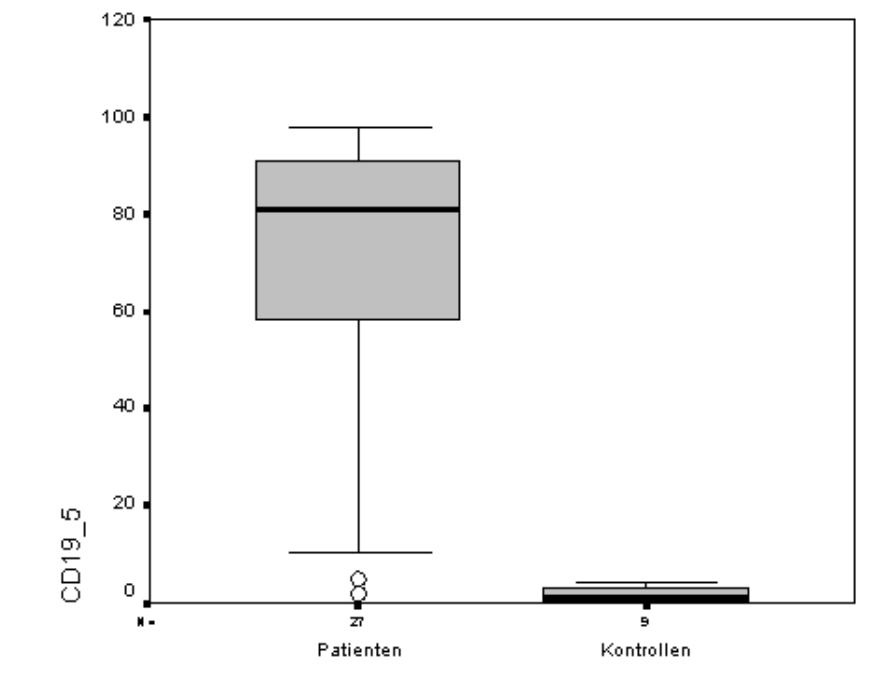


Quad	Events	% Gated	% Total
UL	710	6.20	1.42
UR	253	2.21	0.51
LL	4234	36.95	8.47
LR	6263	54.65	12.53

*Tabelle 11:* Ergebnisse der Messwertverteilung für CD5/CD19 koexprimierende Zellen

	<b>CLL-Patienten</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
Minimum (%)	1.54	0.39
Maximum (%)	98.26	4.27
Mittelwert (%)	66.66	1.82

*Abbildung 15:* Anteile CD5/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen



Ergebnis des Mann-Whitney-Tests:  $p=0.000$

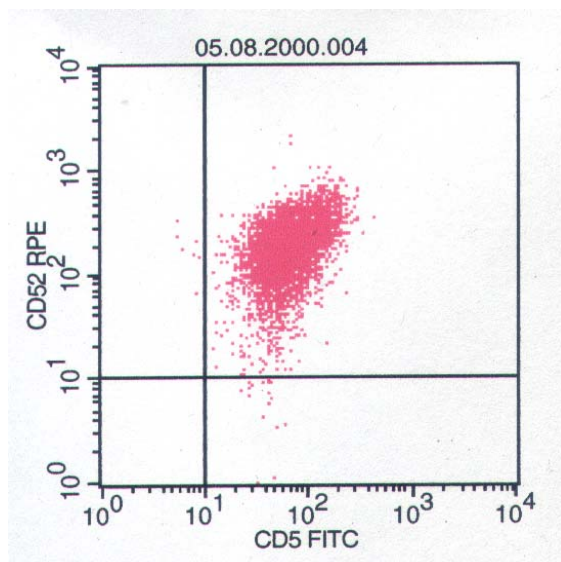
Die nachfolgenden Auswertungen erfolgten nach „Gating“ auf CD19 positive Zellen, um ausschließlich die Anteile der interessierenden koexprimierenden B-Lymphozyten ermitteln zu können (Abbildung 13).

### 3.1.4. CD52/CD19

Abbildung 18 informiert über die prozentualen Anteile CD52/CD19 koexprimierender Zellen. Sowohl für die CLL-Patienten als auch für die gesunden Kontrollpersonen konnte eine fast durchgängige Expression von CD52 bestimmt werden. Der Mittelwert lag in beiden Gruppen bei über 99 %.

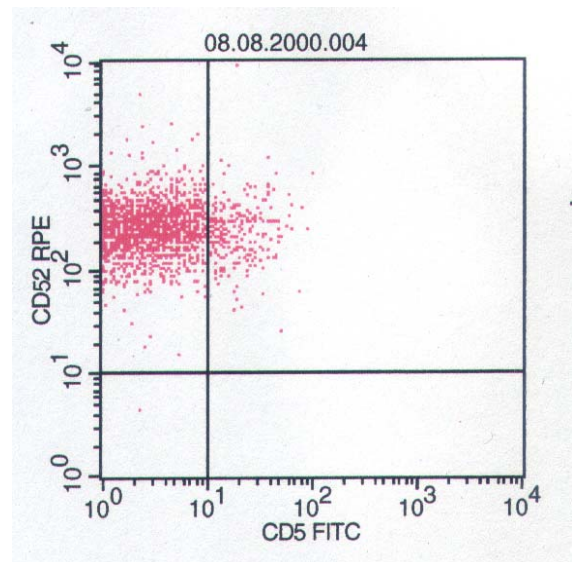
Der statistische Vergleich der beiden Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied.

Abbildung 16: Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD52/CD19 Messwertreihe



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	7	0.07	0.07
UR	9372	99.71	93.72
LL	0	0.00	0.00
LR	20	0.21	0.20

Abbildung 17: Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD52/CD19 Messwertreihe



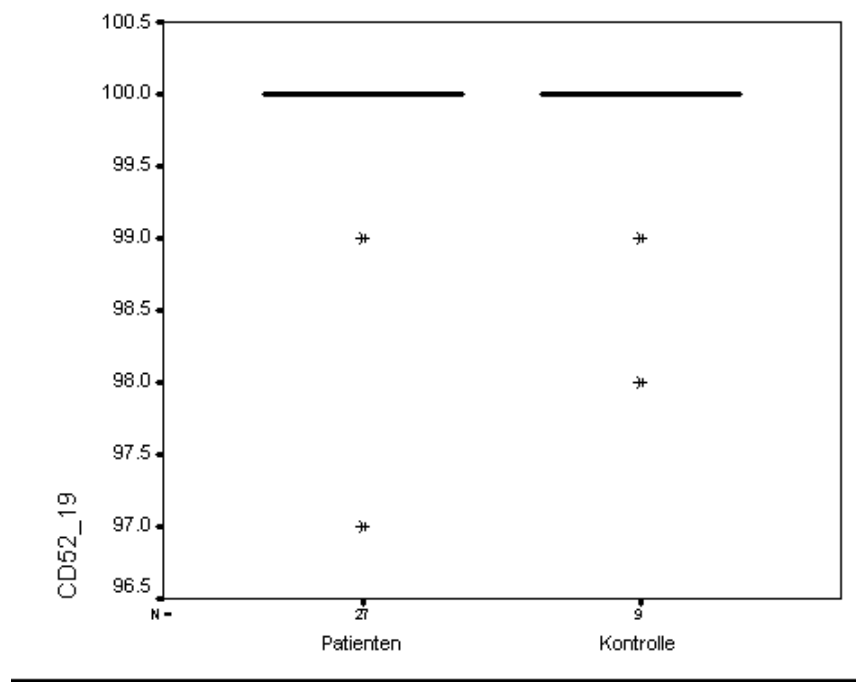
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1645	86.13	3.29
UR	264	13.82	0.53
LL	1	0.05	0.00
LR	0	0.00	0.00



Tabelle 12: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD52/CD19 koexprimierende Zellen

	CLL-Patienten	Kontrollgruppe
Minimum (%)	96.59	97.9
Maximum (%)	100	100
Mittelwert (%)	99.63	99.67

Abbildung 18: Anteile CD52/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen



Ergebnis des Mann-Whitney-Tests:  $p=1.000$

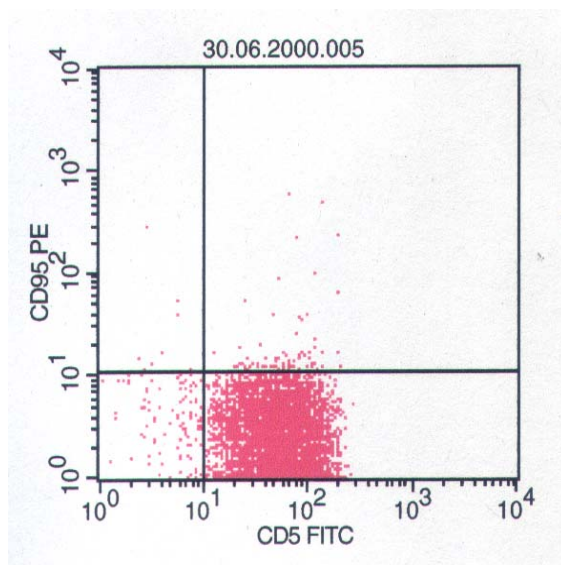
### 3.1.5. CD95/CD19 in der Dot-Plot-Auswertung

Abbildung 21 verdeutlicht, dass der Anteil CD95/CD19 koexprimierender Zellen in der Gruppe der CLL-Patienten geringer ist als in der Kontrollgruppe.

Mithilfe des Mann-Whitney-Tests konnte im statistischen Vergleich mit der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied mit  $p=0.017$  festgestellt werden.

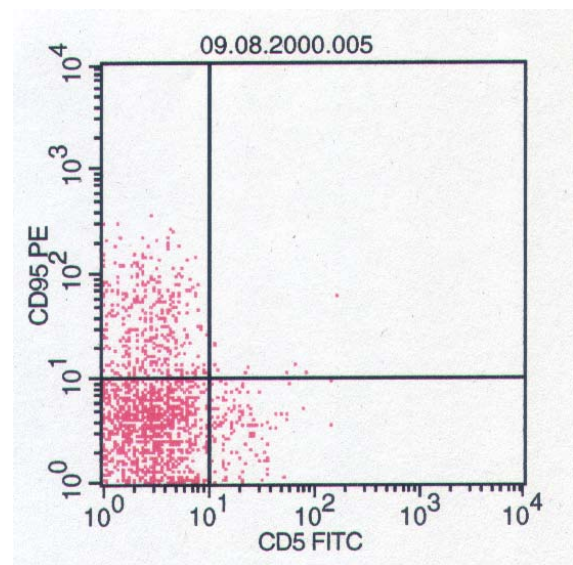
Eine zusätzlich herangezogene ROC-Kurvenanalyse (Abbildung 22) führte zu einem optimalen Schwellenwert von 6 Prozent, bezüglich welchem der sich anschließende Vierfelder-Test einen ebenfalls signifikanten Unterschied lieferte (Tabelle 14).

Abbildung 19: Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD95/CD19 Messwertreihe



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	10	0.12	0.10
UR	93	1.14	0.93
LL	113	1.38	1.13
LR	7961	97.36	79.61

Abbildung 20: Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD95/CD19 Messwertreihe

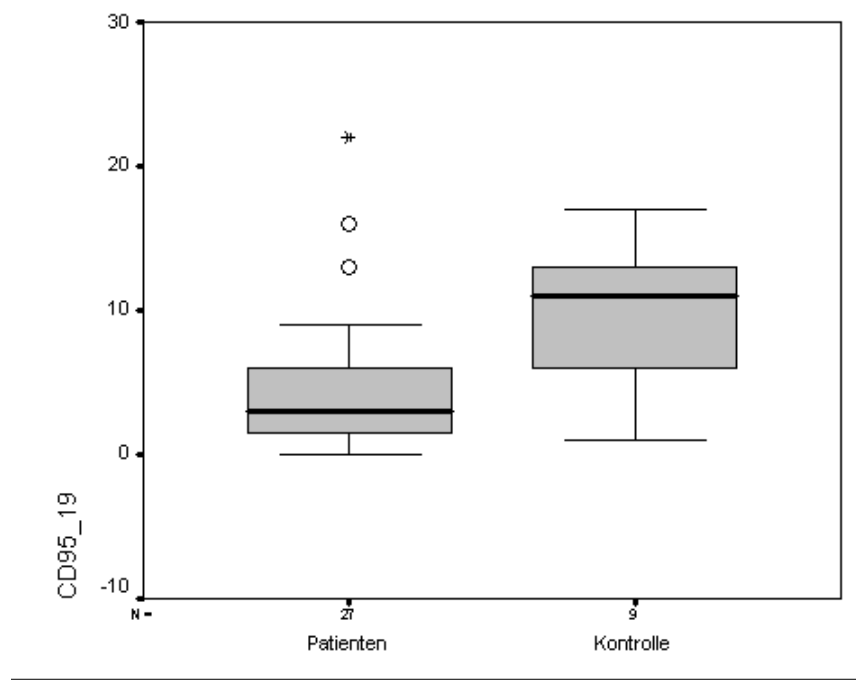


Quad	Events	% Gated	% Total
UL	373	22.83	0.75
UR	10	0.61	0.02
LL	1122	68.67	2.24
LR	129	7.89	0.26

Tabelle 13: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD95/CD19 koexprimierende Zellen

	CLL-Patienten	Kontrollgruppe
Minimum (%)	0.55	0.55
Maximum (%)	22.02	23.44
Mittelwert (%)	4.85	9.44

Abbildung 21: Anteile CD95/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen



Ergebnis des Mann-Whitney-Tests:  $p=0.017$

Abbildung 22: ROC-Kurve für CD95/CD19 mit Wertepaaren Sensitivität und 1-Spezifität

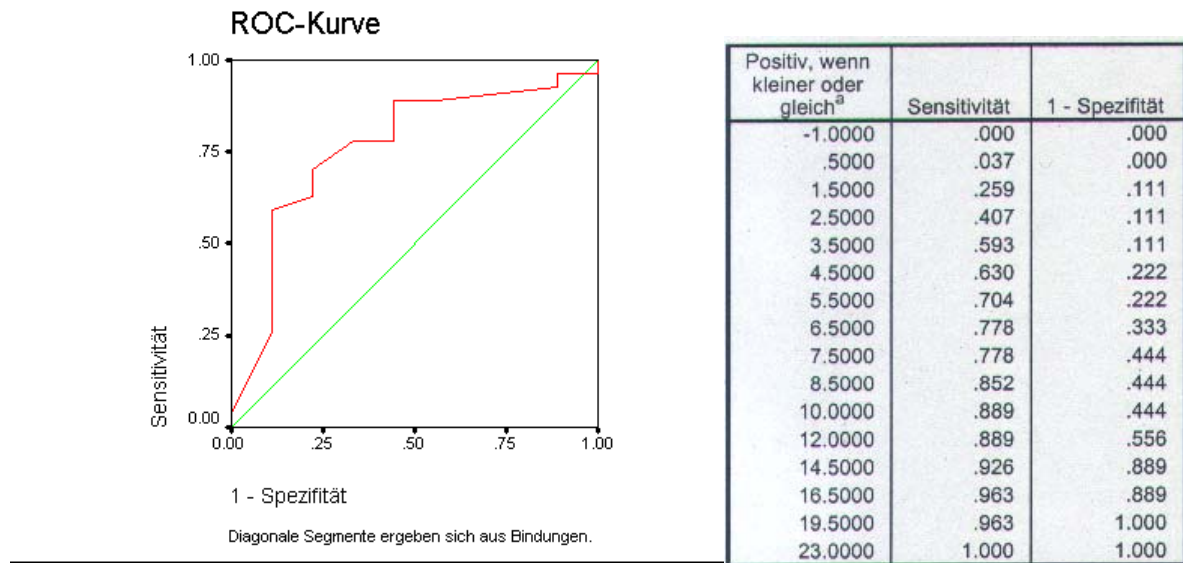


Tabelle 14: Vierfelder-Tafel für CD95/CD19 koexprimierende Zellen bei einem optimalen Schwellenwert von 6 %

	Patienten	Kontrolle	Gesamt
CD95/CD19 <6 % Anzahl	21	3	24
% von Gruppe	77.8 %	33.3 %	66.7 %
CD95/CD19 >6 % Anzahl	6	6	12
% von Gruppe	22.2 %	66.7 %	33.3 %
Gesamt Anzahl	27	9	36
% von Gruppe	100 %	100 %	100 %

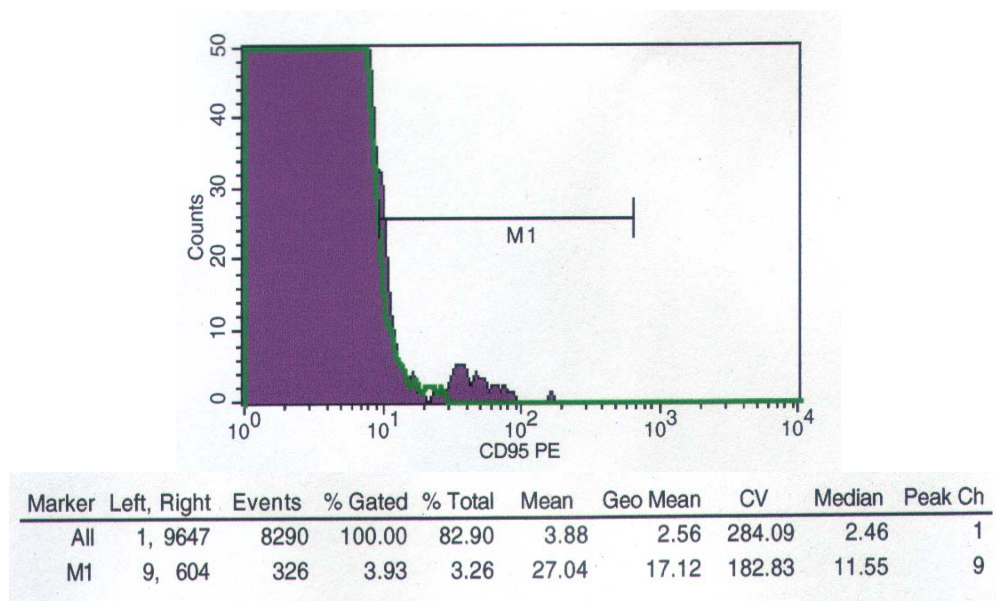
Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson:  $\chi^2=0.014$

### 3.1.6. CD95/CD19 in der Histogramm-Auswertung

Die ermittelten Anteile für CD95/CD19 koexprimierende Zellen in der Histogramm-Auswertung zeigt *Abbildung 25*.

Im Gegensatz zur Dot-Plot-Auswertung dieser Messwertreihe konnte hier kein verringerter Anteil in der Gruppe der CLL-Patienten festgestellt werden. Der statistische Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied.

*Abbildung 23:* Histogramm aus der Patientengruppe der CD95/CD19 Messwertreihe



*Abbildung 24:* Histogramm aus der Kontrollgruppe der CD95/CD19 Messwertreihe

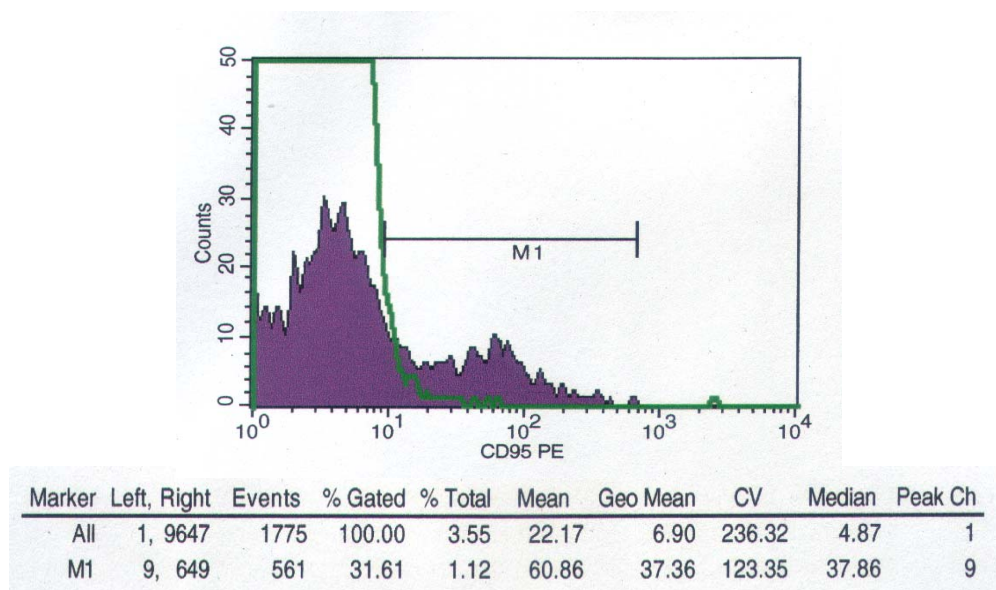
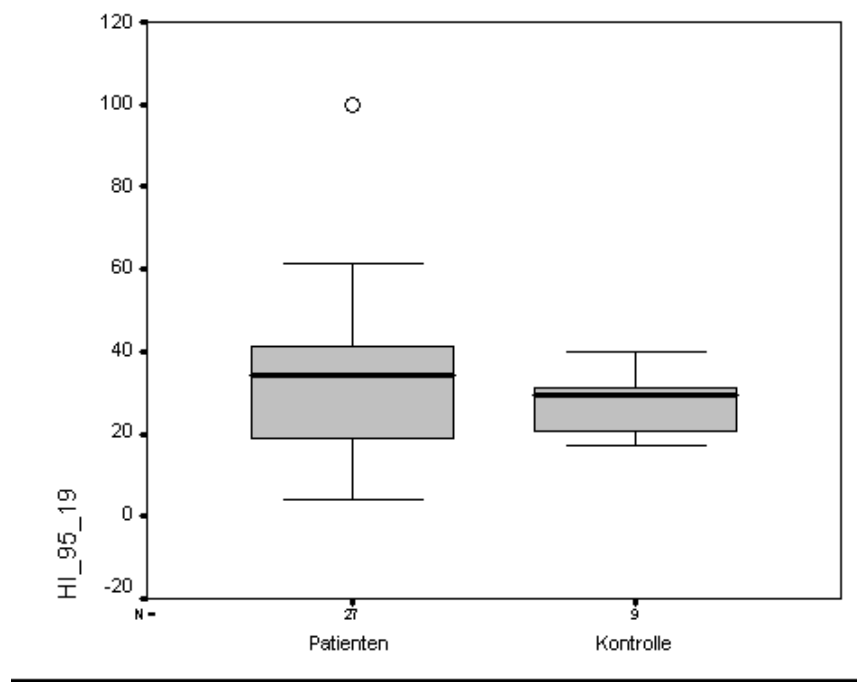


Tabelle 15: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD95/CD19 koexprimierende Zellen in der Histogramm-Auswertung

	CLL-Patienten	Kontrollgruppe
Minimum (%)	3.93	17.13
Maximum (%)	99.98	39.87
Mittelwert (%)	32.59	27.17

Abbildung 25: Anteile CD95/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen in der Histogramm-Auswertung



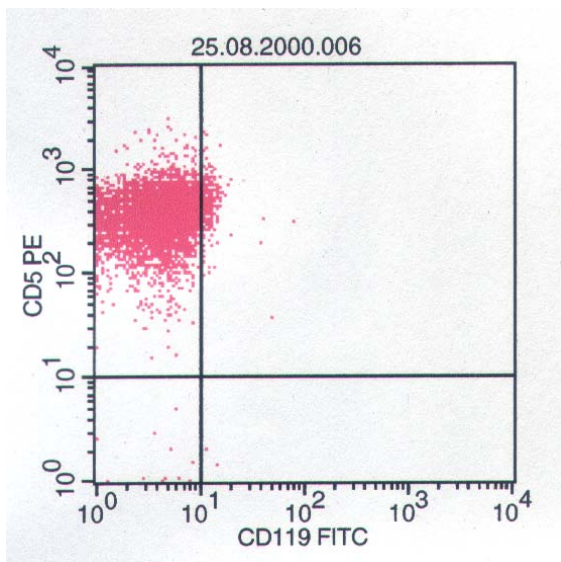
Ergebnis des Mann-Whitney-Tests:  $p=0.476$

### 3.1.7. CD119/CD19 in der Dot-Plot-Auswertung

Abbildung 28 zeigt die Anteile der B-Lymphozyten, die den Interferon- $\gamma$ -Rezeptor (CD119) exprimieren.

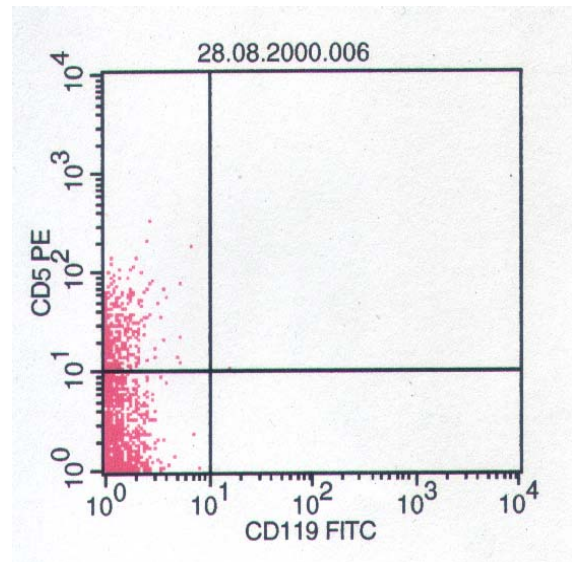
Daraus wird deutlich, dass die prozentualen Anteile der Expression von CD119 kaum differieren. Der Mann-Whitney-Test ergab keinen signifikanten Unterschied.

Abbildung 26: Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD119/CD19 Messwertreihe



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	7410	95.80	74.10
UR	312	4.03	3.12
LL	11	0.14	0.11
LR	2	0.03	0.02

Abbildung 27: Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD119/CD19 Messwertreihe

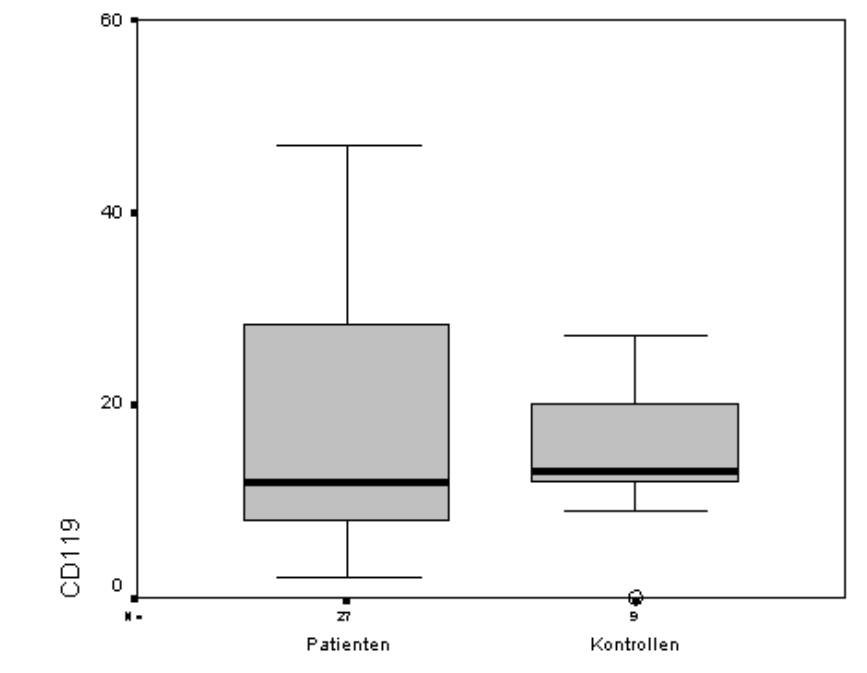


Quad	Events	% Gated	% Total
UL	396	17.67	0.79
UR	1	0.04	0.00
LL	1843	82.24	3.69
LR	1	0.04	0.00

Tabelle 16: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD119/CD19 koexprimierende Zellen

	CLL-Patienten	Kontrollgruppe
Minimum (%)	0.08	0.08
Maximum (%)	16.16	9.55
Mittelwert (%)	2.83	2.31

Abbildung 28: Anteile CD119/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen



Ergebnis des Mann-Whitney-Tests:  $p=0.868$

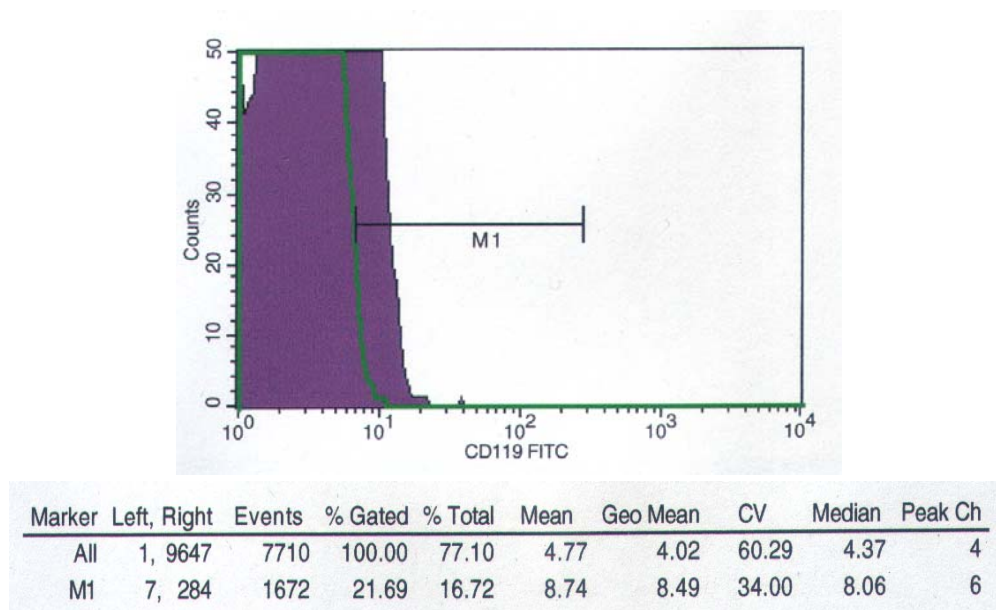


### 3.1.8. CD119/CD19 in der Histogramm-Auswertung

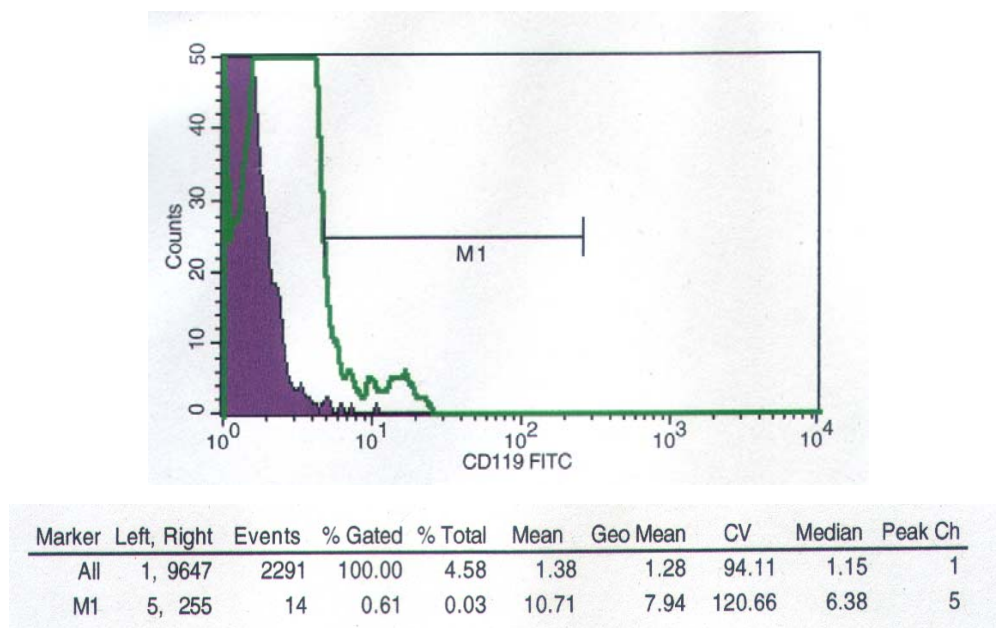
Die ermittelten Anteile für CD119/CD19 koexprimierende Zellen in der Histogramm-Auswertung zeigt *Abbildung 31*.

Parallel zur Betrachtung in der Dot-Plot-Auswertung konnten nur geringe Unterschiede festgestellt werden, welche nach statistischem Vergleich nicht signifikant waren.

*Abbildung 29*: Histogramm aus der Patientengruppe der CD119/CD19 Messwertreihe



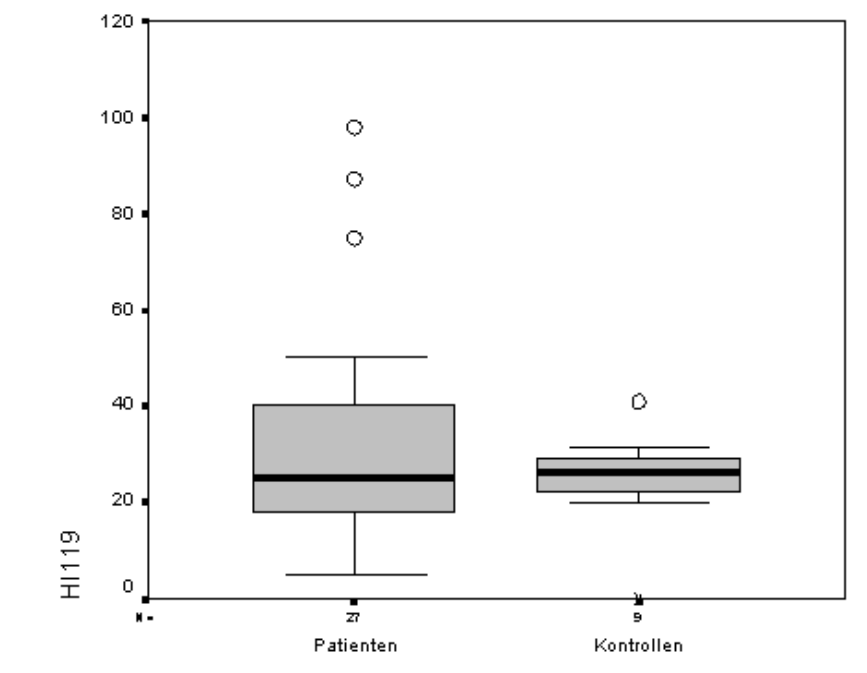
*Abbildung 30*: Histogramm aus der Kontrollgruppe der CD119/CD19 Messwertreihe



*Tabelle 17:* Ergebnisse der Messwertverteilung für CD119/CD19 koexprimierende Zellen in der Histogramm-Auswertung

	<b>CLL-Patienten</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
Minimum (%)	6.4	0.61
Maximum (%)	95.77	40.44
Mittelwert (%)	33.55	28.92

*Abbildung 31:* Anteile CD119/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen in der Histogramm-Auswertung



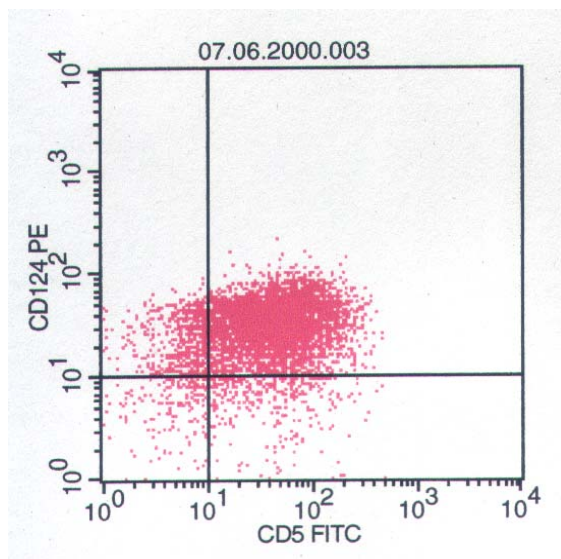
Ergebnis des Mann-Whitney-Tests:  $p=0.902$

### 3.1.9. CD124/CD19 in der Dot-Plot-Auswertung

In *Abbildung 34* sind die Anteile CD124/CD19 positiver Zellpopulationen graphisch dargestellt. Daraus wird deutlich, dass der Interleukin-4-Rezeptor zu einem wesentlich höheren Anteil auf B-Lymphozyten von CLL-Patienten exprimiert wird als von gesunden Blutspendern. Der p-Wert war mit  $p < 0.001$  hochsignifikant.

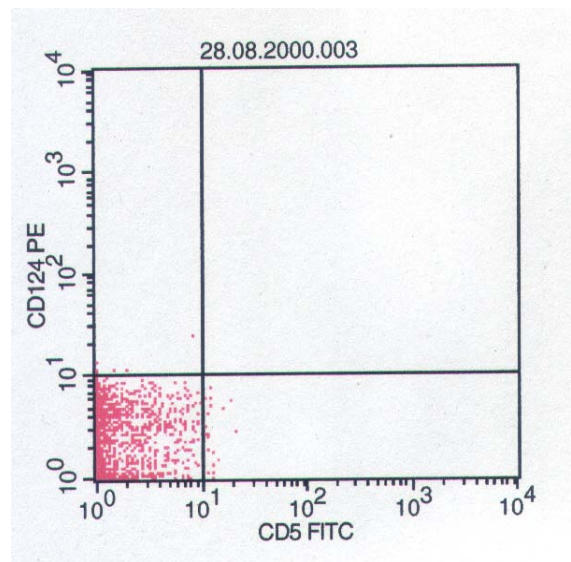
Der Mittelwert war mit 67.48% bei den CLL-Patienten mehr als dreifach so hoch wie in der Kontrollgruppe. In zusätzlich herangezogenen Vierfelder-Tafeln (*Tabelle 19* und *Tabelle 20*) wurde für die beiden gewählten Schwellenwerte bei 60 und 20 Prozent jeweils ein hoch signifikanter Unterschied im Chi-Quadrat-Test ermittelt.

*Abbildung 32:* Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD124/CD19 Messwertreihe



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	618	7.13	6.18
UR	7505	86.58	75.05
LL	184	2.12	1.84
LR	361	4.16	3.61

*Abbildung 33:* Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD124/CD19 Messwertreihe

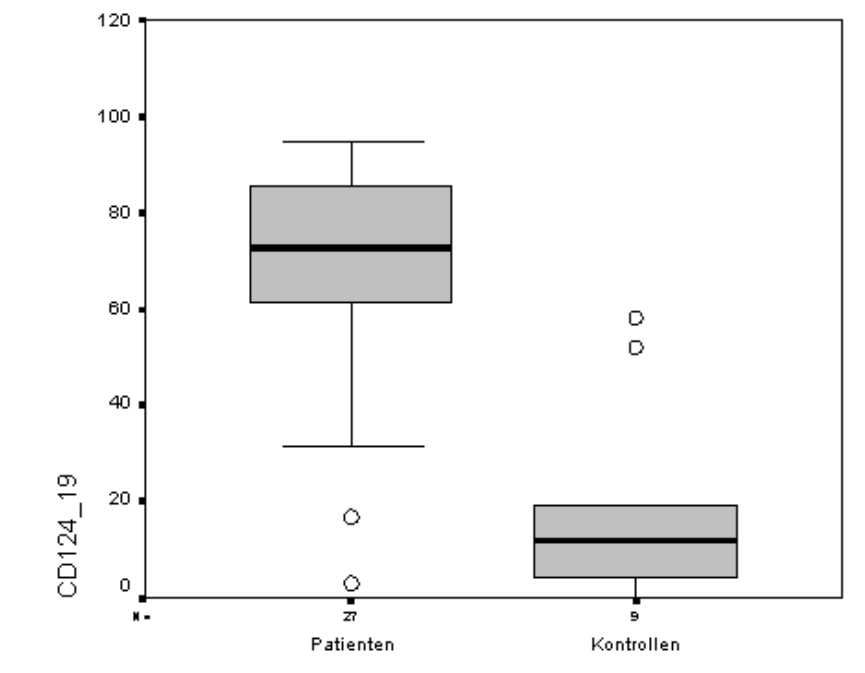


Quad	Events	% Gated	% Total
UL	11	0.51	0.02
UR	0	0.00	0.00
LL	2141	98.39	4.28
LR	24	1.10	0.05

Tabelle 18: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD124/CD19 koexprimierende Zellen

	CLL-Patienten	Kontrollgruppe
Minimum (%)	3.98	0.51
Maximum (%)	94.8	58.18
Mittelwert (%)	67.48	19.01

Abbildung 34: Anteile CD124/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen



Ergebnis des Mann-Whitney-Tests:  $p=0.000$

*Tabelle 19:* Vierfelder-Tafel für CD124/CD19 koexprimierende Zellen bei einem Schwellenwert von 60 %

	Patienten	Kontrolle	Gesamt
CD124/CD19 <60% Anzahl	6	9	15
% von Gruppe	22.2 %	100 %	41.7 %
CD124/CD19 >60 % Anzahl	21	0	21
% von Gruppe	77.8 %	0 %	58.3 %
Gesamt			
Anzahl	27	9	36
% von Gruppe	100 %	100 %	100 %

Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson:  $\chi^2=0.000$

*Tabelle 20:* Vierfelder-Tafel für CD124/CD19 koexprimierende Zellen bei einem Schwellenwert von 20 %

	Patienten	Kontrolle	Gesamt
CD124/CD19 <20% Anzahl	2	7	9
% von Gruppe	7.4 %	77.8 %	25 %
CD124/CD19 >20 % Anzahl	25	2	27
% von Gruppe	92.6 %	22.2 %	75 %
Gesamt			
Anzahl	27	9	36
% von Gruppe	100 %	100 %	100 %

Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson:  $\chi^2=0.000$

### 3.1.10. CD124/CD19 in der Histogramm-Auswertung

Abbildung 37 zeigt die Anteile CD124 exprimierender B-Lymphozyten in der Histogramm-Auswertung. Die stark erhöhte Expression des Interleukin-4-Rezeptors auf den B-Lymphozyten der CLL-Patienten ist wie auch in der Dot-Plot-Auswertung sehr gut feststellbar. Der statistische Vergleich führte mit einem p-Wert von  $p < 0.001$  zu einem hoch signifikanten Unterschied. Der Vierfelder-Test ergab für den bei 20 Prozent liegenden Schwellenwert (Tabelle 22) einen ebenfalls hoch signifikanten Unterschied.

Abbildung 35: Histogramm aus der Patientengruppe der CD124/CD19 Messwertreihe

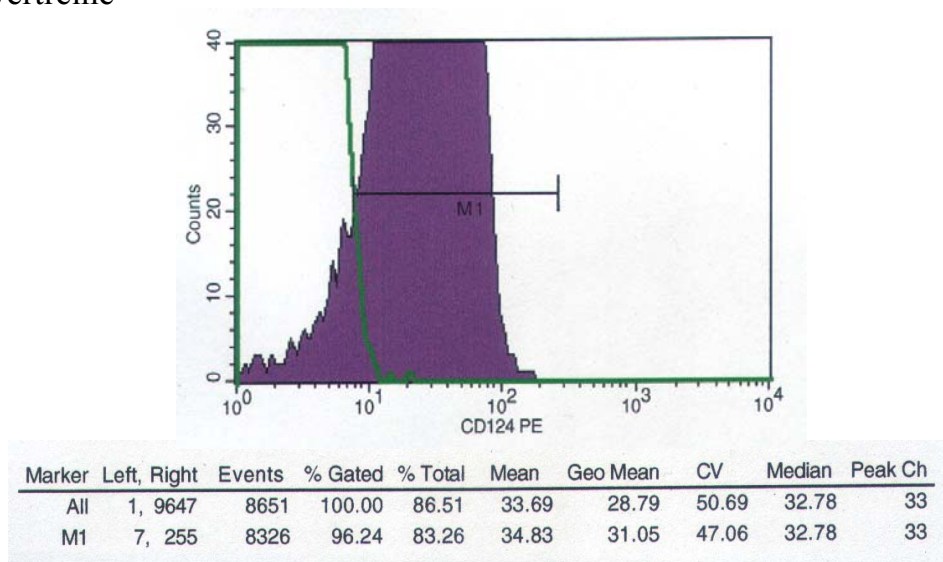
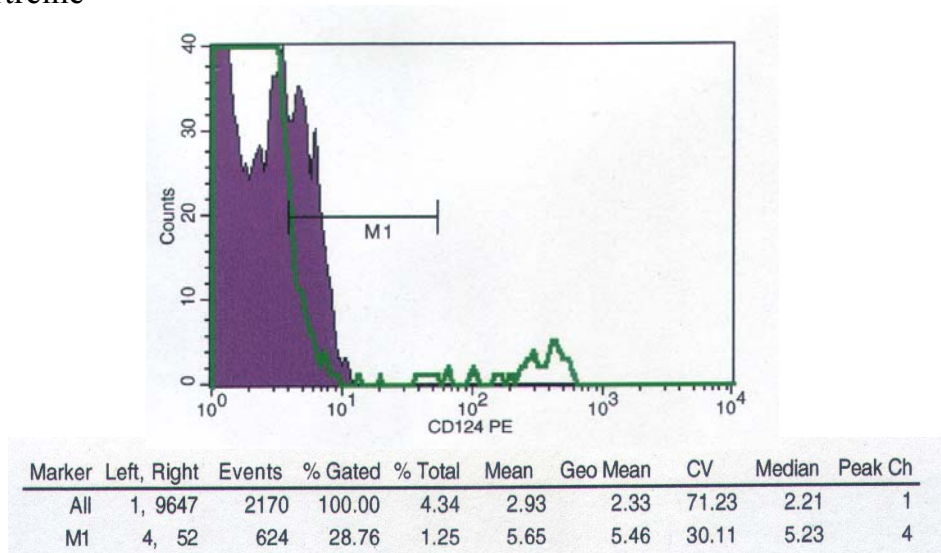


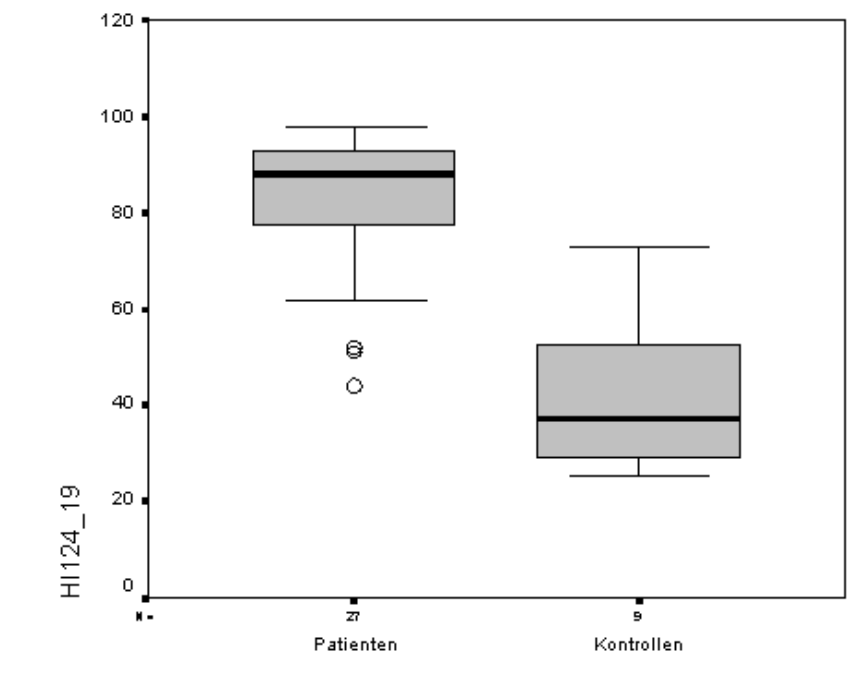
Abbildung 36: Histogramm aus der Kontrollgruppe der CD124/CD19 Messwertreihe



*Tabelle 21:* Ergebnisse der Messwertverteilung für CD124/CD19 koexprimierende Zellen in der Histogramm-Auswertung

	<b>CLL-Patienten</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
Minimum (%)	43.84	24.79
Maximum (%)	97.82	72.8
Mittelwert (%)	82.52	43.88

*Abbildung 37:* Anteile CD124/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen in der Histogramm-Auswertung



Ergebnis des Mann-Whitney-Tests:  $p=0.000$

*Tabelle 22:* Vierfelder-Tafel für CD124/CD19 koexprimierende Zellen in der Histogramm-Auswertung bei einem Schwellenwert von 60%

	Patienten	Kontrolle	Gesamt
CD124/CD19 <60% Anzahl	3	7	10
% von Gruppe	11.1 %	77.8 %	27.8 %
CD124/CD19 >60 % Anzahl	24	2	26
% von Gruppe	88.9 %	22.2 %	72.2 %
Gesamt Anzahl	27	9	36
% von Gruppe	100 %	100 %	100 %

Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson:  $\chi^2=0.000$

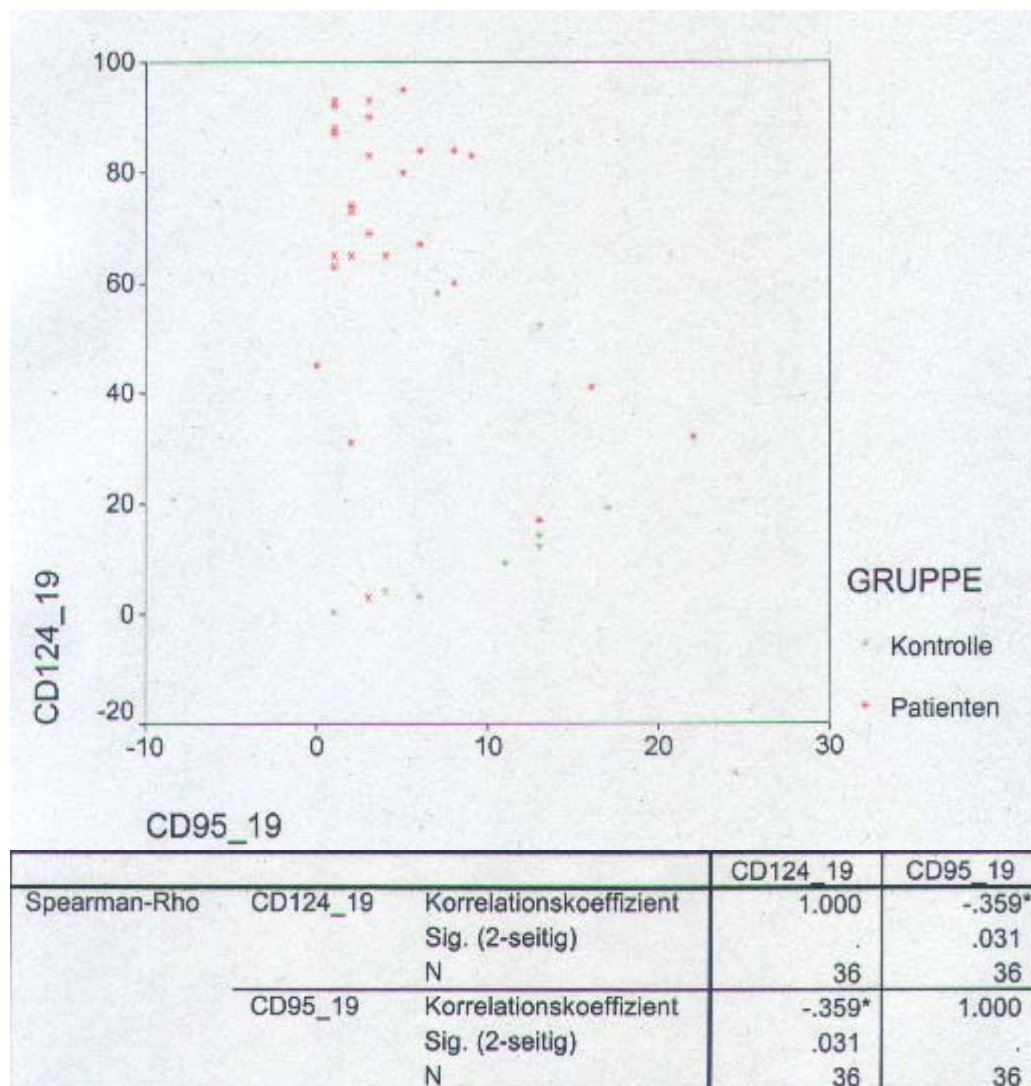


### 3.2. Korrelationsanalyse der Oberflächenexpressionen von CD95 und CD124

Abschließend sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Oberflächenexpressionen der beiden Antigene CD95 und CD124 existiert.

Anhand des hierfür erstellten Punktwolken-Diagramms (*Abbildung 38*) ist zu erkennen, dass tendenziell in der Patientengruppe eine sinkende Oberflächenexpression von CD95 mit einer steigenden von CD124 korreliert. In der Gruppe der Kontrollpersonen hingegen korreliert eine sinkende Expression von CD95 mit einer sinkenden von CD124.

*Abbildung 38*: Punktwolken-Diagramm für CD95 und CD124



## **4.0. Diskussion**

### **4.1. Diskussion der Methode**

Im Mittelpunkt der derzeitigen CLL-Forschung steht die Fehlregulation der Apoptose und eine Reihe an Mechanismen der Umgehung des natürlichen Zelltodes konnte dargestellt werden.

Da sich immunphänotypische Untersuchungen bisher hauptsächlich mit dem Nachweis einzelner Antigenstrukturen auf leukämischen B-Zellen und der Prüfung der klinischen Signifikanz ihrer Expression beschäftigten, war es Ziel dieser Arbeit, das apoptoserelevante, zelluläre Antigenprofil der B-CLL umfassender zu analysieren.

Hierzu untersuchten wir mit Hilfe der Durchflußzytometrie die Zellen von 27 Patienten mit einem Panel von 13 monoklonalen Antikörpern.

Zusätzlich untersuchten wir auch die Zellen 9 gesunder Probanden, um eigene laborspezifische Referenzwerte zu erstellen.

Dies war aufgrund der Variation durchflußzytometrischer Ergebnisse verschiedener Labore von Notwendigkeit. Auf diese Problematik wurde bereits von Gratama et al in einer Multicenter-Studie hingewiesen (Gratama JW 1997).

Die Ursachen für die variierenden durchflußzytometrischen Ergebnisse liegen dabei hauptsächlich in einer unterschiedlichen Probenaufbereitung, zu großen Anteilen an Erythrozyten durch suboptimale Selektion der Lymphozyten und in den verschiedenen Richtlinien zum Setzen der Gates. Auch die Verwendung unterschiedlicher Gerätetypen ist in diesem Zusammenhang zu nennen (Rafael A. 1994).

Für die durchflußzytometrische Analyse fluoreszenzmarkierter Zellen war der Vergleich mit einer geeigneten Negativkontrolle notwendig. Nach Setzen eines Auswertefensters um die interessierende Leukozytensubpopulation und Darstellung der Fluoreszenzintensitätsverteilung als Dot-Plot wurden die negativen Zellen markiert. Diese umfassen den Bereich an Intensitäten bis zu der Klasse (Marke), den die Fluoreszenz einer negativen Zelle, bedingt durch Autofluoreszenz und unspezifische Bindung, noch annehmen kann. Jede Zelle mit einem höheren Klassenbereich wird dann als „positiv“ bewertet. Dabei korreliert die Lage der Verteilungskurven im Histogramm beziehungsweise der Punktwolken im Dot-Plot mit der Expressionsstärke des jeweiligen Antigens.

Die so ermittelten Werte der Antigenexpressionen wurden dann zwischen den beiden Gruppen der CLL-Patienten und der Kontrollpersonen statistisch miteinander verglichen.

Zur weitergehenden Analyse der Messwerte wurden anschließend für bestimmte Antigenkombinationen Schwellenwerte zur Trennung pathologischer Werte von Werten bei gesunden Personen ermittelt sowie Vierfelder-Tests durchgeführt.

Für die Messwertreihe der CD95/CD19 koexprimierenden Zellen wurde zusätzlich eine Receiver-Operating-Kurve erstellt, welche es erlaubte, durch Ermitteln der jeweiligen Wertepaare Sensitivität und Spezifität den optimalen Schwellenwert zu analysieren.

Bei der Auswahl der geeigneten Antikörper mussten die jeweils unterschiedlichen Eigenschaften und die verschiedenen Bindungsverhalten berücksichtigt werden.

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Antigenexpressionen monoklonale Antikörper eingesetzt, da sie eine höhere Spezifität als polyklonale Antikörper besitzen.

Damit in der Datenerhebung hauptsächlich antikörpermarkierte Lymphozyten und nicht Erythrozyten bestimmt werden konnten, war es nötig, eine Zellseparation vorzunehmen. Hierfür konnte zwischen der Erythrozyten-Lyse-Methode und der Methode der Dichtegradientenzentrifugation gewählt werden.

Bei der Dichtegradientenzentrifugation basiert die Zelltrennung auf der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Zellen. Dadurch können die unerwünschten Zellpopulationen aus der Probe beseitigt werden. Der Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass es während der Probenaufbereitung zum Verlust bedeutsamer Zellpopulationen kommen kann (Renzi P 1987). Außerdem sind neoplastische Lymphomzellen nicht immer im Dichtegradienten normaler Lymphozyten nachweisbar, so dass diese von Interesse seienden Zellen nicht mehr beurteilt werden können.

In Anbetracht der erwähnten Nachteile dieser Methode wurde in dieser Arbeit die Erythrozyten-Lyse als Mittel der Zellseparation der Dichtegradientenzentrifugation bevorzugt.

Einen weiteren Vorteil der Erythrozyten-Lyse-Methode stellt nicht zuletzt ein niedrigerer Arbeits- und Zeitaufwand dar.

Außer der Entfernung der Erythrozyten mussten des Weiteren sonstige in der Zellsuspension vorhandene Zellpopulationen wie Granulozyten und Monozyten von den interessierenden Lymphozyten abgegrenzt werden.

Die Lymphozyten wurden bei der Auswertung der Messergebnisse hierfür mit Hilfe des „Gating“, also der Selektion einer bestimmten Zellpopulation, eingegrenzt (*Abbildung 2*).

Die Anwendung der erwähnten Methoden ermöglichte es, ausschließlich die interessierenden Lymphozyten zu untersuchen.

Die Messwterergebnisse wurden dann mit Hilfe von Quadrantenstatistiken als prozentuale Anteile der gemessenen Zellen angegeben.

Für ausgewählte Antigenkombinationen wurden zusätzlich in sensitiveren Histogramm-Auswertungen Histogrammstatistiken erstellt.

Zuletzt muss berücksichtigt werden, dass die zum Teil sehr individuell durchgeführten Auswertungen einen wesentlichen Nachteil durchflußzytometrischer Untersuchungen darstellen, da sie die Vergleichbarkeit von Untersuchungsergebnissen unterschiedlicher Laboratorien erschweren können.

## 4.2. Diskussion der Messergebnisse

Zur durchflußzytometrischen Analyse der Expression der interessierenden Oberflächenantigene bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie der B-Zell-Reihe und bei gesunden Blutspendern wurden Antikörper gegen das Pan-T-Zell-Antigen CD5, das Pan-B-Zell-Antigen CD19, den APO-1/Fas-Rezeptor CD95, den Interferon- $\gamma$ -Rezeptor CD119 sowie den Interleukin-4-Rezeptor CD124 verwendet.

Außerdem wurden Antikörper gegen das Antigen CD52 hinzugezogen, welches vor allem bei B-Zell-Lymphomen auf Lymphozyten und Monozyten, jedoch nicht auf Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Stammzellen nachweisbar ist.

Zur Erfassung der interessierenden B-Lymphozyten wurde das linienspezifische B-Zellantigen CD19 analysiert (*Abbildung 12*).

Der Mittelwert CD19 positiver Zellen der im Lymphozytengate gesunder Kontrollpersonen gemessenen Zellen betrug 12.44 %.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei den CLL-Patienten erwartungsgemäß eine signifikante Erhöhung des Anteils CD19 positiver Lymphozyten nachgewiesen werden. Der Mittelwert lag in dieser Gruppe bei 69.48 % (*Tabelle 10*).

Da der Marker CD19 relativ unspezifisch ist und auch bei reaktiven Prozessen und gutartigen lymphoproliferativen Erkrankungen erhöht sein kann, wurde zur weiteren Charakterisierung der B-Lymphozyten neben dem B-Zell-Antigen CD19 der Marker CD5 untersucht.

In der CLL-Diagnostik nimmt das Pan-T-Zell-Antigen CD5, welches auch von aktivierten B-Lymphozyten und malignen Zellen von B-CLL-Patienten exprimiert wird, eine wichtige Rolle ein.

Zunächst erfolgte eine separate Analyse der Expression von CD5.

Die Analyse der Messergebnisse ergab bei den gesunden Kontrollpersonen einen Mittelwert von 69.33 % (*Tabelle 9*).

Der Vergleich mit der Gruppe der CLL-Patienten mit einem Mittelwert von 87.48 % führte zu einer signifikant erhöhten Expression von CD5 bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie der B-Zell-Reihe.

Damit jedoch das Pan-T-Zell-Antigen CD5 eindeutig den B-Lymphozyten zugeordnet werden konnte, musste die Koexpression mit CD19 untersucht werden.

In der Kontrollgruppe war der Anteil CD5/CD19 koexprimierender Lymphozyten im Gegensatz zum relativ hohen Anteil CD5 positiver Lymphozyten (Mittelwert 69.33 %) mit einem Mittelwert von 1.82 % sehr gering (*Tabelle 11*).

Bemerkenswert dabei war die sehr geringe Streuung der Messwerte bei den gesunden Probanden. Die Messwerte verteilten sich in einem sehr eng begrenzten Bereich zwischen einem Minimalwert von 0.39 % und einem Maximalwert von 4.27 %.

Im Vergleich hierzu konnte für die CLL-Patienten ein signifikant erhöhter Anteil CD5/CD19 koexprimierender Zellen mit einem Mittelwert von 66.66 % ermittelt werden.

Dadurch erfolgte für die CLL-Patienten der Nachweis eines erhöhten Anteils an B-Lymphozyten, die das Pan-T-Zell-Antigen CD5 koexprimieren.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Arbeit von DiGiuseppe et al. (DiGiuseppe and Borowitz 1998), wonach die Koexpression von CD5 und CD19 für die B-CLL charakteristisch ist und deshalb zur Diagnosesicherung und Unterscheidung von der wesentlich selteneren chronischen lymphatischen Leukämie vom T-Zell-Typ hinzugezogen werden kann.

Das Antigen CD52 stellt derzeit einen viel versprechenden Angriffspunkt neuer immuntherapeutischer Strategien dar. Da die wichtigsten Probleme der konventionellen Chemotherapie bei malignen Erkrankungen in der mangelnden Spezifität der zytostatischen Substanzen und dem Verbleib residueller Tumorzellen nach der Primärtherapie liegen, sind die selektive Behandlung mit weniger generalisierten Nebenwirkungen und die Elimination residueller Tumorzellen weltweit verfolgte Ziele der derzeitigen Krebsforschung (DeVita 1993). Das CD52-Antigen, dessen Funktion auf Lymphozyten weitgehend unbekannt ist, befindet sich auf der Oberfläche der überwiegenden Mehrheit aller Lymphozyten und Monozyten sowie auf den meisten B- und T-Zell-Lymphomen. Das Ausmaß der Oberflächenexpression wird in der Literatur bei über 95 % angegeben.

Die Analyse unserer Messergebnisse ergab sowohl für die CLL-Patienten mit einem Mittelwert von 99.63 % als auch für die Kontrollgruppe mit einem bei 99.67 % liegendem Mittelwert damit übereinstimmende Werte (*Tabelle 12*).

Die somit auch in unserer Arbeit ermittelte Expression von CD52 auf nahezu allen CLL-Zellen bietet neue Angriffspunkte für die Therapie der CLL.

So können monoklonale Antikörper an dieses Oberflächenantigen der Leukämiezellen binden und die malignen Zellen über verschiedene Wirkmechanismen wie antikörpervermittelte Zytotoxizität, Apoptose und Komplementaktivierung töten.

Da Erythrozyten, Thrombozyten und Stammzellen dieses Antigen nicht exprimieren, sollte folglich ein therapeutischer Einsatz von Antikörpern gegen CD52 die normale Hämatopoese nicht negativ beeinflussen (Hale G 1988).

Der anti-CD52 Antikörper Campath-1H (Alemtuzumab) wurde vor kurzem in Europa für die Rezidivtherapie zugelassen. Einer Multicenter-Studie (Osterborg, Dyer et al. 1997) zufolge führt diese vorwiegend im Rezidiv eingesetzte Substanz zu einem Ansprechen in etwa 42 % der Fälle mit einem rezidivfreien Intervall von mehr als 12 Monaten. Nebenwirkungen von Alemtuzumab sind Myelosuppression und T-Zelldepletion, die zu infektiösen Komplikationen führen können (Tang SC 1996).

Die Identifizierung weiterer Tumorantigene bei CLL-Patienten könnte zur Entwicklung neuer monoklonaler Antikörper führen, so dass möglicherweise für die künftige Behandlung der CLL immuntherapeutische Konzepte weiter an Bedeutung gewinnen könnten. So befinden sich bereits Anti-CD22-Antikörper und Anti-HLA-DR-Antikörper in der klinischen Erprobungsphase.

Anschließend sollte die Expression des APO-1/Fas-Rezeptors (CD95) auf Lymphozyten gesunder Probanden sowie auf B-CLL-Zellen analysiert werden.

APO-1 stellt dabei ein 48 kDa schweres Zellmembranprotein dar, welches der TNF/NGF-Rezeptor-Familie angehört und identisch mit dem vom Yonehara et al. 1989 beschriebenen Fas-Antigen ist (Itoh N 1991).

Eine der wesentlichen Funktionen dieses Rezeptors besteht in der Übermittlung von Signalen des natürlichen Zelltodes in das Zellinnere. Somit nimmt das APO-1/Fas-Antigen eine wichtige Rolle in der Apoptoseregulierung ein und Veränderungen der Expressionsstärke dieses Rezeptors könnten schwerwiegende Folgen für die Homöostase des Organismus bewirken.

In den hier durchgeführten Dot-Plot-Auswertungen konnte in der Gruppe der CLL-Patienten eine signifikant erniedrigte Expression mit einem Mittelwert von 4.85 % festgestellt werden (*Tabelle 13*). In der Kontrollgruppe betrug der Mittelwert mit 9.44 % fast das Doppelte.

Die Histogrammauswertungen der CD95/CD19 Messwertreihen ergaben jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Expression des APO-1-Antigens (*Tabelle 15*).

Zur besseren Einschätzung der Messergebnisse und Ermittlung eines optimalen Schwellenwertes, mithilfe dessen pathologische Werte von normalen Werten gesunder Probanden unterschieden werden können, wurde zusätzlich eine Receiver-Operating-Kurve erstellt (*Abbildung 22*).

Nach Analyse der Anteile CD95/CD19 koexprimierender Zellen und dem Hinzuziehen eines Vergleichs der Wertepaare Sensitivität und 1-Spezifität für verschiedene Schwellenwerte (*Abbildung 22*) wurde ein optimaler Schwellenwert von 6 % festgelegt.

Unter diesem Wert lagen in den Untersuchungen 77.8 % der Messwerte von CLL-Patienten (21 von 27 Patienten) und nur 33.3 % der ermittelten Messwerte gesunder Probanden (3 von 9 Kontrollpersonen) (*Tabelle 14*). Zu beachten sind dabei eine Sensitivität von ca. 75 % und eine Spezifität von ebenfalls ca. 75 %.

Der  $\chi^2$ -Test für den sich anschließenden Vier-Felder-Test ergab mit einem Wert von 0.014 einen signifikanten Unterschied.

Diese Ergebnisse stimmen mit mehreren veröffentlichten Untersuchungsergebnissen überein, wonach auf der Oberfläche von CLL-Zellen eine verringerte oder gar fehlende Expression des Fas-Rezeptors feststellbar ist (Robertson MJ 1995), (Laytragoon-Lewin, Duhony et al. 1998), (Panayiotidis, Ganeshaguru et al. 1995), (Wang, Freeman et al. 1997), (Kamihira, Yamada et al. 1997).

Hieraus könnte geschlossen werden, dass die CLL-Zellen mittels einer Down-Regulation von CD95 eine Resistenz gegenüber der durch den Fas-Liganden vermittelten Apoptose erlangen. Eine Hochregulierung des Fas-Rezeptors, welche durch Interferone bewirkt werden könnte, würde theoretisch die Empfindlichkeit für Apoptosesignale erhöhen (Panayiotidis, Ganeshaguru et al. 1995).

CD95 stellt daher einen wichtigen Angriffspunkt neuer Therapiestrategien dar und bedarf weitergehender Untersuchungen.

Im Gegensatz zur verlängerten Lebensspanne maligner B-Zellen in vivo wurde in mehreren Untersuchungen festgestellt, dass die leukämischen Zellen in vitro durch Apoptose untergehen (Buschle, Campana et al. 1993), (Levesque, Misukonis et al. 2003), (Rojas, Roman et al. 1996). Hierfür wird das Fehlen essentieller Wachstumsfaktoren und insbesondere des Interferon-gamma verantwortlich gemacht.

Darauf lassen Ergebnisse schließen, welche zeigen konnten, dass durch Zugabe von IFN- $\gamma$  in die Kulturmedien eine Hemmung der Apoptose erfolgte (Rojas, Roman et al. 1996).

Dieser Sachverhalt eröffnet Fragen nach den Mechanismen der Apoptosehemmung durch IFN- $\gamma$ . Wir wollten untersuchen, ob diese durch eine Hochregulierung der IFN- $\gamma$ -Rezeptoren (CD119) auf malignen B-Zellen bewirkt sein könnte.



Die Analyse der Expression von CD119 auf B-Zellen ergab bei den gesunden Kontrollpersonen einen Mittelwert von 2.31 %. Für die CLL-Patienten konnte mit einem Mittelwert von 2.83 % im Vergleich praktisch keine Erhöhung beobachtet werden (*Tabelle 16*).

Ähnlich verhielt es sich für die Messwerte aus den sensitiveren Histogramm-Auswertungen. Auch hier konnte in der Gruppe der CLL-Patienten für CD119/CD19 koexprimierende Zellen mit einem Mittelwert von 33.55 % nur eine geringfügige Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem bei 28.92 % liegenden Mittelwert beobachtet werden (*Tabelle 17*).

Der Mann-Whitney-U-Test bestätigte sowohl für die Ergebnisse der Dot-Plot-Auswertungen als auch der Histogramm-Auswertungen das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes.

Die Ergebnisse unserer Analyse der Expression der IFN- $\gamma$ -Rezeptoren auf B-Lymphozyten liefern somit keinen Hinweis dafür, dass die apoptosehemmende Wirkung des IFN- $\gamma$  auf eine Hochregulierung seines Rezeptors auf malignen B-Zellen zurückzuführen sei.

Levesque et al. (Levesque, Misukonis et al. 2003) verdächtigen, basierend auf den Ergebnissen ihrer in vitro Untersuchungen zur Apoptose von B-CLL-Zellen, Stickstoffmonoxid (NO) und dessen Synthetase NOS2 als einen möglichen Mechanismus, durch welchen IFN- $\gamma$  die verlängerte Lebensspanne der malignen B-Zellen bewirken könnte.

So fanden sie heraus, dass IFN- $\gamma$  in ihrer Kultur mit B-CLL-Zellen die Enzymaktivität und Proteinexpression von NOS2 steigerte.

Dieser mögliche Pathomechanismus der vergrößerten Überlebensfähigkeit der B-CLL-Zellen bedarf jedoch weitergehender Untersuchungen.

Sollte sich bestätigen, dass eine durch IFN- $\gamma$  vermittelte Expression von NOS2 für die Hemmung der Apoptose verantwortlich ist, so würde sich ein neuer, viel versprechender Angriffspunkt für die Therapie der CLL auf tun.

Mehrere in vitro Untersuchungen lieferten Ergebnisse, welche darauf schließen lassen, dass neben den Zytokinen Interferon- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  auch Interleukin-4 die Zellapoptose bei CLL-Patienten inhibiert (Mainou-Fowler and Prentice 1996), (Dancescu, Rubio-Trujillo et al. 1992).

IL-4 stellt dabei ein gut untersuchtes Zytokin dar, welches von T-Zellen produziert wird und Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation normaler B-Zellen besitzt.

Während das aus 129 Aminosäuren bestehende Protein früher noch als B-Zell-Wachstumsfaktor 1 bezeichnet wurde, sind heute vielfältige Wirkungen von IL-4 bekannt.

Bezüglich der B-CLL ist nun bekannt, dass IL-4 die B-Zellen vor Apoptose schützt, ohne dabei einen signifikanten Effekt auf die Proliferation auszuüben. Als Erklärung des erhöhten Schutzes

vor Apoptose wird eine höhere Expression von IL-4-Rezeptoren auf B-CLL-Zellen als auf normalen Zellen angenommen (Douglas, Capocasale et al. 1997).

Dabei handelt es sich um ein aus ca. 800 Aminosäuren bestehendes Membranprotein, welches auf einer Reihe von Zelltypen nachgewiesen werden konnte und der Familie der hämatopoetischen Rezeptoren zugerechnet wird. Der Interleukin-4-Rezeptor-Komplex existiert in drei unterschiedlichen Konformationen, bei den B-Lymphozyten von CLL-Patienten wird das Vorliegen einer trimerischen Form angenommen.

Deshalb untersuchten wir näher die Oberflächenexpression von CD124 auf B-CLL-Zellen und auf B-Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen und verglichen diese miteinander.

Der Vergleich der beiden Gruppen führte dabei übereinstimmend mit der Arbeit von Douglas (Douglas, Capocasale et al. 1997) zu einer hoch signifikanten Überexpression des IL-4-Rezeptors in der Gruppe der CLL-Patienten.

Bemerkenswert dabei war, dass der Mittelwert bei den CLL-Patienten mit 67.48 % mehr als das Dreifache betrug wie in der Kontrollgruppe mit 19.01 % (*Tabelle 18*).

Auch in der sensitiveren Histogramm-Auswertung konnte die hoch signifikante Überexpression von CD124 festgestellt werden. Dabei betrug der Mittelwert in der Gruppe der CLL-Patienten mit 82.52 % noch fast das Doppelte des Mittelwerts der Kontrollgruppe mit 43.81 % (*Tabelle 21*).

Zur weitergehenden Analyse der Messergebnisse wurden zwei Schwellenwerte bei 60 % und 20 % gesetzt.

Bezüglich der Dot-Plot-Auswertungen lagen 92.6 % (25 von 27 Patienten) der Messwerte aus der Patientengruppe über dem Schwellenwert von 20 %. Aus der Kontrollgruppe überschritten lediglich 22.2 % (2 von 9 Personen) diesen Wert (*Tabelle 20*).

Noch eindrucksvoller waren die Ergebnisse für den bei 60 % liegenden Schwellenwert. Hier lagen 77.8 % (21 von 27 Patienten) der Messwerte von CLL-Patienten über diesem Wert und alle ermittelten Ergebnisse gesunder Probanden darunter (*Tabelle 19*). Damit betrug die Spezifität 100 % bei einer Sensitivität von 77.8 %

Auf die Histogramm-Auswertungen bezogen konnten ähnliche Ergebnisse für den Schwellenwert von 60 % ermittelt werden. 88.9 % (24 von 27 Patienten) aller Messwerte der CLL-Gruppe übertrafen diesen Wert. Aus der Kontrollgruppe lagen nur 22.2 % (2 von 9 Personen) darüber (*Tabelle 20*).

Für den bei 20 % liegenden Schwellenwert konnte jedoch hinsichtlich der Ergebnisse aus den Histogramm-Auswertungen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Unsere Untersuchungen ergaben somit für das APO-1/Fas-Antigen und den Interleukin-4-Rezeptor signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer Expressionen in den beiden Untersuchungsgruppen.

Dieses Ergebnis führte zur Frage nach einem möglichen Zusammenhang der veränderten Expressionsmuster der beiden Antigene auf leukämischen B-Zellen. Diesbezüglich könnte ein sich gegenseitig verstärkender, apoptosehemmender Effekt einer Hochregulierung von CD124 und einer Minderexpression von CD95 vermutet werden.

Zur Analyse dieser fraglichen Korrelation wurden die Expressionsanteile der beiden Oberflächenmoleküle in einem Punktwolken-Diagramm gegeneinander aufgetragen.

Anhand dieser Darstellung ist tatsächlich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen den beiden Antigenstrukturen zu erkennen. Bei den CLL-Patienten nimmt dabei die Expression des Interleukin-4-Rezeptors mit sinkenden Expressionsanteilen von CD95 zu.

Anders verhält es sich für die Gruppe der gesunden Probanden. Hier korreliert eine sinkende Expression des APO-1/Fas-Antigens mit einer sinkenden von CD124.

Dabei ist für die durchgeführte Analyse ein Korrelationskoeffizient von 0.359 zu beachten.

Dieser ermittelte Zusammenhang der beiden Antigenexpressionen sollte in weitergehenden Studien anhand größerer Kollektive untersucht werden.

### **4.3. Schlussfolgerung**

Am eindrucksvollsten konnte in unserer Arbeit eine hoch signifikante Überexpression des IL-4-Rezeptors auf leukämischen B-Zellen nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Hypothese des erhöhten Schutzes von B-CLL-Zellen vor Apoptose mittels einer Hochregulierung der Expression von IL-4-Rezeptoren und einer dadurch erlangten, erhöhten Empfindlichkeit gegenüber apoptosehemmenden Signalen von IL-4.

Im Gegensatz hierzu lieferten unsere Untersuchungen keinen Anhalt dafür, dass ein ähnlicher Pathomechanismus für das gleichfalls vor dem natürlichen Zelltod schützende IFN- $\gamma$  und dessen Rezeptor für die verzögerte Apoptose von B-CLL-Zellen verantwortlich gemacht werden kann. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede der IFN- $\gamma$ -Rezeptor-Expression zwischen CLL-Patienten und gesunden Probanden festgestellt werden. Nach unseren Ergebnissen muss daher

ein anderer Pathomechanismus für die apoptosehemmende Wirkung des IFN- $\gamma$  verantwortlich gemacht werden, welcher weiterer Erforschung bedarf.

Bezüglich des APO-1/Fas-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass neben einer Hochregulierung von Rezeptoren für apoptosehemmende Signale wie beim IL-4-Rezeptor auch eine Minderexpression von Rezeptoren für apoptoseinduzierende Signale für die verlängerte Überlebensfähigkeit von B-CLL-Zellen verantwortlich gemacht werden kann. So konnte in unseren Untersuchungen eine signifikant erniedrigte Expression des APO-1/Fas-Rezeptors in der Gruppe der CLL-Patienten bestimmt werden. Daraus schlussfolgernd könnte eine Hochregulierung des Rezeptors, welche durch Interferone bewirkt werden könnte, die Empfindlichkeit für Apoptosesignale erhöhen. Daher könnte auch CD95 einen wichtigen Angriffspunkt neuer Therapiestrategien darstellen und bedarf weitergehender Untersuchungen.

Des Weiteren konnte ein Zusammenhang der Expressionen von CD124 und CD95 gezeigt werden. Diese Korrelation lässt auf sich gegenseitig verstärkende, apoptosehemmende Effekte einer Hochregulierung des IL-4-Rezeptors und einer Minderexpression des APO-1/Fas-Rezeptors schließen.

Schließlich zeigten unsere Untersuchungen, dass über 99% der leukämischen B-Zellen das Oberflächenantigen CD52 exprimieren. Diese fast durchgängige Expression von CD52 auf B-CLL-Zellen ermöglicht den Einsatz neuer, selektiver Immuntherapeutika mit weniger generalisierten Nebenwirkungen und der Elimination residueller Tumorzellen. Die Identifizierung weiterer Tumorantigene könnte zur Entwicklung neuer monoklonaler Antikörper führen, so dass immuntherapeutische Konzepte in der Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen könnten.

## 5.0. Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie wird nach der derzeit favorisierten Hypothese laut Federico Caligaris-Cappio, Turin/Italien, als akkumulative Störung auf dem Boden einer Fehlregulation apoptotischer Signale angesehen. Eine Vielzahl verschiedener Mechanismen, welche zur gestörten Apoptose der B-CLL-Zellen führen könnten, wurden bisher vorgeschlagen. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, welchen bedeutende Rollen in der Umgehung des natürlichen Zelltodes zugesprochen werden.

Hierfür wurde peripheres Blut von 27 CLL-Patienten und 9 gesunden Kontrollpersonen mithilfe der Mehrfarbenimmunfluoreszenz durchflußzytometrisch analysiert.

Die Zellseparation der interessierenden Lymphozyten erfolgte mittels der Erythrozyten-Lyse und der Anwendung des „Gating“-Verfahrens.

Zur Analyse der für die Arbeit relevanten Antigenexpressionen wurde ein aus 13 unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern bestehendes Panel hinzugezogen. Dabei wurden jedem Proberöhrchen jeweils drei verschiedene Antikörper hinzugegeben.

Anschließend erfolgte am Durchflußzytometer je Proberöhrchen die Datenerhebung von 10000 Zellen bei den CLL-Patienten beziehungsweise 50000 bei den gesunden Probanden. Die mittels Quadranten- und Histogrammstatistiken ermittelten prozentualen Anteile der jeweiligen antigenexprimierenden Zellen wurden anschließend unter Zuhilfenahme statistischer Tests auf signifikante Unterschiede bezüglich der Gruppen der CLL-Patienten und der Kontrollpersonen geprüft.

Signifikant erhöhte Anteile konnten bei den CLL-Patienten erwartungsgemäß für CD5 und CD19 bestimmt werden. Das Vorliegen eines erhöhten Anteils CD5 positiver B-Lymphozyten, einem wichtigen Merkmal der B-CLL, konnte erst durch die zusätzliche Betrachtung der Koexpression von CD5 und CD19 bestimmt werden. Auch diese führte zu einer hoch signifikanten Erhöhung in der Patientengruppe.

Für das Oberflächenadhäsionsmolekül CD52 wurde für die B-Lymphozyten beider Gruppen eine konstante Expression von jeweils über 99 % ermittelt. Diese fast durchgängige Expression von CD52 auf B-Lymphozyten stellt eine wichtige Voraussetzung neuer immuntherapeutischer Strategien der B-CLL mithilfe monoklonaler Antikörper dar.

Bezüglich des Apo-1/Fas-Antigens (CD95) sollte untersucht werden, ob auf leukämischen B-Zellen eine verminderte Expression dieses apoptoseregulierenden Moleküls nachzuweisen ist.

Dies wäre ein Hinweis auf eine durch Down-Regulation von CD95 erreichte Minderempfindlichkeit für Apoptosesignale.

Tatsächlich konnte in unseren Dot-Plot-Auswertungen für die Gruppe der CLL-Patienten eine signifikant erniedrigte Expression dieses Markers beobachtet werden. Außerdem konnte nach Erstellung einer Receiver-Operating-Kurve und Ermittlung eines optimalen Schwellenwertes in einem sich anschließenden Vierfelder-Test ein signifikantes Ergebnis ermittelt werden.

Die Histogramm-Auswertungen für CD95 lieferten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen.

Des Weiteren wurden die Expressionen des IFN- $\gamma$ -Rezeptors (CD119) und des IL-4-Rezeptors (CD124) hinsichtlich einer möglichen Hochregulierung auf malignen B-Zellen untersucht.

Eine Überexpression dieser Oberflächenmarker könnte auf eine hierdurch erreichte Überempfindlichkeit für apoptosehemmende Signale ihrer Liganden hinweisen.

Bezüglich des IFN- $\gamma$ -Rezeptors lieferten unsere Ergebnisse keinen Anhalt für diese Annahme. Sowohl in den Dot-Plot-Auswertungen als auch in den Histogramm-Auswertungen konnte kein signifikanter Unterschied der Expressionen zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

Anders verhielt es sich für den IL-4-Rezeptor. Hier wurde in beiden Auswertungsverfahren für die CLL-Patienten jeweils eine hoch signifikante Überexpression von CD124 ermittelt. Auch anschließende Vierfelder-Tests lieferten für zwei gewählte Schwellenwerte signifikante Unterschiede.

In einer abschließenden Korrelationsanalyse konnte mit Hilfe eines Punktwolken-Diagramms ein tendenzieller Zusammenhang zwischen den Expressionen von CD95 und CD124 nachgewiesen werden. Dabei korrelierte bei den CLL-Patienten eine sinkende Expression des Fas-Antigens mit einer steigenden des IL-4-Rezeptors.

Zusammenfassend lieferten unsere Untersuchungen Hinweise für bestimmte Pathomechanismen der Apoptosehemmung bei der CLL, welche in zukünftigen therapeutischen Strategien der chronisch lymphatischen Leukämie wichtige Angriffspunkte darstellen könnten.

## 6.0. Literatur

Achsah K, K. N., Ling-Mei W, Jacalyn P, William P (1994). "Interleukin 4 receptor: Signaling mechanisms." Immunology Today **15**(9): 423-31.

Aguet M, D. Z., Merlin G (1988). "Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor." Cell **55**(273-80).

Armitage J.O., Longo D.L. (2005) "Neoplasien des lymphatischen Systems". In: Dietel M., Suttorp N., Zeitz M., eds. *Harrisons Innere Medizin*. 16th ed. ABW Wissenschaftsverlag, 2005; 688-702

Aronica MA, G. S., Boothby M (2000). "IL-4-dependent induction of BCL-2 and BCL-XL in activated T lymphocytes through a STAT6- and PI 3-kinase-independent pathway." Cytokine **12**: 578-87.

Beckmann MP, C. D., Fanslow W, Maliszewski CR, Lyman SD (1992). "The interleukin-4 receptor: structure, function and signal transduction." Chem Immunol **51**(107): 107-34.

Benton H (1991). "Cytokines and their receptors." Curr. Opinion Cell Biol. **3**: 171-5.

Bergstedt LS, M. H., Persson U, Moller G, Heusser C, Severinson E (1988). "Interleukin 4 instructs uncommitted B lymphocytes to switch to IgG1 and IgE." Eur J Immunol **18**(7): 1073-7.

Binet, J. L., A. Auquier, et al. (1981). "A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis." Cancer **48**(1): 198-206.

Borowitz MJ, B. R., Gascoyne R et al (1997). "U.S.-Canadian Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematologic Neoplasia by Flow Cytometry: Data Analysis and Interpretation." Cytometry **30**: 236-44.

Buschle, M., D. Campana, et al. (1993). "Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia." J Exp Med **177**(1): 213-8.

Byrd, J. C., K. R. Rai, et al. (1998). "Old and new therapies in chronic lymphocytic leukemia: now is the time for a reassessment of therapeutic goals." Semin Oncol **25**(1): 65-74.

Caligaris-Cappio, F. and T. J. Hamblin (1999). "B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather." J Clin Oncol **17**(1): 399-408.

Cheson, B. D., J. M. Bennett, et al. (1996). "National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment." Blood **87**(12): 4990-7.

Dancescu, M., M. Rubio-Trujillo, et al. (1992). "Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression." J Exp Med **176**(5): 1319-26.

- de Lima, M., S. O'Brien, et al. (1998). "Chronic lymphocytic leukemia in the young patient." Semin Oncol **25**(1): 107-16.
- Debinski W, M. R., Leland P, Obiri NI, Puri RK (1996). "Receptor for interleukin (IL) 13 does not interact with IL4 but receptor for IL4 interacts with IL13 on human glioma cells." J Biol Chem **271**: 22428-33.
- Defrance T, A. J., Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N, Takebe Y, Yokota T, Lee F, Arai K, et al. (1987). "Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes." J Exp Med **165**: 1459-67.
- DeVita, V. (1993). Principles in chemotherapy. Cancer: Principles and Practice in Oncology. H. S. De Vita VTJ., Rosen SE. Philadelphia, J.B. Lippincott. **4**: 276.
- Dighiero, G., T. Kipps, et al. (1996). "What is the CLL B-lymphocyte?" Leuk Lymphoma **22 Suppl 2**: 13-39.
- DiGiuseppe, J. A. and M. J. Borowitz (1998). "Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias." Semin Oncol **25**(1): 6-10.
- Dohner, H., S. Stilgenbauer, et al. (2000). "Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia." N Engl J Med **343**(26): 1910-6.
- Doody GM, D. P., Fearon DT (1996). "Activation of B lymphocytes: integrating signals from CD19, CD22 and FcgammaRIIb1." Curr. Opin. Immunol. **8**: 378-82.
- Douglas, R. S., R. J. Capocasale, et al. (1997). "Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor-beta." Blood **89**(3): 941-7.
- Fegan, C. (2001). "Molecular abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukaemia." Clin Lab Haematol **23**(3): 139-48.
- Flinn, I. W. and G. Vogelsang (1998). "Bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia." Semin Oncol **25**(1): 60-4.
- Frankfurt, O. S., J. J. Byrnes, et al. (1997). "Protection from apoptotic cell death by interleukin-4 is increased in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients." Leuk Res **21**(1): 9-16.
- Grabstein K, D. S., Gillis S, Urdal D and Larsen A (1986). "Epression of interleukin-2, interferon -gamma and the IL-2 receptor by human peripheral blood lymphocytes." J Immunol **136**(12): 4503-8.
- Gratama JW, K. J., Van den Beemd R et al. (1997). "Analysis of Variation in Results of Flow Cytometric Lymphocyte Immunophenotyping in a Multicenter Study." Cytometry **30**: 166-177.
- Guggenmoos-Holzmann I, W. K. (1995). Medizinische Statistik. Berlin/Wien, Blackwell Wissenschaftsverlag.
- Hale G, W. H., Dyer m (1988). "Specificity of monoclonal antibody Campath-1." Bone Marrow Transplant **3**: 237-9.



Hallek, M., B. Schmitt, et al. (2001). "[Chronic lymphocytic leukemia. 2. Therapy.]." Dtsch Med Wochenschr **126**(23): 690-5.

Howard M, F. J., Hilfiker M, et al (1982). "Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2." J Exp Med **155**(3): 914-23.

Idzerda RL, M. C., Mosley B, Lyman SD, Vanden Bos T, Gimpel SD, Din WS, Grabstein KH, Widmer MB, Park LS, Cosman D, Beckmann P (1990). "Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily." J Exp Med **171**: 861-73.

Itoh N, Y. S., Ishii A, Yonehara M, Mizushima SI, Samashima M, Seto Y, Nagata S (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen FAS can mediate apoptosis." Cell **66**: 233-243.

Kamihira, S., Y. Yamada, et al. (1997). "Quantitative characterization and potential function of membrane Fas/APO-1 (CD95) receptors on leukaemic cells from chronic B and T lymphoid leukaemias." Br J Haematol **99**(4): 858-65.

Kawakami, K., M. Kawakami, et al. (2001). "Overexpressed cell surface interleukin-4 receptor molecules can be successfully targeted for antitumor cytotoxin therapy." Crit Rev Immunol **21**(1-3): 299-310.

Kay NE, B. N., Jelinek DF, Leland P, Frank DA, Battle TE, Puri RK (2002). "Plasma membrane IL-4 receptors can be targeted to eliminate B-chronic-lymphocytic-leukemia B-cells." Abstract 2324 American Society of Hematology, Philadelphia, PA.

Kay, N. E. and B. T. Pittner (2003). "IL-4 biology: impact on normal and leukemic CLL B cells." Leuk Lymphoma **44**(6): 897-903.

KD, W. (1995). Angewandte Statistik für die Praxis. Bonn/Paris, Addison-Wesley.

Keating, M. J., S. O'Brien, et al. (1998). "Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy." Blood **92**(4): 1165-71.

Knauf W, T. E. (1999). Chronische lymphatische Leukämie. Thiemes Innere Medizin. Stuttgart, New York, Thieme. **1**: 920-924.

Langer JA, P. S. (1988). "Interferon receptors." Immunology Today **9**(12): 393-400.

Laytragoon-Lewin, N., E. Duhony, et al. (1998). "Downregulation of the CD95 receptor and defect CD40-mediated signal transduction in B-chronic lymphocytic leukemia cells." Eur J Haematol **61**(4): 266-71.

Levesque, M. C., M. A. Misukonis, et al. (2003). "IL-4 and interferon gamma regulate expression of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia cells." Leukemia **17**(2): 442-50.

- Löffler H, R. J. (1999). Atlas der klinischen Hämatologie. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag.
- Maggi E, P. P., Manetti R, Simonelli C, Piccinni M, Ruggi FS (1992). "Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human TH1 and TH2 clones." J Immunol **147**(7): 2142-7.
- Mainou-Fowler, T. and A. G. Prentice (1996). "Modulation of apoptosis with cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukaemia." Leuk Lymphoma **21**(5-6): 369-77.
- Morrison, V. A. (1998). "The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia." Semin Oncol **25**(1): 98-106.
- Nelms K, K. A., Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE, (1999). "The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions." Annu Rev Immunol **17**: 701-38.
- Noelle R, K. R., Ohara J, Uhr JW, Vitetta ES. (1984). "Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(6): 6149-53.
- Ohara J, P. W. (1988). "Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression." Proc Natl Acad Sci U S A **85**: 8221-25.
- Osterborg, A., M. J. Dyer, et al. (1997). "Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia." J Clin Oncol **15**(4): 1567-74.
- Panayiotidis, P., K. Ganeshaguru, et al. (1995). "Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia." Leukemia **9**(7): 1227-32.
- Pene J, R. F., Briere F, et al. (1988). "IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma." J Immunol **141**(4): 1218-24.
- Pfizenmaier K, B. H., Scheurich P, Seliger B, Ücer U, Vehmeyer K, Nagel GA (1985). "Differential gamma interferon response of human colon carcinoma cells: inhibition of proliferation and modulation of immunogenicity as independent effects of gamma interferon on tumor cell growth." Cancer Res. **45**(3503-9).
- Possinger K. (1999) Chronisch lymphatische Leukämie. In Schmoll H.J., Höffken K., Possinger K., eds.. Kompendium internistische Onkologie. Standards in Diagnostik und Therapie. 3rd ed. Springer Verlag Berlin
- Rafael A., N. C. T., Valet G. (1994). Grundlagen der Durchflußzytometrie. Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Stuttgart, Schattauer. **1**: 3-94.
- Rai, K. R., A. Sawitsky, et al. (1975). "Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia." Blood **46**(2): 219-34.

Rai, R. a. P., DV (1995). Chronic lymphocytic leukemia. Hematology. Basic Principles and Practice, Second Edition. B. E. Hoffman R, Shattil SJ et al. New York, NY, Churchill Livingstone: 1308-1322.

Raphael, B., J. W. Andersen, et al. (1991). "Comparison of chlorambucil and prednisone versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone as initial treatment for chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of an Eastern Cooperative Oncology Group randomized clinical trial." J Clin Oncol **9**(5): 770-6.

Renzi P, G. L. (1987). "Analysis of T-cell subsets in normal adults: Comparison of whole blood lysis technique to ficoll-hypaque separation by flow cytometry." J Immunol Meth **98**(53-56).

Robertson MJ, M. T., Pichert G et al (1995). "Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells." Leuk Lymphoma **17**: 51-61.

Rojas, R., J. Roman, et al. (1996). "Inhibition of apoptotic cell death in B-CLL by interferon gamma correlates with clinical stage." Leukemia **10**(11): 1782-8.

Rothe G, S. G. (1996). "Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies." Leukemia **10**: 877-95.

Rozman, C. and E. Montserrat (1995). "Chronic lymphocytic leukemia." N Engl J Med **333**(16): 1052-7.

Rummel, M. (2002). "Diagnostik und Therapie der chronisch-lymphatischen Leukämie." Der Onkologe **8**: 708-720.

Schriever, F. and D. Huhn (2003). "New directions in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia." Drugs **63**(10): 953-69.

Stelzer GT, M. G., Hurley A et al (1997). "U.S.-Canadian Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematologic Neoplasia by Flow Cytometry: Standardization and Validation of Laboratory Procedures." Cytometry **30**: 214-30.

Stilgenbauer, S., P. Lichter, et al. (2000). "Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia." Rev Clin Exp Hematol **4**(1): 48-72.

Tamura, K., H. Sawada, et al. (2001). "Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is rare, but the proportion of T-CLL is high in Japan." Eur J Haematol **67**(3): 152-7.

Tang SC, H. K., Reis MD, Berinstein ML (1996). "Immunosuppressive toxicity of CAMPATH1H monoclonal antibody in the treatment of patients with recurrent low grade lymphoma." Leuk Lymphoma **24**: 93-101.

Trinchieri G, P. B. (1985). "Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects." Immunology Today **6**(4): 131-6.

Ulker N, S. C. (1985). "Mechanisms of interferon action: inhibition of Vesicular Stomatitis Virus replication in human amnion U cells by cloned human gamma interferon." J Biol Chem **260**: 4319-23.

Wang, D., G. J. Freeman, et al. (1997). "Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies." Br J Haematol **97**(2): 409-17.

Wheelock EF (1965). "Interferon-like virus inhibitor induced in human lymphocytes by phytohemagglutinin." Science **149**: 310-11.

Yokota T, O. T., Mosmann T, et al. (1986). "Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that express B-cell and T-cell-stimulating activities." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(16): 5894-8.

Zaki, M., R. Douglas, et al. (2000). "Disruption of the IFN-gamma cytokine network in chronic lymphocytic leukemia contributes to resistance of leukemic B cells to apoptosis." Leuk Res **24**(7): 611-21.

## 7.0. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildungen</b>	<b>Seite</b>
Abb. 1 :	Mögliche Konformationen des IL-4-Rezeptors aus (Kay and Pittner 2003) 14
Abb. 2 :	Lymphozyten-Gating 25
Abb. 3 :	Beispiel der Verteilung von Zellpopulationen 27
Abb. 4 :	Box-Plot-Graphik am Beispiel einer CD19 Messreihe 29
Abb. 5 :	Receiver-Operating-Kurve am Beispiel der CD95/CD19 Messreihe 30
Abb. 6 :	Die Wertepaare Sensitivität und 1-Spezifität für verschiedene Schwellenwerte am Beispiel einer CD95/CD19 Messreihe 31
Abb. 7 :	Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD5 Messwertreihe 39
Abb. 8 :	Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD5 Messwertreihe 39
Abb. 9 :	Anteile CD5 positiver Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen 40
Abb. 10:	Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD19 Messwertreihe 41
Abb. 11:	Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD19 Messwertreihe 41
Abb. 12:	Anteile CD19 positiver Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen 42
Abb. 13:	Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD5/CD19 Messwertreihe 43
Abb. 14:	Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD5/CD19 Messwertreihe 43
Abb. 15:	Anteile CD5/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen 44
Abb. 16:	Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD52/CD19 Messwertreihe 45
Abb. 17:	Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD52/CD19 Messwertreihe 45
Abb. 18:	Anteile CD52/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen 46
Abb. 19:	Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD95/CD19 Messwertreihe 47
Abb. 20:	Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD95/CD19 Messwertreihe 47
Abb. 21:	Anteile CD95/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen 48

Abb. 22:	ROC-Kurve für CD95/CD19 mit Wertepaaren Sensitivität und 1-Spezifität	49
Abb. 23:	Histogramm aus der Patientengruppe der CD95/CD19 Messwertreihe	50
Abb. 24:	Histogramm aus der Kontrollgruppe der CD95/CD19 Messwertreihe	50
Abb. 25:	Anteile CD95/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen in der Histogramm-Auswertung	51
Abb. 26:	Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD119/CD19 Messwertreihe	52
Abb. 27:	Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD119/CD19 Messwertreihe	52
Abb. 28:	Anteile CD119/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen	53
Abb. 29:	Histogramm aus der Patientengruppe der CD119/CD19 Messwertreihe	54
Abb. 30:	Histogramm aus der Kontrollgruppe der CD119/CD19 Messwertreihe	54
Abb. 31:	Anteile CD119/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen in der Histogramm-Auswertung	55
Abb. 32:	Dot-Plot aus der Patientengruppe der CD124/CD19 Messwertreihe	56
Abb. 33:	Dot-Plot aus der Kontrollgruppe der CD124/CD19 Messwertreihe	56
Abb. 34:	Anteile CD124/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen	57
Abb. 35:	Histogramm aus der Patientengruppe der CD124/CD19 Messwertreihe	59
Abb. 36:	Histogramm aus der Kontrollgruppe der CD124/CD19 Messwertreihe	59
Abb. 37:	Anteile CD124/CD19 koexprimierender Zellen der im Lymphozytengate gemessenen Zellen in der Histogramm-Auswertung	60
Abb. 38:	Punktwolken-Diagramm für CD95 und CD124	62

<b>Tabellen</b>	<b>Seite</b>
Tab.1 : Stadieneinteilung nach Rai von 1975 aus (Possinger)	9
Tab.2 : Stadieneinteilung nach Binet von 1981 aus (Possinger)	10
Tab.3 : Zusammenstellung der verwendeten Antikörper	22
Tab.4 : Einteilung der untersuchten Gruppen	28
Tab.5 : Arbeitsanleitung	32
Tab.6 : Materialien und Geräte	34
Tab.7 : Anteile antigenexprimierender Lymphozyten bei CLL-Patienten	36
Tab.8 : Anteile antigenexprimierender Lymphozyten bei Kontrollpersonen	38
Tab.9 : Ergebnisse der Messwertverteilung für den Marker CD5	40
Tab.10: Ergebnisse der Messwertverteilung für den Marker CD19	42
Tab.11: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD5/CD19 koexprimierende Zellen	44
Tab.12: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD52/CD19 koexprimierende Zellen	46
Tab.13: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD95/CD19 koexprimierende Zellen	48
Tab.14: Vierfelder-Tafel für CD95/CD19 koexprimierende Zellen bei einem optimalen Schwellenwert von 6 %	49
Tab.15: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD95/CD19 koexprimierende Zellen in der Histogramm-Auswertung	51
Tab.16: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD119/CD19 koexprimierende Zellen	53
Tab.17: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD119/CD19 koexprimierende Zellen in der Histogramm-Auswertung	55
Tab.18: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD124/CD19 koexprimierende Zellen	57
Tab.19: Vierfelder-Tafel für CD124/CD19 koexprimierende Zellen bei einem Schwellenwert von 60 %	58
Tab.20: Vierfelder-Tafel für CD124/CD19 koexprimierende Zellen bei einem Schwellenwert von 20 %	58
Tab.21: Ergebnisse der Messwertverteilung für CD124/CD19 koexprimierende Zellen in der Histogramm-Auswertung	60
Tab.22: Vierfelder-Tafel für CD124/CD19 koexprimierende Zellen in der Histogramm-Auswertung bei einem Schwellenwert von 60 %	61

## 8.0. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
B-CLL	Chronische lymphatische Leukämie der B-Zell-Reihe
CD	Cluster of Differentiation
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
COP	Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylene diamine tetraacetate
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Hb	Hämoglobin
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL-4	Interleukin-4
IL-4R	Interleukin-4-Rezeptor
n	Anzahl
NaCl	Natrium Chloratum
NCI-WG	National Cancer Institute Sponsored Working Group on CLL
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate Buffered Salt Solution
PC5	Konjugation aus Phycoerythrin mit Cyanin 5.1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
ROC	Receiver Operating Curve
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor necrosis factor



Der auf den Seiten 86 und 87 vorhandene Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Fassung nicht online veröffentlicht.

Der auf den Seiten 86 und 87 vorhandene Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Fassung nicht online veröffentlicht.

## **10.0. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. K. Possinger, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie der Charité Campus Mitte, Berlin, gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Förderung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. B. Flath für seine hervorragende Betreuung, die wissenschaftliche Anleitung und die stetige Unterstützung bei dieser Arbeit.

Den Mitarbeiterinnen des Hämatologischen Labors der Onkologischen Klinik danke ich für die allzeit freundliche Zusammenarbeit. Insbesondere bin ich Frau M. Becker verbunden für die intensive Einweisung und hilfsbereite Beratung in labortechnischen Fragen. Frau Marquardt bin ich für die verständnisvolle Unterstützung in organisatorischen Fragen dankbar.

Frau Siebert vom Institut für Medizinische Biometrie der Charité danke ich für ihre große Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ferner bin ich meinem Cousin und Freund Nektarios Kokinogenis für seine Hilfsbereitschaft bei Softwareproblemen sehr dankbar.

## **11.0. Erklärung**

„Ich, Georgios Kokinogenis, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Expression von Zytokinrezeptoren und apoptoserelevanter Antigene bei der B-CLL“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Aarau, Schweiz, 03. November 2005

Georgios Kokinogenis