Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

Der Einfluss von Azacytidin auf CD8-positive T-Lymphozyten nach deren Stimulation mit immunogenen Peptiden

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von

Johannes Broschewitz

geb. in Rostock

2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jochen Greiner

2. Berichterstatter: PD Dr. Oliver Zimmermann

Tag der Promotion: 16.11.2012

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1 Myelodysplastisches Syndrom (MDS) 1

1.1.1 Definition und Einteilung 1

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie 2

1.1.3 Symptomatik und klinischer Verlauf 3

1.1.4 Diagnose und Therapie 4

1.2 Azacytidin 8

1.2.1 Pharmakodynamik und Wirkungsweise 8

1.2.2 Pharmakokinetik 9

1.2.3 Klinische Wirksamkeit 9

1.2.4 Nebenwirkungen 11

1.3 Ziel der Arbeit 11

2. MATERIAL UND METHODEN 13

2.1 Materialien 13

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte 13

2.1.2 Plastikwaren 14

2.1.3 Chemikalien 15

2.1.4 Spezielle Chemikalien 15

2.1.5 Puffer 16

2.1.6 Antikörper, Zelllinien und Zytokine 17

2.1.7 Zellkulturmedien 19

2.1.8 Peptide 19

2.1.9 β_2-Mikroglobulin 20

2.1.10 Blutproben 20

2.2 Methoden 21

2.2.1 Kultur von T2-Zellen 21

2.2.2 Probengewinnung 21

2.2.3 Ficoll-Separation 21
2.2.4 HLA-Typisierung 23
2.2.5 Azacytidin 24
2.2.6 Zellseparation der PBMC und MLPC 25
2.2.7 Nachweis spezifischer Immunreaktionen mittels ELISPOT-Assay 27
2.2.8 Statistik 32

3. ERGEBNISSE 33
3.1 HLA-Typisierung 33
3.2 Nachweis der Immunogenität der verwendeten Peptide 34
3.3 Resultate der ELISPOT-Assays für Granzym B und Interferon-γ 35
3.4 Anzahl der T-Lymphozyten 8 Tage nach Zugabe von Azacytidin 42

4. DISKUSSION 44
4.1 Einfluss von Azacytidin auf stimulierte $CD8^+$-T-Lymphozyten 44
4.2 Anzahl der T-Lymphozyten 8 Tage nach Zugabe von Azacytidin 49
4.3 Ausblick 50

5. ZUSAMMENFASSUNG 52

6. LITERATURVERZEICHNIS 54

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AHSCT	allogene Blutstammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
β_2-MG	β_2-Mikroglobulin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CMV	Aminosäurenonamer des Zytomegalievirus-Peptid pp65 an Position 495-503
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISPOT	enzyme-linked Immunospot
Fa.	Firma
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Fluoreszenz-Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor

Gy	Gray
HLA	humanes Leukozytenantigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HCMV	humanes Zytomegalievirus
HV	healthy volunteer (gesunder Proband)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMP	Aminosäurenonamer des Influenza-A Matrixprotein an Position 58-66
insb.	insbesondere
IPSS	International Prognostic Scoring System
l	Liter
MACS	magnetic-activated cell sorting
MDS	myelodysplastisches Syndrom
min	Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MLPC	mixed lymphocyte peptide culture (gemischte Lymphozyten-Peptid-Kultur)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
o. g.	oben genannt
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
pH	Pondus hydrogenii ($-\log_{10}c(H_3O^+)$)

RA	refraktäre Anämie
RAEB	refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten
RAEB-T	refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten in Transformation
RARS	refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RNase	Ribonuklease
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 (Zellkulturmedium)
s.	siehe
Tab.	Tabelle
TAP	Transporter associated with Antigen Processing (Antigenpeptid-Transporter)
t-MDS	therapie-assoziiertes myelodysplastisches Syndrom
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehung
Vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
WPSS	World Health Organization adapted Prognostic Scoring System
z. B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Myelodysplastisches Syndrom (MDS)

1.1.1 Definition und Einteilung

Das Myelodysplastischen Syndrom bezeichnet eine heterogene Gruppe von Neoplasien des Knochenmarks, welche auf eine gestörte Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen der myeloischen Zellreihe zurückzuführen sind. Es kommt hierbei zu einer klonalen Vermehrung der entarteten Zellen, die das regelrechte Knochenmark verdrängen. In der Folge führt dies zu einer beeinträchtigten Produktion peripherer Blutzellen, die zu Zytopenien führt [8,95,99].

Im Jahre 1976 wurde das MDS erstmals von der French-American-British (FAB)-Klassifikation für myelodysplastische Syndrome in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt [8]. Eine Erweiterung um 5 weitere Subtypen des MDS von 1982 definierte zusätzlich refraktäre Anämie (RA), refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS), refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten (RAEB), refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten in Transformation (RAEB-T) und chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) [9]. Die FAB-Klassifikation beruhte hauptsächlich auf einer Einteilung nach zytomorphologischen und laborchemischen Kriterien. Die heutzutage gebräuchliche Klassifikation der World Health Organization (WHO) von 2008 berücksichtigt zusätzliche zytogenetische Befunde des MDS. Im Zuge dieser Neuerungen werden einige Definitionen, wie z. B. RAEB-T, nicht mehr verwendet. Die aktuellen Subtypen nach WHO sind in Tabelle 1 dargestellt [101].

Eine Prognose über die Erkrankung kann mithilfe des 1997 publizierten International Prognostic Scoring System (IPSS) getroffen werden. (s. Tab. 2) [34]. Ein aktuelleres System stellt das WHO Classification-Based Prognostic Scoring System (WPSS) dar. Im Gegensatz zum IPSS legt das WPSS die WHO-Klassifikation für dessen Einteilung in prognostisch relevante Subgruppen zugrunde [57]. Das WPSS lässt eine genauere Vorhersage über den Verlauf des MDS zu als das IPSS [70]. Trotz dieses Vorteils nutzen viele Autoren weiterhin das IPSS.

Tab. 1: Subtypen des myelodysplatischen Syndroms (MDS), definiert nach der World Health Organisation (WHO) Klassifikation von 2008.

Entität	Befunde im peripheren Blut	Befunde im Knochenmark
Refraktäre Zytopenien mit unilineärer Dysplasie (RCUD) Refraktäre Anämie (RA) Refraktäre Neutropenie (RN) Refraktäre Thrombozytopenie (RT)	Uni- oder Bizytopenie Keine oder wenige Blasten (<1%) Anämie Neutropenie Thrombozytopenie	Unilineäre Dysplasie; 10% aller Zellen der betroffenen Linie sind dysplastisch <5% Blasten <15% der Erythrozytenvorläufer sind Ringsideroblasten
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	Anämie Keine Blasten	Ausschließliche Erythrozytendysplasie <5% Blasten ≥15% Ringsideroblasten
Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD)	Zytopenien Keine oder wenige Blasten (<1%) Keine Auerstäbchen <1 x 10^9 Monozyten /l	Dysplasie in ≥10% der Zellen zweier oder mehrerer myeloiden Linien <5% Blasten Keine Auerstäbchen ±15% Ringsideroblasten
Refraktäre Anämie mit Blastenexzess 1 (RAEB-1)	Zytopenien <5% Blasten Keine Auerstäbchen <1 x 10^9 Monozyten /l	Uni- oder multiliniäre Dysplasie 5-9% Blasten Keine Auerstäbchen
Refraktäre Anämie mit Blastenexzess 2 (RAEB-2)	Zytopenien 5-19% Blasten ±Auerstäbchen <1 x 10^9 Monozyten /l	Uni- oder multiliniäre Dysplasie 10-19% Blasten ±Auerstäbchen
Unklassifiziertes MDS (MDS-U)	Zytopenien Keine oder wenige Blasten (<1%)	Dysplasie in <10% der Zellen einer oder mehrerer myeloiden Linien <5% Blasten
5q-minus-Syndrom	Anämie Keine oder wenige Blasten (<1%) Thrombozytenzahl normal oder erhöht	normale oder erhöhte Megakaryozytenzahl mit nicht gelappten Nuclei <5% Blasten Isolierte 5q-Deletion Keine Auerstäbchen

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Das MDS ist mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 3 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen eine seltene Erkrankung. Männer sind um den Faktor 1,2-1,8 häufiger betroffen als Frauen [4,76]. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei circa 71 Jahren [56,76]. Da mit zunehmendem Alter das Risiko für MDS steigt und mehr als 80% aller Patienten älter als 60 Jahre alt sind, ist das MDS eine Erkrankung des älteren Menschen. Allerdings sind bis zu 9% aller Patienten jünger als 50 Jahre

[4]. Das MDS macht in dieser Population einen Anteil von 1-3% aller bösartigen Neoplasien aus [5]. Im Alter unter 14 Jahren hat das MDS einen Anteil von weniger als 5% an allen hämatologischen Neoplasien [30].
Risikofaktoren für die Entstehung eines MDS sind eine durchgeführte Chemotherapie oder Exposition gegenüber ionisierender Strahlung. Das sekundäre, therapiebedingte MDS (t-MDS) nach therapeutischer Bestrahlung oder Chemotherapie, vor allem mit Alkylantien oder Topoisomerase II-Inhibitoren machen etwa 10% aller Fälle eines MDS aus [51,56]. Das t-MDS weist mit ca. 90% einen deutlich höheren Anteil an Hochrisikopatienten nach IPSS auf als ein de novo entstandenes MDS. Zusätzlich ist das mediane Manifestationsalter geringer als beim de novo MDS [11].
Als Risikofaktoren mit einer geringen Assoziation wurden Nikotinabusus und Exposition gegenüber Lösungsmitteln (insbesondere Benzol) [96] und Pestiziden identifiziert [66]. Eine paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) kann in bis zu 5% aller Fälle in ein MDS übergehen [88]. Das Down-Syndrom ist neben dem erhöhten Risiko für eine AML mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an einem MDS assoziiert [30]. Wegen des hohen Anteils an juvenilen MDS sehen einige Autoren das MDS bei Down-Syndrom als einen eigenen Subtyp an [91]. Darüber hinaus gibt es einige sehr seltene hereditäre Erkrankungen, die ebenfalls das Risiko für die Entwicklung eines MDS erhöhen. Zu diesen prädisponierenden Erkrankungen zählen die Diamond-Blackfan-Anämie, das Shwachman-Diamond-Syndrom, die kongenitale Dyskeratose, die Fanconi-Anämie und die schwere kongenitale Neutropenie [69].

1.1.3 Symptomatik und klinischer Verlauf

Die individuelle Symptomatik, mit der sich MDS-Patienten initial beim Arzt vorstellen, ist stark abhängig davon welche der drei Zellreihen des Knochenmarks kompromittiert ist bzw. sind. Die Symptomatik unterscheidet sich folglich kaum von Anämien, Thrombozytopenien oder Leukozytopenien anderer Genese.
Am häufigsten ist die erythropoetische Zelllinie betroffen, sodass es zur Anämie kommt. Die Patienten präsentieren sich in diesem Fall mit Blässe, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Tachykardie, Hypotension und reduzierter Belastbarkeit. Bei entsprechenden Vorerkrankungen, wie z. B. einer koronaren Herzkrankheit, einem

Herzfehler oder einer respiratorisch relevanten Lungenerkrankung, kann es zu einer Verschlechterung dieser Erkrankungen kommen.
Ist die Thrombozytopoese betroffen, kann dies zu spontanen Blutungen führen. Häufig sind Petechien und Nasen- und Zahnfleischblutungen. Seltener kann es zu gastrointestinalen oder intrakraniellen Hämorrhagien kommen, die potentiell lebensbedrohlich sein können.
Wiederholte bakteriellen Infektionen verschiedener Organsysteme oder komplizierte Verläufe banaler Infektionen sind die Hauptsymptome einer Leukozytopenie, insbesondere einer Neutropenie.
Weitere unspezifische Befunde eines MDS können eine Splenomegalie oder Lymphadenopathie sein [65,95].
Die Prognose eines MDS ist, insgesamt gesehen, schlecht. MDS-Patienten der Hochrisikogruppe nach IPSS haben ein Gesamtüberleben von 15-24 Monaten, je nachdem welche Therapie sie erhalten [26]. Ein höheres Lebensalter und schwere Begleiterkrankungen, wie eine koronare Herzerkrankung oder chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, erschweren die Behandlung und verschlechtern die Prognose zusätzlich [52]. Eine retrospektive Studie zeigt, dass selbst Patienten, die sich initial mit einem Niedrigrisiko-MDS präsentieren, in 84% der Fälle an den unmittelbaren Folgen des MDS versterben. Die mit Abstand häufigsten Todesursachen sind Infektionen (38%), die Transformation in eine AML (15%) und Blutungen (13%) [18].
Finden sich bei MDS-Patienten mehr als 20% Blasten im Knochenmark, so ist das MDS definitionsgemäß zu einer AML fortgeschritten [101]. MDS-Patienten haben ein sehr viel höheres Risiko an einer AML zu erkranken als eine gesunde Vergleichsgruppe. Das MDS kann deshalb auch als Präkanzerose einer AML bezeichnet werden [31]. Zusätzlich hat eine AML auf dem Boden eines MDS eine schlechte Prognose, da diese häufig zytogenetische Veränderungen aufweist, die mit einem erhöhten Risiko assoziiert sind [21].

1.1.4 Diagnose und Therapie

Das MDS wird nicht selten im Rahmen von Routineuntersuchungen, wie der Laborkontrolle des Blutbildes entdeckt. Oft haben die Patienten zu diesem Zeitpunkt keine oder nur geringe Beschwerden, die auf die vorliegende Anämie, Thrombozy-

topenie oder Leukozytopenie zurückzuführen sind [52]. Um ein MDS diagnostizieren zu können, müssen drei Kriterien erfüllt sein, welche im Jahr 2007 publiziert wurden. Es muss eine mindestens 6 Monate bestehende Zytopenie in einer der drei Zelllinien des Knochenmarks vorliegen. Andere Ursachen für diese Zytopenie müssen ausgeschlossen sein und es muss zusätzlich mindestens ein MDS-typischer Befund des Knochenmarks bestehen. Dieser typische Befunde kann eine Dysplasie in mehr als 10% der Zellen einer Zelllinie, mehr als 15% Ringsideroblasten, mehr als 5% Myeloblasten oder ein MDS-spezifischer Karyotyp sein [97]. Liegen neben einer Zytopenie auch Befunde vor, die für ein MDS pathognomonisch sind (z. B. Karyotyp), so kann die Diagnose auch ohne 6-monatige Persistenz einer Zytopenie gestellt werden [98].

Die minimale Diagnostik für ein MDS erfordert auf Grund der o. g. Kriterien ein großes Blutbild, einen Blutausstrich, ein Knochenmarksausstrich und eine Knochenmarkshistologie [98]. Im Blutausstrich kann man möglicherweise Blasten, dysplastische neutrophile Granulozyten oder atypische Monozyten finden. Ein Knochenmarksaspirat eignet sich, um den Anteil an Myeloblasten zu beurteilen und um dysplatische Zellen zu detektieren [100]. Eine zusätzliche Durchflusszytometrie des Aspirats ermöglicht neben einer genaueren Quantifizierung der unreifen Zellen eine Aussage über den Immunphänotyp und abnorme Expressionsmuster von zellulären Oberflächenantigenen [68,93]. Eine Knochenmarkshistologie hilft vor allem beim Ausschluss anderer möglicher Diagnosen, da sich hierbei das Knochenmark in seiner Architektur und Zellularität als Ganzes darstellen lässt [6,98]. Zytogenetische Untersuchungen, wie die Bestimmung des Karyotyps oder die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eignen sich, um MDS-typische chromosomale Abberationen zu detektieren [97]. Zur Diagnostik der Nebenkriterien können weitere Spezialuntersuchungen, wie z. B. der Nachweis somatischer Mutationen oder die Analyse der mRNA-Expression sein [98].

Die aktuellen Ziele in der Behandlung des MDS wurden von der International Working Group im Jahr 2006 postuliert. Diese Therapieziele umfassen die positive Beeinflussung des natürlichen Krankheitsverlaufs, ein Ansprechen auf zytogenetischer Ebene, eine Verbesserung des hämatologischen Status (insb. der Zytopenien) und eine Verbesserung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität.

Eine Risikoadaptation der Therapieziele führt dazu, dass Patienten mit Niedrigrisiko-MDS Maßnahmen zugeführt werden, die sich zumeist auf eine Ver-

besserung des hämatologischen Status und der gesundheitsbezogenen Lebensqualität beschränken. Ausnahmen bilden hier Subtypen, wie z. B. das 5q-minus-Syndrom oder relativ junge Patienten. Hochrisiko-Patienten erhalten hingegen eine Therapie, welche vor allem darauf abzielt den Krankheitsverlauf entscheidend zu beeinflussen [15]. Trotz der o. g. Empfehlungen gibt es aber Hinweise, dass auch beschwerdefreie Patienten mit Niedrigrisiko-MDS von einer umfangreicheren Therapie profitieren könnten [19].

Supportive Therapiestrategien werden bei MDS-Patienten, gleich welcher Risikogruppe sie angehören, angewendet. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um die Therapie von Zytopenien [15].

Nahezu alle MDS-Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine transfusionsbedürftige Anämie [36]. Um Komplikationen zu vermeiden und die Lebensqualität zu verbessern erhalten die Patienten deswegen Erythrozytenkonzentrate [41]. Bei häufigen Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten wird eine Prophylaxe mit Eisenchelatoren empfohlen, um eine Eisenüberladung mit dem konsekutiven Bild einer Hämochromatose zu verhindern [41,73]. Präparate, die die Erythropoese stimulieren können, helfen auf Transfusionen zu verzichten oder zumindest deren Anzahl zu reduzieren. Klinisch eingesetzte Substanzen sind z. B. das rekombinant hergestellte Erythropoetin oder Darbepoetin [32,40]. Die Ansprechraten auf Erythropoetinanaloga bei Patienten mit Niedrigrisiko-MDS reichen, je nach Studie, von 32-82% [63]. Am meisten profitieren von einer solchen Therapie Patienten, die per se einen niedrigen Erythropoetinspiegel und geringen Transfusionsbedarf aufweisen [15,37]. Ein Ansprechen auf Erythropoetinanaloga kann durch gleichzeitige Gabe von Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF) erhöht werden [7,13].

Etwa 20% der MDS-Patienten entwickeln im Krankheitsverlauf eine Thrombozytopenie und ein Teil dieser Patienten benötigt Thrombozytenkonzentrate, um schweren Blutungen vorzubeugen. Bedingt durch die häufig auftretende Alloimmunisierung während einer Therapie mit Thrombozytenkonzentraten, kann sich die anfangs erzielte Verbesserung allerdings verringern [44]. In einer Studie scheint Romiplostim (AMG 531), welches ursprünglich für die Therapie idiopathischer Thrombzytopenien entwickelt wurde, eine Verbesserung der Thrombozytopenie zu bewirken [45].

In Ausnahmefällen kann man für Patienten mit Niedrigrisiko-MDS eine über die

supportive Therapie hinausgehende Behandlung durchführen. Bei Patienten mit hypozellulärem Knochenmark kommt eine Behandlung mit Immunsuppressiva wie Antithymozytenglobulin oder Ciclosporin in Betracht [61]. Eine Verbesserung des hämatologischen Status durch Antithymozytenglobulin hat jedoch, je nach Studie, sehr variable Ansprechraten von 15-70% [1,53]. Lenalidomid bietet beim 5q-minus-Syndrom für fast zwei Drittel der Patienten eine Verringerung des Transfusionsbedarfs [54]. Es hat sich für diese MDS-Variante als Mittel der Wahl etablieren können [37]. Zusätzlich spricht ca. ein Viertel der Niedrigrisiko-Patienten ohne 5q-minus-Syndrom auf Lenalidomid mit einer Verringerung des Transfusionsbedarfs an [74]. Darüber hinaus kann für sehr junge Patienten eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) erwogen werden [15]. Die allogene HCST stellt die einzige kurative Behandlungsoption in der MDS-Therapie dar. Sie wird häufig bei Patienten mit Hochrisiko-MDS durchgeführt. Aufgrund von relevanten Nebenerkrankungen der zumeist älteren Patienten und wegen eines hohen Risikos von transplantations-assoziierter Mortalität wird eine HSCT aber nur bei 5% aller MDS-Patienten durchgeführt. Zusätzlich kann sich die Suche nach einem geeigneten Spender in manchen Fällen als schwierig gestalten [18,80]. Kommt eine HSCT nicht in Frage, so kann eine Therapie mit hypomethylierenden Substanzen, wie Azacytidin oder Decitabin durchgeführt werden [41]. Azacytidin wurde auf Grund seiner klinischen Wirksamkeit bereits im Jahr 2004 von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung des Hochrisiko-MDS zugelassen. Im Jahre 2008 erfolgte die Zulassung für den europäischen Markt durch die European Medicines Agency [39].

Bei Versagen der o. g. Therapieoptionen kann eine Chemotherapie mit gängigen Zytostatika in erwogen werden. Bei der intensiven Chemotherapie kann Cytarabin mit Daunorubicin, Idarubicin oder Mitoxantron kombiniert werden. In der Niedrigdosis-Chemotherapie kann allein Cytarabin verwendet und das auch in geringeren Dosen, als es bei der intensiven Chemotherapie der Fall ist. Allerdings sind die klinischen Ansprechraten in Form von Verbesserung des hämatologischen Status, partieller und kompletter Remission, für alle Varianten der Chemotherapie, einer Therapie mit Azacytidin bisher unterlegen [26]. In einer Phase II Studie aus dem Jahr 2008 wird über eine Wirkungssteigerung der Niedrigdosis-Chemotherapie mit Cytarabin durch Kombination mit dem Nukleosidanalogon Clofarabin berichtet [24]. Ein weiteres Alternativverfahren stellt die kurative,

nicht-myeloablative HSCT dar. Im Gegensatz zur myeloablativen HSCT handelt es sich hierbei aber um ein Verfahren, welches weniger Nebenwirkungen hervorruft [59,86].

1.2 Azacytidin

Azacytidin ist ein Derivat des Nucleosids Cytidin. Es besteht aus dem Saccharid β-D-Ribose und der Base Cytosin, welche an der 5. Stelle im Pyrimidinring ein zusätzliches Stickstoffatom aufweist (s. Abb. 1) [82]. In wässriger Lösung ist Azacytidin eine relativ instabile Substanz und zerfällt durch Spaltung des Pyrimidinringes oder Auflösung der glykosidischen Bindung [67].

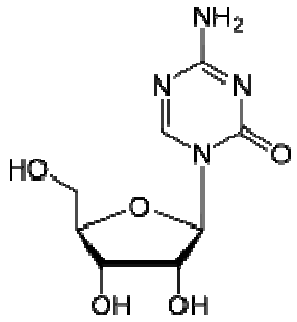


Abb. 1: Strukturformel von Azacytidin

1.2.1 Wirkungsweise und Pharmakodynamik

Azacytidin ist eine zytotoxische Substanz, die ihre Wirkung im Zellzyklus und DNA-Metabolismus entfaltet. Die klinischen Effekte, die von Azacytidin ausgehen werden hauptsächlich durch den Einfluss auf Apoptose und Methylierung der DNA erklärt [94]. Azacytidin ist in der Lage die Hypermethylierung der DNA aufzuheben, indem es die im Zellkern befindlichen DNA-Methyltransferasen hemmt. Die Hypermethylierung ist ein wichtiger Faktor in der Karzinogenese, da es durch diese epigenetischen Veränderungen zu einem Silencing von Tumorsuppressorgenen und anderen in den Zellzyklus involvierten Genen kommen kann [23,64]. Durch die Reaktivierung der stumm geschalteten Gene können in vitro die zelluläre Differenzierung gefördert und apoptotische Signalwege wieder ausgelöst werden [84,100]. Das Tumorsuppressorgen p15 ist beim MDS und der AML häufig

hypermethyliert und damit inaktiv. Azacytidin ist in der Lage diese Methylierung in vivo rückgängig zu machen. Die klinischen Ansprechraten auf Azacytidin korrelieren aber nicht mit der Reaktivierung von p15 [33,90].
Als Prodrug muss Azacytidin nach Eintritt in die Zelle in die aktive Form umgewandelt werden. Durch die Uridin-Cytidin-Kinase wird es in einem ATP-abhängigen Prozess vom Nukleosid in das monophosphorylierte Nukleotid überführt [62]. In weiteren Reaktionsschritten wird das Nukleotid dann in 5-Aza-2‘-deoxycytidintriphosphat umgewandelt. In dieser Form kann es durch die DNA-Synthase während der Replikation als Substrat erkannt und in die DNA eingebaut werden. Statt Cytosin befindet sich nun Azacytosin als Base im neu synthetisierten Strang. Die am Cytosin angreifende DNA-Methyltransferase kann sich nach erfolgter Methylierung nicht mehr von Azacytosin lösen. Das reaktive Zentrum des Enzyms ist somit blockiert und zu weiteren Methylierungen nicht mehr fähig. Im weiteren Verlauf wird es durch das Proteasom als fehlerhaft erkannt und abgebaut [14,78]. Dieser Mechanismus läuft auch ab, wenn das reaktive Zentrum der DNA-Methyltransferase mutiert ist [31].

1.2.2 Pharmakokinetik

5-Azacytidin wird nach subkutaner Gabe von 75 mg/m² relativ rasch absorbiert und erreicht die höchste Plasmakonzentration von durchschnittlich 687 ng/ml (entspricht ca. 3 µM) nach einer halben Stunde. Bei intravenöser Gabe derselben Dosis beträgt die höchste Plasmakonzentration 2580 ng/ml (entspricht ca. 11 µM). Die Halbwertszeit nach subkutaner Applikation beträgt 41 min und ist etwa doppelt so hoch wie nach intravenöser Applikation. Im Vergleich zur intravenösen Anwendung beträgt die Bioverfügbarkeit bei subkutaner Verabreichung 89% [58]. In einer Pilotstudie mit vier Patienten wurde eine orale Bioverfügbarkeit von 17,4% gegenüber subkutaner Anwendung festgestellt [28].

1.2.3 Klinische Wirksamkeit

Die ausführlichsten Untersuchungen zur Wirksamkeit von Azacytidin wurden im „AZA-001 Trial“ durchgeführt und 2009 veröffentlicht. Ingesamt wurden dabei 358 Patienten mit intermediate-2 und high-risk MDS eingeschlossen, allerdings

wurden Patienten mit t-MDS ausgeschlossen. 105 Patienten erhielten eine supportive Therapie, bestehend aus Transfusionen und Gabe von Wachstumsfaktoren. 49 Patienten erhielten zusätzlich eine Niedrigdosis-Chemotherapie mit Cytarabin über 4 Zyklen und 25 Patienten erhielten eine intensive Chemotherapie mit Cytarabin in Kombination mit Daunorubicin, Idarubicin oder Mitoxantron. Die restlichen 179 Patienten erhielten 75 mg/m² Azacytidin subkutan täglich für 7 Tage mit einer anschließenden Pause von 21 Tagen. Hierauf schloss sich jeweils der nächst Zyklus an. Vorausgesetzt, dass keine gravierenden Nebenwirkungen auftraten, die zum Therapieabbruch führten. Insgesamt wurde die Prozedur bis zum sechsten Zyklus wiederholt.

Azacytidin konnte das Gesamtüberleben gegenüber den anderen Therapien durchschnittlich um 9,4 Monate verlängern. Im Einzelnen: 21,1 gegenüber 11,5 Monaten mit supportiver Therapie, 24,5 gegenüber 15,3 Monaten mit Niedrigdosis-Chemotherapie und 25,1 gegenüber 15,7 Monaten mit intensiver Chemotherapie. Ebenso konnte Azacytidin die Dauer bis zur Transformation in eine AML um 6,3 Monate gegenüber den anderen Therapien signifikant verlängern [26].

Weitere Untersuchungen zur Wirksamkeit von Azacytidin wurden in einer kontrollierten, randomisierten Phase III-Studie durchgeführt. Der, im Jahr 2002 publizierte, „CALBG 9221-Trial“ hatte ein ähnliches Design, wie die o. g. Studie. Wichtige Unterschiede waren aber, dass die Azacytidintherapie nur mit der supportiven Therapie verglichen wurde, dass der Azacytidinarm höchstens 4 Zyklen erhielt, und dass alle MDS-Risikogruppen nach IPSS vertreten waren. Insgesamt waren 191 Patienten eingeschlossen worden. Die Studie zeigte dabei signifikant höhere Ansprechraten für eine Therapie mit Azacytidin, 60% gegenüber 5% bei supportiver Therapie ($p < 0,001$). Als Ansprechen galt das Erreichen einer kompletten Remission (7% gegenüber 0%), einer partiellen Remission (16% gegenüber 0%) und einer hämatologischen Verbesserung (37% gegenüber 5%). Außerdem konnte eine im Durchschnitt längere Dauer bis zum Versagen der Therapie gezeigt werden, 9,1 gegenüber 3,8 Monaten ($p < 0,001$). Ähnlich verhält es sich mit der durchschnittlichen Zeit bis zur Transformation in eine AML oder bis zum Tod. Das Gesamtüberleben ist in der Azacytidin-Gruppe ebenfalls signifikant länger, 18 gegenüber 11 Monate ($p < 0,03$) [84].

In zwei Phase II-Studien, in die 68 Patienten eingeschlossen und mit demselben

Dosierungsschema für Azacytidin behandelt wurden, konnten ähnliche Ansprechraten gezeigt werden [83]. Darüber hinaus wurde in diversen unkontrollierten Studien von der Effektivität einer Therapie mit Azacytidin berichtet [35,49,82].

1.2.4 Nebenwirkungen

Die häufigsten Nebenwirkungen sind, wie bei fast allen Zytostatika, Übelkeit und Erbrechen. Sie treten bei mehr als 50% der Patienten auf, weswegen eine antiemetische Prämedikation empfohlen wird. Weitere vegetative Nebenwirkungen sind Diarrhoe oder Obstipation, welche bei ca. einem Drittel der Patienten zu beobachten sind. Eine Rötung an der Einstichstelle tritt ebenfalls bei ca. einem Drittel der Patienten auf [84]. Lebensbedrohliche Nebenwirkungen sind die Zytopenien. Im „CALGB 9221-Trial“ treten Anämien jedoch in der Gruppe, die nur die supportive Therapie erhält fast ebenso häufig auf, wie in der mit Azacytidin behandelten Gruppe. Bei Thrombo-, Neutro- und Leukozytopenie weist die Azacytidin-Gruppe hingegen deutlich höhere Raten auf. Trotz dieser höheren Frequenz an potentiell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen ist die Blutungs- bzw. Infektionsrate jedoch nicht erhöht [84]. Die Inzidenz an tödlichen Blutungen und Infektionen war in der Gruppe mit supportiver Therapie sogar höher [85].

1.3 Ziel der Arbeit

Die klinische Wirksamkeit von Azacytidin ist durch mehrere Phase III-Studien relativ gut belegt. Wirkmechanismen durch Einfluss auf Apoptose und DNA-Methylierung sind ebenfalls gut charakterisiert. Dennoch ist zweifelhaft, ob sich die klinische Wirksamkeit ausschließlich durch diese Mechanismen erklären lässt [29,90].

Eine aberrante DNA-Methylierung ist ein aussagekräftiger Prädiktor für den natürlichen Verlauf eines MDS. Die Beeinflussung der DNA-Methylierung in vitro liefert jedoch keinen Hinweis darauf, ob eine Therapie in vivo mit hypomethylierenden Substanzen, wie Azacytidin oder Decitabin, für den jeweiligen Patienten erfolgreich sein kann [81]. Es scheinen demnach noch weitere Wirkmechanismen zu existieren. Neben der indirekten Beeinflussung des Immunsystems durch epigenetische Mechanismen, wie das Aufheben des Silencing bestimmter Genregionen,

kommt eine direkte Beeinflussung des Immunsystems durch Azacytidin in Frage. Bislang sind zu diesem Sachverhalt allerdings nur wenige Ergebnisse publiziert worden.

Einen wesentlichen Bestandteil des zellulären Immunsystems stellen $CD8^+$-T-Lymphozyten dar. Sie können u. a. durch das Erkennen von tumor-assoziierten Antigenen einen Host-versus-tumor-Effekt verursachen und damit die Lyse von Tumorzellen veranlassen. Eine Sensibilisierung gegenüber Antigenen oder verstärkte Aktivierung von $CD8^+$-T-Lymphozyten kann somit ein möglicher Mechanismus von Azacytidin sein. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, zu klären, ob Azacytidin einen Einfluss auf die Aktivität von stimulierten $CD8^+$-T-Lymphozyten hat.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Brutschrank	B 5042 E (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
ELISPOT-Reader	Immuno Spot (C.T.L. Europe, Reutlingen, Deutschland)
FACS-Gerät:	FACScan, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gamma-Counter	145 Microbeta Plus, Liquid Scintillation Counter, Fa. Wallac (Loughborough Leics, England)
Gefrierschrank	-20° C: (Bosch GmbH, München, Deutschland) -80° C: Ultra Low (Sanyo Fisher GmbH, München, Deutschland)
Magnetständer	MACS MultiStand (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)
Mikroskop	Vergrößerung: 3,2; 10; 16 und 100fach (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)
Multistep-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
pH-Messgerät	pH744 Meter (Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt, Deutschland)
Pipetten	0,5 – 10 µl; 10 – 100 µl; 50 – 250 µl und 200 – 1000 µl Eppendorf Reference (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe	Nalge Nunc international, Roskilde, Dänemark
Sterile Arbeitsbank	Hera-Safe HS-18 und HLB 2448 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
Stickstofftank	M280 (Taylor-Warton GmbH, Husum, Deutschland)
Wasserbad	Julabo U3/7 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach/West, Deutschland)
Zählkammer	Neubauer 0,1 mm Tiefe; 0,0025 mm² (LO - Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland)

Zentrifugen	Beckmann GS-6R und Beckmann GS-15R (Beckmann Instruments, Fullerton, CA, USA)

2.1.2 Plastikwaren

Alle verwendeten Plastikwaren wurden von folgenden Herstellern bezogen.

Kryoröhrchen	Nunc Cryo Tube™ Vials 1,8 ml (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark)
Einmalspritzen	2 ml (Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
ELISPOT-Platten	MultiScreen-IP, MultiScreen 96-well filtration and Assay Plate (Millipore, Bedford, MA, USA)
Filter	MACS Pre-Separations-Filter (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)
Gewebekulturflaschen	NUNCLON™ Surface 40, 160 und 400 ml (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark)
Multistep-Pipetten-Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten	FALCON® Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25 und 50 ml (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Pipettenspitzen	epT.I.P.S. Standard 0,1-10 µl, 2-200 µl und 50-1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Platten	NUNCLON™ Surface 12, 24, 48 und 96 well (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark)
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tube 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml und 2 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Röhrchen	FALCON® Polypropylen Tubes 15 ml und 50 ml (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Sterilfilter	Minisart RC 15 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
Trennsäule	MACS MS+ Separation Columns (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt
Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
GibcoBRL™, Karlsruhe, Deutschland
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Cambrex Bio Science, Rockland, USA
USB Corporation, Cleveland, USA
Invitrogen, Carlsbad, USA
Dela Select GmbH, Pfullingen, Deutschland

2.1.4 Spezielle Chemikalien

Alle verwendeten speziellen Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

AB-Serum	Deutsches Rotes Kreuz, Ulm, Deutschland
AEC-Substrat	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Aqua destillata Spüllösung	Braun AG, Melsungen, Deutschland
Azacytidin (Vidaza®)	Celgene GmbH, München, Deutschland
β_2-Mikroglobulin (β_2-MG)	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylformid (DMF)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Färbetabletten	BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) Färbetabletten, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Fetales Kälberserum	GibcoBRL™, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll Seperating Solution	Seromed-Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Granzym B-Antikörper	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

IFN-γ-Antikörper	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden
IL-2 / IL-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin	Seromed-Biochrom AG, Berlin
MicroBeads CD8	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
PBS 10x	GibcoBRL™, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	GibcoBRL™, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Seromed-Biochrom AG, Berlin
Tryptanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

2.1.5 Puffer

Coating-Puffer

In 100 ml Aqua bidestillata wurden folgende Substanzen gelöst:

- 580 mg Natriumhydrogencarbonat
- 318 mg Natriumcarbonat
- 49 mg Natriumazid

Die Lösung hat einen pH-Wert von 9,6 und wurde steril filtriert.

Substrat-Puffer

In 500 ml Aqua bidestillata wurden folgende Substanzen gelöst:

- 5 M Magnesiumchlorid (237 g/500 ml)
- 0,1 M TRIS-Puffer (6,05 g/500 ml)
- 0,1 M Natriumchlorid (2,9 g/500 ml)

Die Lösung hat einen pH-Wert von 9,5 und wurde steril filtriert.

Dilution-Puffer

In 500 ml PBS wurden 50 ml fetales Kälberserum (FCS) gelöst, sodass der Dilution-Puffer 10% FCS enthält.

PBS-Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung)

In 1 l Aqua bidestillata wurden folgende Substanzen gelöst:

- 8,0 g Natriumchlorid
- 1,44 g Natriumhydrogenphosphat
- 0,24 g Kaliumhydrogenphosphat
- 0,2 g Kaliumchlorid

Die Lösung wurde hat pH-Wert von 7,2 und wurde steril filtriert.

PBS / Tween-Puffer

In 1 l PBS-Puffer wurden 0,5 ml Tween-20 gelöst.

Separations-Puffer

500 ml PBS enthalten folgende Substanzen:

- 2 mM EDTA
- 0,5% FCS

FACS-Puffer

500 ml PBS enthalten folgende Substanzen:

- 2 mM EDTA
- 1% bovines Serumalbumin (BSA)

Blockierungslösung für Granzyme B ELISPOT-Assays

500 ml RPMI 1640-Medium enthalten folgende Substanzen:

- 50 ml FCS
- 5 ml Penicillin / Streptomycin
- 5 ml L-Glutamin

Blockierungslösung für IFN γ ELISPOT-Assays

In 500 ml PBS wurden 5 ml AB-Serum gelöst.

2.1.6 Antikörper, Zelllinien und Zytokine

Die American Type Culture Collection (ATCC) ist ein Register für biologische Materialien. Sie verwaltet eine Sammlung vieler humaner Zelllinien und stellt diese

zur freien Verfügung. In Deutschland hat diese Aufgabe die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DMSZ) inne.
Folgende, in den o. g. Sammlungen verzeichnete Zelllinien wurden verwendet:

T2-Zelllinie

Die T2-Zelllinie, mit der ATCC-Nummer CRL-1992, ist eine TAP-defiziente Hybride aus einer lymphoblastischen B- und T-Zelllinie. Die Zellen synthetisieren zwar HLA B5, aber exprimieren es nicht. Die Zelllinie T2 eignet sich für das Studium der T-Zell-Erkennung von MHC-Klasse I Antigenen. Die Zelllinie exprimiert außerdem die Antigene HLA A2 und CD7+, aber keine MHC-Klasse II Moleküle. Das für die Experimente entscheidende Merkmal der T2-Zellen ist das Fehlen des natürlicherweise vorkommenden Proteins TAP. Es prozessiert in gesunden Körperzellen Antigene, die auf MHC-Klasse-I-Rezeptoren präsentiert werden sollen. Um eine unerwünschte Prozessierung, der von uns verwendeten Nonapeptide zu verhindern, wurden daher T2-Zellen verwendet.

K562-Zelllinie

Die K562-Zelllinie, mit der DMSZ-Nummer ACC 10, besteht aus Zellen eines malignen Pleuraergusses. Sie wurden im Jahr 1970 einer 53-jährigen Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie entnommen. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Patientin in einer Blastenkrise.

Interleukin-2 (IL-2)

T-Lymphozyten benötigen für die Aufrechterhaltung ihrer Proliferation den Wachstumsfaktor IL-2. Wegen seiner wachstumsfördernden Wirkung auf aktivierte T-Lymphozyten wurde IL-2 zur Langzeitkultivierung von T-Lymphozyten eingesetzt. Daneben stimuliert IL-2 die auch deren Differenzierung [22].

Interleukin-7 (IL-7)

IL-7 ist ein Wachstumsfaktor für B- und T-Lymphozyten. IL-7 stimuliert darüber hinaus die Differenzierung von B-Zellen und T-Zellen, hemmt aber die Differenzierung von CTL. Il-7 ist für die Proliferation von T-Lymphozyten erforderlich und wurde aufgrund seiner wachstumsfördernden Wirkung zur Langzeitkultivierung von T-Lymphozyten eingesetzt [2,3].

FACS-Antikörper

FITC konjugierter, muriner IgG1-Antikörper	Becton Dickinson GmbH
FITC konjugierter α-Human HLA-A2-Antikörper	Becton Dickinson GmbH

2.1.7 Zellkulturmedien

Medium zur T-Zell-Kultivierung (AB-Medium)

Zu 500 ml RPMI 1640-Medium wurden folgende Zusätze gegeben:

- 10% steril filtriertes, humanes AB-Serum
- 1% Penicillin / Streptomycin
- 1% L-Glutamin

Medium zur K562-Zell-Kultivierung

Zu 500 ml RPMI 1640-Medium wurden folgende Zusätze gegeben:

- 10% FCS
- 1% Penicillin / Streptomycin
- 1% L-Glutamin

Medium zur Kryokonservierung

Zu 500 ml RPMI 1640-Medium wurden folgende Zusätze gegeben:

- 20% steril filtriertes, humanes AB-Serum
- 10% DMSO
- 1% Penicillin / Streptomycin
- 1% L-Glutamin

Hitzeinaktivierung der Sera

AB-Serum und FCS wurden im Wasserbad bei 56°C für eine Dauer von mindestens 30 min hitzeinaktiviert. Dieses Vorgehen denaturiert hitzelabile Komplementfaktoren. Das hitzeinaktivierte Serum wurde anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.1.8 Peptide

Die antigenspezifische CTL-Immunantwort auf das humane Zytomegalievirus (HCMV) wird hauptsächlich durch das virale Protein pp65 ausgelöst. Der immunogene Bestandteil dieses Proteins ist ein Nonapeptid, welches sich an der Position 495-503 der korrespondierenden Aminosäuresequenz befindet. Dieses Nonapeptid wird im Folgenden als CMV bezeichnet. CMV wird von humanen HCMV-spezifischen CTL erkannt und setzt so die zelluläre Immunantwort in Gang [89].

IMP bezeichnet ein Nonapeptid, das sich im natürlich vorkommenden Influenza-A-Matrixprotein an Position 58-66 befindet. IMP wird von humanen Influenza-spezifischen CTL erkannt und bindet hochavide an diese, was daraufhin die zelluläre Immunreaktion einleitet [25].

Die Aminosäuresequenzen der Nonapeptide sind in Tab. 2 aufgeführt. Bei beiden Peptiden handelt es sich um HLA-A2*0201-restringierte $CD8^+$-T-Zellepitope. Die an Klasse I MHC-Moleküle bindenden Peptide wurden von der Fa. Thermo Electron (Ulm, Deutschland) bezogen. Die Reinheit der Peptide beträgt mindestens 95%, was mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) kontrolliert wurde. Sie wurden in DMSO gelöst und mit PBS verdünnt, sodass die Konzentration 1 µg/ml betrug. Die Konzentration, die wir zum Pulsen der Kulturen verwendeten, betrug 20 µg/ml.

Tab. 2: Aminosäuresequenzen des Nonamere des Zytomegalievirus-Protein pp65 an Position 495-503 (CMV-Peptid) und des Influenza-A Matrixprotein an Position 58-66 (IMP-Peptid).

	CMV-Peptid	**IMP-Peptid**
Aminosäuresequenz	NLVPMVATV	GILGFVFTL

Da die verwendeten Peptide sind HLA-A2-restringiert sind, konnten für die Versuche nur T-Lymphozyten genutzt werden, die von HLA-A2-positiven Probanden stammen. In Mitteleuropa exprimieren ca. 60% der Bevölkerung dieses HLA-Merkmal [38].

2.1.9 β_2-Mikroglobulin

Die Funktion von β_2-Mikroglobulin in vivo ist die Stabilisierung von MHC-Klasse-I-Rezeptoren. Obwohl nicht direkt an der Bindung des Antigens beteiligt, ermöglicht β_2-Mikroglobulin eine höhere Affinität des MHC-Komplexes für spezifische Antigene durch dessen Konformationsänderung. Auf Grund dieses stabilisierenden Effektes erfolgte immer eine Zugabe von β_2-Mikroglobulin, bevor die Kulturen mit Peptid gepulst wurden [71].

2.1.10 Blutproben

Zur Durchführung der Arbeit wurden Blutproben von gesunden Spendern verwendet. Die Proben wurden in Form von Buffy-Coats von der Blutbank des Deutschen Roten Kreuzes Ulm, Abteilung Transfusionsmedizin, bezogen. Der HLA-Status wurde per FACS-Analyse ermittelt.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur von T2-Zellen

Die T2-Zelllinie wurde in T-Zell-Medium bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Dreimal pro Woche wurde je nach Bedarf die gesamte Kultur, die halbe oder 1/5 der Kultur zentrifugiert und in neues AB-Medium gegeben. Die Färbung des Zellkulturmediums zeigt die Notwendigkeit an es durch neues zu ersetzen. Die Zellzahl wurde wöchentlich in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.2 Probengewinnung

Zur Durchführung der Tests wurden mononukleäre Zelllen des peripheren Blutes (PBMC) von gesunden Probanden benötigt. Die Probanden-PBMCs wurden aus Buffy-Coats gewonnen. Ein Buffy-Coat beinhaltet aus dem Blut extrahierte mononukleäre Zellen und Thrombozyten. Aus 450 ml einer Vollblutspende lassen sich ca. 90 ml Buffy-Coat gewinnen.

2.2.3 Ficoll-Separation

Die Ficoll-Separation ist eine Methode zur Zellisolation, die auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation beruht. Vollblut setzt sich zu ca. 55% aus Plasma, und zu ca. 45% aus korpuskulären Bestandteilen (Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten) zusammen. Aufgrund des unterschiedlichen spezifischen Gewichts der verschiedenen Zelltypen sedimentieren sie beim Zentrifugieren in unterschiedliche Phasen. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrosepolymer mit einem spezifischen Gewicht von 1,077 g/ml, das als Phasentrenner fungiert. Dies ermöglicht die Isolation der verschiedenen zellulären Bestandteile.
Bei der Durchführung wird peripheres Vollblut im Verhältnis 2:1 mit PBS-Puffer verdünnt, Blutbestandteile aus einem Buffy Coat im Verhältnis 1:1. Anschließend wird dieses Substrat über 15 ml Ficoll-Lösung geschichtet und für 20 min bei Raumtemperatur mit 2000 U/min ohne anschließendes Abbremsen zentrifugiert. Erythrozytenaggregate und tote Zellen können aufgrund ihres größeren spezifischen Gewichtes den Gradienten passieren, Granulozyten dringen, wegen ihres ähnlichen spezifischen Gewichts in die Ficollschicht ein. Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten sammeln sich hingegen oberhalb der Ficollschicht an der Plasma-Gradientengrenze an und können dort mit Hilfe einer sterilen Pipette extrahiert werden. Das Substrat wird dreimal mit PBS-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 1200 U/min für 10 min), um die noch enthaltenen Thrombozyten zu entfernen.
Nun wird die Zellzahl der PBMC bestimmt. Hierzu wird eine definierte Menge der PBMC mit Färbelösung (Tryptanblau) vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Es wird die Anzahl der Zellen in 64 Quadraten gezählt und anschließend die gesamte Zellzahl mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zahl der gezählten Zellen x Verdünnungsfaktor}}{\text{Zahl der ausgezählten Quadrate}} \quad x\ 10^4/\text{ml}$$

Die so isolierten PBMCs wurden entweder sofort in entsprechenden Tests weiterverwendet oder kryokonserviert. Für Letzteres wurden die Zellen in das Medium zur Kryokonservierung (RPMI 1640-Medium mit 20% AB-Serum, 1% L-Glutamin,

1% Penicillin/Streptomycin, 10% DMSO) gegeben und als Zellpellet mit je 5 x 10^7 Zellen in 1,5 ml große Kryoröhrchen abgefüllt. Diese wurden zunächst bei -80°C, ab dem folgenden Tag schließlich in Flüssigstickstoff bei ca. -200°C gelagert.

2.2.4 HLA-Typisierung

Die HLA-Typisierung wurde mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. Mit ihr lassen sich auf der Zelloberfläche exprimierte Antigene detektieren. Dies geschieht durch Markierung mit spezifischen, monoklonalen und fluorochrom-markierten Antikörpern. Auf diese Weise können Zellen auf biologische und immunologische Eigenschaften hin untersucht werden.
Die Suspension, der mit Antikörpern markierten Zellen, wird zunächst vom FACS-Gerät in die Messkammer gesaugt. Durch eine vibrierende Fließkammer werden die Zellen für die Messung vorbereitet. Die Vibration sorgt dafür, dass die Zellsuspension in feinste Tröpfchen verteilt wird. Bestenfalls enthält am Ende der Prozedur jeder Tropfen nur eine einzige Zelle. In der Messkammer werden die Tropfen anschließend mit dem monochromatischen Licht eines Lasers beleuchtet. Während dieses Vorgangs werden die Zellen sortiert. Die fluoreszierenden Farbstoffe ermöglichen damit die Visualisierung bestimmter Zelleigenschaften.
Die verwendeten FACS-Antikörper sind mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. FITC wird bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, das Emissionsmaximum liegt bei 530 nm. Beim Auftreffen des Laserstrahls auf den Fluoreszenzfarbstoff des Antikörpers emittiert dieser sog. Fluoreszenzlicht. Detektoren messen die Intensität der Lichtemission und lassen damit Rückschlüsse auf die Dichte der Antigene an der Zelloberfläche zu. Mittels FACS-Analyse wurde das HLA-Oberflächenantigen der Proben daraufhin untersucht, ob es das HLA-A2-Allel exprimiert.
Für die Durchführung einer FACS-Analyse wurden die Zellen des jeweiligen Probanden für die Messung in reichlich AB-Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert und Überstand dekantiert. Die verbliebenen Pellets wurden mit 4 µl FACS-Puffer aufgefüllt und nach Durchmischen jeweils 2 µl der Suspension in 2 FACS-Röhrchen gefüllt. Diese wurden danach bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. In ein FACS-Röhrchen wurde mit 10 µl FITC konjugierter, muriner

IgG1-Antikörper pipettiert, in das andere FACS-Röhrchen 2 µl FITC konjugierter α-Human HLA-A2-Antikörper. Beide Ansätze wurden für 20 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Suspensionen bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Pellets mit zweimal 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in mindestens 200 µl PBS aufgenommen, je nachdem wie viele Zellen insgesamt vorhanden waren. Ziel war es, das Volumen so einzustellen, dass die Durchflusszahl der Zellen am FACS-Gerät bei der Messung ca. 300 Zellen/s betrug. Für eine suffiziente Messung wurden pro FACS-Röhrchen mindestens 2 x 10^5 Zellen benötigt, um die Zellen analysieren zu können. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software „CellQuest™".

Für jeden Versuch wurden gleichzeitig eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Für die Positivkontrolle wurde die HLA-A2-positive T2-Zelllinie und für die Negativkontrolle die HLA-A2-negative K562-Zelllinie verwendet. Um die unspezifische Bindung von Antikörpern bei der FACS-Analyse auszuschließen wurden, begleitend zu den Proben mit FITC konjugiertem α-Human HLA-A2-Antikörper, Proben mit FITC konjugiertem, murinem IgG1-Antikörper als Kontrolle verwendet.

2.2.5 Azacytidin

Azacytidin ist vom Hersteller nur als kristallines Pulver lieferbar. In einer Durchstechflasche mit Vidaza® sind je 100 mg Azacytidin und Mannitol enthalten. In publizierten, experimentellen Arbeiten, bei denen Azacytidin verwendet wurde, hat man es in sterilem Wasser gelöst [47,48]. Deshalb haben wir zunächst 7 mg des Pulvers ausgewogen und es dann unter der Flow in 328 µl sterilem Wasser aufgelöst. Zum Schutz vor enzymatischer Lyse war es zusätzlich frei von DNase und RNase. Die hergestellte Lösung hatte damit eine Konzentration von 43,7 mM. Nach unseren Berechnungen reichten 10 µl der hergestellten Lösung als Menge für einen Versuche aus. Wir haben daher das gesamte Volumen auf 30 Küvetten à 10 µl aliquotiert. Das Pulver wurde, wie beschrieben, einmalig in einer für alle Versuche ausreichenden Menge aufgelöst. Der Vorteil dieser Vorgehensweise lag darin, dass man es nicht für jedes Experiment kurz vor der Verwendung aufzulösen brauchte. Die Gefahr von Verunreinigungen konnte somit minimiert werden.

Azacytidin ist, bei Raumtemperatur in Wasser gelöst, eine leicht zerfallende Sub-

stanz. In Ringerlaktat-Lösung verringert sich die Konzentration von Azacytidin um ca. 10% nach 2-3 Stunden [75]. Die Halbwertszeit von in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem Azacytidin beträgt bei 4°C 21 Tage und bei 37°C 7 Stunden [48]. Um einen Zerfall von Azacytidin in flüssigem Medium zu verhindern, wurden die Küvetten deshalb bei -20°C gelagert.
Die Konzentrationen von Azacytidin sollten in den Kulturen 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM und 50 µM betragen. Dafür wurde eine Küvette kurz vor Gebrauch aufgetaut und in 1990 µl AB-Medium aufgelöst. Von den 2 ml dieser Lösung mit der Konzentration 218,5 µM wurden 297 µl für 50 µM, 129 µl für 25 µM, 48 µl für 10µM und 23 µl für 5 µM in die 1000 µl der Kulturen gegeben. Anschließend wurden 100 µl der Lösung nochmals mit 900 µl AB-Medium verdünnt, was einer Lösung mit einer Konzentration von 21,85 µM entspricht. Hiervon wurden 129 µl für 2,5 µM und 48 µl für 1 µM in die Kulturen pipettiert.

2.2.6 Zellseparation der PBMC und MLPC

Die, für die Experimente benötigten, $CD8^+$-T-Lymphozyten wurden mittels magnetic-activated cell sorting (MACS) extrahiert. Bei MACS handelt es sich um ein Verfahren, bei dem bestimmte Zellarten durch eine Magnetsäule separiert werden können. Die zu isolierenden Zellen werden mit monoklonalen, murinen Antikörpern (MicroBeads®) markiert, an denen Magnetpartikel gebunden sind. Für die beschriebenen Versuche wurden Antikörper verwendet, die spezifisch an humane $CD8^+$-T-Lymphozyten binden.
Nach Isolation der $CD8^+$-T-Lymphozyten wurden diese in einer mixed lymphocyte peptide culture (MLPC) kultiviert. Die exakte Durchführung einer MLPC wurde im Jahr 2000 publiziert [42].

Tag 0

Die mittels Zellisolation durch Ficoll gewonnenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und dreimal mit PBS-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 10 Minuten bei 1200 U/min). Vor der letzten Zentrifugation wurde von der Suspension aus Zellen und PBS-Puffer eine definierte Menge in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und so die Zellzahl bestimmt.

Pro 1 x 10^7 Zellen wurden nun 80 µl Separationspuffer und 20 µl MicroBeads® zugegeben und diese Lösung für 15 min im Kühlschrank bei 7°C inkubiert.
Währenddessen wurde die Separationssäule vorbereitet. Hierzu wurde diese an einen Magnetständer gesteckt und mit 500 µl Separationspuffer befeuchtet. Die Menge des durchgelaufenen Separationspuffers wurde verworfen.
Nach Ende der Inkubationszeit wurden 5 ml Separationspuffer zur Zelllösung gegeben und diese zentrifugiert (10 Minuten bei 1200 U/min). Das Zellpellet wurde danach in 500 µl Separationspuffer aufgenommen und auf die vorbereitete Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule noch dreimal mit je 500 µl Separationspuffer gewaschen. Nachdem nun die $CD8^-$-Zellfraktion aufgefangen war, musste die $CD8^+$-Fraktion aus der Säule gewaschen werden. Die Säule wurde dafür aus dem Magnetständer entfernt und nach Zugabe von 1000 µl Separationspuffer wurde die Suspension mit einem Stempel durch die Säule gedrückt.
Die so separierten Zellfraktionen wurden zweimal mit AB-Medium gewaschen und die jeweilige Zellzahl anschließend in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Je 2 x 10^6 Zellen wurden in 500 µl AB-Medium aufgenommen.
Die $CD8^-$-Zellfraktion wurde nun mit 30 Gy einer Cäsium-137-Quelle bestrahlt (Deutsches Rotes Kreuz Ulm, Abteilung Transfusionsmedizin), um zu verhindern, dass die mononukleären Zellen als Reaktion auf die T-Lymphozyten aktiviert werden und proliferieren. Gleichzeitig wurden die Zellen mit der Bestrahlung soweit zerstört, dass intrazelluläre Pfade nicht mehr existierten. Peptide können daher nicht mehr prozessiert werden, da der zur Präsentation von Antigenen TAP-abhängige Mechanismus nicht mehr funktionsfähig ist. Die MHC-Moleküle an der Zelloberfläche bleiben jedoch unangetastet, weshalb die Nonapeptide auch ohne Prozessierung den $CD8^+$-Zellen präsentiert werden können.
Nach der Bestrahlung erfolgte die Zugabe von 2,5 µg/ml β_2-Mikroglobulin und anschließend die Aufteilung in verschiedene Röhrchen. Auf jedes Röhrchen erfolgte nun die Zugabe von 20 µg/ml des jeweiligen zu testenden Peptides (CMV oder IMP) bzw. keine Zugabe als Leerkontrolle. Die Inkubation erfolgte für 1,5 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank.
Die $CD8^+$-Zellfraktion wurde auf 5 x 10^5 Zellen/ml mit AB-Medium eingestellt und anschließend je 500 µl pro Well auf eine 24er-Lochplatte gegeben.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die mit Peptid gepulsten $CD8^-$-Zellkulturen zentrifugiert und wieder mit 500 µl AB-Medium je 2 x 10^6 Zellen gelöst. Anschließend wurden die entsprechenden Zellfraktionen zu den bereits auf der Lochplatte befindlichen $CD8^-$-Zellfraktionen pipettiert.
Die Kulturen wurden mit der entsprechenden Konzentration an Azacytidin behandelt.
Die verbliebenden Löcher der Lochplatte wurden mit 1000 µl PBS-Puffer gefüllt, um eine Verdunstung der Zellsuspensionen zu minimieren. Es erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank über Nacht.

Tag 1

Die MLPC wurde mit IL-2 (2,5 ng/ml) und IL-7 (20 ng/ml) stimuliert und für weitere 7 Tage bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Tag 8

Die stimulierten Zellen wurden aus den Wells der Lochplatte resuspendiert und mit AB-Medium gewaschen. Anschließend wurden sie auf 1 x 10^4 Zellen/50 µl mit AB-Medium verdünnt und zur Auswertung mittels ELISPOT-Assay vorbereitet.

2.2.7 Nachweis spezifischer Immunreaktionen mittels ELISPOT-Assay

Der Nachweis spezifischer, T-Zell-vermittelter Immunreaktionen wurde mit Hilfe des ELISPOT-Assays (enzyme-linked immunospot) durchgeführt. Der Assay basiert auf dem sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) und ist ein sensitiver Test zur Analyse von Zellaktivitäten auf Ebene der einzelnen Zelle. Er weist sezernierte Signalmoleküle in direkter Umgebung der aktivierten T-Zelle nach. Im Falle der stimulierten $CD8^+$-T-Lymphozyten sind dies unter anderem die Moleküle Interferon-Gamma und Granzym B.
Daher wurden in der vorliegenden Arbeit ELISPOT-Assays für Interferon-γ und Granzym B durchgeführt. Bei diesen Assays wird der Boden einer Well-Platte mit spezifischen Antikörpern beschichtet, welche das sezernierte Molekül binden. Durch die Zugabe von Zweitantikörpern werden diese Moleküle dann nachweisbar. An der Stelle einer spezifischen Zelle entsteht dadurch ein sog. Spot. Die Gesamtzahl aller Spots in einem Well kann schließlich ausgezählt werden.

Interferon-γ ELISPOT-Assay

Tag 7

Beschichten der ELISPOT-Platte

Die Platten für den ELISPOT-Assay für Interferon-γ wurden zunächst mit einem monoklonalen Interferon-γ Antikörper (Coating antibody 1-D1K, Mabtech AB) beschichtet. Dazu wurde der Antikörper mit Coating Buffer auf eine Konzentration von 15 µg/ml verdünnt und von dieser Lösung dann 85 µl in jedes Well gegeben. Die ELISPOT-Platte wurde anschließend bei 4°C im Kühlraum bis zum Tag 8 gelagert.

Tag 8

Pulsen der T2-Zellen

Aus der T2-Zellkultur wurden 40 ml der Suspension entnommen und zentrifugiert (10 Minuten bei 1200 U/min, Raumtemperatur). Anschließend wurde das Zellpellet wieder in AB-Medium aufgenommen und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die T2-Zellen wurden daraufhin auf eine Konzentration von 4 x 10^5 pro 500 µl eingestellt und mit 2,5 µg/ml β_2-Mikroglobulin behandelt. Anschließend wurde der Ansatz auf verschiedene Falcon®s aufgeteilt, entsprechend der jeweiligen Azacytidinkonzentration mit und ohne immunogenes Peptid.

Das entsprechende Peptid (c = 20 µg/ml) wurde je Falcon® hinzugegeben und die Falcon®s zwei Stunden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert.

ELISPOT-Platte blocken

Die ELISPOT-Platten aus dem Kühlraum wurden zweimal mit PBS gewaschen (200 µl/Well). Anschließend wurde jedes Well mit 100 µl PBS + 10% AB-Serum befüllt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert.

Abschließend wurde die Platte sechsmal mit PBS gewaschen (200 µl/Well).

ELISPOT-Platte beladen

Die entsprechend gepulsten $CD8^+$-T-Lymphozyten aus der MLPC und T2-Zellen werden im Verhältnis 1:4 in Eppendorfröhrchen gemischt ($CD8^+$-T-Lymphozyten : T2-Zellen = 1 x 10^4 : 4 x 10^4). In die Wells der ELISPOT-Platte wurden 100 µl der

Suspension pipettiert. Zum Wärmeausgleich wurde der Boden der Platte mit Alufolie versehen und diese dann über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Tag 9

Vorbereitung zum Färben

Die ELISPOT-Platte wurde fünfmal mit PBS (200 µl/Well) gewaschen, anschließend weitere fünfmal mit PBS und 0,05% Tween-20 (200 µl/Well).

Um die sezernierten Interferon-γ Moleküle sichtbar zu machen wurde ein biotinylierter, monoklonaler Interferon-γ Antikörper verwendet. Pro Well wurden 100 µl dieses Antikörpers (Mabtech, 7-B6-1-biotin, Konzentration 1 µg/µl, Verdünnung mit PBS/Tween-20) pipettiert. Die Lösung inkubierte zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Nun wurde die ELISPOT-Platte sechsmal mit PBS und 0,05% Tween-20 (200 µl/Well) gewaschen. Des Weiteren wurde die Platte mit 100 µl einer Streptavidin-Peroxidase-Lösung (Streptavidin-Alkaline Phosphatase 1:1000 in PBS/Tween-20 verdünnt) bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit folgten weitere sechs Waschvorgänge mit PBS und 0,05% Tween-20 sowie zwei weitere mit Substrat-Puffer (jeweils 200 µl/Well).

Färbung

Zum Entwickeln der Spots musste eine Substrat-Lösung angesetzt werden:

Eine Tablette 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) wurde in 500 µl Dimethylformamid gelöst und eine Tablette Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) wurde in 1 ml Aqua destillata gelöst. Anschließend wurden beide Lösungen mit einem Filter der Porengröße 0,45 µm filtriert.

Das Substrat bestand nun aus 10 ml Substratpuffer, 330 µl NBT-Stock sowie 33 µl BCIP-Stock. Pro Well wurden nun 100 µl pipettiert. Durch die Streptavidin-Peroxidase und die Substrat-Lösung wurden nun die sezernierten Interferon-γ Moleküle als blauer Spot sichtbar.

Die Färbelösung wirkte über einen Zeitraum von 2-5 Minuten ein und wurde dann verworfen.

Abstoppen

Die ELISPOT-Platte wurde dreimal mit 200 µl/Well Aqua destillata gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Auswertung

Die Auswertung der Platten erfolgte mittels ELISPOT-Reader. Nach dem Einlegen der Platte wird diese per Motortisch zu einer Farbkamera mit Autofokus bewegt. Die Kamera erzeugt digitale Bilder jedes einzelnen Wells. Die Bilder wurden anschließend durch die dazugehörige Software ausgewertet und die Anzahl der Spots pro Well in einer Excel-Datei ausgegeben.

Granzym B-ELISPOT

Tag 7

Beschichten der ELISPOT-Platte

Die Platten für den Granzym-B ELISPOT-Assay wurden zunächst mit einem monoklonalen Granzym B-Antikörper (BD Biosciences capture antibody, Konzentration 1 mg/ml, Verdünnung 1:200 mit PBS-Puffer) beschichtet. Dafür wurden 100 µl des Antikörpers in jedes Well pipettiert. Anschließend wurde die Platte bei 4°C über Nacht im Kühlraum gelagert.

Tag 8

Pulsen der T2-Zellen

Die Durchführung ist identisch mit dem Vorgehen beim ELISPOT-Assay für Interferon-γ am Tag 8.

ELISPOT-Platte blocken

Die ELISPOT-Platten aus dem Kühlraum wurden einmal mit 200 µl/Well Blocklösung gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 200 µl Blocklösung pro Well geblockt und so zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

ELISPOT-Platte beladen

Die Durchführung ist identisch mit dem Vorgehen beim beim ELISPOT-Assay für Interferon-γ am Tag 8.

Tag 9

Vorbereitung zum Färben

Die Zellsuspension aus dem Brutschrank wurde dekantiert und die Platte zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen (Einwirkzeit 3 Minuten). Dann wurde dreimal mit PBS und 0,05% Tween-20 gewaschen (200 µl/Well).

Um das durch die $CD8^+$-T-Lymphozyten sezernierte Granzym B sichtbar zu machen, wurde ein monoklonaler Granzym B-Antikörper (BD Biosciences detection antibody, Konzentration 0,5 mg/ml, Verdünnung 1:250 mit PBS und 10% FCS) verwendet. Von diesem Antikörper wurden 100 µl/Well pipettiert und die Platte bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Lösung verworfen und die Wells dreimal mit 200 µl PBS/Tween-20 gewaschen. (Einwirkzeit: 2 min)

Nun wurde in jedes Well 100 µl einer Streptavidin-Peroxidase-Lösung (BD Biosciences Streptavidin-HRP, Verdünnung 1:100 mit PBS mit 10% FCS) pipettiert und die Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur gelagert.

Anschließend wurde die Lösung verworfen und die Platte viermal mit PBS/Tween-20 sowie zweimal mit PBS (jeweils 200 µl/Well) gewaschen.

Färbung

Zum Entwickeln der Färbung musste eine Substrat-Lösung angesetzt werden: 5 ml einer AEC-Substrat-Lösung (3-Amino-9-ethyl-carbazol, BD Biosciences) sowie 100 µl einer AEC-Chromogen-Lösung (BD Biosciences) wurden gemischt. Die Färbelösung wurde dann mit 100 µl pro Well zügig pipettiert. Nach 5-10 Minuten wurde die Lösung dekantiert.

Abstoppen

Die Platte wurde dreimal mit 200 µl Aqua destillata pro Well gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte analog dem Vorgehen beim ELISPOT-Assay für Interferon-γ am Tag 9.

2.2.7 Statistik

Die statistische Analyse der Daten erfolgte deskriptiv. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden arithmetische Mittelwerte und empirische Standardabweichungen berechnet. Die Signifikanztestung ($p < 0,05$; $p < 0,02$; $p < 0,01$) erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test für abhängige Stichproben. Für die Weiterverarbeitung der Daten wurde das Computerprogramm Microsoft® Excel 2007 verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1 HLA-Typisierung

In den Versuchen wurden Peptide (CMV- und IMP-Peptid) verwendet, die HLA-A2-restringiert sind und deshalb nur von HLA-A2-positiven Zellen präsentiert werden können. Die Präsentation der Peptide war aber für die Stimulation der $CD8^+$-T-Lymphozyten notwendig. Zellmaterial von HLA-A2-negativen Probanden, wie in Abb. 2 dargestellt, konnte daher nicht für die Experimente verwendet werden. Der HLA-Status der Leukozyten der Probanden wurde deshalb mittels FACS-Analyse überprüft.

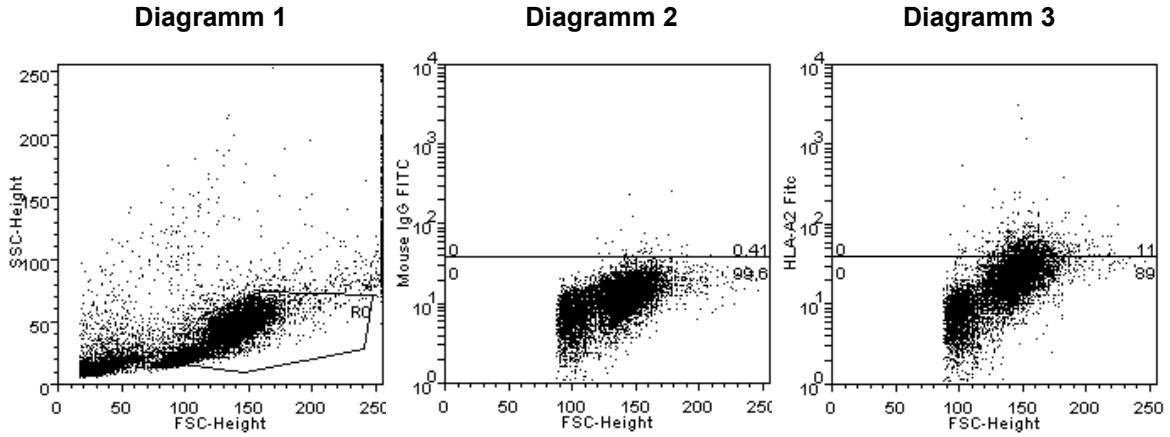


Abb. 2: **Dargestellt ist das Ergebnis eines Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS-Analyse) von Leukozyten (ohne Granulozyten) eines humanen Leukozytenantigen (HLA)-A2-negativen Probanden. In Diagramm 1 ist die Lymphozytenfraktion innerhalb des Gate. Außerhalb des Gate befinden sich die Monozyten und Detritus. In Diagramm 2 ist die Negativkontrolle, die mit murinem IgG-Antikörpern behandelt wurde, abgebildet. Die Zellen in Diagramm 3 sind mit HLA-A2-Antikörpern behandelt worden.**
In den Diagrammen 2 und 3 ist in der unteren Hälfte ein cut-off eingezeichnet. Zellen, die sich oberhalb dieses cut-offs befinden, werden als HLA-A2-positiv gewertet. Bei der, im Diagramm 2 abgebildeten Negativkontrolle sind die Zellen wegen fehlender Zugabe von HLA-A2-Antikörper unterhalb des cut-off. In Diagramm 3 befindet sich fast die gesamte Zellpopulation ebenfalls unterhalb des cut-offs, weil die Leukozyten des Probanden HLA-A2-negativ sind.

Abb. 3 zeigt den Befund eines HLA-A2-positiven Probanden. Zellmaterial, welches

diesen Befund zeigte konnte für die Experimente verwendet werden.

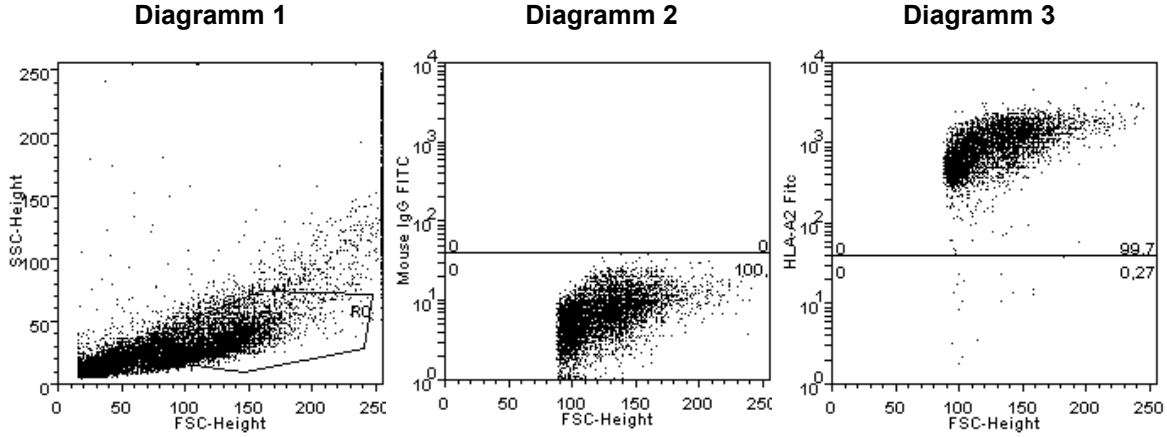


Abb. 3: **Dargestellt ist das Ergebnis eines Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS-Analyse) von Leukozyten (ohne Granulozy ten) eines humanen Leukozytenantigen (HLA)-A2-positiven Probanden. In Diagramm 1 ist die Lymphozytenfraktion innerhalb des Gate. Außerhalb des Gate befinden sich Monozyten und Detritus. In Diagramm 2 ist die Negativkontrolle, die mit murinem IgG-Antikörpern behandelt wurde abgebildet. In Diagramm 3 wurden die Zellen mit HLA-A2-Antikörpern behandelt.**

In den Diagrammen 2 und 3 ist in der unteren Hälfte ein cut-off eingezeichnet. Zellen, die sich oberhalb dieses cut-offs befinden, werden als HLA-A2-positiv gewertet. Bei der, im Diagramm 2 abgebildeten Negativkontrolle sind die Zellen wegen fehlender Zugabe von HLA-A2-Antikörper unterhalb des cut-off. In Diagramm 3 befindet sich die gesamte Zellpopulation hingegen oberhalb des cut-offs, weil die Zellen des Probanden HLA-A2-Antikörper gebunden haben und somit als HLA-A2-positiv detektiert worden sind.

3.2 Nachweis der Immunogenität der verwendeten Peptide

Neben einem positiven HLA-A2-Status war eine weitere Voraussetzung für die Versuche mit Azacytidin der Nachweis, dass die verwendeten Peptide für die $CD8^+$-T-Lymphozyten der Probanden immunogen sind.

In Abb. 4 ist auf der linken Seite ein Versuch dargestellt, bei dem keine spezifischen Immunreaktionen hervorgerufen werden konnten. Die rechte Seite in Abb. 4 zeigt hingegen spezifische Immunreaktionen, da hier das verwendete Peptid immunogen für die $CD8^+$-T-Lymphozyten des Probanden war.

Ein Vergleich von Negativkontrollen ohne Peptid mit Zellkulturen, die mit Peptid inkubiert wurden, zeigte, dass die T-Lymphozyten aller 13 Probanden mit einer

ausreichenden Immunantwort auf die Peptide reagiert haben. Diese T-Lymphozyten konnten deshalb für die Versuche mit Azacytidin verwendet werden.

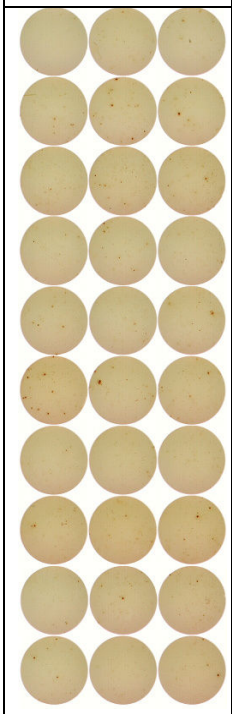
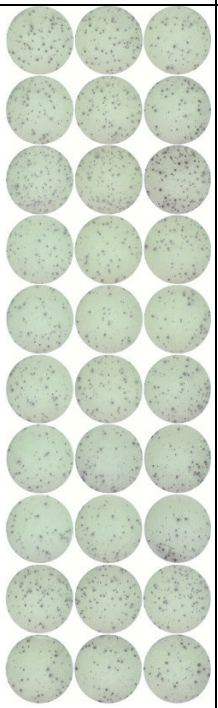
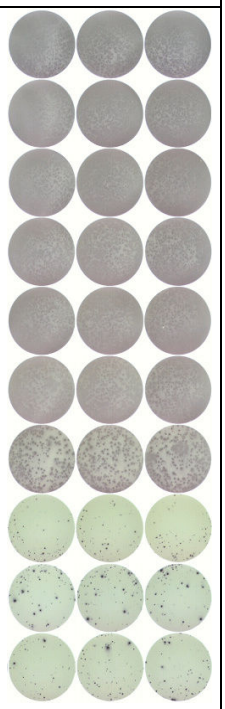
HV 406, ELISPOT-Assay für Granzym B	HV 406, ELISPOT-Assay für Interferon-γ	Azacytidin-konzentration	HV 369, ELISPOT-Assay für Granzym B	HV 369, ELISPOT-Assay für Interferon-γ
		0 µM mit Peptid 1 µM mit Peptid 2,5 µM mit Peptid 5 µM mit Peptid 10 µM mit Peptid 25 µM mit Peptid 50 µM mit Peptid 0 µM ohne Peptid 2,5 µM ohne Peptid 25 µM ohne Peptid		

Abb. 4: **Darstellung der enzyme-linked Immunospot (ELISPOT)-Assays für Granzym B und Interferon-γ von healthy volunteer (HV) 406 (linke Seite) und HV 369 (rechte Seite). Die Lymphozyten der Probanden wurden, bis auf die unteren drei Negativkontrollen, mit Peptid stimuliert. Zusätzlich wurden die Kulturen auf die aufgeführten Azacytidinkonzentrationen eingestellt.**
In den ELISPOT-Assays auf der linken Seite sind kaum Spots vorhanden. Folglich ist es nur zu einer geringen Sekretion von Granzym B und Interferon-γ gekommen. Das verwendete Peptid ist nicht immunogen für HV 406 gewesen und konnte deshalb keine Immunreaktion auslösen, die stärker ausfällt, als die in den Negativkontrollen. In den Assays auf der rechten Seite war das Peptid für HV 369 immunogen. Hier kommt es im Vergleich zu den Negativkontrollen bei allen Azacytidinkonzentrationen mit Peptid zu höheren Anzahlen an Spots, was einer erhöhten Anzahl an sekretorisch aktiven $CD8^+$-T-Lymphozyten entspricht.

3.3 Resultate der ELISPOT-Assays für Granzym B und Interferon-γ

Die HLA-A2-positiven $CD8^+$-T-Lymphozyten wurden an Tag 0 mit immunogenem

Peptid und Azacytidin inkubiert. 8 Tage nach Inkubation der Zellkulturen mit Peptid und den verschiedenen Azacytidinkonzentrationen wurden ELISPOT-Assays für Granzym B und Interferon-γ angelegt. Die ELISPOT-Assays wurden anschließend mit Hilfe eines ELISPOT-Readers ausgewertet. Dieser zählte die Spots in den Wells der ELISPOT-Platten. Jeder Spot bildet einen einzelnen, sekretorisch aktiven $CD8^+$-T-Lymphozyt ab. Auf diese Weise konnten die Induktion, Intensität und Frequenz spezifischer Immunreaktionen quantifiziert werden.

Als Material für die Versuche dienten Zellproben von 13 gesunden Probanden. 13 Proben wurden mit ELISPOT-Assays für Granzym B untersucht, wovon 6 mit CMV-Peptid und 7 mit IMP-Peptid gepulst wurden. 9 Proben wurden mit ELISPOT-Assays für Interferon-γ untersucht, wovon 4 mit CMV-Peptid und 5 mit IMP-Peptid gepulst wurden. 4 ELISPOT-Assays für Interferon-γ konnten wegen Qualitätsmängeln (z. B. Überfärbung) der Assays nicht zur Auswertung herangezogen werden. Eine erneute Durchführung der mangelhaften Versuche war aufgrund der begrenzten Menge an Zellmaterial nicht möglich.

In Tab. 3 ist die durchschnittliche Anzahl der Spots für das jeweilige Peptid und die der korrespondierenden Negativkontrolle ohne Peptid in den ELISPOT-Assays für Granzym B und Interferon-γ angegeben. Im Granzym B ELISPOT-Assay wurde im Vergleich zur Negativkontrolle die Anzahl der Spots durch das CMV-Peptid ca. 126-fach signifikant erhöht ($p < 0,05$) und durch das IMP-Peptid ca. 27-fach erhöht. Im ELISPOT-Assay für Interferon-γ wurde die Anzahl der Spots durch das CMV-Peptid ca. 8-fach erhöht und durch das IMP-Peptid ungefähr verdoppelt, beides jeweils signifikant ($p < 0,01$).

Tab. 3: Die $CD8^+$-T-Lymphozyten wurden mit dem Aminosäurenonamer des Zytomegalievirus-Protein pp65 an Position 495-503 (CMV-Peptid) und mit dem Aminosäurenonamer des Influenza-A Matrixprotein an Position 58-66 (IMP-Peptid) stimuliert. Zusätzlich wurden jeweils Negativkontrollen ohne Peptidzugabe angelegt. Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl der Spots aus den 13 enzyme-linked Immunospot (ELISPOT)-Assays für Granzym B und den 9 ELISPOT-Assays für Interferon-γ.

	Anzahl der Spots ohne CMV-Peptid	Anzahl der Spots mit CMV-Peptid	Anzahl der Spots ohne IMP-Peptid	Anzahl der Spots mit IMP-Peptid
Granzym B	3,2	398,9	8,1	216,2
Interferon-γ	45,9	384,2	124,3	294,1

Bei Versuchen, in denen zusätzlich Azacytidin eingesetzt wurde, konnte in den ELISPOT-Assays für Granzym B bei einer Azacytidinkonzentration von 25 µM (Abb. 5) die höchste Anzahl an Spots bei mit Peptid inkubierten Zellkulturen erzielt werden. Bei 2,5 µM ist ebenfalls eine höhere Anzahl an Spots zu verzeichnen, als bei 0 µM. Beide Erhöhungen sind allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$). Bei allen anderen Azacytidinkonzentrationen liegt die Anzahl der Spots unter der bei 0 µM registrierten, was aber ebenfalls nicht signifikant ist ($p > 0,05$).

Bei Kulturen, die nicht mit Peptid gepulst wurden (Negativkontrolle für die Azacytidinkonzentrationen 0 µM, 2,5 µM und 25 µM), konnten erwartungsgemäß nur wenige Spots gezählt werden, da die Stimulation für die $CD8^+$-T-Lymphozyten fehlte. Es zeigte sich hierbei um eine jeweils signifikant geringere Anzahl an Spots ($p < 0,01$).

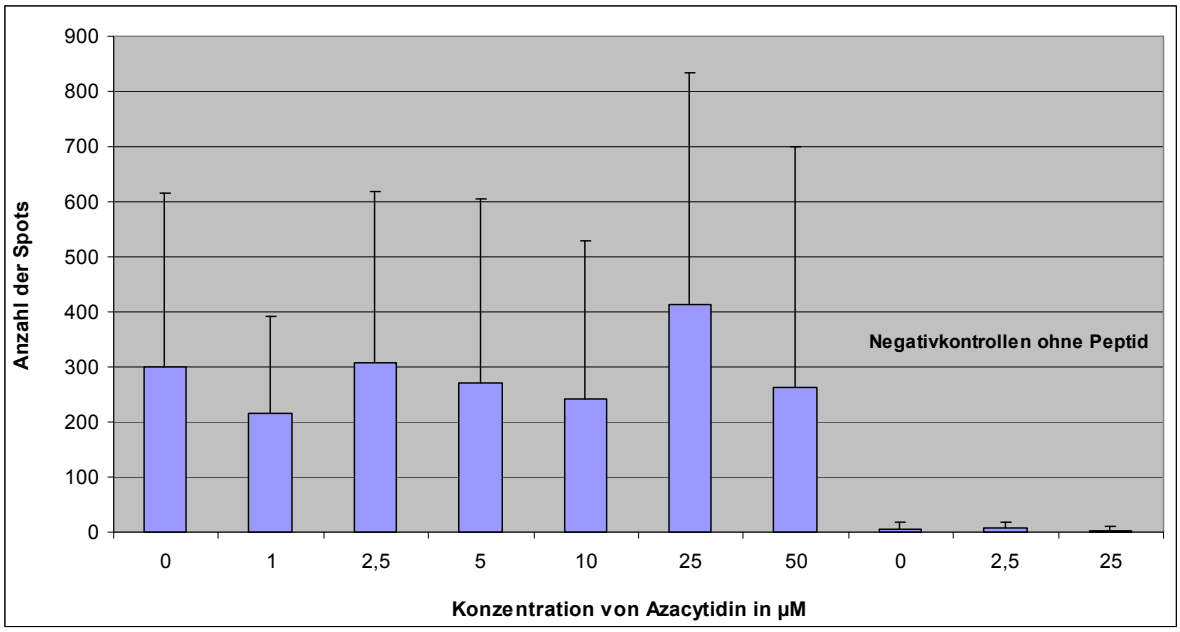


Abb. 5: **Es wurden T-Lymphozytenkulturen von 13 gesunden Probanden angelegt. An Tag 0 und 8 wurden diese, mit Ausnahme der drei Negativkontrollen (rechts), entweder mit dem Aminosäurenonamer des Zytomegalievirus-Protein pp65 an Position 495-503 (CMV-Peptid) oder mit dem Aminosäurenonamer des Influenza-A Matrixprotein an Position 58-66 (IMP-Peptid) stimuliert. Zusätzlich wurden die Kulturen an Tag 0 mit verschiedenen Azacytidinkonzentrationen (Abszisse) behandelt. An Tag 8 wurden die Immunreaktionen mit enzyme-linked Immunospot (ELISPOT)-Assays für Granzym B durch die Anzahl der hervorgerufenen Spots (Ordinate) quantifiziert. Aus den Daten der Assays wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, welche oben abgebildet sind.**

Die ELISPOT-Assays für Interferon-γ (Abb. 6) zeigen ein anderes Ergebnis, als die für Granzym B. Bei Kulturen, die mit immunogenem Peptid gepulst wurden, lagen die höchsten Anzahlen an Spots bei Azacytidinkonzentrationen von 1 µM und 2,5 µM. Ab einer Konzentration von 5 µM ist die Anzahl der Spots niedriger als bei 0 µM. Bei 50 µM ist sie sogar signifikant niedriger als bei der Kultur ohne Azacytidin ($p < 0,02$). Bei Kulturen, die nicht mit Peptid stimuliert wurden, konnten im Vergleich zu den ELISPOT-Assays für Granzym B relativ viele Spots gezählt werden. Für die drei Azacytidinkonzentrationen von 0 µM, 2,5 µM und 25 µM liegt die Anzahl der Spots, aber immer noch signifikant niedriger als in den korrespondierenden, mit Peptid behandelten Kulturen ($p < 0,01$).

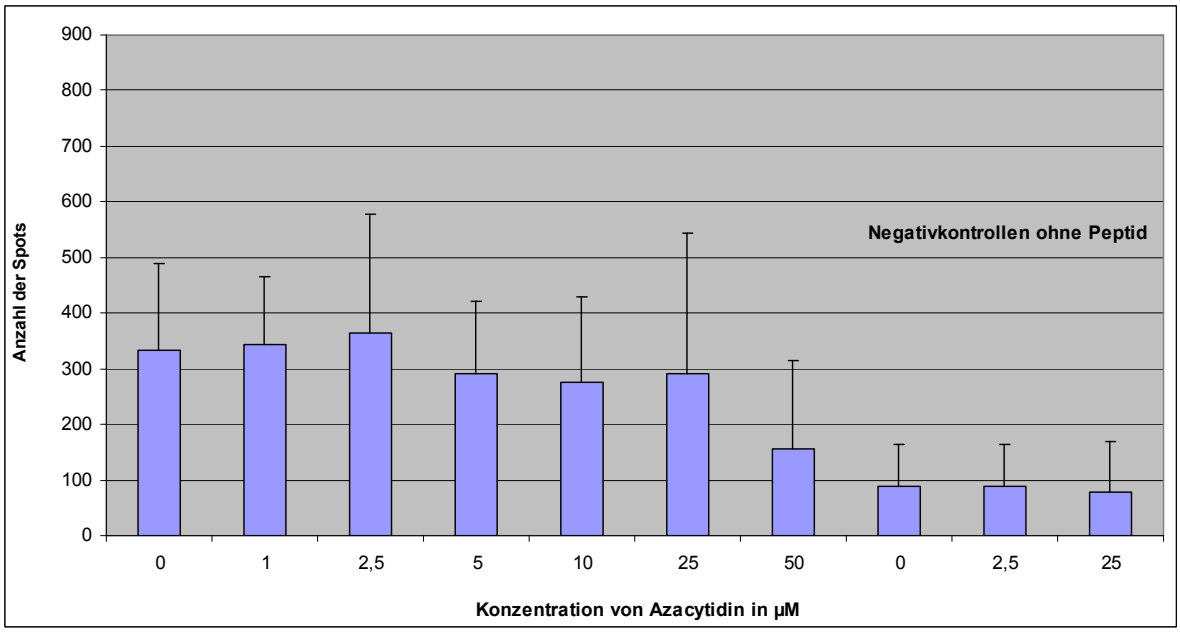


Abb. 6: **Es wurden T-Lymphozytenkulturen von 9 gesunden Probanden angelegt. An Tag 0 und 8 wurden diese, mit Ausnahme der drei Negativkontrollen (rechts), entweder mit dem Aminosäurenonamer des Zytomegalievirus-Protein pp65 an Position 495-503 (CMV-Peptid) oder mit dem Aminosäurenonamer des Influenza-A Matrixprotein an Position 58-66 (IMP-Peptid) stimuliert. Zusätzlich wurden die Kulturen an Tag 0 mit verschiedenen Azacytidinkonzentrationen (Abszisse) behandelt. An Tag 8 wurden die Immunreaktionen mit enzyme-linked Immunospot (ELISPOT)-Assays für Interferon-γ durch die Anzahl der hervorgerufenen Spots (Ordinate) quantifiziert. Aus den Daten der Assays wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, welche oben abgebildet sind.**

Die Ergebnisse der beiden ELISPOT-Assays für Granzym B und Interferon-γ (Abb. 5 und 6) konnten im Durchschnitt also bei keiner Azacytidinkonzentration von 1 - 50 µM eine signifikante Erhöhung der Anzahl an Spots gegenüber der Kontrolle ohne Azacytidin zeigen.

Die relativ hohen Standardabweichungen belegen jedoch, dass die Streuung um die Mittelwerte sehr hoch ist. Betrachtet man die Ergebnisse der Versuche getrennt voneinander und bewertet jeden Versuch einzeln, lassen sich diese immensen Streuungen nachvollziehen.

Für 9 Probanden konnten beide ELISPOT-Assays (Granzym B und Interferon-γ) der Zellkulturen zur Auswertung herangezogen werden. In 7 dieser 9 Kulturen lag die höchste Anzahl an Spots bei einer Azacytidinkonzentration von 1 - 50 µM (Tab. 4). Tab. 4 zeigt außerdem, dass jede der verwendeten Azacytidinkonzentra-

tionen bei den $CD8^+$-T-Lymphozyten von mindestens einem Probanden eine höhere Anzahl an Spots hervorrufen konnte als in der Kultur ohne Azacytidin. Exemplarisch sind in Abb. 7 die ELISPOT-Assays der Zellkulturen von zwei Probanden gegenübergestellt, die auf die getesteten Azacytidinkonzentrationen unterschiedlich reagiert haben.

Tab. 4: **Es wurden Lymphozyten-Zellkulturen von 13 gesunden Probanden angelegt. An Tag 0 und 8 wurden diese entweder mit dem Aminosäurenonamer des Zytomegalievirus-Protein pp65 an Position 495-503 (CMV-Peptid) oder mit dem Aminosäurenonamer des Influenza-A Matrixprotein an Position 58-66 (IMP-Peptid) stimuliert. Zusätzlich wurden die Kulturen an Tag 0 mit verschiedenen Azacytidinkonzentrationen (oberste Zeile) behandelt. An Tag 8 wurden die Immunreaktionen mit enzyme-linked Immunospot (ELISPOT)-Assays für Granzym B und Interferon-γ durch die Anzahl der hervorgerufenen Spots quantifiziert. Angegeben ist, bei wie vielen Probanden in den ELISPOT-Assays die jeweilige Azacytidinkonzentration die höchste Anzahl an Spots hervorrufen konnte.**

Azacytidinkonzentration in µM	0	1	2,5	5	10	25	50
absolute Häufigkeit der höchsten Immunantwort							
• bei Granzym B ELISPOT-Assays	2	3	1	1	1	3	2
• bei Interferon-γ ELISPOT-Assays	2	3	0	0	1	3	0

Es zeigt sich darüber hinaus, dass es bei der Immunreaktion der stimulierten $CD8^+$-T-Lymphozyten ein bestimmtes Muster zu erkennen ist. Bei 6 von 9 Proben ist die Tendenz zu beobachten, dass mit steigender Azacytidinkonzentration die Anzahl der Spots steigt, bis bei einer bestimmten Konzentration das jeweilige Maximum erreicht ist und die Anzahl der Spots nach dem Maximum mit steigender Konzentration wieder fällt (z. B. HV 784 in Abb. 7). Liegt das Maximum bei einer Azacytidinkonzentration von 0 µM, wie bei 2 von 9 Proben, ist nur das Sinken der Anzahl an Spots mit steigender Konzentration zu beobachten (z. B. HV 532 in Abb. 7). Lediglich bei einer Probe lässt sich kein Muster erkennen und die Anzahl der Spots ist ohne einen erkennbaren konzentrationsabhängigen Verlauf.

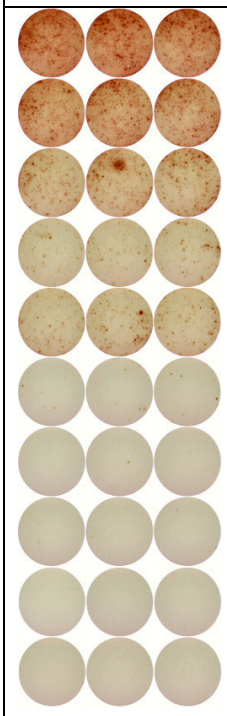
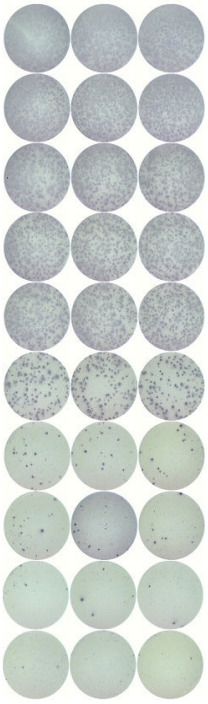
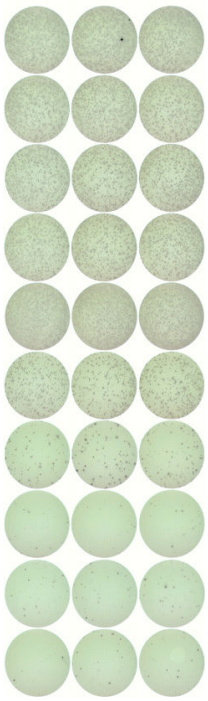
HV 532, ELISPOT-Assay für Granzym B	HV 532, ELISPOT-Assay für Interferon-γ	Azacytidin-konzentration	HV 784, ELISPOT-Assay für Granzym B	HV 784, ELISPOT-Assay für Interferon-γ
		0 µM mit Peptid 1 µM mit Peptid 2,5 µM mit Peptid 5 µM mit Peptid 10 µM mit Peptid 25 µM mit Peptid 50 µM mit Peptid 0 µM ohne Peptid 2,5 µM ohne Peptid 25 µM ohne Peptid		

Abb. 7: **Darstellung der enzyme-linked Immunospot (ELISPOT)-Assays für Granzym B und Interferon-γ von healthy volunteer (HV) 532 (linke Seite) und HV 784 (rechte Seite). Die $CD8^+$-T-Lymphozyten der Probanden wurden, bis auf die unteren drei Negativkontrollen, mit immunogenem Peptid stimuliert. Zusätzlich wurden die Kulturen auf die aufgeführten Azacytidinkonzentrationen eingestellt.**
In den Assays von HV 532 ist die höchste Anzahl an Spots in der Kultur ohne Azacytidin zu sehen. Diese nimmt dann mit steigender Azacytidinkonzentration ab. Die drei Negativkontrollen ohne Peptidstimulation zeigen kaum Spots. In den Assays von HV 784 ist die höchste Anzahl an Spots hingegen bei einer Konzentration von 10 µM zu beobachten. Die Negativkontrollen zeigen ebenfalls kaum Immunreaktionen an.

Für 4 Zellkulturen konnten nur die ELISPOT-Assays für Granzym B ausgewertet werden. Hier zeigte sich bei einer Kultur das Muster mit Anstieg vor und Abfall nach der maximalen Anzahl an Spots bei 2,5 µM. Ein weiterer Assay zeigt nur einen Anstieg bis zur höchsten verwendeten Azacytidinkonzentration von 50 µM. Zwei Assays ließen keinen kontinuierlichen Anstieg oder Abfall der Anzahl an Spots erkennen.

Insgesamt konnte also in den ELISPOT-Assays bei 8 von 13 Probanden eine Erhöhung der Anzahl an Spots bei einer Azacytidinkonzentration zwischen 1 µM und

50 µM festgestellt werden. Die Assays von 7 der 13 Probanden zeigen dabei ein Muster mit Anstieg der Anzahl der Spots bis zum Maximum und anschließendem Abfall. Hinzu kommt noch ein Assay, bei dem der weitere Verlauf der Anzahl an Spots nicht nachvollzogen werden kann, da die maximale Anzahl bei 50 µM auftrat, welches die höchste der verwendeten Konzentrationen ist.

3.4 Anzahl der T-Lymphozyten 8 Tage nach Zugabe von Azacytidin

An Tag 0 wurden die T-Lymphozyten mit immunogenem Peptid und Azacytidin versetzt. Die jeweilige Azacytidinkonzentration von 0 - 50 µM wurde dafür in den entsprechenden Zellkulturen eingestellt. Bei der Zugabe von Azacytidin waren 5 x 10^5 $CD8^+$- und 2 x 10^6 $CD8^-$-T-Lymphozyten in Suspension. Nach 8 Tagen wurden die T-Lymphozyten in den Kulturen dann ausgezählt. Die erhobenen Daten wurden ausgewertet und grafisch dargestellt (Abb. 8).

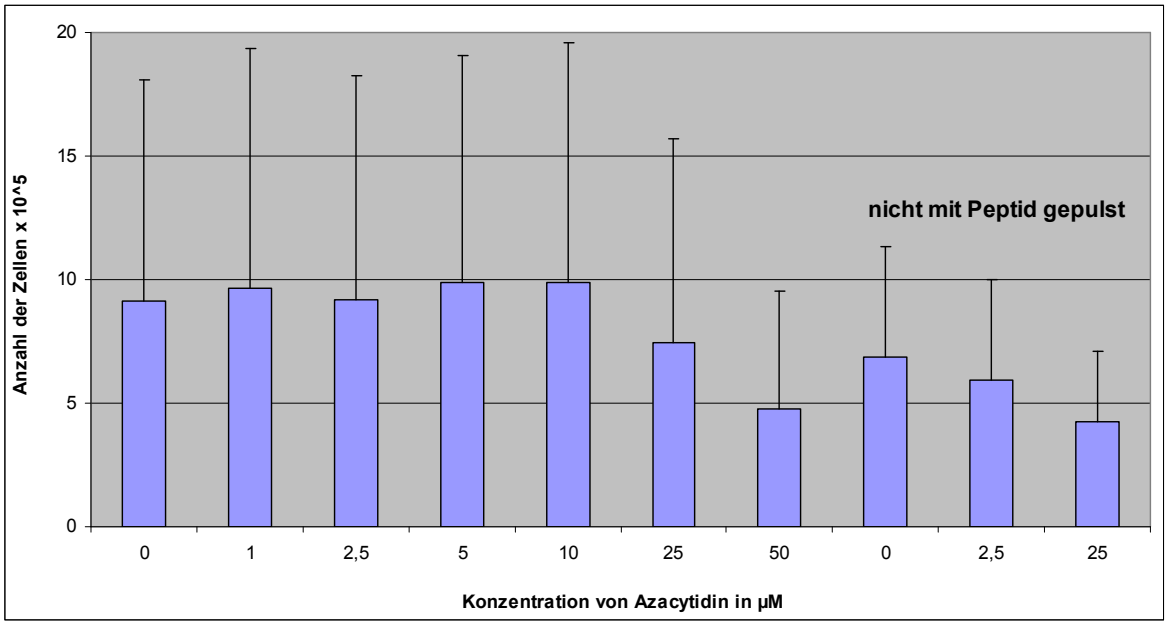


Abb. 8: **5 x 10^5 $CD8^+$- und 2 x 10^6 $CD8^-$-T-Lymphozyten, die von 13 gesunden Probanden stammten, wurden mit Azacytidinkonzentration von 0 - 50 µM (Abszisse) behandelt. 1,5 Stunden zuvor wurden alle Zellkulturen, bis auf die drei am rechten Bildrand, mit immunogenen Peptiden versetzt. 8 Tage nach Zugabe von Azacytidin wurden die T-Lymphozyten ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (Ordinate), die aus den Daten der Auszählung berechnet wurden.**

Die absolute Anzahl der T-Lymphozyten bewegt sich im Bereich von 4,4 x 10^4 –

3,02 x 10^6 Zellen. Die höchsten Zellzahlen befinden sich bei Azacytidinkonzentrationen von 0 – 10 µM auf einem Plateau und unterscheiden sich kaum. Ab einer Azacytidinkonzentration von 25 µM fällt die Anzahl der T-Lymphozyten um ca. 18% gegenüber der mit Peptid stimulierten Positivkontrolle ohne Azacytidin. Bei 50 µM ist sie gegenüber der Kultur ohne Azacytidin um ca. 48% signifikant gefallen ($p < 0,02$) und damit noch etwa halb so groß wie bei den Azacytidinkonzentrationen von 0 – 10 µM. Auffällig ist, dass es einen Einfluss auf die Anzahl der vitalen T-Lymphozyten zu haben scheint, ob die Kulturen mit immunogenen Peptiden stimuliert wurden. Die Anzahl der vitalen Zellen liegt bei mit Peptiden behandelten Kulturen höher als bei Kulturen mit derselben Azacytidinkonzentration, die nicht mit Peptid behandelt wurden. Diese Unterschiede sind allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$).

4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Effekts von Azacytidin auf $CD8^+$-T-Lymphozyten, die mit immunogenen Peptiden stimuliert wurden. Hierfür wurden Zellen von gesunden Probanden untersucht und die Immunreaktionen mithilfe von ELISPOT-Assays für Granzym B und Interferon-γ quantifiziert. Granzym B und Interferon-γ sind wichtige Marker für antivirale und antitumorale Immunreaktionen. Beide können entweder im Zusammenspiel oder einzeln Infektionserreger bekämpfen und das Wachstum von Tumoren unterdrücken [10,46]. Die beiden Moleküle werden von aktivierten T-Lymphozyten sezerniert.
Die Lyse von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen erfolgt vornehmlich durch Granzym B [47,87], welches in den Granula von $CD8^+$-T-Lymphozyten und NK-Zellen gespeichert ist [43,55,72]. Interferon hingegen verstärkt die Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-II-Moleküle und aktiviert dadurch $CD4^+$-T-Lymphozyten. Dies führt zu einer gerichteten zytotoxischen Immunreaktion [12]. Interferon-γ wird ebenfalls von $CD8^+$-T-Lymphozyten und NK-Zellen sezerniert. Die Anzahl der Spots in den ELISPOT-Assays spiegelt somit das Ausmaß spezifischer Immunreaktionen in Form von sekretorisch aktiven $CD8^+$-T-Lymphozyten wider.

4.1 Einfluss von Azacytidin auf stimulierte $CD8^+$-T-Lymphozyten

In der klinischen Praxis wird Azacytidin bei der Behandlung von intermediate-2 und high-risk MDS eingesetzt. Im gebräuchlichen Verabreichungsschema werden täglich 75 mg/m² Azacytidin über sieben Tage subkutan appliziert. [26,84] Die maximale Plasmakonzentration von Azacytidin beträgt, 30 Minuten nach subkutaner Injektion von 75 mg/m², ca. 3 µM [58]. Hauptverantwortlich für die Wirksamkeit von Azacytidin ist die Induktion von Apoptose und Demethylierung der DNA [94]. Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist die Verstärkung der Immunreaktion auf immunogene Antigene durch Azacytidin. Bei der Untersuchung dieses Mechanismus in vitro wurden 6 verschiedene Azacytidinkonzentration von 1 – 50 µM verwendet. Dabei war die Konzentration von 2,5 µM diejenige, welche der maximalen Plasmakonzentration von 3 µM nach applizierter Standarddosis am nächsten lag [58]. Da Azacytidin, laut Li-

teratur, in vitro erst ab einer Konzentration von 0,5 µM einen Einfluss auf Apoptose und DNA-Methylierung zeigte [47], bestand keine Notwendigkeit in den Versuchen diesen Wert zu unterschreiten. Aus diesem Grund wurde die niedrigste Konzentration mit 1 µM gewählt. Neben dem untersuchten Wirkmechanismus ist die Zytotoxizität von Azacytidin, welche bei höheren Konzentrationen zunimmt, relevant. Von besonderem Interesse war im Experiment der Punkt, an dem sich diese zytotoxische Wirkung in einer Verringerung der spezifischen Immunreaktion niederschlägt. Die höchste Konzentration wurde deshalb mit 50 µM ca. 17-fach höher gewählt als die höchste Plasmakonzentration nach subkutaner Applikation von 75 mg/m² Azacytidin.

Aus den ELISPOT-Assays für Granzym B und Interferon-γ wurde die Anzahl der Spots ermittelt und aus diesen Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen berechnet. Sie sind im Ergebnisteil graphisch dargestellt (Abb. 5 und 6).

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass Azacytidin allein keine Verstärkung der Immunreaktion durch $CD8^+$-T-Lymphozyten generieren kann. Dies ergibt sich aus den Ergebnissen der Negativkontrollen ohne immunogenes Peptid für die Azacytidinkonzentrationen von 0 µM, 2,5 µM und 25 µM in beiden ELISPOT-Assays. Im Vergleich mit den korrespondierenden Kulturen, die mit CMV- oder IMP-Peptid stimuliert wurden, ist die Anzahl der Spots in den Negativkontrollen signifikant niedriger ($p < 0,01$). Die folgenden Abschnitte der Diskussion werden sich daher ausschließlich mit Ergebnissen der ELISPOT-Assays von Zellkulturen befassen, die mit CMV- oder IMP-Peptid stimuliert wurden.

Die ELISPOT-Assays für Granzym B zeigten im Durchschnitt keine signifikante Steigerung der Immunreaktion durch $CD8^+$-T-Lymphozyten gegenüber der Positivkontrolle ($p > 0,05$). Die Anzahl der Spots stieg zwar im Vergleich zur Positivkontrolle ohne Azacytidin bei einer Azacytidinkonzentration von 25 µM um ca. 27% und bei 2,5 µM um ca. 2%, sank jedoch bei den anderen getesteten Azacytidinkonzentrationen. Im ELISPOT-Assay für Interferon-γ konnte die Anzahl der Spots bei 2,5 µM im Durchschnitt um ca. 8% und bei 1 µM um ca. 2% gesteigert werden. Diese Steigerungen waren aber ebenfalls nicht signifikant ($p > 0,05$). Bei den anderen Azacytidinkonzentrationen sank die Anzahl der Spots. Bei 50 µM war diese Senkung signifikant ($p < 0,02$), was als Ausdruck des zytotoxischen Effektes von Azacytidin gewertet werden kann. Eine signifikante Senkung lässt sich jedoch bei den ELISPOT-Assays für Granzym B nicht beobachten.

Für die ermittelten Durchschnittswerte wurde die absolute Anzahl an Spots der jeweiligen Probanden als Berechnungsgrundlage genutzt. Es ist aber davon auszugehen, dass diese Durchschnittswerte das biologische Verhalten nicht exakt abbilden können, da die Vergleichbarkeit der Probanden untereinander problematisch ist. Ein Grund hierfür ist, dass die Probanden in den ELISPOT-Assays ein unterschiedliches Niveau der Anzahl an Spots zeigten. Bei einigen Probanden findet sich auch in den Negativkontrollen per se eine hohe Anzahl an Spots. Dies spricht für eine hohe spontane, unspezifische Aktivität der $CD8^+$-T-Lymphozyten. In Versuchen mit anderen Probanden ist dieses Phänomen hingegen nicht zu beobachten. Ursächlich hierfür können genetische Faktoren sein, aber auch Umwelteinflüsse (z. B. kürzlich zurückliegende Infektionen), die auf die Probanden vor der Entnahme der Zellen eingewirkt haben. Ein weiterer Grund ist, dass die Experimente zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfanden. Hierdurch kann es zu Unterschieden bei den Experimentierbedingungen gekommen sein, obwohl diese durch die genauen Experimentiervorschriften minimiert worden sind. Die errechneten Durchschnittswerte nivellieren daher die zum Teil erheblichen Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden in der Reaktion der $CD8^+$-T-Lymphozyten auf immunogene Peptide. In den folgenden Abschnitten werden die Versuche deshalb unabhängig voneinander betrachtet.

6 von 9 untersuchten Probanden weisen im Vergleich zur Negativkontrolle in den ELISPOT-Assays für Granzym B und Interferon-γ eine höhere Anzahl an Spots in einer mit Azacytidin behandelten Zellkultur auf (Tab. 4). Zusätzlich zur höheren Immunantwort lässt sich bei diesen ELISPOT-Assays eine konzentrationsabhängige Entwicklung der Anzahl an Spots mit kontinuierlichem Anstieg zum Maximum und darauf folgendem Abfall beobachten. Der Anstieg zu einem Maximum und der anschließende Abfall zeigen, dass es sich nicht um eine zufällige, punktuelle Erhöhung der Anzahl der Spots bei einer willkürlichen Azacytidinkonzentration handelt. Lediglich bei einem Probanden ließ sich in den ELISPOT-Assays kein derartiges Muster erkennen, weshalb dieses Ergebnis als zufällige Konstellation interpretiert werden muss.

Konnten für eine Zellkultur beide ELISPOT-Assays (Granzym B und Interferon-γ) ausgewertet werden, so zeigten beide dieselben konzentrationsabhängigen Relationen. Dies spricht für eine gute Kontrolle von unspezifischen Einflussfaktoren bzw. Störfaktoren und rechtfertigt die Berücksichtigung von Versuchen in der

Auswertung, bei denen nur der ELISPOT-Assay für Granzym B ein verwertbares Ergebnis geliefert hat.

Insgesamt kam es in Zellkulturen, die mit dem ELISPOT-Assay für Granzym B ausgewertet wurden bei 8 von 13 Probanden zu einer verstärkten Immunreaktion durch eine Azacytidinkonzentration von 1 – 50 µM. Ebenfalls mit einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Anzahl an Spots zum Maximum und anschließendem Abfall. Somit hat Azacytidin immerhin bei über der Hälfte der Probanden einen verstärkenden Einfluss auf die Immunreaktion von stimulierten $CD8^+$-T-Lymphozyten gezeigt. Es hat sich jedoch keine Azacytidinkonzentration ergeben, bei welcher diese Verstärkung häufig eintritt. Jede Azacytidinkonzentration führte bei mindestens einem Probanden zur höchsten Immunreaktion (Tab. 4). Diese Beobachtung spricht dafür, dass das konzentrationsabhängige Ansprechen auf Azacytidin individuell sehr verschieden ist.

Die klinischen Ansprechraten in Form einer Verbesserung des hämatologischen Status, einer partiellen oder kompletten Remission liegen unter Therapie mit Azacytidin bei ca. 60% [84]. Das heißt, dass auch in vivo die Reaktion auf Azacytidin individuell sehr verschieden ist. Diese Tatsache würde die o. g. Beobachtungen aus den Versuchen unterstützen, wobei auch in der klinischen Praxis unklar ist, worin die Ursachen für das unterschiedliche Ansprechen auf Azacytidin liegen. Möglicherweise korreliert das Ergebnis des ELISPOT-Assays mit dem klinischen Ansprechen. Dies ist ein interessanter Ansatz, der vielleicht genutzt werden könnte, um vorherzusagen, welche MDS-Patienten von einer Therapie mit Azacytidin profitieren.

Bei jeder der verwendeten Azacytidinkonzentrationen (1 - 50 µM) zeigten die $CD8^+$-T-Lymphozyten von mindestens einem Probanden eine verstärkte Immunreaktion (Tab. 4). Klinische Studien, die die Wirksamkeit von Azacytidin gezeigt haben, gebrauchen Azacytidin in subkutaner Applikation von 75 mg/m², was einer Plasmakonzentration von 3 µM entspricht [26,58,83,84]. Aus diesem Grund könnten die experimentell gezeigten Effekte auf $CD8^+$-T-Lymphozyten in der Praxis wegen relevanter Nebenwirkungen nicht erzielbar sein, da sie zum Teil bei höheren Plasmakonzentrationen als 3 µM erzielt werden. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Haupteffekte von Azacytidin auf einer Induktion von Apoptose und Demethylierung der DNA beruhen. Daher ist es möglich, dass die Auswirkungen einer verstärkten Immunreaktion auf immunogene Peptide (z. B. tumor-assoziierte

Antigene) sich klinisch nicht bemerkbar machen. Hinzu kommt, dass die Experimente der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu klinischen Studien in vitro durchgeführt wurden.

Eine weitere Einschränkung besteht hinsichtlich der Applikation von Azacytidin. Bei MDS-Patienten wird Azacytidin nach einem festen Schema verabreicht, die Gabe von 75 mg/m² erfolgt täglich über sieben Tage mit anschließender Pause von 21 Tagen. Dieser Zyklus kann vier- bis sechsmal wiederholt werden [26,84]. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde Azacytidin jedoch nur einmalig in die Zellkulturen gegeben. Daher ist nicht auszuschließen, dass eine mehrmalige Gabe von Azacytidin einen anderen Effekt hervorruft.

Alle Versuche wurden außerdem an T-Lymphozyten durchgeführt, die ausschließlich von gesunden Probanden stammten. Da das MDS das Immunsystem kompromittiert, werden auch die T-Lymphozyten in ihrer zytotoxischen Funktion beeinträchtigt. [17] Es ist daher wahrscheinlich, dass die $CD8^+$-T-Lymphozyten von MDS-Patienten anders auf Azacytidingabe reagieren, als die von gesunden Probanden.

Darüber hinaus wird im Experiment mit den $CD8^+$-T-Lymphozyten nur ein Teil des Immunsystems untersucht. Das Immunsystem in vivo ist jedoch sehr viel komplexer. Nicht berücksichtigt werden beispielsweise $CD4^+$-T-Lymphozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten und das gesamte humorale Immunsystem. Daher beziehen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ausschließlich auf $CD8^+$-T-Lymphozyten und deren sekretorische Aktivität.

Eine weitere Fehlerquelle, welche die Ergebnisse der ELISPOT-Assays verfälschen kann, liegt im Auftreten von unspezifischen Immunreaktionen. Eine mögliche Ursache hierfür kann die unvollständige Separation der Zellen im MACS-Verfahren sein. Die MACS-Technik erlaubt zwar eine relativ reine Trennung von zellulären Bestandteilen, wegen zu geringer magnetischer Adhäsion der markierten Zellen oder unspezifisch gebundener MicroBeads® ist diese Fraktionierung aber praktisch nie vollständig. Die Reinheit dieses Verfahrens beträgt bei einmaliger Durchführung aber immerhin 97-98% [60,77]. Vitale $CD8^-$-T-Lymphozyten verbleiben deshalb in geringer Anzahl in den Zellkulturen und sind dort in der Lage unspezifische Immunantworten hervorzurufen. Eine weitere Ursache für unspezifische Immunreaktionen kann die Verwendung von allogenem AB-Serum als Medium für die Zellkulturen sein. Die darin enthaltenen allogenen Antigene können T-

Zell-vermittelte Immunreaktionen hervorrufen. Zur Vermeidung von unspezifischen Immunreaktionen durch wurde das verwendete AB-Serum hitzeinaktiviert, was die Anzahl der potentiell immunogenen Antigene minimiert. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unspezifische Immunantworten zu erkennen, verwendeten wir als Negativkontrolle bei jedem Versuch eine Kultur, die weder mit Peptid stimuliert noch mit Azacytidin behandelt wurde.
Obwohl Limitationen bestehen konnte in den Experimenten gezeigt werden, dass Azacytidin in vitro bei 8 von 13 Probanden einen verstärkenden Einfluss auf die, durch $CD8^+$-T-Lymphozyten vermittelte, Immunreaktion auf immunogene Peptide hatte. In der Literatur werden die von Azacytidin ausgehenden Effekte zwar hauptsächlich durch den Einfluss auf Apoptose und Methylierung der DNA [94] erklärt, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern aber Hinweise auf einen weiteren Wirkungsmechanismus von Azacytidin.

4.2 Anzahl der $CD8^+$-T-Lymphozyten 8 Tage nach Zugabe von Azacytidin

In publizierten Experimenten mit einer myeloischen P39-Zellreihe, die von einem CMML-Patienten stammte, wurden Versuche mit höheren Azacytidinkonzentrationen als 8 µM nicht durchgeführt. Der Grund hierfür war, dass es innerhalb einer Stunde nach Hinzugabe von Azacytidin zu exzessivem Zelltod gekommen ist [47]. Das Spektrum der verwendeten Azacytidinkonzentrationen in den Experimenten der vorliegenden Arbeit reichte von 1 – 50 µM. 8 Tage nach Hinzugabe von Azacytidin in die Zellkulturen wurde die Anzahl der vitalen T-Lymphozyten bestimmt. Die Ergebnisse dieser Auszählung am Tag 8 ergaben, dass sich ein zytotoxischer Effekt von Azacytidin hier erst ab einer Konzentration von 25 µM in einem sprunghaften Rückgang der Anzahl an vitalen T-Lymphozyten von ca. 18% gegenüber der Positivkontrolle ohne Azacytidin niederschlägt. Bei 50 µM ist ein signifikanter Rückgang von ca. 48% zu verzeichnen ($p < 0,02$). Bei niedrigeren Azacytidinkonzentrationen bleibt die Zellzahl hingegen nahezu unverändert. Es sind keine eklatanten Schwankungen bis 10 µM festzustellen, was gegen eine relevante Zytotoxizität von Azacytidin in diesem Konzentrationsbereich spricht.
Es wurden T-Lymphozyten von gesunden Probanden untersucht. Dies ist ein Grund, warum sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von den eingangs genannten, publizierten Ergebnissen unterscheiden. Möglicherweise sind T-

Lymphozyten von gesunden Probanden weniger vulnerabel, als die in der Publikation verwendete myeloide P39-Zellreihe eines CMML-Patienten. Zumal die Einwirkzeit von Azacytidin in unseren Versuchen über eine Woche statt einer Stunde betrug. Die Beobachtung, dass die Zytotoxizität von Azacytidin generell dosisabhängig ist, deckt sich jedoch mit den publizierten Ergebnissen [47].
Wurden die Zellen nicht mit Peptid gepulst, so war die Anzahl der T-Lymphozyten nach 8 Tagen im Durchschnitt etwa ein Drittel geringer, als in den gepulsten Kulturen mit derselben Azacytidinkonzentration. Da diese Veränderungen allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$) sind, bleibt fraglich, ob die Stimulation der $CD8^+$-T-Lymphozyten mit immunogenen Peptiden einen Einfluss auf deren Widerstandsfähigkeit gegenüber Azacytidin in höheren Konzentrationen hat.

4.3 Ausblick

Konzipiert wurden die durchgeführten Experimente, um die Frage zu klären, ob Azacytidin einen Einfluss auf die Immunreaktion von stimulierten $CD8^+$-T-Lymphozyten hat. Es konnte gezeigt werden, dass Azacytidin einen verstärkenden Einfluss auf die Immunreaktion bei mehr als der Hälfte der untersuchten Zellkulturen von 13 gesunden Probanden hatte. Neben den bereits gezeigten Wirkungen, Induktion von Apoptose und Demethylierung der DNA, [94] kann Azacytidin somit auch eine Wirkung auf $CD8^+$-T-Lymphozyten entfalten. Aufgrund dieses interessanten Ergebnisses sollte die Wirkung von Azacytidin auf $CD8^+$-T-Lymphozyten von MDS-Patienten untersucht werden. Möglicherweise reagieren stimulierte $CD8^+$-T-Lymphozyten von MDS Patienten anders auf Azacytidingabe als $CD8^+$-T-Lymphozyten von gesunden Probanden. Darüber hinaus ist die Auswirkung von Azacytidin auf andere Komponenten des Immunsystems relevant. Neben den $CD8^+$-T-Lymphozyten sollten z. B. auch $CD4^+$-T-Lymphozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen untersucht werden.
Bisher wurden mehrere Arbeiten publiziert, in denen ein prädiktiver Marker getestet wurde, der eine Vorhersage darüber zulässt, ob eine Therapie mit Azacytidin, für einzelne Patienten wirksam ist. Jedoch zeigten in vitro weder die Veränderung der DNA-Methylierung noch die Aktivität des Tumorsuppressors p15 nach Azacytidingabe eine hinreichende Assoziation mit dem klinischen Ansprechen auf eine Azacytidintherapie [33,81,90]. Möglicherweise ist die Verstärkung einer Immun-

antwort auf immunogene Peptide in vitro ein Prädiktor, der für eine zuverlässigere Vorhersage eines Ansprechens auf eine Azacytidintherapie verwendet werden kann. Hierfür muss überprüft werden, ob eine Verstärkung der Immunreaktion der $CD8^+$-T-Lymphozyten von MDS-Patienten in vitro mit dem Ansprechen einer Azacytidintherapie in vivo korreliert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Azacytidin ist seit einigen Jahren für die Therapie des myelodysplastischen Syndroms (MDS) im Stadium intermediate-2 und high-risk nach International Prognostic Scoring System (IPSS) zugelassen. In klinischen Studien ist die Wirksamkeit in Form einer Überlebensverlängerung gegenüber der alleinigen supportiven Therapie gezeigt worden. Grundlegende Wirkmechanismen von Azacytidin sind die Demethylierung der DNA und die Beeinflussung der Apoptose. Zu Auswirkungen von Azacytidin auf das Immunsystem ist hingegen wenig bekannt. Ein möglicher Effekt von Azacytidin ist die Verstärkung einer Immunreaktion auf immunogene Peptide, wie z. B. tumor-assoziierte Antigene, durch körpereigene $CD8^+$-T-Lymphozyten. Die Untersuchung dieses Mechanismus war das Ziel der vorliegenden Arbeit. Dafür wurden in den Versuchen periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) von 13 gesunden Probanden untersucht. Mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) wurde die $CD8^+$-T-Zellpopulation isoliert und mit immunogenem Peptid stimuliert. Anschließend wurde Azacytidin in die Lymphozytenkulturen mit Konzentrationen von 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM und 50 µM gegeben. Die Zellen wurden daraufhin in einer mixed lymphocyte peptide culture (MLPC) für 8 Tage kultiviert. Die durch sekretorisch aktive $CD8^+$-T-Lymphozyten hervorgerufene Immunreaktion wurde mittels Enzyme-linked immunosorbent spot-Assay (ELISPOT-Assay) quantifiziert. Als Marker diente die Anzahl der Spots, die durch Sekretion der Moleküle Granzym B bzw. Interferon-γ hervorgerufen wurden.
Die gemittelte Anzahl an Spots von 13 Probanden zeigte bei keiner der getesteten Azacytidinkonzentrationen eine signifikant verstärkte Immunreaktion im Vergleich zur Positivkontrolle ($p > 0,05$). Die Vergleichbarkeit der Probanden untereinander ist aufgrund von biologischen Unterschieden jedoch problematisch. Die Betrachtung der einzelnen Probanden lieferte deshalb ein relevanteres Ergebnis. Bei 8 von 13 Probanden zeigte sich mit Azacytidin im Vergleich zur Positivkontrolle ohne Azacytidin eine verstärkte spezifische Immunreaktion bei mindestens einer der getesteten Azacytidinkonzentrationen. Dies war mit einem kontinuierlichen Anstieg der Anzahl an Spots bis zum Maximum und einem darauf folgendem Abfall verbunden. Diese Beobachtung spricht für die konzentrationsabhängige Wirkung von Azacytidin auf $CD8^+$-T-Lymphozyten.
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten somit zeigen, dass Azacytidin die

spezifische Immunreaktion von $CD8^+$-T-Lymphozyten auf immunogene Peptide verstärken kann.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aivado M, Rong A, Stadler M, Germing U, Giagounidis A, Strupp C, Novotny J, Josten KM, Kobbe G, Hildebrandt B, Gattermann N, Aul C, Haas R, Ganser A: Favourable response to antithymocyte or antilymphocyte globulin in low-risk myelodysplastic syndrome patients with a 'non-clonal' pattern of X-chromosome inactivation in bone marrow cells. Eur J Haematol 68: 210-216 (2002)

2. Alderson MR, Tough TW, Ziegle SF, Grabstein KH: Interleukin 7 Induces Cytokine Secretion and Tumoricidal Activity by Human Periperal Blood Monocytes. J Exp Med 173: 923-930 (1991)

3. Armitage RJ, Namen AE, Sassenfeld HM, Grabstein KH: Regulation of human T-cell proliferation by interleukin 7. Immunol 144: 938-941 (1990)

4. Aul C, Gattermann N, Schneider W: Epidemiological and etiological aspects of myelodysplastic syndromes. Leuk Lymphoma 16: 247-262 (1995)

5. Aul C, Bowen DT, Yoshida Y: Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. Haematol 83: 71-86 (1998)

6. Bain BJ: Bone marrow trephine biopsy. J Clin Pathol 54: 737-742 (2001)

7. Balleari E, Rossi E, Clavio M, Congiu A, Gobbi M, Grosso M, Secondo V, Spriano M, Timitilli S, Ghio R: Erythropoietin plus granulocyte colony-stimulating factor is better than erythropoietin alone to treat anemia in low-risk myelodysplastic syndromes: results from a randomized single-centre study. Ann Hematol 85: 174–180 (2006)

8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukeamias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 33: 451-458 (1976)

9. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 52 :189-199 (1982)

10. Berthou C, Bourge JF, Zhang Y, Soulie A, Germin D, Denizot Y, Sigaux F, Sasportes M: Interferon-gamma-induced membrane PAF-receptor expression confers tumor cell susceptibility to NK perforin-dependent lysis. Blood 95: 2329-2336 (2000)

11. Bhatia R, Deeg HJ. Treatment-related myelodysplastic syndrome: molecular characteristics and therapy. Curr Opin Hematol 18: 77-82 (2011)

12. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. Annu Rev Immunol 15: 749-795 (1997)

13. Casadevall N, Durieux P, Dubois S, Hemery F, Lepage E, Quarré MC, Damaj G, Giraudier S, Guerci A, Laurent G, Dombret H, Chomienne C, Ribrag V, Stamatoullas A, Marie JP, Vekhoff A, Maloisel F, Navarro R, Dreyfus F, Fenaux P: Health, economic, and quality-of-life effects of erythropoietin and granulocyte colonystimulating factor for the treatment of myelodysplastic syndromes: a randomized, controlled trial. Blood 104: 321-327 (2004)

14. Chen L, MacMillan AM, Chang W, Ezaz-Nikpay K, Lane WS, Verdine GL: Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA cytosine-5)-methyltransferase. Biochemistry 30: 11018-11025 (1991)

15. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, Pinto A, Beran M, de Witte TM, Stone RM, Mittelman M, Sanz GF, Gore SD, Schiffer CA, Kantarjian H: Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. Blood 108: 419-425 (2006)

16. Cui W, Kaech SM: Generation of effector $CD8^+$ T cells and their conversion to memory T cells. Immunol Rev 236: 151-166 (2010)

17. Cukrova V, Neuwirtova R, Dolezalova L, Belickova M, Bartunkova J, Jonasova A, Cermak J, Homolkova H, Malikova I: Defective cytotoxicity of T lymphocytes in myelodysplastic syndrome. Experimental Hematol 37: 386-394 (2009)

18. Cutler CS, Lee SJ, Greenberg P, Deeg HJ, Pérez WS, Anasetti C, Bolwell BJ, Cairo MS, Gale RP, Klein JP, Lazarus HM, Liesveld JL, McCarthy PL, Milone GA, Rizzo JD, Schultz KR, Trigg ME, Keating A, Weisdorf DJ, Antin JH, Horowitz MM: A decision analysis of allogeneic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes: delayed transplantation for low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome. Blood 104: 579–585 (2004)

19. Dayyani F, Conley AP, Strom SS, Stevenson W, Cortes JE, Borthakur G, Faderl S, O'Brien S, Pierce S, Kantarjian H, Garcia-Manero G. Cause of death in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. Cancer 116: 2174-2179 (2010)

20. Di Fabio S, Mbawuike IN, Kiyono H, Fujihashi K, Couch RB, McGhee JR: Quantitation of human influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation of cytotoxicity and increased numbers of IFN-gamma producing CD8+ T cells. Int Immunol 6: 11-19 (1994)

21. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Lowenberg B, Bloomfield CD: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood 115: 453-474 (2010)

22. D'Souza WN, Lefrancois L: IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. J Immunol 171: 5727-5735 (2003)

23. Esteller M: Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nat Rev Genet 8: 286-298 (2007)

24. Faderl S, Ravandi F, Huang X, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Estrov Z., Borthakur G, Verstovsek S, Thomas DA, Kwari M, Kantarjian H. A randomized study of clofarabine versus clofarabine plus low-dose cytarabine as front-line therapy for patients aged 60 years and older with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. Blood 112: 1638-1645 (2008)

25. Falk K, Rötzschke O, Stevanović S, Gnau V, Sparbier K, Jung G, Rammensee HG, Walden P. Analysis of a naturally occurring HLA class I-restricted viral epitope. Immunol 82: 337-342 (1994)

26. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: A randomised, open-label, phase III study. Lancet Oncol 10: 223-232 (2009)

27. Finn OJ, Lotze MT: A decade in the life of tumor immunology. Clin Cancer Res 7: 759-760 (2001)

28. Garcia-Manero G, Stoltz ML, Ward MR, Kantarjian H, Sharma S. A pilot pharmacokinetic study of oral azacitidine. Leuk 22: 1680-1684 (2008)

29. Garcia-Manero G, Fenaux P. Hypomethylating agents and other novel strategies in myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol 29: 516-523 (2011)

30. Germing U, Aul C, Niemeyer CM, Haas R, Bennett JM: Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. Ann Hematol 87: 691-699 (2008)

31. Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST. 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. Mol Cell Biol 25: 4727-4741 (2005)

32. Golshayan AR, Jin T, Maciejewski J, Fu AZ, Bershadsky B, Kattan MW, Kalaycio ME, Sekeres MA: Efficacy of growth factors compared to other therapies for low-risk myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 137: 125-132. (2007)

33. Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, Grever M, Galm O, Dauses T, Karp JE, Rudek MA, Zhao M, Smith BD, Manning J, Jiemjit A, Dover G, Mays A, Zwiebel J, Murgo A, Weng LJ, Herman JG: Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. Cancer Res 66: 6361-6369 (2006)

34. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood 89: 2079-2088 (1997)

35. Gryn J, Zeigier ZK, Shadduck RK, Lister J, Raymond JM, Sbeitan I, Srodes C, Meisner D, Evans C: Treatment of myelodysplastic syndromes with 5-azacytidine. Leuk Res 26: 593-897 (2002)

36. Heaney ML, Golde DW. Myelodysplasia. N Engl J Med 340: 1649-1660 (1999)

37. Hellstrom-Lindberg E, Gulbrandsen N, Lindberg G, Ahlgren T, Dahl IM, Dybedal I, Grimfors G, Hesse-Sundin E, Hjorth M, Kanter-Lewensohn L, Linder O, Luthman M, Löfvenberg E, Oberg G, Porwit-MacDonald A, Rådlund A, Samuelsson J, Tangen JM, Winquist I, Wisloff F: A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: significant effects on quality of life. Br J Haematol 120: 1037–1046 (2003)

38. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T: Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. Tjuji K, Aizawa M, Sasazuki T. (Hrsg.) In: HLA 1991, Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference. Oxford University Press, Oxford/ New York/ Tokyo. 1065-1220 (1992)

39. Itzykson R, Fenaux P. Optimal sequencing of treatments for patients with myelodysplastic syndromes. Curr Opin Hematol 16: 77-83 (2009)

40. Jadersten M, Malcovati L, Dybedal I, Della Porta MG, Invernizzi R, Montgomery SM, Pascutto C, Porwit A, Cazzola M, Hellstrom-Lindberg E: Erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor treatment associated with improved survival in myelodysplastic syndrome. J Clin Oncol 26: 3607-3613 (2008)

41. Jadersten M, Hellstrom-Lindberg E: Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. J Intern Med 265: 307-328 (2009)

42. Jager E, Nagata Y, Gnjatic S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jager D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A: Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. Proc Natl Acad Sci USA 97: 4760-4765 (2000)

43. Kagi D, Hengartner H: Different roles for cytotoxic T cells in the control of infections with cytopathic versus noncytopathic viruses. Curr Opin Immunol 8: 472-477 (1996)

44. Kantarjian H, Giles F, List A, Lyons R, Sekeres MA, Pierce S, Deuson R, Leveque J. The incidence and impact of thrombocytopenia in myelodysplastic syndromes. Cancer 109: 1705-1714 (2007)

45. Kantarjian H, Fenaux P, Sekeres MA, Becker P, Boruchov A, Bowen D, Larson R, Lyons R, Muus P, Shammo J, Ehrman M, Hu K, Nichol J. Phase 1／2 study of AMG 531 in thrombocytopenic patients (pts) with low-risk Myelodysplastic syndrome (MDS): update including extended treatment. Blood 110: 81a (2007) (abstract)

46. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD: Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveilance system in immunocompetent mice. Proc Natl Acad Sci USA 95: 7556-7561 (1998)

47. Khan R, Aggerholm A, Hokland P, Hassana M, Hellstrom-Lindberg E: A pharmacodynamic study of 5-azacytidine in the P39 cell line. Exp Hematol 34: 35-43 (2006)

48. Khan R, Schmidt-Mende J, Karimi M, Gogvadze V, Hassana M, Ekstrom TJ, Zhivotovsky B, Hellstrom-Lindberg E: Hypomethylation and apoptosis in 5-azacytidine–treated myeloid cells. Exp Hematol 36: 149-159 (2008)

49. Koldehoff M, Westerhausen M: 5-Azacytidine treatment for recurrent myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloblastic leukemias. Ann Oncol 4: 96-97 (2000)

50. Leone G, Teofili L, Voso MT, Lübbert M: DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. Haematol 87: 1324-1341 (2002)

51. Leone G, Pagano L, Ben-Yehuda D, Voso MT. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. Haematol 92: 1389-1398 (2007)

52. Lichtman MA, Rowe JM: The relationship of patient age to the pathobiology of the clonal myeloid diseases. Semin Oncol 31: 185-197 (2004)

53. Lim ZY, Killick S, Germing U, Cavenagh J, Culligan D, Bacigalupo A, Marsh J, Mufti GJ: Low IPSS score and bone marrow hypocellularity in MDS patients predict haematological responses to antithymocyte globulin. Leukemia 21: 1436-1441 (2007)

54. List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, Powell B, Greenberg P, Thomas D, Stone R, Reeder C, Wride K, Patin J, Schmidt M, Zeldis J, Knight R: Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. N Engl J Med 355: 1456-1465 (2006)

55. Liu CC, Persechini PM, Young JD: Perforin and lymphocyte-mediated cytolysis. Immunol Rev 146: 145-175 (1995)

56. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST: Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. Cancer 109: 1536-1542 (2007)

57. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S, Strupp C, Lazzarino M, Aul C, Cazzola M: Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol 25: 3503-3510 (2007)

58. Marcucci G, Silverman LR, Eller M, Lintz L, Beach CL: Bioavailability of Azacitidine Subcutaneous Versus Intravenous in Patients With the Myelodysplastic Syndromes. J Clin Pharmacol 45: 597-602 (2005)

59. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, Chauncey TR, Gooley TA, Hegenbart U, Nash RA, Radich J, Wagner JL, Minor S, Appelbaum FR, Bensinger WI, Bryant E, Flowers ME, Georges GE, Grumet FC, Kiem HP, Torok-Storb B, Yu C, Blume KG, Storb RF: Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing highdose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. Blood 97: 3390-3400 (2001)

60. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A: High gradient magnetic cell separation with MACS. Cytometry 11: 231-238 (1990)

61. Molldrem JJ, Leifer E, Bahceci E, Saunthararajah Y, Rivera M, Dunbar C, Liu J, Nakamura R, Young NS, Barrett AJ: Antithymocyte globulin for treatment of the bone marrow failure associated with myelodysplastic syndromes. Ann Intern Med 137: 156-163 (2002)

62. Momparler RL, Derse D: Kinetics of phosphorylation of 5-aza-2'-deoxycytidine by deoxycytidine kinase. Biochem Pharmacol 28: 1443-1444 (1979)

63. Moyo V, Lefebvre P, Duh MS, Yektashenas B, Mundle S. Erythropoiesis-stimulating agents in the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. Ann Hematol 87: 527-536 (2008)

64. Mund C, Brueckner B, Lyko F: Reactivation of epigenetically silenced genes by DNA methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications. Epigenetics 1: 7-13 (2006)

65. Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. Blood 111: 4841-4851 (2008)

66. Nisse C, Lorthois C, Dorp V, Eloy E, Haguenoer JM, Fenaux P: Exposure to occupational and environmental factors in myelodysplastic syndromes: preliminary results of a case-control study. Leukemia 9: 693-699 (1995)

67. Notari RE, DeYoung JL: Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions. J Pharm Sci 64: 1148-1157 (1975)

68. Ogata K, Nakamura K, Yokose N, Tamura H, Tachibana M, Taniguchi O, Iwakiri R, Hayashi T, Sakamaki H, Murai Y, Tohyama K, Tomoyasu S, Nonaka Y, Mori M, Dan K, Yoshida Y: Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. Blood 100: 3887-3896 (2002)

69. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J: Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia – a review. Br J Haematol 140: 123-132 (2008)

70. Park MJ, Kim HJ, Kim SH, Kim DH, Kim SJ, Jang JH, Kim K, Kim WS, Jung CW. Is International Prognostic Scoring System (IPSS) still standard in predicting prognosis in patients with myelodysplastic syndrome? External validation of the WHO Classification-Based Prognostic Scoring System (WPSS) and comparison with IPSS. Europ J Haematol 81: 364-373 (2008)

71. Parker KC, DiBrino M, Hull L, Coligan JE. The β_2-Microglobulin dissociation date is an accurate measure of the stability of MHC Class I heterotrimers and depends on which peptide is bound. J Immunol 149: 1896-1904 (1992)

72. Podack ER: Execution and suicide: cytotoxic lymphocytes enforce Draconian laws through seperate molecular pathways. Curr Opin Immunol 7: 11-16 (1999)

73. Porter JB. Concepts and goals in the management of transfusional iron overload. Am J Hematol 82: 1136-1139 (2007)

74. Raza A, Reeves JA, Feldman EJ, Dewald GW, Bennett JM, Deeg HJ, Dreisbach L, Schiffer CA, Stone RM, Greenberg PL, Curtin PT, Klimek VM, Shammo JM, Thomas D, Knight RD, Schmidt M, Wride K, Zeldis JB, List AF: Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q. Blood 111: 86-93 (2008)

75. Reynolds JEF. In: Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 29. Aufl, The Pharmaceutical Press London, S. 599 (1989)

76. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Merritt WD, Ries LA, Edwards BK, List AF: Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. Blood 112: 45-52 (2008)

77. Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U: Utility of Magnetic Cell Separation as a Molecular Sperm Preparation Technique. J Androl 29: 134-142 (2008)

78. Santi DV, Norment A, Garrett CE: Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. Proc Natl Acad Sci USA 81: 6993-6997 (1984)

79. Schmitt A, Bechter C, Yao J, Goetz M, Maccari B, Schauwecker P, Wiesneth M, Schmitt M: Cytomegalovirus vaccination of leukemia and lymphoma patients after allogeneic stem cell transplantation - validation of a peptide vaccine. J Immunol Methods 343: 140-147 (2009)

80. Sekeres MA, Schoonen WM, Kantarjian H, List A, Fryzek J, Paquette R, Maciejewski JP: Characteristics of US patients with myelodysplastic syndromes: results of six crosssectional physician surveys. J Natl Cancer Inst 100: 1542-1551 (2008)

81. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, Lin E, Shan J, Huang X, Berry D, Ahmed S, Zhu W, Pierce S, Kondo Y, Oki Y, Jelinek J, Saba H, Estey E, Issa JP. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol 28: 605-613 (2010)

82. Silverman LR, Holland JF, Veinberg RS, Alter BP, Davis RB, Ellison RR, Demakos EP, Cornell CJ Jr, Carey RW, Schiffer C: Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia 7: 21-29 (1993)

83. Silverman LR, Holland JF, Demakos EP, Peterson B, Nelson DA, Clamon G, Powell BL, Larson R, Bloomfield CD, McIntyre OR, Schiffer C: Azacitidine (AzaC) in myelodysplastic syndromes (MDS), CALBG studies 8421 and 8921. Ann Hematol: 12a (1994) (abstract)

84. Silverman LR, Dernakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA, Holland JF: Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. J Clin Oncol 20: 2429-2440 (2002)

85. Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, Holland JF, Backstrom JT, Beach CL, Larson RA: Further Analysis of Trials With Azacitidine in Patients With Myelodysplastic Syndrome: Studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. J Clin Oncol 24: 3895-3903 (2006)

86. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R: Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant hematologic diseases. Blood 91: 756-763 (1998)

87. Smyth MJ, Trapani JA: Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. Immunol Today 16: 202-206 (1995)

88. Socié G, Mary JY, Degramont A, Rio B, Leporrier M, Rose C, Heudier P, Rochant H, Cahn JY, Gluckman E: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria – long-term follow-up and prognostic factors. Lancet 348: 573-577 (1996)

89. Solache A, Morgan CL, Dodi AI, Morte C, Scott I, Baboonian C, Zal B, Goldman J, Grundy JE, Madrigal JA. Identification of three HLA-A*0201-restricted cytotoxic T cell epitopes in the cytomegalovirus protein pp65 that are conserved between eight strains of the virus. J Immunol 163: 5512-5518 (1999)

90. Soriano AO, Yang H, Faderl S, Estrov Z, Giles F, Ravandi F, Cortes J, Wierda WG, Ouzounian S, Quezada A, Pierce S, Estey EH, Issa JP, Kantarjian HM, Garcia-Manero G: Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Blood 110: 2302-2308 (2007)

91. Stary J, Baumann I, Creutzig U, Harbott J, Michalova K, Niemeyer, C. Getting the numbers straight in pediatric MDS: Distribution of subtypes after the exclusion of Down syndrome. Pediatric Blood Cancer 50: 435-436 (2007)

92. Steensma DP, Tefferi A: The myelodysplastic syndrome(s): a perspective and review highlighting current controversies. Leuk Res 27: 95-120 (2003)

93. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, Venzon D, Rick ME: Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. Blood 98: 979-987 (2001)

94. Stresemann C, Lyko F: Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. Int J Cancer 123: 8-13 (2008)

95. Tefferi A, Vardiman JW: Myelodysplastic Syndromes. N Engl J Med 361: 1872-1885 (2009)

96. Travis LB, Li CY, Zhang ZN, Li DG, Yin SN, Chow WH, Li GL, Dosemeci M, Blot W, Fraumeni JF Jr: Hematopoietic malignancies and related disorders among benzene-exposed workers in China. Leuk Lymphoma 14: 91-102 (1994)

97. Valent P, Horny H, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P: Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus Statements and Report from a Working Conference. Leuk Res 31: 727-736 (2007)

98. Valent P, Horny H: Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: update and open questions. Eur J Clin Invest 39: 548-553 (2009)

99. Van Etten RA, Shannon KM: Focus on myeloproliferative diseases and myelosdysplastic syndromes. Cancer Cell 6: 547-552 (2004)

100. Vardiman JW: Myelodysplastic syndromes, chronic myeloproliferative diseases, and myelodysplastic/myeloproliferative diseases. Semin Diagn Pathol 20: 154-179 (2003)

101. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD: The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 114: 937-951 (2009)