

# **Untersuchung prätherapeutischer Zytokinspiegel bei Kindern mit anaplastisch-großzelligem Lymphom**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Fabian Gustav Knörr  
aus Essen

Gießen 2016

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendheilkunde  
Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. A. Reiter (bis 2015)

Prof. Dr. med. D. Körholz (ab 2015)

Gutachter: Prof. Dr. W. Wößmann

Gutachter: Prof. Dr. G. Bein

Tag der Disputation: 14.02.2017

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 Einleitung .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Non-Hodgkin-Lymphome   | 1         |
| 1.2 Anaplastisch-großzellige Lymphome                                    | 1         |
| 1.3 Prognosefaktoren des ALCL  | 3         |
| 1.4 Die Rolle der Immunantwort beim ALCL                                 | 4         |
| 1.5 Zytokine   | 6         |
| 1.6 T-Zellimmunantwort und T-Helferzellklassen                           | 12        |
| 1.7 Zielsetzung der Arbeit   | 18        |
| <b>2 Patienten und Methoden .....</b>                                    | <b>19</b> |
| 2.1 Patienten  | 19        |
| 2.2 Zytokin-Messung mittels Durchflusszytometrie                         | 22        |
| 2.3 Datenauswertung und statistische Verfahren                           | 26        |
| <b>3 Ergebnisse .....</b>  | <b>28</b> |
| 3.1 Auswertung einzelner Zytokine und löslicher Faktoren                 | 28        |
| 3.2 Zytokinspiegel vor dem 6. Chemotherapiekurs                          | 36        |
| 3.3 Einfluss der Lagerdauer  | 37        |
| 3.4 Zusammenhang der Zytokine mit klinischen und biologischen Parametern | 40        |
| 3.5 Auswertung nach Rezidivhäufigkeit und Überleben                      | 50        |
| 3.6 Korrelationen der Zytokinspiegel untereinander                       | 52        |
| <b>4 Diskussion.....</b>   | <b>54</b> |
| 4.1 Kritische Wertung der Ergebnisse                                     | 54        |
| 4.2 sIL-2R/sCD30 als Marker der Tumoraktivität                           | 56        |
| 4.3 Zytokinspiegel zum Zeitpunkt der Diagnosestellung                    | 57        |
| 4.4 Zytokinspiegel und minimal disseminierte Erkrankung                  | 67        |
| 4.5 Zytokinspiegel und Höhe der anti-ALK-Antikörperantwort               | 68        |
| 4.6 Beteiligte T-Helferzellen  | 68        |
| 4.7 Fazit und Ausblick   | 71        |
| <b>5 Zusammenfassung .....</b>   | <b>73</b> |
| <b>6 Summary .....</b>   | <b>74</b> |
| <b>7 Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                     | <b>75</b> |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>8</b>  | <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                    | <b>77</b> |
| <b>9</b>  | <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                      | <b>78</b> |
| <b>10</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                     | <b>79</b> |
| <b>11</b> | <b>Anhang .....</b>                                   | <b>91</b> |
| 11.1      | Material- und Geräteliste                             | 91        |
| 11.2      | Inhalt der Kits zur Zytokinmessung                    | 92        |
| <b>12</b> | <b>Publikationen und Vorträge.....</b>                | <b>94</b> |
| 12.1      | Vorträge  | 94        |
| 12.2      | Poster  | 94        |
| <b>13</b> | <b>Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation.....</b> | <b>95</b> |
| <b>14</b> | <b>Danksagung .....</b>                               | <b>96</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) umfassen eine heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems, die durch das Fehlen von Sternberg-Reed-Riesenzellen historisch von der Gruppe der Hodgkin-Lymphome abgegrenzt wurden. Gemeinsames Merkmal ist eine unkontrollierte Proliferation lymphatischer Zellen, die sich klinisch durch Lymphknotenschwellungen, Fieber, Gewichtsverlust und Symptome einer Knochenmarksinfiltration zeigen kann.

Bei Kindern und Jugendlichen machen NHL etwa 5–10 % aller Malignome aus, die in Deutschland fast ausschließlich im Rahmen von Therapiestudien oder Registern einheitlich behandelt werden [1].

Verschiedene Klassifikationssysteme wurden entwickelt, um eine Einteilung nach biologischen Kriterien vorzunehmen, wie die sogenannte Kiel-Klassifikation, die 1974 von K. Lennert vorgeschlagen [2] und 1988 überarbeitet wurde. Die Kiel-Klassifikation und andere vor allem in den USA gebräuchliche Unterteilungen, wie die „Working Formulation“ wurden 1994 durch die R.E.A.L.-Klassifikation ersetzt, die schließlich 2001 in der WHO-Klassifikation der malignen Lymphome aufging. In dieser werden die Lymphome nach ihrer zellulären Linienzugehörigkeit und dem Reifegrad in B- und T-Zell-Lymphome und in Vorläufer- oder reifzellige Neoplasien eingeteilt. Die letzte Aktualisierung dieser Klassifikation erfolgte 2008 [3].

## 1.2 Anaplastisch-großzellige Lymphome

Das anaplastisch-großzellige Lymphom (*anaplastic large cell lymphoma*, ALCL) wurde erstmals im Jahr 1985 von Stein et al. als eine Unterform der T-Zell-Lymphome beschrieben und macht unter den kindlichen Non-Hodgkin-Lymphomen etwa 15 % aus [4, 5].

In der aktuellen WHO-Klassifikation werden 3 Formen des ALCL unterschieden: Die systemische ALK-positive-, die systemische ALK-negative-Form sowie die primär kutane Form [3].

Bei Vorliegen von Translokationen unter Einbeziehung des Genes der *Anaplastic Lymphoma Kinase* (ALK) erfolgt die Einordnung als ALK-positives ALCL. Die häufigste Translokation ist t(2;5)(p23;q35), diese führt zur Bildung des *Nucleophosmin* (NPM)-ALK-Fusionsprodukts [6].

Neben NPM wurden weitere ALK-Translokationspartner beschrieben, so zum Beispiel ATIC, TFG, TPM3, MYH9 und CLTCL [7-12]. Diese varianten ALK-Translokationen machen ungefähr 10-15 % der ALK-positiven Fälle aus [13-16].

Infolge der Translokation kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase ALK, die in normalen Lymphozyten nicht exprimiert wird. Der extrazelluläre Rezeptoranteil von ALK geht dabei verloren und es kommt zu einer Dimerisierung über den NPM-Anteil. Über Signalwege wie RAS/Erk, PCL- $\gamma$ , PI3K und STAT3 folgen zellproliferative und antiapoptotische Veränderungen, die eine maligne Transformation zur Folge haben [17].

Dieser Form gegenübergestellt sind die ALK-negativen ALCL. Bei erwachsenen Patienten machen diese etwa 45–54 % [18-20] aus und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert [21]. Einige Autoren sehen diese Form als eine eigenständige Erkrankung an [22] und in der aktuellen WHO-Klassifikation ist das ALK-negative ALCL als vorläufige Entität gekennzeichnet. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die ALK-positive Form des systemischen ALCL, da bei pädiatrischen Patienten fast ausschließlich diese Form vorkommt [23].

Klinisch wird das ALCL häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium (III oder IV gemäß des St. Jude-Staging-Systems [24]) diagnostiziert [25-29]. B-Symptome wie Fieber, Nachtschweiß und ungewollte Gewichtsabnahme liegen bei 40–50 % der Patienten vor und sind damit häufiger als bei anderen Entitäten pädiatrischer Non-Hodgkin-Lymphome [28, 30]. Eine extranodale Beteiligung, z. B. von Haut, Knochen oder Lunge findet sich bei etwa 40–60 % [25, 28]. Mit einem Verhältnis von etwa 1,8:1 betrifft das ALCL häufiger männliche Patienten [23, 25]. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt bei etwa 11 Jahren [23, 25, 29].

Histologisch ist das ALCL gekennzeichnet durch großzellige lymphoide Zellen mit viel Zytoplasma und häufig U-förmigen Zellkernen [13]. Der Nachweis von CD30, welches zunächst als Oberflächenmarker von Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen beschrieben und als Ki1-Antigen bezeichnet wurde [31], an der Zellmembran und im Golgi-Apparat ist zur Diagnosestellung erforderlich [32, 33].

Unterschieden wird zwischen verschiedenen histologischen Unterformen, von denen der *common type* mit ca. 65 % der pädiatrischen Fälle sowie die *kleinzellige* Form (6 %) und die *lymphozytäre* Variante (2 %) die häufigsten sind [34].

Immunphänotypisch lässt sich heute in den meisten Fällen klar eine Zuordnung zu T-Zellen oder natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) vornehmen. Während CD3 bei mehr als 75 % der Tumoren negativ bleibt, was früher häufig zu einer Einordnung als *null-cell-*

*phenotype* führte, erlauben weitere T-Zell-Marker wie CD2, CD4, CD5, CD7 oder CD45Ro in den meisten Fällen eine eindeutige Einordnung [13, 34].

Als normale Vorläuferzelle des ALCL wurden reife, aktivierte zytotoxische T-Zellen postuliert [3]. Es wurden ebenfalls ALCL-Zellen mit dem Phänotyp regulatorischer T-Zellen beschrieben, gekennzeichnet durch Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$  sowie Expression von FOXP3 [35]. In einer weiteren Untersuchung zeigte sich allerdings bei keinem von vier ALCL-Patienten eine Expression von FOXP3 [36].

In einer Arbeit von Moti et al. wurde anhand von ALCL-Zellkulturlinien eine Unterpopulation von Zellen definiert, von der das Wachstum der Gesamtpopulation abhing. Diese Zellen zeigten ein Genexpressionsmuster ähnlich dem von unreifen thymozytischen Vorläuferzellen („early thymic progenitors“), was zu der Vermutung führte, dass diese unreifen Zellen die Ursprungszellen des ALCL darstellen könnten [37]. Die abschließende Klärung der Frage nach dem zellulären Ursprung steht weiterhin aus.

### 1.3 Prognosefaktoren des ALCL

Mit einer stadiengerechten Behandlung gemäß des ALCL99- oder des CCG-5941-Protokolls wird beim ALCL eine ereignisfreie 5-Jahresüberlebensrate (EFS) von etwa 70 % erreicht [27, 29, 38]. Das Gesamtüberleben liegt bei 85–90 % [27, 29, 38].

Um einerseits Patienten mit einer sehr guten Prognose nicht zu übertherapieren und andererseits diejenigen Patienten, die von einer intensiveren Therapie profitieren, identifizieren zu können, wurden neben dem Stadium weitere Kriterien zur Stratifizierung vorgeschlagen.

Eine multivariate Auswertung von 225 ALCL-Patienten, die zwischen 1987 und 1997 in Studien der deutschen, französischen und englischen Studiengruppen eingeschlossen waren, zeigte die Bedeutung klinischer Risikofaktoren: Eine mediastinale und viszerale Beteiligung vor allem von Lunge, Leber und Milz sowie einen Hautbefall waren mit einem höherem Rezidivrisiko verbunden [39].

Patienten mit einem anderen histologischen Typ als dem *common type* haben eine schlechtere Prognose [34, 40].

In den letzten Jahren sind zwei weitere biologische Parameter beschrieben worden, die eine große Aussagekraft als Risikofaktoren haben. Dies sind die minimal-disseminierte Erkrankung (*MDD, minimal disseminated disease*), also das Vorhandensein von konventionell-mikroskopisch nicht nachweisbaren Tumorzellen im Knochenmark und peripherem Blut, sowie die Höhe des gegen ALK gerichteten Antikörpertiters:

Eine minimale Beteiligung des Knochenmarks oder des peripheren Blutes, nachgewiesen durch quantitative PCR von NPM-ALK [41], geht mit einer schlechteren Prognose einher. Eine Untersuchung von Damm-Welk et al. zeigte ein Rezidivrisiko von fast 70 % bei Patienten mit einem Nachweis von mehr als 10 normalisierten Kopien (NCN) von NPM-ALK in Blut oder Knochenmark zum Zeitpunkt der Diagnosestellung [40].

Eine wichtige prognostische Bedeutung hat auch die Stärke der humoralen Immunantwort gegen ALK. Pulford et al. wiesen im Serum von ALK-positiven ALCL-Patienten zirkulierende Antikörper gegen ALK nach [42]. Ait-Tahar et al. zeigten 2010, dass der Titer der Autoantikörper gegen ALK invers mit dem Stadium, der Menge der zirkulierenden Tumorzellen und dem Rezidivrisiko korreliert. Über 90 % der NPM-ALK positiven ALCL-Patienten hatten nachweisbare anti-ALK-Antikörper [43].

Bei Auswertung nach einer Kombination aus MDD und der humoralen Immunantwort lassen sich drei Risikogruppen mit jeweils 28 %, 68 % bzw. 93 % ereignisfreiem Überleben voneinander unterscheiden. Dabei hatten Patienten ohne nachgewiesene MDD und mit hohen Antikörpertitern ( $> 1/750$ ) das beste ereignisfreie Überleben [44].

### 1.4 Die Rolle der Immunantwort beim ALCL

Das Immunsystem spielt eine zentrale Rolle bei der Erkennung und Vernichtung von defekten körpereigenen Zellen und Tumorzellen (*Immunosurveillance*).

Es erfolgt vor allem durch zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen eine Erkennung und Eliminierung maligne veränderter Zellen und damit eine Abwehr gegen verschiedene Tumore. Die Bedeutung dieser Abwehr zeigt sich in der erhöhten Krebsinzidenz bei immunkompromittierten Patienten [45].

Bei Patienten nach solider Organtransplantation und nachfolgender Immunsuppression sind solide, nicht-infektassoziierte Tumoren wie das kolorektale Karzinom, Nierentumoren oder maligne Melanome deutlich häufiger als in der Normalbevölkerung [46].

Neben der Funktion des Immunsystems zur Tumorabwehr können auf der anderen Seite aber auch physiologische und pathologische Immunreaktionen die Tumorentstehung begünstigen. Entzündung und Tumorentstehung sind eng miteinander verknüpft [47]. Auch die Reaktion des Immunsystems auf einen entstehenden Tumor kann die Proliferation noch weiter fördern. Dies wird über eine Vielzahl zellulärer und humoraler Mechanismen vermittelt, z. B. antiapoptotische Zytokine, vaskuläre Wachstumsfaktoren, Auflockerung der zellulären Matrix und Suppression von zytotoxischen Zellen [48].

Die Wechselwirkungen zwischen Tumor- und Stromazellen sowie humoralen und zellulären Elementen des Immunsystems bewirken auch eine Veränderung und Anpassung

der Tumorzellen durch Selektion. So kann es bei einer primär effektiven Immunreaktion und Kontrolle des Tumors schließlich doch zu einer unkontrollierten Proliferation kommen [49]. Weitere Mechanismen des *immune escape* umfassen eine Herunterregulation von MHC-I, die Neutralisierung von Granzymen oder eine lokale Anergie von T-Zellen. Eine besondere Rolle könnten dabei immunmodulatorische Zytokine als Botenstoffe des Immunsystems spielen [50, 51].

Die Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem spielt auch bei ALCL-Patienten eine wichtige Rolle. Die bei einigen Patienten zu beobachtenden Verläufe mit einem „Kommen und Gehen“ des Tumors (*wax and wane*) lassen sich durch eine Reaktion des Immunsystems mit zeitweiliger Kontrolle des Tumors erklären [25, 52].

Aus immunologischer Sicht ist das ALK-Fusionsprotein von besonderer Bedeutung bei ALK-positiven ALCL-Patienten. Dieses erfüllt die Anforderungen an ein Onkoantigen, oder Tumor-assoziiertes Antigen, und stellt ein nahezu ideales Ziel für mögliche und bereits angewandte Immuntherapien dar [53]: Abgesehen von Zellen im zentralen Nervensystem, einem immunologisch privilegiertem Organ, wird ALK nur auf den Tumorzellen exprimiert [54]. Die Aktivierung der Tyrosinkinase ALK ist außerdem das zentrale Element der malignen Transformation [17].

ALCL-Patienten entwickeln eine sowohl humoral als auch zellulär vermittelte adaptive Immunantwort:

Zirkulierende Antikörper gegen ALK im Blut von ALK-positiven ALCL-Patienten wurden erstmals von Pulford et al. beschrieben [42]. Wie oben beschrieben, sind hohe Antikörpertiter mit einer deutlich besseren Prognose korreliert.

Bekannt ist, dass tumor-assoziierte Antigene (TAA) auch von T-Zellen nach MHC-Präsentation durch dendritische Zellen erkannt werden können und damit eine tumorspezifische Immunreaktion auslösen [55].

2002 wurden zwei Peptidketten aus der ALK-Kinasedomäne identifiziert, gegen die *in vitro* eine Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen aus dem Blut gesunder Probanden nachgewiesen werden konnte [56].

Sowohl ALCL-Patienten als auch gesunde Probanden verfügen über ALK-spezifische T-Zellen [57, 58]. Eine Arbeit von Ait-Tahar et al. zeigte das Vorhandensein von ALK-spezifischen zytotoxischen T-Zellen bei ALK-positiven ALCL-Patienten, die eine zytolytische Aktivität gegen ALCL-Tumorzellenlinien aufwiesen [57].

In der Untersuchung von Passoni et al. an *ex vivo* untersuchten CD8-positiven T-Zellen hatten gesunde Probanden einen vorwiegenden naiven Phänotyp, während 5 von 6 ALCL-Patienten aktivierte zytotoxische Zellen sowie T-Gedächtniszellen hatten [58].

Auch eine Immunantwort durch CD4-positive T-Helferzellen wurde gezeigt, dabei zeigte sich bei allen sechs ALK-positiven ALCL-Patienten eine Interferon- $\gamma$ -Produktion durch *ex vivo* mit ALK-Peptiden stimulierten CD4-positiven T-Zellen. Bei einem Patienten zeigte sich auch eine IL-4-Produktion [59].

Trotz der immunogenen Eigenschaften des ALK-Fusionsproteins und den genannten humoralen und zellulären Immunantworten entgehen die Tumorzellen einer effektiven Elimination durch das Immunsystem.

Eine erhöhte Zahl von unspezifischen aktivierten zytotoxischen T-Zellen ging in einer kleinen Gruppe von ALCL-Patienten mit einer deutlich schlechteren Prognose einher [51]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für Hodgkin-Lymphome und das diffus-groß-zellige B-Zell-Lymphom gemacht [60].

Es wurde vermutet, dass das Vorhandensein von zytotoxischen T-Zellen (CTL) mittels Selektion zu einer erhöhten Resistenz der Tumorzellen gegen den CTL-vermittelten Zelltod führt. Dies könnte über Veränderung von Apoptosemechanismen ebenfalls zu einer erhöhten Chemotherapieresistenz führen [51].

### 1.5 Zytokine

Neben den verschiedenen Zelltypen, die an der Immunantwort beteiligt sind, spielen Zytokine (griechisch *kýtos* „Zelle“ und *kinos* „Bewegung“) als hormonähnliche, zelluläre Botenstoffe eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um kleine Proteine von etwa 100–250 Aminosäuren Länge.

Als Mediatoren werden sie von verschiedenen Zellen, insbesondere von Immunzellen sezerniert und entfalten dann eine auto- oder parakrine und teilweise systemische Wirkung. Es wurde ihre Rolle in der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr sowie der Tumorgenese beschrieben [61]. Ein besonderes Kennzeichen der Zytokine ist ihre funktionelle Vielfalt, also die Fähigkeit, an ganz unterschiedlichen Zielzellen verschiedene Wirkungen zu entfalten [61].

Zytokine lassen sich in funktionelle Gruppen einteilen. Heute ist die Unterteilung in Interferone, Interleukine, Chemokine, mesenchymale Wachstumsfaktoren und Tumornekrosefaktoren üblich. Den Interleukinen kommt dabei eine besondere Rolle bei der Signalübertragung zwischen Lymphozyten zu. Chemokine (abgeleitet von *chemotaktische*

Zytokine) sind Signalmoleküle, anhand derer Immunzellen eine zielgerichtete Chemotaxis durchführen können. Auf die Zuordnung zu bestimmten Zelltypen wird weiter unten eingegangen.

Hinweise darauf, dass prätherapeutische Zytokinspiegel bei malignen Tumoren prognostische Informationen geben können, zeigte die Arbeit von Ansell et al. [62]. Es konnte für Hodgkin-Lymphome gezeigt werden, dass erhöhte Serumspiegel vor allem von Interleukin-6 (IL-6) und des löslichen IL-2-Rezeptors (sIL-2R) mit einem erhöhten Rezidivrisiko einhergehen. Erhöhte Spiegel von sIL-2R, IP-10, MIG, IL-6 und HGF waren außerdem mit einer erhöhten Blutsenkungsgeschwindigkeit, B-Symptomen, fortgeschrittenem Stadium und einer Milzbeteiligung assoziiert [62].

Für Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) wurde in einer Fall-Kontroll-Studie gezeigt, dass prädiagnostisch erniedrigte Spiegel von IL-12 und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für NHL einhergehen [63].

Zu Zytokinspiegeln bei ALCL-Patienten sind bisher vor allem Fallberichte, kleine Patientenserien und *in vitro*-Messungen veröffentlicht worden [35, 64-68]. Erhöhte Spiegel der Interleukine 22, 17, 6 und 8 in einer Gruppe von 11 unbehandelten erwachsenen ALCL-Patienten wurden von 2011 von Savan et al. beschrieben [66]. Diese normalisierten sich unter Behandlung.

Zytokinmessungen bei 6 ALCL-Patienten von insgesamt 31 NHL-Patienten zeigten bei den ALCL-Patienten im peripheren Blut erhöhte Spiegel der Zytokine IL-6, MIP-1 $\alpha$ , IL-10 und der Rezeptoren sTNF-RI und sIL-2R im Vergleich zu den anderen Subentitäten [67].

Auf die Interleukine IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IL-17a, IL-22, IL-23 sowie IFN- $\gamma$ , MCP-1 und MIG wird aufgrund ihrer bereits beschriebenen oder vermuteten Rollen beim ALCL im Folgenden einzeln eingegangen.

### **1.5.1 Interleukin-2 und der Interleukin-2-Rezeptor**

Interleukin-2, ein Zytokin von 15 kDa Größe, wurde 1965 als noch unbekannter Lymphozytenwachstumsfaktor beschrieben und 1976 als T-Zellwachstumsfaktor identifiziert [69-71].

Nach Antigenpräsentation wird IL-2 von aktivierten T-Lymphozyten ausgeschüttet und ist dann an der Aufrechterhaltung einer Immunreaktion beteiligt. Die Wirkung an den Zielzellen erfolgt über die Bindung von Interleukin-2 an den Interleukin-2-Rezeptor, der ebenfalls hauptsächlich von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird [72].

Neben aktivierten T-Zellen haben auch einige B-Zellen und Monozyten einen Interleukin-2-Rezeptor. Der Interleukin-2-Rezeptor ist aus drei Untereinheiten aufgebaut; einer  $\alpha$ -Kette (CD25), einer  $\beta$ -Kette (CD122) und einer  $\gamma$ -Kette (CD132). CD132 ist ein gemeinsamer Bestandteil einer ganzen Familie von Interleukinrezeptoren, zu der unter anderem auch die Rezeptoren für IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 und IL-15 gehören. CD122 und CD132 werden konstitutiv exprimiert, CD25 nur nach Aktivierung. Der extrazelluläre Anteil des Rezeptors wird proteolytisch abgespalten und liegt dann als löslicher IL-2-Rezeptor (sIL-2R) vor. Der Serumspiegel des sIL-2R lässt Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad von T-Zellen zu und findet in der Diagnostik der Sarkoidose und anderer T-Zell-vermittelten Erkrankungen auch klinisch Anwendung. Als Referenzbereich werden dabei für den sIL-2R 112–502 U/ml, entsprechend 370–1657 pg/ml angegeben [73].

CD25 wird bei den meisten pädiatrischen ALCL-Patienten auf den Tumorzellen exprimiert [74].

Die Konzentration des sIL-2R ist bei ALCL-Patienten als erhöht beschrieben worden. In einer Untersuchung zeigten Janik et al. dass 7 von 9 unbehandelten ALCL-Patienten einen sIL-2R-Spiegel von  $\geq 3600$  pg/ml hatten, der sich unter Chemotherapie normalisierte [75].

### 1.5.2 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Zytokin mit sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Eigenschaften. Es wird vor allem von T-Helferzellen und Makrophagen, aber auch von Muskelzellen nach Belastung und weiteren Zelltypen produziert und ist ein wichtiger Mediator von Fieber und der Akute-Phase-Reaktion. IL-6 wird in der klinischen Diagnostik als Prognoseparameter für Sepsis und Trauma verwendet, mit einem Referenzbereich bis 10 pg/ml im Plasma [76].

Der Interleukin-6-Rezeptor ist ein Komplex, bestehend aus der IL-6-spezifischen  $\alpha$ -Kette (CD126) und Glykoprotein 130 (CD130). Über Glykoprotein 130 kommt es zu einer nachfolgenden Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs [77, 78].

Die Rolle von IL-6 wurde bereits für die Pathogenese verschiedener solider Tumoren beschrieben, so zum Beispiel bei Zervix- oder Prostatakarzinomen [79, 80].

Für Non-Hodgkin-Lymphome wurde gezeigt, dass im Vergleich zu Gesunden erhöhte IL-6-Spiegel vorliegen und dass erhöhte Spiegel mit dem Vorhandensein von B-Symptomen und einer schlechteren Prognose einhergehen [81, 82]. Wang et al. zeigten 2011 in einer Untersuchung an 132 Lymphompatienten, dass Patienten mit T-NHL signifikant höhere IL-6-Spiegel als B-NHL hatten [83].

Als mögliche Erklärung für die Rolle von IL-6 bei Tumorerkrankungen nennen Hodge et al. die antiapoptotischen Eigenschaften von IL-6, die Zellen ein Überleben in sehr toxischen Umgebungen erlauben. Obwohl dies für eine normale Funktion des Immunsystems erforderlich ist, könnte IL-6 so auch neoplastische Zellen vor Apoptose und Chemotherapeutika schützen [84].

### 1.5.3 Interleukin-9

Interleukin-9 (IL-9) wird vor allem von verschiedenen Klassen von T-Helferzellen produziert, kann aber auch von Mastzellen ausgeschüttet werden. TGF- $\beta$ , IL-4 und IL-2 wirken fördernd auf die IL-9-Produktion, während Interferon- $\gamma$  eine hemmende Wirkung besitzt. IL-9 fördert das Wachstum von T-Helferzellen, die Entwicklung von B-Zellen, Mastzellwachstum und Hämatopoese [85-87].

Klinisch spielt IL-9 bei allergischen Entzündung eine wichtige Rolle und wird z. B. bei Patienten mit Asthma bronchiale vermehrt produziert [88].

Die autokrine Freisetzung von IL-9 führt über JAK3 zu einem verstärktem Überleben von ALCL-Zellen, wobei eine Hemmung mittels anti-IL9-Antikörpern *in vitro* zu einer Reduktion des Wachstumspotentials führt [89].

### 1.5.4 Interleukin-10

Interleukin-10 wird vor allem von Monozyten, Mastzellen, T<sub>H</sub>2-Zellen, regulatorischen T-Zellen (iT<sub>Reg</sub>) und nach IL-12 vermittelter Aktivierung auch von T<sub>H</sub>1-Zellen produziert [90-92].

Es wird zu den antiinflammatorischen Zytokinen gezählt, da es die Synthese einiger inflammatorischer Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  in Makrophagen und T-Zellen hemmen kann [93, 94]. Dabei spielt die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs eine wichtige Rolle, wie für die Regulation der TNF- $\alpha$ -Produktion gezeigt werden konnte [95]. Vermittelt über STAT3 ist IL-10 auch ein wichtiger Mediator für die Aktivierung von iT<sub>REG</sub> [96].

Gupta et al. zeigten 2012 [97], dass bei Patienten mit einem diffus-großzelligem B-Zelllymphom (DLBCL) erhöhte IL-10-Spiegel vorliegen und dass ein höherer Spiegel (es wurde ein Grenzwert von 26 pg/ml festgelegt) mit einem kürzeren ereignisfreien Überleben (EFS) einhergeht. *In vitro* konnten Gupta et al. zeigen, dass die Stimulation mit IL-10 eine Hochregulation von JAK2/STAT3 zur Folge hatte.

In Untersuchungen an vor allem erwachsenen NHL-Patienten (überwiegend DLBCL) zeigte sich IL-10 als erhöht gegenüber gesunden Kontrollen, und höhere IL-10-Spiegel

gingen mit einem geringeren Überleben einher [82, 98]. *In vitro* zeigte sich an verschiedenen ALCL-Zelllinien eine IL-10-Produktion mit maximalen IL-10-Spiegeln von etwa 1000 pg/ml in den Überständen. Auch hier wurde STAT3 als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Produktion von IL-10 angesehen [35].

### 1.5.5 Interleukin-17a

Interleukin-17a wurde erstmals 1993 von Rouvier et al. beschrieben [99]. Es ist das definierende Zytokin einer Familie von ähnlichen Interleukinen, die als IL-17a–f bezeichnet werden und hat als kennzeichnendes Zytokin der T-Helferzellklasse T<sub>H</sub>17 (siehe unten) vor allem proinflammatorische Effekte. IL-17a fördert die Synthese weiterer Zytokine, wie beispielsweise IL-6, IL-8, G-CSF und MCP-1 [100, 101] und spielt so unter anderem in der Abwehr bakterieller Infektionen eine wichtige Rolle [102]. Insbesondere erfolgen eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und eine Stimulation der Hämatopoese.

Interleukin-17a spielt eine Rolle bei der Pathogenese verschiedener Tumorerkrankungen, mit teilweise tumorfördernden und –hemmenden Eigenschaften [103].

IL-17 kann im Rahmen einer Immunantwort auf einen Tumor durch Immunzellen gebildet werden, aber auch Tumorzellen selbst können dieses Interleukin produzieren. Beschrieben wurde dies unter anderem bei Prostatakarzinomen [104]. Auch beim ALCL könnte dies der Fall sein: Zwei Arbeiten zeigten die Produktion von IL-17a durch ALCL-Zellen sowohl *in vitro* als auch im Serum von unbehandelten Patienten [66, 105].

### 1.5.6 Interleukin-22

Interleukin-22 wurde erstmalig im Jahr 2000 als Teil der IL-10-Zytokinfamilie beschrieben [106] und wird unter anderem von T<sub>H</sub>17-Zellen produziert [107]. Interleukin-22 ist ein Zytokin, das normalerweise nicht an Zellen des Immunsystems, sondern vor allem an Haut- und Leberzellen wirkt. 2008 wurde durch Bard et al. gezeigt, dass der Interleukin-22-Rezeptor (IL-22R) auf T-Zellen aus ALK-positiven ALCL-Zellreihen exprimiert wird [108], im Gegensatz zu benignen Lymphozyten, die diesen Rezeptor nicht besitzen. Savan et al. verwendeten transgene Mäuse mit IL-22R-Expression auf Lymphozyten, die zwar keine Lymphome ausbildeten, aber eine systemische Inflammation entwickelten. Dabei wirkte Interleukin-22 autokrin im Sinne einer Verstärkung. Die systemische Inflammation korrelierte mit ansteigenden IL-17 und G-CSF-Spiegeln [66].

### 1.5.7 Interleukin-23

Interleukin-23 ist ein mit IL-12 verwandtes proinflammatorische Interleukin, mit diesem teilt es sich die gemeinsame Untereinheit IL-12p40 [109]. Aktivierte dendritische Zellen produzieren IL-23, in der Maus führt IL-23 zur Stimulation und Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen [109]. IL-23 ist über IL-17 und G-CSF an der Regulation der Granulopoese beteiligt. [110]. Von besonderer Bedeutung ist IL-23 bei der Aufrechterhaltung einer T<sub>H</sub>17-Antwort [111].

### 1.5.8 Interferon- $\gamma$

Interferon- $\gamma$  ist der einzige Vertreter der Klasse-II-Interferone und wird vor allem von T<sub>H</sub>1-Zellen (siehe unten), zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gebildet. Als kennzeichnendes Zytokin der T<sub>H</sub>1-Antwort wirkt Interferon- $\gamma$  im Sinne einer positiven Rückkopplung auf die T<sub>H</sub>1-Zellen und bewirkt eine Rekrutierung weiterer T<sub>H</sub>0-Zellen während es gleichzeitig die T<sub>H</sub>2-Antwort hemmt [112].

Interferon- $\gamma$  aktiviert Makrophagen und erhöht deren bakterizide Aktivität, wodurch vor allem intrazelluläre Erreger wie Mykobakterien bekämpft werden. Dies geschieht unter anderem über eine Hochregulation der induzierbaren NO-Synthasen (iNOS) [113].

Interferon- $\gamma$  ist ebenfalls in der Abwehr einiger viraler Infektionen, Pilzen und Parasiten sowie in der Tummorimmunität von Bedeutung [112].

Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die Chemokine MIG und IP-10, die von zahlreichen Zellen nach Stimulation mit Interferon- $\gamma$  gebildet werden und im Folgenden näher beschrieben werden.

### 1.5.9 MIG und IP-10 / CXCL9 und CXCL10

*Monokine induced by  $\gamma$ -Interferon* (MIG, CXCL9 nach neuer Nomenklatur) ist ein Chemokin, das vor allem von Makrophagen nach Stimulation mit Interferon- $\gamma$  produziert wird [114]. Es ist strukturell eng mit  *$\gamma$ -Interferon induced protein 10* (IP-10, CXCL10) [115] [116] und CXCL11 verwandt. Diese sind Liganden des Rezeptors CXCR3, der vor allem von aktivierten T<sub>H</sub>1-Zellen exprimiert wird [117, 118].

Dadurch besteht ein positiver Feedback-Mechanismus, bei dem IP-10 T-Lymphozyten chemotaktisch anlockt und T<sub>H</sub>1-Zellen zur Produktion von IFN- $\gamma$  anregt [119]. IP-10 kann als starker Inhibitor der Angiogenese wirken [120] und an einer Immunreaktion gegen Tumorzellen beteiligt sein; es wurden allerdings auch tumorfördernde Effekte beschrieben [121]. Moriai et al. beschreiben auch eine autokrine Förderung der Invasion von nasalen NK/T-Zelltumoren [122].

### 1.5.10 MCP-1 / CCL2

*Monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), nach neuerer Nomenklatur auch *Chemokine (C-C motif) ligand 2* (CCL2) genannt, ist ein Chemokin, welches vor allem Monozyten, dendritische Zellen und Gedächtnis-T-Zellen chemotaktisch anzieht [123]. MCP-1 fördert außerdem die Entwicklung von undifferenzierten T-Zellen in Richtung einer T<sub>H</sub>2-Anwort und die vermehrte Produktion von IL-4 [124].

## 1.6 T-Zellimmunantwort und T-Helferzellklassen

Das adaptive Immunsystem besteht aus einem System spezialisierter Abwehrzellen, die basierend auf dem Prinzip der somatischen Rekombination und Hypermutation eine Vielzahl an Pathogenen erkennen und bekämpfen können. B-Zellen erfüllen hierbei mit der Produktion von spezifischen Antikörpern den humoralen Anteil der Abwehr.

Die zweite Säule der adaptiven Abwehr machen die T-Zellen aus, die nach dem Thymus als dem Ort ihrer Reifung benannt wurden. Diese sind gekennzeichnet durch den variablen T-Zellrezeptor (TCR) und dem Oberflächenmarker CD3, die gemeinsam einen Rezeptorkomplex bilden. Dieser wird durch Bindung an ein MHC-gebundenes Antigen im Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen aktiviert.

Nach Aktivierung erfüllen T-Lymphozyten eine Vielfalt von Aufgaben, wie die zellvermittelte Zytotoxizität, Rekrutierung und Steuerung von Zellen der unspezifischen Immunabwehr, Steuerung des B-Zellklassenwechsels und Verhinderung einer überschießenden Immunantwort.

T-Lymphozyten lassen sich unter anderem durch das Vorhandensein von Oberflächenmarkern wie CD4 und CD8 in verschiedene Untergruppen mit unterschiedlichen Funktionen unterteilen. Dazu gehören neben weiteren Zellklassen die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen, die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen [125].

Im Folgenden soll vor allem auf die T-Helferzellen als wichtige Regulatoren einer Immunreaktion eingegangen werden. Die reifen, naiven CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (auch als T<sub>H</sub>0 bezeichnet) nehmen in der T-Zell-Zone der sekundären lymphatischen Organe Kontakt mit dendritischen Zellen auf. Nach Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch den T-Zellrezeptor und Bindung von ko-stimulierenden Molekülen kommt es zu einer – unter anderem durch IL-2 vermittelten – klonalen Expansion. Zytokin-vermittelt entstehen

dann unterschiedliche Arten von T-Helferzellen mit verschiedenen Funktionen. Die Zytokine werden dabei beispielsweise von den antigenpräsentierenden Zellen oder anderen, bereits aktivierten T-Zellen gebildet.

Vereinfacht ist dieser Ablauf in Abbildung 1 (S. 14) dargestellt.

1986 beschrieben Mosmann et al. zwei verschiedene murine T-Zellklone die sich durch ein jeweils spezifisches Zytokinprofil unterscheiden. Diese wurden als Typ-1- ( $T_H1$ ) und Typ-2- ( $T_H2$ ) T-Helferzellen bezeichnet [126, 127]. Es konnte auch gezeigt werden, dass diese Typen auch bei menschlichen T-Helferzellen vorliegen und stabile,  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -polarisierte Zellpopulationen bei unterschiedlichen Reaktionen des Immunsystems bestehen [128, 129].

In den letzten Jahren wurden weitere T-Helferzell-Typen wie  $T_H9$  und  $T_H17$  beschrieben. Zudem wurde deutlich, dass Übergangsformen zwischen verschiedenen Typen bestehen und teilweise Umwandlungen von einem Typ in einen anderen möglich sind, zum Beispiel von  $T_H17$  zu  $T_H1$  [130]. Daher ist von einer noch weiter zu differenzierenden Plastizität auszugehen, die eine Zuordnung der produzierten Zytokine erschwert und eine strikte Trennung in verschiedene Zellklassen unmöglich macht [131].

Im Folgenden werden die beschriebenen T-Helferzellklassen kurz erläutert und auf ihre Rolle bei der Pathogenese von Tumoren und dem ALCL eingegangen. Eine Übersicht über die Oberflächenmarker und wichtige Zytokine der einzelnen Zellklassen gibt die Tabelle 1 (S. 17).

### 1.6.1 $T_H1$ -Zellen

Die  $T_H1$ -Zellen produzieren als ihr kennzeichnendes Zytokin vor allem Interferon- $\gamma$  sowie Interleukin-2, Interleukin-3 und den *Tumor necrosis factor*  $\beta$ , der auch als Lymphotoxin- $\alpha$  bezeichnet wird [127].

Auch Interleukin-10 kann von  $T_H1$ -Zellen gegen eine überschießende Immunreaktion gebildet werden [90, 132].

Die Differenzierung zu  $T_H1$ -Zellen wird durch Interleukin-12 [133] und IFN- $\gamma$  [134] stimuliert, während IL-10 [90] und IL-4 die  $T_H1$ -Antwort hemmen [135]. IFN- $\gamma$  wirkt in diesem Zusammenhang autokrin im Sinne einer Aufrechterhaltung der  $T_H1$ -Antwort und hemmt gleichzeitig die Differenzierung zu  $T_H2$ -Zellen.

Die primäre Funktion der aktivierten  $T_H1$ -Zelle ist die Abwehr von intrazellulären Erregern, dabei führt insbesondere IFN- $\gamma$  zu einer Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen und einer Hochregulation von mikrobiziden Systemen wie iNOS, siehe oben. Auch werden die Chemokine *Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*  und -1 $\beta$  (MIP-

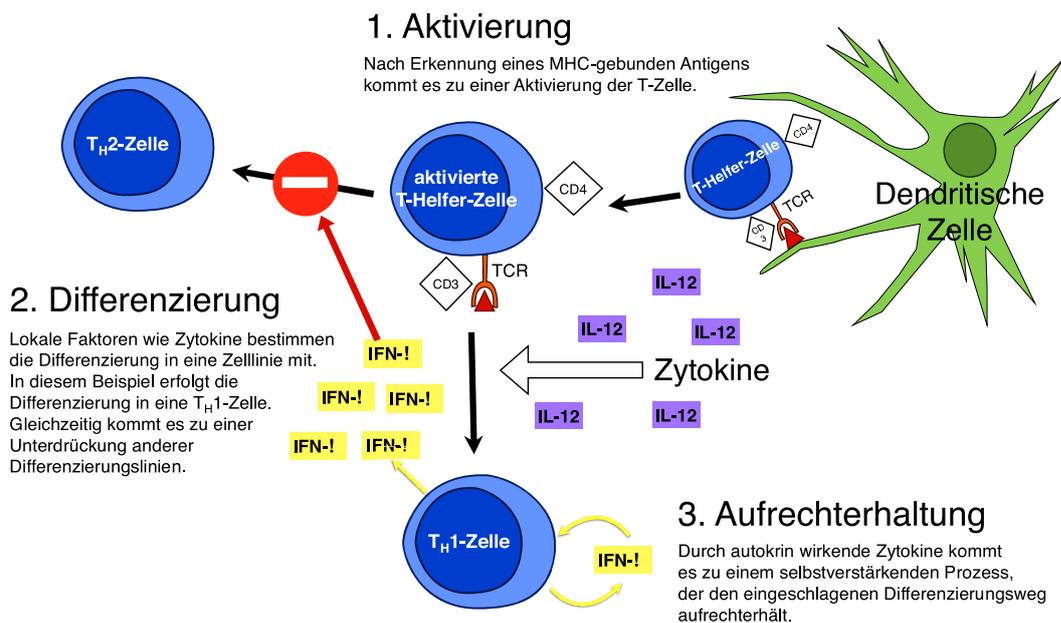
1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ) sowie MCP-1 von T<sub>H</sub>1-Zellen produziert [136] und so die gezielte Migration von Makrophagen gefördert.

Die Aktivierung von T<sub>H</sub>1-Zellen kann beispielsweise mithilfe eines ELISPOT mit Darstellung der IFN- $\gamma$ -Produktion nachgewiesen werden [137]. Das Vorhandensein einer T<sub>H</sub>1-Antwort bei ALCL-Patienten wurde bei 5 von 6 untersuchten Patienten durch Ait-Tahar et al. gezeigt [59].

## 1.6.2 T<sub>H</sub>2-Zellen

Diese Untergruppe der reifen T-Helferzellen ist durch die Produktion der Interleukine 4, 5, 6, 10 und 13 gekennzeichnet [127, 138]. T<sub>H</sub>2-Zellen aktivieren über eine Stimulation von B-Zellen vor allem den humoralen Teil der adaptiven Immunantwort.

Zur Induktion von T<sub>H</sub>2-Zellen führen die Zytokine IL-4 [139] und in geringerem Umfang auch IL-10. Die Anwesenheit von IL-12, welches von T<sub>H</sub>1-Zellen gebildet wird, hemmt die Differenzierung zu T<sub>H</sub>2-Zellen. Über die Produktion des Zytokins IL-4 hemmen T<sub>H</sub>2-Zellen die T<sub>H</sub>1-Antwort. IL-4 fördert die T<sub>H</sub>2-Proliferation, wirkt also selbstverstärkend.



**Abbildung 1: Differenzierung von T-Helferzellen**

Die Grafik zeigt vereinfacht die Differenzierung von T-Helferzellen. Nach Aktivierung durch MHC-gebundene Antigenpräsentation kommt es unter anderem durch IL-2 vermittelt zu einer klonalen Proliferation (nicht dargestellt). Das lokale Zytokin-Milieu und weitere Faktoren beeinflussen die Festlegung auf eine T-Helferzelllinie, in diesem Fall T<sub>H</sub>1. Das kennzeichnende Zytokin von T<sub>H</sub>1-Zellen, Interferon- $\gamma$  hält in einer positiven Rückkoppelung die T<sub>H</sub>1-Antwort aufrecht, während gleichzeitig die Differenzierung in andere Linien (hier T<sub>H</sub>2) unterdrückt wird.

Eigene Darstellung.

IFN- $\gamma$ , welches von T<sub>H</sub>1-Zellen produziert wird, wirkt hingegen hemmend auf T<sub>H</sub>2-Zellen [140]. Damit hemmen sich T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen jeweils gegenseitig.

### 1.6.3 T<sub>H</sub>9-Zellen

2008 wurden ein neuer Subtyp von T-Helferzellen beschrieben, der sich durch die Produktion von Interleukin-9 auszeichnet [141]. Voraussetzung zur Proliferation dieses Typs ist das Vorhandensein von TGF- $\beta$  und IL-4. Die Beobachtung, dass sich T<sub>H</sub>2-Zellen unter Einfluss von TGF- $\beta$  zu T<sub>H</sub>9-Zellen umbilden können, wurde als Beleg für die hohe Plastizität der T-Helferzellklassen gewertet [141]. TH9-Zellen sind bei der Abwehr von Parasiten und Entstehung von Allergien beteiligt, können das Wachstum von Melanomzellen hemmen aber haben möglicherweise proliferationsfördernde Effekte auf hämatologische Neoplasien [142].

### 1.6.4 T<sub>H</sub>17-Zellen

2005 wurden IL-17a produzierenden T-Helferzellen als von T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 unabhängige T-Helferzellklasse beschrieben und als T<sub>H</sub>17-Zellen bezeichnet [143, 144]. Induziert werden diese Zellen durch TGF- $\beta$  [145], IL-1 $\beta$  [146] und IL-6 [147] und aufrechterhalten durch IL-23 [143] und IL-21 [148, 149]. Hemmend wirken die T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4 und IFN- $\gamma$  [143, 144]. Das kennzeichnende Zytokin der T<sub>H</sub>17-Zellen ist IL-17a. T<sub>H</sub>17-Zellen produzieren außerdem IL-21 [149], IL-22 [107, 150] und IL-26 [151]. Die Rolle von T<sub>H</sub>17-Zellen bei Tumoren ist Gegenstand intensiver Forschung. Beschrieben wurden sowohl tumorhemmende als auch tumorfördernde Wirkungen von T<sub>H</sub>17-Zellen [152].

### 1.6.5 T<sub>Reg</sub>-Zellen

Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Selbsttoleranz des Immunsystems und zur Verhinderung überschießender Immunreaktionen. Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (nT<sub>Reg</sub>) sind durch die Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD25 [153] sowie des Transkriptionsfaktors *forkhead box 3* (FOXP3) [154] gekennzeichnet. Diese antigenspezifischen Zellen entstehen unter Einfluss des Wachstumsfaktors TLSP (*thymic stroma-derived lymphopoetin*) direkt im Thymus [155] und dienen vor allem der Selbsttoleranz.

Eine weitere Gruppe regulatorischer T-Zellen, die als T<sub>R</sub>1 oder induzierbare regulatorischen T-Zellen (iT<sub>Reg</sub>) bezeichnet werden, zeichnet sich durch die Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$  aus [156]. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Beendigung einer Immunantwort.

## Einleitung

---

Über produzierte Zytokine und durch Zellkontakt vermittelt wirken T<sub>Reg</sub>-Zellen supprimierend auf dendritische Zellen und T-Helferzellen.

Neben der physiologisch wichtigen Funktion der Selbsttoleranz können regulatorische T-Zellen allerdings auch eine wirksame Immunreaktion auf Tumorzellen verhindern [157].

**Tabelle 1: T-Zellklassen und zugehörige Zytokine**

Überblick über verschiedene T-Zellklassen mit ihren als typisch beschriebenen produzierten, induzierenden und hemmenden Zytokinen. Interleukin-2 als wichtiger autokriner Wachstumsfaktor für verschiedene T-Zellklassen ist nicht gesondert aufgeführt.

|                        | <b><i>T<sub>H1</sub></i></b>  | <b><i>T<sub>H2</sub></i></b>                                       | <b><i>T<sub>H9</sub></i></b>     | <b><i>T<sub>H17</sub></i></b>   | <b><i>nT<sub>Reg</sub>/iT<sub>Reg</sub></i></b>   |
|------------------------|---|--|----------------------------------|---|---|
| <b>Induktion durch</b> | IL-12 [133]<br>IFN- $\gamma$ [134]                                      | IL-4 [139]   | IL-4 [141]<br>TGF- $\beta$ [141] | IL-6 [147, 158]<br>IL-1 $\beta$ [146]<br>TGF- $\beta$ [145, 147]<br>IL-21 [149]<br>IL-23 [143, 144] | TSLP (nT <sub>Reg</sub> ) [155]<br>IL-10 (iT <sub>Reg</sub> ) [96, 156, 159]<br>TGF- $\beta$ (iT <sub>Reg</sub> ) [160] |
| <b>Hemmung durch</b>   | IL-4 [135]<br>IL-10 [90]  | IFN- $\gamma$ [140]<br>IL-10 [90]                                  |                                  | IFN- $\gamma$ [143, 144]<br>IL-4 [143, 144]   | IL-6 [147]  |
| <b>Produktion von</b>  | IFN- $\gamma$ [126]<br>TNF- $\beta$ [126]<br>GM-CSF [126]<br>IL-10 [92] | IL-4 [127]<br>IL-5 [127]<br>IL-6 [127]<br>IL-10 [90]<br>IL-13[138] | IL-9 [141]<br>IL-10 [141]        | IL-17 [143]<br>IL-21 [149]<br>IL-22 [107]<br>IL-26 [151]  | IL-10 [161]<br>IL-17 [162]<br>IL-35 [163]<br>IFN- $\gamma$ [164]  |

### 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht, welche Zytokine und lösliche Faktoren bei pädiatrischen ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im peripheren Blut erhöht vorliegen und ob typische Konstellationen von Zytokinen auftreten.

Dazu wurden die Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17a, IL-22, IL-23, Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , der lösliche IL-2-Rezeptor sowie die Chemokine *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  sowie die Wachstumsfaktoren *hepatocyte growth factor* (HGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) untersucht. Zusätzlich wurde die lösliche Form des bei ALCL-Lymphomen exprimierten Oberflächenantigens CD30 (sCD30) bestimmt.

Als Vergleichsgruppe dienten Patienten mit der Diagnose eines B-NHL niedriger Stadien sowie ALCL-Patienten kurz vor Abschluss der Therapie mit verfügbaren Blutproben vor dem letzten Chemotherapiekurs.

Es sollen mögliche Korrelationen der Zytokinspiegel mit weiteren klinischen und biologischen Parametern wie dem Stadium, B-Symptomatik, minimaler systemischer Erkrankung, Höhe der anti-ALK-Antikörper-Titer sowie dem Rezidivrisiko untersucht werden.

Es soll die Frage beantwortet werden, ob es ein spezifisches Muster von Zytokinen gibt, das mit der humoralen Antwort gegen NPM-ALK korreliert und ob sich daraus ein Rückschluss auf an der Immunantwort gegen ALK beteiligte T-Helferzellklassen ziehen lässt.

# 2 Patienten und Methoden

## 2.1 Patienten

Als Untersuchungsmaterial wurde Serum oder Plasma aus EDTA-Blut von insgesamt 119 Patienten im Kindes- und Jugendalter mit der Diagnose ALCL sowie von 11 altersentsprechenden Patienten mit der Diagnose eines reifzelligen B-NHL der Risikogruppe R2 verwendet. Die Risikogruppe R2 umfasst Patienten ohne oder mit unvollständiger Resektion des Lymphoms, die sich im Stadium I oder II (nach St. Jude [24]) befinden, oder Patienten im Stadium III mit einem prätherapeutisch gemessenen LDH-Wert von weniger als 500 U/l.

Die Serum- und Plasmaproben wurden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung gewonnen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und vor ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

Es wurden 27 Patienten aus der NHL-BFM-95-Studie und 92 Patienten aus der ALCL-99-Studie aus den Jahren 1996 bis 2010 eingeschlossen. Als Einschlusskriterium wurden alle NPM-ALK-positiven Patienten ohne relevante Vortherapie ausgewählt, bei denen anti-ALK-Autoantikörper zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits nachgewiesen worden waren. Der Nachweis erfolgte durch Anfärbung mittels der indirekten Immunperoxidasetechnik von NPM-ALK-transfizierten Zellen mit Patientenserum in absteigenden Konzentrationen [43].

Die ALCL-Patienten wurden gemäß des NHL-BFM 95-Protokolls oder des ALCL-99-Protokolls chemotherapeutisch behandelt. Im NHL-BFM 95-Protokoll erhielten Patienten im Stadium I und II mit vollständiger Resektion 3 Chemotherapieblöcke, in höheren Stadien oder bei unvollständiger Resektion wurden 6 Blöcke verabreicht. In der ALCL99-Studie erhielten nur Patienten des Stadiums I mit vollständiger Resektion eine Behandlung mit 3 Kursen, die übrigen erhielten 6 Therapiekurse.

Als Vergleichsgruppe wurden 15 NPM-ALK-positive ALCL-Patienten in Remission ausgewählt, von denen unmittelbar vor Beginn des sechsten Chemotherapie-Zyklus gewonnenes Serum oder Plasma zur Verfügung stand.

Die Patienten mit der Diagnose eines reifzelligen B-NHL waren in der B-NHL BFM 04-Studie eingeschlossen.

Es lag ein positives Votum der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen vor. Von sämtlichen Patienten beziehungsweise deren Eltern lag eine Einwilligung nach erfolgter Aufklärung gemäß der Deklaration von Helsinki vor.

## Patienten und Methoden

---

Das mediane Alter der untersuchten ALCL-Studienpatienten betrug zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 12,0 Jahre (0,3–17,8 Jahre), bei den B-NHL-Patienten 12,3 Jahre (2,9–17,3 Jahre). 58,0 % der ALCL- und 63,6 % der B-NHL-Patienten waren männlich. Von den ALCL-Patienten erlitten 31,9 % ein Rezidiv, entsprechend einer 3-Jahres-Überlebensrate von 67,6 %. Das Gesamtüberleben betrug 86,6 %. Das mediane Follow-Up für die ALCL-Patienten betrug 5,5 Jahre.

Weitere Details der Patienten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

## Patienten und Methoden

**Tabelle 2: Klinische und biologische Parameter der Patienten**

|                             |                          | ALK+ALCL |        | B-NHL  |         | ALCL vor 6. Kurs |         |
|-----------------------------|--------------------------|----------|--------|--------|---------|------------------|---------|
| Gesamtanzahl                |                          | n = 119  |        | n = 11 |         | n = 15           |         |
| Geschlecht                  | m                        | 69       | 58,0 % | 7      | 63,6 %  | 9                | 60,0 %  |
|                             | w                        | 50       | 42,0 % | 4      | 36,4 %  | 6                | 40,0 %  |
| Alter bei Diagnose          | < 1 Jahr                 | 1        | 0,8 %  | -      | -       | -                | -       |
|                             | 1–9 Jahre                | 44       | 37,0 % | 4      | 36,4 %  | 4                | 26,7 %  |
|                             | > 10 Jahre               | 74       | 62,2 % | 7      | 63,6 %  | 11               | 73,3 %  |
| Stadium <sup>1</sup>        | I                        | 8        | 6,7 %  | -      | -       | 1                | 6,7 %   |
|                             | II                       | 20       | 16,8 % | 4      | 36,4 %  | 3                | 20,0 %  |
|                             | III                      | 71       | 59,7 % | 7      | 63,4 %  | 11               | 73,3 %  |
|                             | IV                       | 17       | 14,3 % | -      | -       | -                | -       |
|                             | k. A.                    | 3        | 2,5 %  | -      | -       | -                | -       |
| Histologie                  | common                   | 52       | 45,4 % | -      | -       | 10               | 66,7 %  |
|                             | Nicht-common             | 38       | 31,9 % | -      | -       | 5                | 33,3 %  |
|                             | k. A.                    | 27       | 22,7 % | -      | -       | -                | -       |
| B-Symptome                  | keine                    | 55       | 47,1 % | 9      | 81,8 %  | 10               | 66,7 %  |
|                             | vorhanden                | 63       | 52,9 % | 2      | 18,2 %  | 5                | 33,3 %  |
| Allgemein-zu-stand          | normale Aktivität        | 29       | 24,4 % | 3      | 27,3 %  | 6                | 40,0 %  |
|                             | geringe Beeinträchtigung | 52       | 43,7 % | 7      | 63,6 %  | 7                | 46,7 %  |
|                             | starke Beeinträchtigung  | 24       | 20,2 % | 1      | 9,1 %   | 1                | 6,7 %   |
|                             | bettlägerig              | 12       | 10,1 % | -      | -       | 1                | 6,7 %   |
|                             | schwerstkrank            | 2        | 1,7 %  | -      | -       | -                | -       |
| Rezidiv                     | nein                     | 81       | 68,1 % | 11     | 100 %   | -                | -       |
|                             | ja                       | 38       | 31,9 % | -      | -       | -                | -       |
| Beteiligung von ...         |                          |          |        |        |         |                  |         |
| ZNS <sup>2</sup>            | nein                     | 117      | 98,3 % | 11     | 100,0 % | 15               | 100,0 % |
|                             | ja                       | 2        | 1,7 %  | -      | -       | 0                | -       |
| Haut                        | nein                     | 89       | 74,8 % | 11     | 100,0 % | 11               | 73,3 %  |
|                             | ja                       | 30       | 25,2 % | -      | -       | 4                | 26,7 %  |
| Mediastinum                 | nein                     | 59       | 49,6 % | 11     | 100,0 % | 8                | 53,3 %  |
|                             | ja                       | 60       | 50,4 % | -      | -       | 7                | 46,7 %  |
| Viszeralorgane <sup>3</sup> | nein                     | 80       | 67,2 % | 3      | 27,3 %  | 14               | 93,3 %  |
|                             | ja                       | 39       | 32,8 % | 8      | 72,7 %  | 1                | 6,7 %   |
| Knochenmark <sup>4</sup>    | nein                     | 103      | 86,6 % | 11     | 100,0 % | 15               | 100 %   |
|                             | ja                       | 16       | 13,4 % | -      | -       | -                | -       |

1 Angabe des Stadium nach St. Jude [24]

2 In der Arbeit wurden nur Patienten mit eindeutigem ZNS-Befall als ZNS-positiv betrachtet. Bei 4 Patienten lag ein fraglicher Befall vor.

3 Eine Beteiligung der Viszeralorgane wurde definiert als Beteiligung von Leber, Lunge oder Milz [39]

4 Die Definition des Knochenmarkbefalls war in den Studien NHL95 und ALCL 99 verschieden. Hier wurden Patienten mit zytomorphologisch nachgewiesenen Blasten im Knochenmark als positiv gewertet, unabhängig von der prozentualen Beteiligung.

### 2.2 Zytokin-Messung mittels Durchflusszytometrie

#### 2.2.1 Prinzip des Tests

Die Bestimmung der Zytokine erfolgte mittels Reagenziensätzen der Firma eBioscience, Frankfurt, die auf dem Prinzip eines Partikel-Immunoassays mit durchflusszytometrischer Messung basieren.

Der Test beruht auf einer Bindung der Analyte an einen mit spezifischen Antikörpern gegen die zu messenden Zytokine beschichteten Mikropartikel (*Bead*). Die Mikropartikel sind in verschiedenen Stärken fluoreszierend gefärbt, mit einer Emission im fernen Rot-Spektrum bei 700 nm. Die Mikropartikel liegen zudem in zwei verschiedenen Größen, 4  $\mu\text{m}$  und 5  $\mu\text{m}$ , vor. Sowohl die Größe als auch die Fluoreszenzintensität erlauben es, die Mikropartikel für die verschiedenen Analyte voneinander zu unterscheiden.

Nach Waschung erfolgt die Bindung eines zweiten, Biotin-konjugierten Antikörpers gegen die zu messenden Zytokine und nach erneuter Waschung die Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin. Phycoerythrin (PE) ist ein häufig verwendetes Fluorochrom und emittiert nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm ein fluoreszierendes Signal mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 575 nm, welches durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Konjugiert mit Streptavidin bindet PE an den Biotin-konjugierten Antikörper.

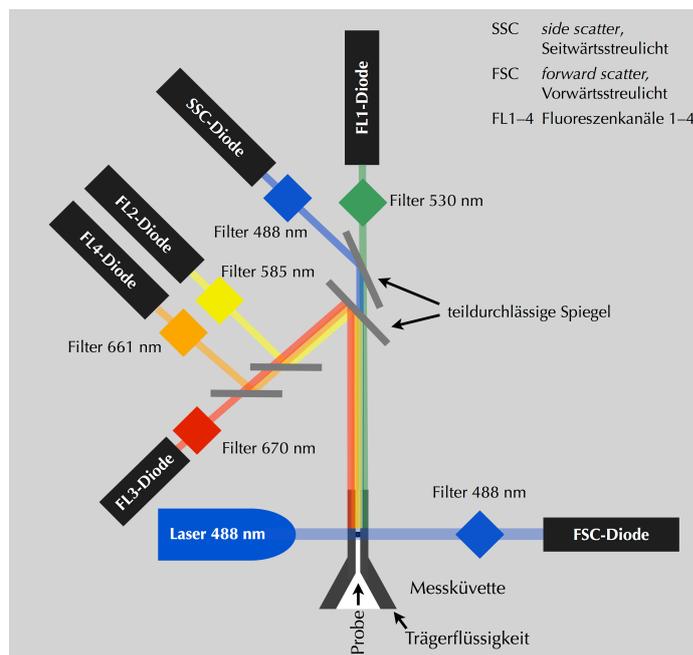
Die Messung einer Standardreihe mit definierten, absteigenden Konzentrationen der zu messenden Analyte ermöglicht es, aus der mittleren Intensität der Fluoreszenz (MFI, einheitenlos) die Konzentration (in pg/ml) der Analyte zu berechnen.

Die Durchflusszytometrie (siehe Abbildung 2, S. 23) beruht auf an einem Laser in einer laminaren Strömung einzeln vorbeiströmenden Zellen oder Partikeln. Aus der Ablenkung und Streuung des Lichtes lassen sich Informationen über Größe und Zusammensetzung der einzelnen Partikel gewinnen. Durch Markierung der Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden kann und dann ein spezifisches Signal emittiert, können zusätzliche Informationen gewonnen werden. Der Laser als Lichtquelle des Zytometers erzeugt dabei monophasisches Licht. Sobald eine einzelne Zelle in der Messküvette den Lichtweg passiert, kann diese Veränderung des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) mit Dioden registriert werden. Ein optisches System aus Spiegeln und Filtern erlaubt es Fluoreszenzen verschiedener Wellenlängen zu erfassen.

Der Vorteil eines Durchflusszytometers gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie besteht in der schnellen Erfassung mehrerer Parameter einer großen Anzahl von Zellen oder Partikeln mit einer Zählrate von über 1000 Zellen pro Sekunde.

Für die Messung der Serumspiegel von IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-22 und TNF- $\alpha$  wurde der Reagenziensatz *Human TH1/Th2/Th9/TH17/Th22 13plex FlowCytomix* (Fa. eBioscience, Frankfurt) verwendet. Für die Messung von G-CSF, IL-8, MCP-1, MIG, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  sowie von IL-23 wurde das Kit *Human Chemokine 6plex FlowCytomix* in Kombination mit dem Reagenziensatz *Human IL-23 FlowCytomix* verwendet. Die Messung von sCD30, sIL-2R, VEGF, HGF und IP-10 erfolgte mittels eines individuell zusammengestellten Reagenziensatz (alle Fa. eBioscience, Frankfurt).

Als Durchflusszytometer wurde das Gerät *FACSCalibur* der Firma Becton-Dickinson, Heidelberg eingesetzt.



**Abbildung 2: Funktionsweise eines Durchflusszytometers**

Ein Laser erzeugt monochromatisches Licht, hier mit einer Wellenlänge von 488 nm. Durch eine Messküvette strömende Zellen und Partikel verändern den Lichtstrahl, dies kann mit Dioden (FSC und SSC) registriert werden. Von den Zellen ausgehenden Fluoreszenzsignale werden nach Trennung durch halbdurchlässige Spiegel und Filter in vier verschiedenen Kanälen (FL1–FL4) gemessen.

Eigene Darstellung.

### 2.2.2 Versuchsdurchführung

Die Messungen wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Zum Einsatz kamen mehrere Reagenziensätze, siehe dazu auch die Materialliste im Anhang. Zunächst wurden die Patientenproben, entweder Serum oder Plasma aus EDTA-Blut, aufgetaut, auf Raumtemperatur gebracht und mit dem Vortexmischer durchmischt.

Dann erfolgte die Pipettierung von Verdünnungsreihen, die später für die Erstellung von Standardkurven dienten. Dafür wurden die Standardlösungen aus den gefriergetrockneten Standards mit definierten Konzentrationen der zu messenden Zytokine nach Herstellerangaben mit *Aqua dest.* rekonstituiert. Danach wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  der verschiedenen Standardlösungen (je nach Anzahl der zu testenden Analyten) in einem Röhrchen zusammengeführt und mit *Assay Buffer* (PBS mit 10 % BSA, Bestandteil des Kits, Fa. eBioscience, Frankfurt) auf ein Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Dies entsprach einer Verdünnung von 1 zu 20. In sechs weitere Röhrchen wurden dann jeweils 100  $\mu\text{l}$  *Assay Buffer* vorgegeben. Aus dem ersten Röhrchen wurden dann 50  $\mu\text{l}$  Standardlösung in das zweite Röhrchen überführt. Der Inhalt des zweiten Röhrchens wurde gemischt und wiederum 50  $\mu\text{l}$  in das dritte Röhrchen überführt. Dies wurde für alle weiteren Röhrchen wiederholt und anschließend in gleicher Weise eine zweite Verdünnungsreihe hergestellt. Daraus resultieren folgende Verdünnungen: 1:20, 1:60, 1:180, 1:540, 1:1620, 1:4860 und 1:14580.

Danach wurden die im Kit enthaltenen fünf, sieben bzw. dreizehn verschiedene Lösungen der jeweiligen Mikropartikel zu einem Gemisch zusammengefügt. Für 48 zu messende Proben wurden jeweils 75  $\mu\text{l}$  der Mikropartikelösungen verwendet. Die Mischung der Mikropartikel wurde dann mit 525  $\mu\text{l}$  (für dreizehn Analyte); 975  $\mu\text{l}$  (für sieben Analyte) bzw. 1125  $\mu\text{l}$  (für fünf Analyte) *Reagent Dilution Buffer* (Bestandteil des Kits, Fa. eBioscience, Frankfurt) auf ein Gesamtvolumen von 1500  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Anschließend wurde die Mikropartikelmischung für fünf Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Danach wurde 1450  $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen, verworfen und die Mikropartikelmischung wieder mit *Reagent Dilution Buffer* aufgefüllt.

Zum Anfeuchten der Mikrofilter wurde die Hälfte der Mikrofilterplatte mit Folie abgeklebt und in die verbleibenden 48 Vertiefungen jeweils 50  $\mu\text{l}$  *Assay Buffer* pipettiert und mit einer Vakuumpumpe (Fa. eBioscience) abgesaugt. Danach wurde der Plattenboden gründlich mit einer saugfähigen Unterlage abgetupft, um die Flüssigkeit wieder vollständig zu entfernen.

## Patienten und Methoden

---

Anschließend wurden die Standardverdünnungsreihen sowie zwei Leerwerte mit je 25  $\mu\text{l}$  *Assay Buffer* in die ersten 16 Vertiefungen der Platte pipettiert. 25  $\mu\text{l}$  des unverdünnten Standards wurde in die nächste Vertiefung pipettiert.

Daraufhin wurden je 25  $\mu\text{l}$  der Patientenproben in die restlichen Vertiefungen pipettiert. Weiterhin wurden jeweils 25  $\mu\text{l}$  Mikropartikel-Mischung und jeweils 50  $\mu\text{l}$  Biotin-Konjugat in alle Vertiefungen gegeben. Die Vertiefungen wurden dann mit Folie verschlossen, die Mikrotiterplatte lichtgeschützt in Aluminiumfolie gewickelt und für zwei Stunden auf einem Rüttler bei 500 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur inkubiert.

Mit der Vakuumpumpe wurden die Vertiefungen dann abgesaugt und auf der Unterseite mit einem saugfähigen Tuch abgetupft. Zur Waschung wurde anschließend 100  $\mu\text{l}$  *Assay Buffer* in jede Vertiefung pipettiert und wiederum abgesaugt und abgetupft. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, dann erfolgte die Zugabe von jeweils 100  $\mu\text{l}$  *Assay Buffer* und 50  $\mu\text{l}$  Streptavidin-Phycoerythrin. Die Platte wurde wieder mit einer selbstklebenden Folie und mit Aluminiumfolie abgedeckt und so vor Licht geschützt.

Dann erfolgte eine erneute, einstündige Inkubation auf einem Rüttler bei 500 Umdrehungen pro Minute. Danach wurde der Waschschrift mit *Assay Buffer* wiederholt (siehe oben) und anschließend 200  $\mu\text{l}$  *Assay Buffer* in alle Vertiefungen gegeben.

Nun erfolgte die Überführung des Inhalts der Vertiefungen in beschriftete Plastikröhrchen. Diese wurden mit 300  $\mu\text{l}$  *Assay Buffer* auf 0,5 ml aufgefüllt und die Messung mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

Die Messung der PE-Emission erfolgte im Fluoreszenzkanal 2 (FL-2, Filter  $585 \pm 42$  nm) und die Messung der Fluoreszenz der Mikropartikel im Kanal 3 (FL-3, Langpassfilter 670 nm).

Vor Messung der Proben wurde das Durchflusszytometer entsprechend der Herstellervorschrift kalibriert. Dafür wurden spezielle Mikropartikel zur Geräteeinstellung (*Setup Beads*) des Herstellers verwendet. Zunächst wurden die Parameter des Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht so angepasst, dass beide Größen (4  $\mu\text{m}$  bzw. 5  $\mu\text{m}$ ) der Mikropartikel sichtbar waren. Für beide Größen wurde dann jeweils ein *Gate* angelegt. Die Fluoreszenzkanäle FL-3 und FL-2 wurden so angepasst, dass die Mikropartikel auf der linken Seite des *dot plot* abgebildet wurden. Die Kompensation zwischen FL-2 und FL-3 wurde schließlich so eingestellt, dass die Mikropartikel-Populationen waagrecht im *dot plot* dargestellt wurden.

Während der Messung wurde eine hohe Durchflussrate am Zytometer eingestellt und in jeder Probe bis zu 1500 Ereignisse erfasst.

Zur Datenerfassung kam die Software CellQuest Pro in der Version 4.0.2 (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) auf einem Apple Macintosh G4 zum Einsatz.

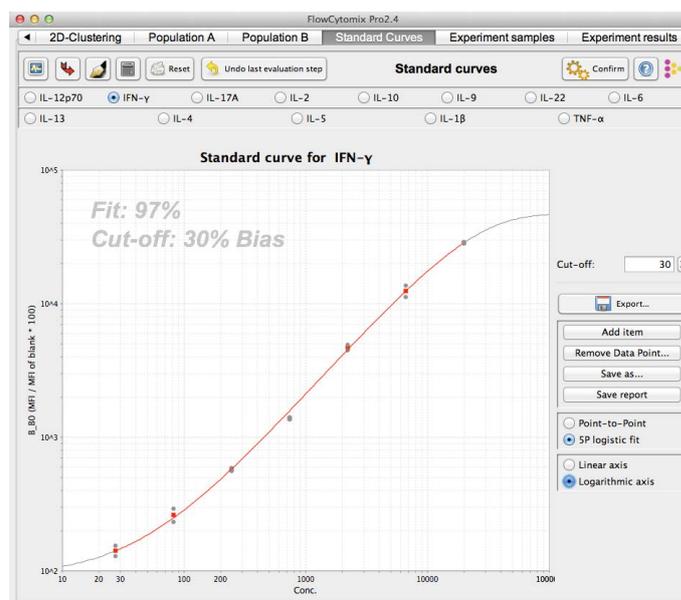
### 2.3 Datenauswertung und statistische Verfahren

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte zunächst mittels der Software FlowCytomix Pro (Version 2.4, Fa. eBioscience, Wien), um aus den aufgezeichneten Messwerten die Konzentrationen der Zytokine zu berechnen.

Dafür wurde aus den Standardverdünnungsreihen und den jeweiligen MFI-Werten eine Ausgleichskurve erzeugt, anhand derer anschließend aus einem gegebenen MFI-Wert die Konzentration berechnet werden konnte (siehe Abbildung 3).

Die Messergebnisse wurden unter Verwendung einer Microsoft Access-Datenbank zusammen mit weiteren Patientendaten pseudonymisiert erfasst. Die statistischen Analysen erfolgten vorrangig mittels der Software *SPSS Statistics* der Firma IBM in der Version 23. Ein Teil der grafischen und statistischen Auswertungen wurde mithilfe des frei verfügbaren Programmpakets R [165] erstellt.

Zunächst wurden die Messergebnisse hinsichtlich ihrer Verteilung untersucht. Dabei wurden die Ergebnisse mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Vergleiche zwischen Untergruppen wurden bei nicht-normalverteilten Messergebnissen anhand des Medians durchgeführt. Die Berechnung statistischer Signifikanzen erfolgte



**Abbildung 3: Datenauswertung mit FlowCytomix Pro**

Darstellung einer Standardkurve für Interferon- $\gamma$ . Aus den bekannten Konzentrationen der Verdünnungsreihe und den gemessenen MFI-Werten wurde eine Umrechnungskurve erstellt.

für unabhängige Stichproben mit Hilfe des robusten, nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test und des Mann-Whitney-U-Tests. Bei Vergleichen zwischen Subgruppen wurde das Signifikanzniveau mithilfe der Bonferroni-Korrektur für mehrfache Vergleiche angepasst [166]. Verbundene Stichproben wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest untersucht.

Korrelationen der Zytokinkonzentrationen untereinander wurden mittels Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten berechnet.

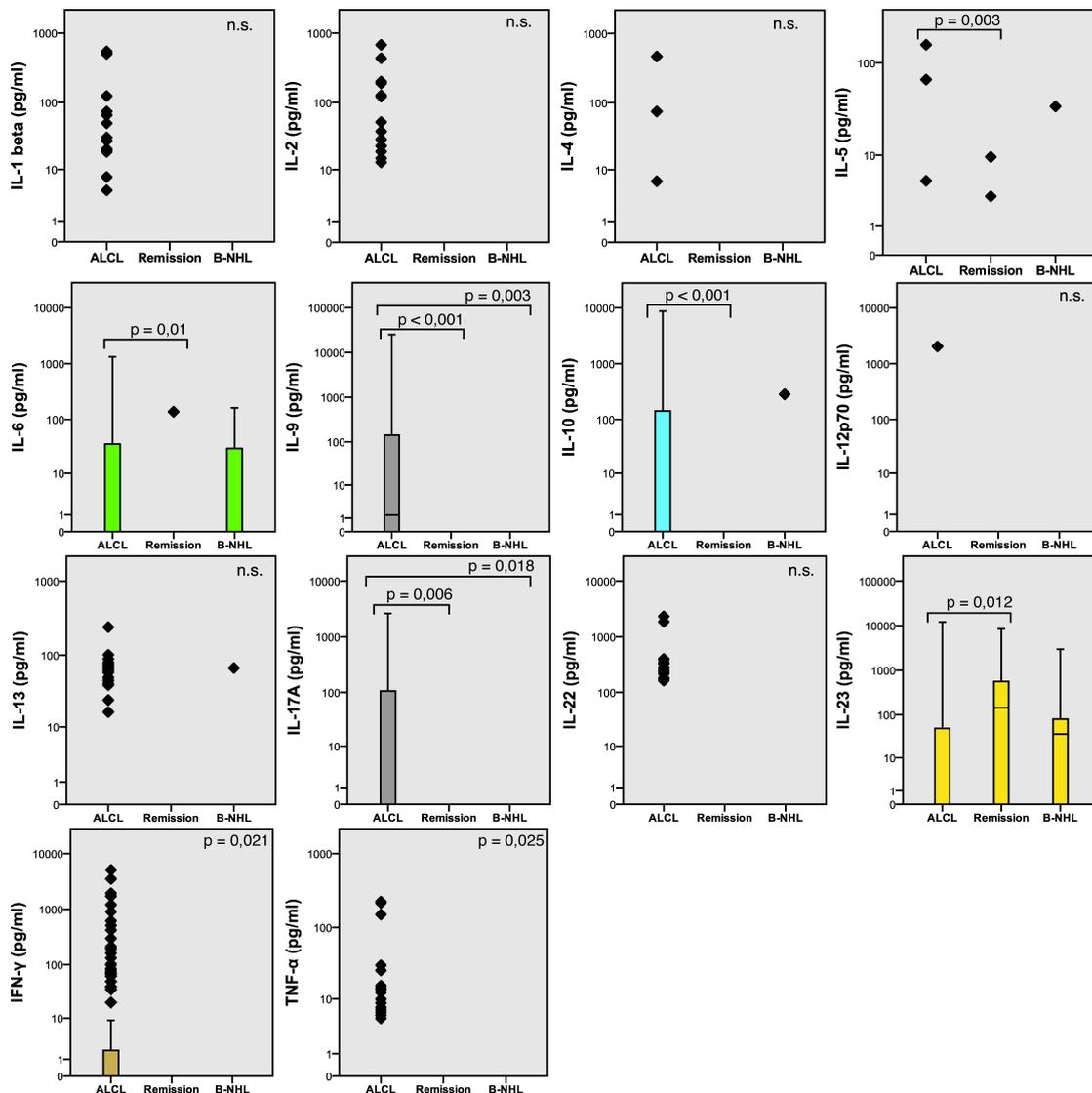
Zur Auswertung des Einflusses der gemessenen Zytokine auf das ereignisfreie Überleben (EFS) wurde das Schätzverfahren nach Kaplan-Meier [167] sowie eine Regressionsanalyse nach Cox [168] durchgeführt. Dabei wurden das ereignisfreie Überleben nach 36 Monaten und das 95 %-Konfidenzintervall für dieses angegeben. Der Vergleich zwischen verschiedenen Untergruppen erfolgte mittels des log-Rank-Tests.

Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $< 0,05$  angesehen. Wenn keine exakten Werte wiedergegeben werden, wurden im Folgenden p-Werte  $< 0,05$  mit einem Sternchen (\*), p-Werte  $< 0,01$  mit zwei Sternchen (\*\*) und p-Werte  $< 0,001$  mit drei Sternchen (\*\*\*) gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswertung einzelner Zytokine und löslicher Faktoren

Eine Übersicht über die Messergebnisse geben die Abbildung 4 (s. u.), Abbildung 6 (S. 33) sowie die Tabelle 3 (S. 38). Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse für die Zytokine, Chemokine und die löslichen Faktoren sIL-2R, sCD30, HGF und VEGF einzeln und im Vergleich zwischen den Patientengruppen dargestellt.



**Abbildung 4: Interleukine, TNF-α und IFN-γ bei ALCL-Patienten und Kontrollen**

Logarithmische Boxplot-Darstellung der gemessenen Zytokinkonzentrationen in pg/ml. Angabe des Medianes als Strich innerhalb der Box. Innerhalb der Balken befinden sich 50 % der Fälle. ALCL n = 119, Remission n = 15, B-NHL n = 11. Signifikanzniveaus nach Kruskal-Wallis, adjustiert für multiple Vergleiche zwischen den Patientengruppen.

### 3.1.1 Interleukin-1 $\beta$

Die Spiegel von Interleukin-1 $\beta$  lagen in der Gruppe der ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnoseerstellung in 14 von 119 Fällen (11,8 %) oberhalb der Nachweisgrenze. Der maximale Wert betrug zum Zeitpunkt der Diagnose 543,2 pg/ml. Bei den Kontrollen konnte Interleukin-1 $\beta$  nicht nachgewiesen werden. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant.

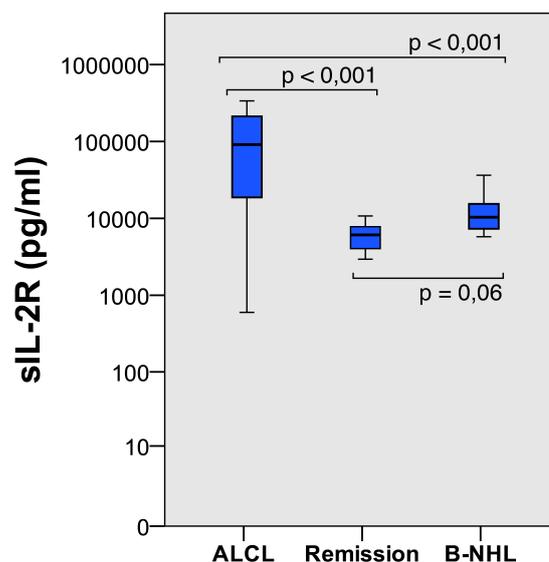
### 3.1.2 Interleukin-2

Interleukin-2 war bei 14 von 119 ALCL-Patienten (11,8 %) nachzuweisen. Bei den Kontrollen war Interleukin 2 nicht nachweisbar. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant.

Der maximale Spiegel von Interleukin-2 betrug 679,0 pg/ml zum Zeitpunkt der Diagnoseerstellung.

### 3.1.3 sIL-2R

Der lösliche Interleukin-2-Rezeptor war bei allen ALCL-Patienten nachzuweisen. Aufgrund der in einem Teilversuch niedrigeren oberen Grenze des Messbereichs waren die Spiegel bei 28 Patienten oberhalb des Bereichs. Für diese Messungen wurde in den folgenden Auswertungen der obere Wert des Messbereichs von 221870,0 pg/ml angenommen. Der mediane Wert von 119 Patienten lag bei 94163,8 pg/ml mit einem Bereich



**Abbildung 5: Der lösliche IL-2-Rezeptor**

Logarithmische Darstellung. Der mediane Spiegel des löslichen IL-2-Rezeptors lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung signifikant höher. Signifikanzniveaus nach Kruskal-Wallis, adjustiert für multiple Vergleiche zwischen den Patientengruppen. ALCL n = 119, Remission n = 15, B-NHL n = 11.

von 629,0–353044,8 pg/ml. In der Gruppe vor dem sechsten Chemotherapiekurs lag der mediane Wert bei 6399,7 pg/ml und bei den B-NHL-Patienten bei 10839,0 pg/ml. Damit lagen die Spiegel des sIL-2R bei den ALCL-Patienten signifikant ( $p < 0,001$ ) über denen der Kontrollgruppen, siehe Abbildung 5.

### 3.1.4 Interleukin-4

Interleukin-4 war lediglich bei drei ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose erhöht, bei den Kontrollen war es nicht nachzuweisen, dieser Unterschied war nicht signifikant. Der maximale Spiegel zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug 466,0 pg/ml.

### 3.1.5 Interleukin-5

Drei von 119 ALCL-Patienten (2,5 %) zeigten erhöhte Interleukin-5-Spiegel. In den Kontrollen vor dem sechsten Chemotherapie-Kurs waren bei 3 von 15 Patienten (20 %) erhöhte Interleukin-5-Spiegel nachweisbar. Bei den B-NHL-Patienten war Interleukin-5 bei 1 von 11 (9 %) Patienten nachzuweisen. Der Unterschied zwischen den ALCL-Patienten und den Kontrollen war signifikant ( $p = 0,012$ ).

### 3.1.6 Interleukin-6

Bei 56 von 119 ALCL-Patienten (47,1 %) lagen die Interleukin-6-Spiegel über der Nachweisgrenze. Der maximale IL-6-Spiegel lag bei 1326,6 pg/ml. Nur ein Patient zeigte vor dem sechsten Chemotherapie-Kurs einen erhöhten IL-6-Spiegel von 137,2 pg/ml. Von den 11 B-NHL-Patienten hatten 4 nachweisbare Interleukin-6-Spiegel.

Damit unterschied sich Interleukin-6 signifikant ( $p = 0,035$ ) zwischen den ALCL-Patienten initial und vor dem sechsten Kurs. Zwischen den IL-6-Spiegeln zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bestand zwischen ALCL-Patienten und Patienten mit einem B-NHL kein signifikanter Unterschied.

### 3.1.7 Interleukin-9

Interleukin-9 war bei 60 (50,4 %) der 119 ALCL-Patienten nachweisbar, bei der Vergleichsgruppe vor dem sechsten Chemotherapie-Kurs war es bei keinem der 15 Patienten nachweisbar. Auch bei den B-NHL-Patienten war Interleukin-9 nicht nachweisbar. Dieser Unterschied war signifikant ( $p < 0,001$ ). Der höchste IL-9-Spiegel betrug bei den ALCL-Patienten 25207,4 pg/ml.

### **3.1.8 Interleukin-10**

Interleukin-10 war bei 53 (44,5 %) der 119 ALCL-Patienten nachweisbar, bei der Vergleichsgruppe vor dem sechsten Chemotherapie-Kurs war es bei keinem der 15 Patienten nachweisbar. Bei einem der B-NHL-Patienten lag ein erhöhter Wert vor. Die Unterschiede zwischen den Patientengruppen waren signifikant ( $p = 0,001$ ). Der maximale IL-10-Spiegel betrug bei den ALCL-Patienten 8693,7 pg/ml.

### **3.1.9 Interleukin-12p70**

Interleukin-12p70 war lediglich bei einem ALCL-Patienten mit einem Spiegel von 2033,1 pg/ml nachzuweisen, in der Kontrolle war es bei keinem Patienten nachweisbar. Es bestanden damit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

### **3.1.10 Interleukin-13**

Interleukin-13 war bei 25 (21,0 %) der 119 ALCL-Patienten nachweisbar, bei der Vergleichsgruppe vor dem sechsten Chemotherapie-Kurs war es bei keinem der 15 Patienten nachweisbar. Bei den ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug der maximale Wert 239,6 pg/ml. Einer der Patienten mit einem reifzelligem B-NHL hatte einen erhöhten Interleukin-13-Wert von 66,95 pg/ml. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

### **3.1.11 Interleukin-17a**

Interleukin-17a war bei 43 (36,1 %) der 119 ALCL-Patienten mit einem maximalen Wert von 2623,3 pg/ml nachweisbar, bei den Kontrollgruppen vor dem sechsten Chemotherapie-Kurs und den B-NHL-Patienten war es bei keinem der 15 bzw. 11 Patienten nachweisbar. Die Unterschiede waren statistisch signifikant ( $p = 0,002$ ).

### **3.1.12 Interleukin-22**

Interleukin-22 war bei 17 (14,3 %) der 119 ALCL-Patienten mit einem maximalen Wert von 2322,5 pg/ml nachweisbar, bei den Vergleichsgruppen vor dem sechsten Kurs und den B-NHL-Patienten war es nicht nachweisbar. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

### **3.1.13 Interleukin-23**

Interleukin-23 lag bei 46 (38,7 %) der 119 ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oberhalb der Nachweisgrenze. Bei den Kontrollen vor dem sechsten Kurs lag es bei 9 von 15 Patienten (60 %) erhöht vor. Der Median betrug für die Patienten vor

dem sechsten Kurs 143,2 pg/ml. In der Gruppe der B-NHL-Patienten war Interleukin-23 bei 6 von 11 Patienten (54,5 %) nachweisbar und der mediane Spiegel lag bei 36,4 pg/ml. Damit lag ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,029$ ) zwischen den ALCL-Patienten und den Kontrollen vor, mit höheren Interleukin-23-Konzentrationen vor dem 6. Kurs und bei B-NHL-Patienten.

### **3.1.14 TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  war bei 28 (23,5 %) von 119 ALCL-Patienten mit einem maximalen Spiegel von 224,0 pg/ml nachzuweisen. Bei den Kontrollgruppen war TNF- $\alpha$  nicht nachzuweisen. Dieser Unterschied war signifikant ( $p = 0,025$ ).

### **3.1.15 Interferon- $\gamma$**

IFN- $\gamma$  war bei 29 (24,4 %) von 119 ALCL-Patienten mit einem maximalen Wert von 5068,1 pg/ml nachzuweisen, in der Gruppe vor dem sechsten Kurs war es nicht nachweisbar. Auch in der Kontrollgruppe der Patienten mit der Diagnose B-NHL war IFN- $\gamma$  nicht nachweisbar. Der Unterschied zwischen den Patientengruppen war signifikant ( $p = 0,021$ ).

### **3.1.16 Interleukin-8 / CXCL8**

Das Chemokin Interleukin-8, nach neuer Nomenklatur CXCL8, konnte bei 96 (80,7 %) der ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt vor dem sechsten Chemotherapie-Kurs lagen die Interleukin-8-Werte bei 13 von 15 Patienten über der Nachweisgrenze, ebenso bei 10 von 11 B-NHL-Patienten. Der Median betrug initial 49,5 pg/ml (Bereich 0–16580,9 pg/ml) und vor dem sechstem Kurs 41,0 pg/ml. Patienten mit einem B-NHL hatten einen medianen Spiegel von 34,3 pg/ml. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

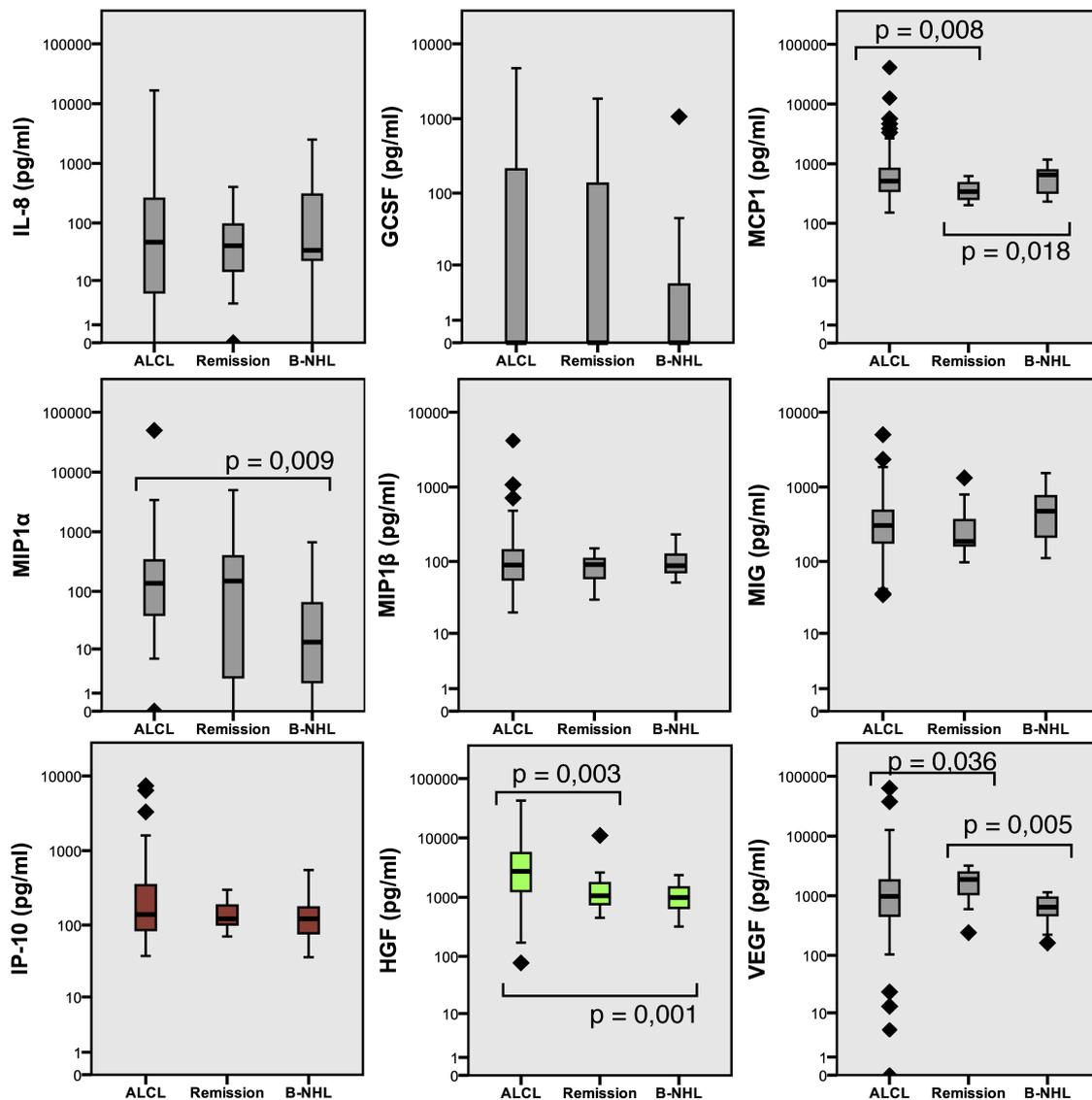
### **3.1.17 G-CSF**

G-CSF lag bei 51 von 119 (42,9 %) ALCL-Patienten über der Nachweisgrenze. Der maximale Spiegel lag bei 4731,4 pg/ml. Zum Zeitpunkt vor dem sechsten Kurs war es bei 7 von 15 (46,7 %) ALCL-Patienten sowie bei 3 von 11 B-NHL-Patienten nachzuweisen. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen.

## Ergebnisse

### 3.1.18 MCP-1 / CCL2

MCP-1 konnte bei allen ALCL-Patienten und allen Kontrollen nachgewiesen werden. Der Median lag dabei zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei 511,8 pg/ml, zum Zeitpunkt vor dem sechsten Kurs 340,2 pg/ml. Bei den Patienten mit der Diagnose „B-NHL“ lag der mediane Spiegel bei 653,6 pg/ml. Zwischen B-NHL-Patienten und ALCL-Patienten bestand kein signifikanter Unterschied. Die Werte der ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lagen signifikant über den Werten zum Zeitpunkt vor dem sechsten Chemotherapiekurs ( $p = 0,024$ ).



**Abbildung 6: Chemokine im Vergleich zwischen den Patientengruppen**

Logarithmische Darstellung der Messwerte der Chemokine IL-8, G-CSF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 sowie der Wachstumsfaktoren VEGF und HGF im Vergleich zwischen den Patientengruppen. Signifikanzniveaus nach Kruskal-Wallis, adjustiert für multiple Vergleiche zwischen den Patientengruppen. ALCL n = 119, Remission n = 15, B-NHL n = 11.

### 3.1.19 MIP-1 $\alpha$ / CCL3

MIP-1 $\alpha$  lag bei 110 von 119 (92,4 %) initialen ALCL-Patienten erhöht vor, mit einem maximalen Spiegel von 49650,4 pg/ml. In der Gruppe vor dem sechsten Kurs konnte es bei 11 von 15 (73,3 %) nachgewiesen werden. Die Mediane betragen 136,3 pg/ml bzw. 149,4 pg/ml für die ALCL-Patienten zum Diagnosezeitpunkt bzw. vor dem sechsten Kurs. Die B-NHL-Patienten hatten einen medianen Spiegel von 13,3 pg/ml. Damit lagen die Werte der ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung signifikant ( $p = 0,038$ ) über denen der B-NHL-Patienten, zwischen den ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und vor dem 6. Kurs bestand kein signifikanter Unterschied.

### 3.1.20 MIP-1 $\beta$ / CCL4

MIP-1 $\beta$  konnte bei allen ALCL-Patienten, auch in der Gruppe vor dem sechsten Kurs, nachgewiesen werden. Die Mediane betragen 89,7 pg/ml bzw. 90,5 pg/ml für die ALCL-Patienten zum Diagnosezeitpunkt bzw. vor dem sechsten Kurs. B-NHL-Patienten hatten einen medianen MIP-1 $\beta$ -Spiegel von 87,6 pg/ml. Damit bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

### 3.1.21 MIG / CXCL9

MIG konnte bei allen ALCL-Patienten, auch zum Zeitpunkt vor dem sechsten Kurs, nachgewiesen werden. Die ALCL-Patienten hatten zum Diagnosezeitpunkt einen medianen MIG-Spiegel von 299,0 pg/ml, zum Zeitpunkt vor dem sechsten Kurs 186,1 pg/ml und die B-NHL-Patienten 472,6 pg/ml. Damit bestand zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied.

### 3.1.22 IP-10 / CXCL10

IP-10 konnte bei allen Kontrollen und 118 ALCL-Patienten nachgewiesen werden. Der mediane Spiegel von IP-10 betrug bei den ALCL-Patienten 138,1 pg/ml. Damit bestand kein signifikanter Unterschied zu der Patientengruppe vor dem sechsten Kurs mit einem Median von 120,8 pg/ml bzw. den B-NHL-Patienten mit einem medianen IP-10-Spiegel von 121,2 pg/ml.

### 3.1.23 HGF

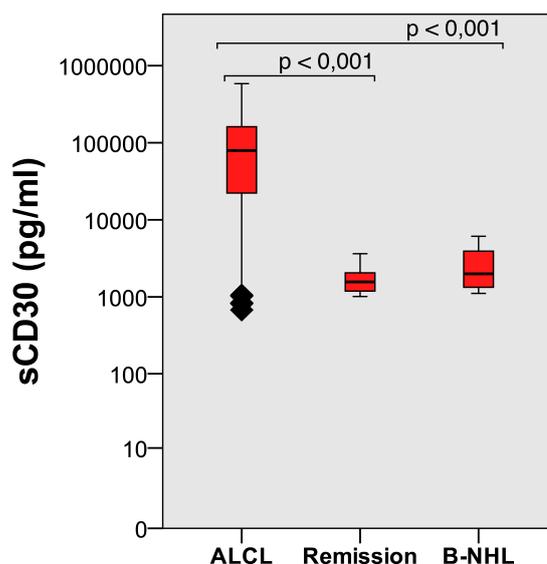
HGF war bei allen ALCL-Patienten nachzuweisen. Der Bereich lag zwischen 77,5 pg/ml und 42569,8 pg/ml mit einem medianen Wert von 2716,8 pg/ml. Dies lag signifikant ( $p < 0,001$ ) über den Spiegeln der Patienten vor dem sechsten Kurs (Median 1061,9 pg/ml) und den B-NHL-Patienten (Median 989,4 pg/ml).

### 3.1.24 VEGF

Der Spiegel des VEGF lag bei den ALCL-Patienten im Median bei 979,7 pg/ml mit einem Bereich von 0–63031,2 pg/ml. In der Gruppe vor dem sechsten Chemotherapiekurs lag der mediane Wert bei 1870,5 pg/ml und damit signifikant höher als bei den B-NHL-Patienten mit einem medianen Spiegel von 644,0 pg/ml ( $p = 0,020$ ).

### 3.1.25 sCD30

Der Spiegel des löslichen CD30 lag bei den ALCL-Patienten im Median bei 79788,9 pg/ml. Es lag damit signifikant ( $p < 0,001$ ) über den Werten der Patienten vor dem sechsten Kurs mit einem Median von 1568,7 pg/ml bzw. den Werten bei B-NHL-Patienten mit einem Wert von 1993,1 pg/ml. Die Verteilung der Messergebnisse ist in Abbildung 7 dargestellt.

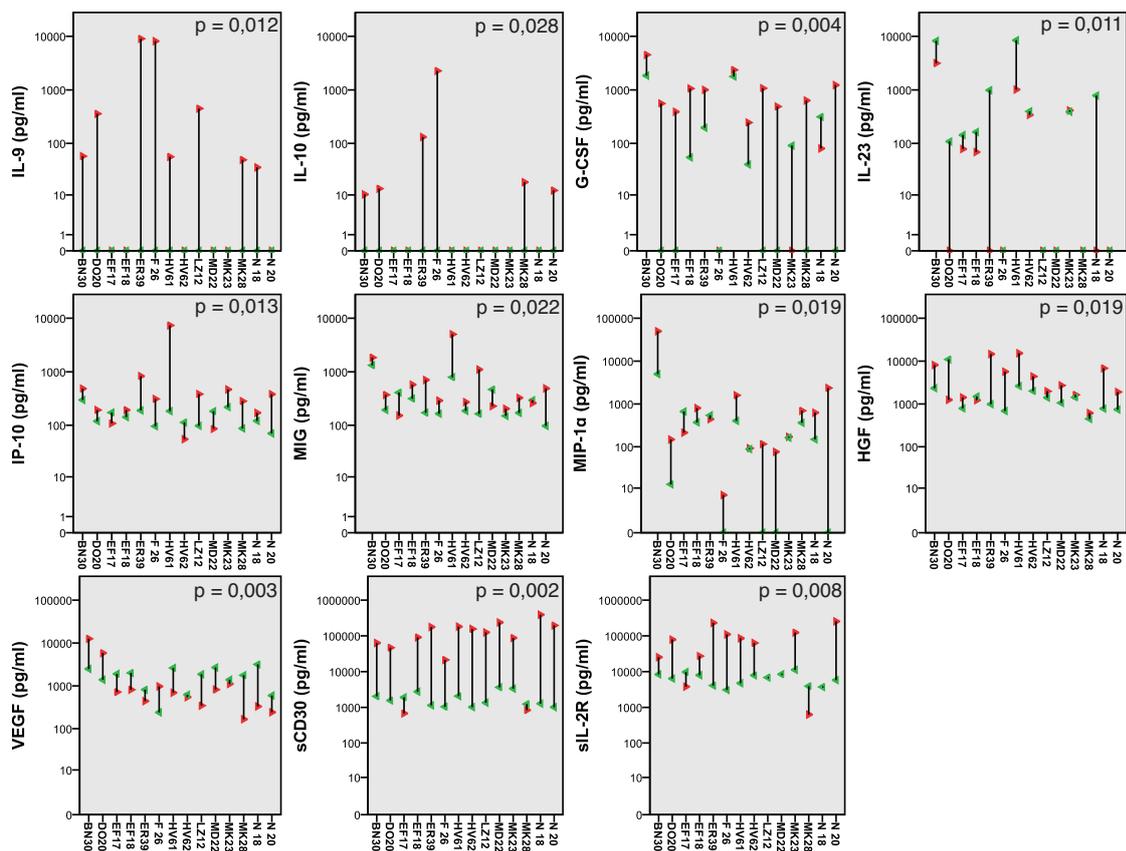


**Abbildung 7: CD30 im Vergleich zwischen den Patientengruppen**

Logarithmische Darstellung der CD30-Spiegel im Vergleich zwischen den Patientengruppen. Signifikanzniveaus nach Kruskal-Wallis, adjustiert für multiple Vergleiche zwischen den Patientengruppen. ALCL  $n = 119$ , Remission  $n = 15$ , B-NHL  $n = 11$ .

## 3.2 Zytokinspiegel vor dem 6. Chemotherapiekurs

In der Auswertung der Zytokinspiegel der 14 Patienten, zu denen Material sowohl zum Zeitpunkt der Diagnosestellung als auch vor dem 6. Kurs vorlag, unterschieden sich die Spiegel von IL-9, IL-10, IL-23, IP-10, MIG, MIP-1  $\alpha$ , HGF, VEGF, G-CSF, sIL-2R und sCD30 signifikant. Die Interleukin-23-Spiegel lagen vor dem 6. Kurs signifikant höher als zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Die Veränderungen der Spiegel sind in Abbildung 8 dargestellt. Bei den Patienten EF17 und MK28 lagen die Spiegel von sIL-2R und sCD30 zum Zeitpunkt der Diagnosestellung unter denen in Remission.



**Abbildung 8: Zytokinspiegel zur Diagnosestellung und in Remission**

Logarithmische Darstellung der Zytokinspiegel zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (rotes Dreieck mit Spitze nach rechts) sowie in Remission vor dem 6. Chemotherapiekurs (grünes Dreieck mit Spitze nach links). Nur Zytokine mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Zeitpunkten sind dargestellt. Bei sIL-2R lagen von 3 Patienten nur Spiegel zum Zeitpunkt der Remission vor. Angabe der p-Werte gemäß Wilcoxon-Rang-Vorzeichentest.

### 3.3 Einfluss der Lagerdauer

Die Proben wurden bis zur Messung der Zytokinspiegel teilweise über mehrere Jahre bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im Median betrug die Lagerdauer 5,8 Jahre, der Zeitraum erstreckte sich von 14,8 Jahre bis 3 Monate. Um mögliche Einflüsse der Lagerdauer zu erfassen, erfolgte eine Korrelationsauswertung zwischen Lagerdauer und den Zytokinspiegeln. Zwischen den Spiegeln der Zytokine TNF- $\alpha$  ( $r = 0,462$ ,  $p < 0,001$ ), IL-13 ( $r = 0,577$ ,  $p < 0,001$ ) und IL-22 ( $r = 0,504$ ,  $p < 0,001$ ) und der Lagerdauer der Blutproben bestand eine direkte Korrelation, in länger gelagerten Proben lagen höhere Konzentrationen dieser Zytokine vor. Für GCSF ( $r = 0,578$ ,  $p < 0,001$ ) bestand eine inverse Korrelation.

**Tabelle 3: Übersicht der Messergebnisse**

Die Tabelle zeigt die Anzahl der Patienten bei denen das jeweilige Zytokin oder der lösliche Faktor nachweisbar war, den medianen Spiegel und den Bereich der Messergebnisse.

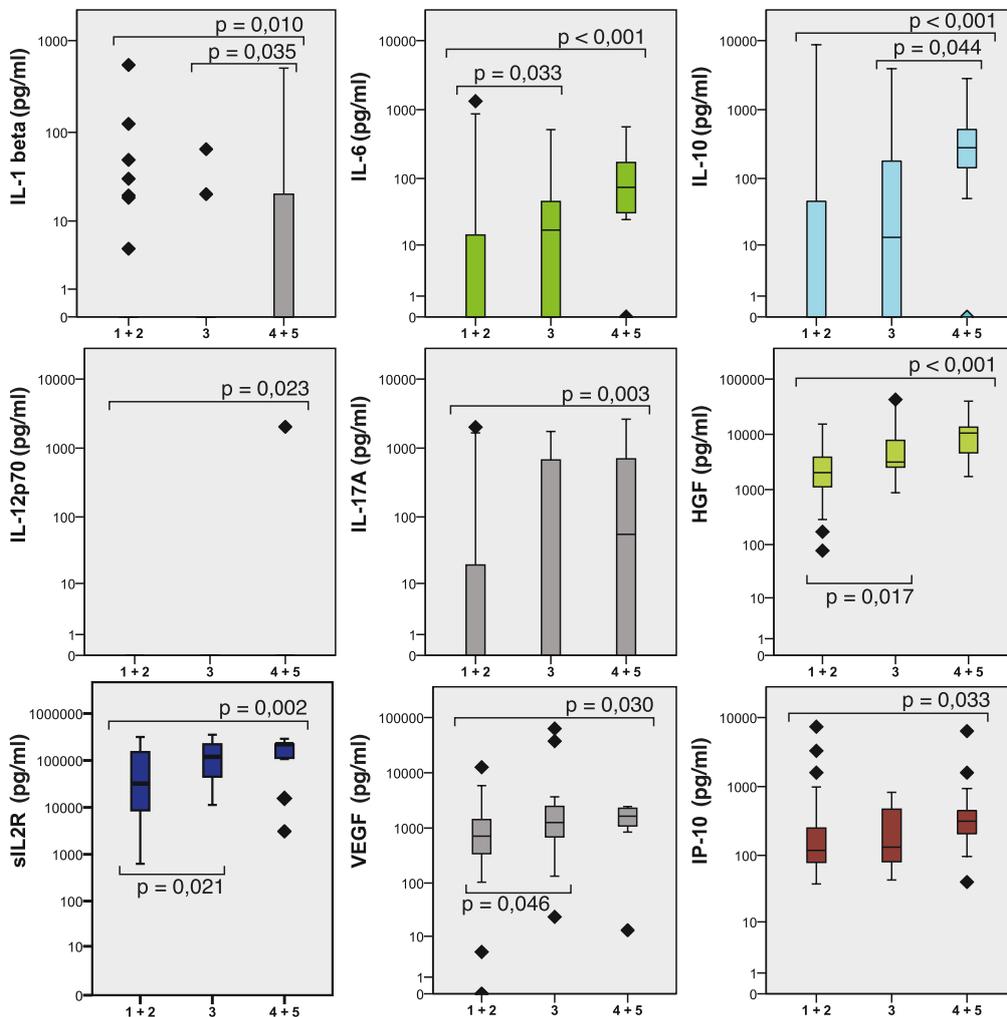
|              | ALCL (n = 119) |                |                 | ALCL vor dem 6. Kurs (n = 15) |                |                 | B-NHL (n = 11) |                |                 |
|--------------|----------------|----------------|-----------------|-------------------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
|              | Nachweisbar    | Median [pg/ml] | Bereich [pg/ml] | Nachweisbar                   | Median [pg/ml] | Bereich [pg/ml] | Nachweisbar    | Median [pg/ml] | Bereich [pg/ml] |
| IL-1 $\beta$ | 14 (11,8 %)    | 0              | 0–543,1         | –                             | –              | –               | –              | –              | –               |
| IL-2         | 14 (11,8 %)    | 0              | 0–679,0         | –                             | –              | –               | –              | –              | –               |
| sIL-2R       | 119 (100 %)    | 94163,8        | 629,0–353044,8  | 15 (100 %)                    | 6399,6         | 3088,3–11250,1  | 11 (100 %)     | 10839,0        | 6041,6–38131,0  |
| IL-4         | 3 (2,5 %)      | 0              | 0–466,0         | –                             | –              | –               | –              | –              | –               |
| IL-5         | 3 (2,5 %)      | 0              | 0–155,3         | 3 (20 %)                      | 0              | 0–9,6           | 1 (9 %)        | 0              | 0–34,5          |
| IL-6         | 56 (47,1 %)    | 0              | 0–1326,6        | 1 (7 %)                       | 0              | 0–137,3         | 4 (36,4 %)     | 0              | 0–161,5         |
| IL-9         | 60 (50,4 %)    | 4,5            | 0–25207,4       | –                             | –              | –               | –              | –              | –               |
| IL-10        | 53 (44,5 %)    | 0              | 0–8693,7        | –                             | –              | –               | 1 (9 %)        | 0              | 0–283,1         |
| IL-12p70     | 1 (0,8 %)      | 0              | 0–2033,1        | –                             | –              | –               | –              | –              | –               |
| IL-13        | 25 (21,0 %)    | 0              | 0–239,6         | –                             | –              | –               | 1 (9 %)        | 0              | 0–67,0          |
| IL-17a       | 43 (36,1 %)    | 0              | 0–2623,3        | –                             | –              | –               | –              | –              | –               |
| IL-22        | 17 (14,3 %)    | 0              | 0–2322,5        | –                             | –              | –               | –              | –              | –               |
| IL-23        | 46 (38,7 %)    | 0              | 0–12102,7       | 9 (60 %)                      | 143,2          | 0–8450,0        | 6 (54,5 %)     | 36,4           | 0–2970,6        |

|                | ALCL (n = 119) |                |                 |  | ALCL vor dem 6. Kurs (n = 15) |                |                 |  | B-NHL (n = 11) |                |                 |  |
|----------------|----------------|----------------|-----------------|--|-------------------------------|----------------|-----------------|--|----------------|----------------|-----------------|--|
|                | Nachweisbar    | Median [pg/ml] | Bereich [pg/ml] |  | Nachweisbar                   | Median [pg/ml] | Bereich [pg/ml] |  | Nachweisbar    | Median [pg/ml] | Bereich [pg/ml] |  |
| TNF- $\alpha$  | 28 (23,5 %)    | 0              | 0–224,0         |  | –                             | –              | –               |  | –              | –              | –               |  |
| IFN- $\gamma$  | 29 (24,4 %)    | 0              | 0–5068,1        |  | –                             | –              | –               |  | –              | –              | –               |  |
| HGF            | 119 (100 %)    | 2716,8         | 77,5–42569,8    |  | 15 (100 %)                    | 1061,9         | 449,4–10965,3   |  | 11 (100 %)     | 989,4          | 0–2358,4        |  |
| IL-8           | 96 (80,7 %)    | 49,5           | 0–16580,9       |  | 13 (86,7 %)                   | 41,0           | 0–402,3         |  | 13 (87 %)      | 34,3           | 0–2495,7        |  |
| MIG            | 119 (100 %)    | 299,1          | 35,1–5010,9     |  | 15 (100 %)                    | 186,1          | 97,2–1322,8     |  | 11 (100 %)     | 472,6          | 111,1–1528,6    |  |
| G-CSF          | 51 (42,9 %)    | 0              | 0–4731,4        |  | 7 (46,7 %)                    | 0              | 0–1847,4        |  | 3 (27,3 %)     | 0              | 0–1061,9        |  |
| MIP-1 $\alpha$ | 110 (92,4 %)   | 139,3          | 0–49650,4       |  | 11 (73,3 %)                   | 149,4          | 0–4983,0        |  | 8 (72,8 %)     | 13,3           | 0–668,3         |  |
| MIP-1 $\beta$  | 119 (100 %)    | 89,7           | 20,0–4174,6     |  | 15 (100 %)                    | 90,5           | 30,0–150,3      |  | 11 (100 %)     | 87,6           | 51,7–230,2      |  |
| MCP-1          | 119 (100 %)    | 511,8          | 151,8–40720,0   |  | 15 (100 %)                    | 340,2          | 201,9–622,4     |  | 11 (100 %)     | 653,7          | 231,0–1175,6    |  |
| IP-10          | 118/118        | 138,1          | 37,9–7357,4     |  | 15 (100 %)                    | 120,8          | 70,1–298,3      |  | 11 (100 %)     | 121,2          | 36,5–548,0      |  |
| sCD30          | 119 (100 %)    | 79788,9        | 678,6–584894,4  |  | 15 (100 %)                    | 1568,7         | 1012,7–3639,2   |  | 11 (100 %)     | 1993,1         | 1111,1–6117,3   |  |
| VEGF           | 117 (98,3 %)   | 979,7          | 0–63031,2       |  | 15 (100 %)                    | 1870,5         | 240,9–3182,2    |  | 11 (100 %)     | 644            | 161,3–1144,5    |  |

### 3.4 Zusammenhang der Zytokine mit klinischen und biologischen Parametern

#### 3.4.1 Alter und Geschlecht

Die gemessenen Zytokinspiegel unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Geschlechtern. Die medianen Spiegel von IL-17a (1,1 pg/ml vs. 0 pg/ml,  $p = 0,008$ ) und MIP-1 $\alpha$  (251,5 pg/ml vs. 101,7 pg/ml,  $p = 0,041$ ) waren in der Altersgruppe von 1 bis 9 Jahren höher als bei den Patienten älter als 9 Jahre.



**Abbildung 9: Zytokinspiegel in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand**

Der Allgemeinzustand ist in folgenden Kategorien dargestellt: 1 - keine Einschränkung (n = 29), 2 - leichte Einschränkung (n = 52), 3 - erhebliche Einschränkung (n = 24), 4 - bettlägerig (12), 5 - schwerkrank (n = 2). Logarithmische Darstellung in pg/ml. Signifikanzniveaus nach Kruskal-Wallis, adjustiert für multiple Vergleiche zwischen den Patientengruppen.

### 3.4.2 Allgemeinzustand

Der Allgemeinzustand der ALCL-Patienten wurde in fünf Abstufungen von „normaler Aktivität“ bis „schwerstkrank“ dokumentiert. Dabei befanden sich 81 Patienten (68,1 %) in den Kategorien mit keiner oder leichter Beeinträchtigung, 24 (20,2 %) mit starker Beeinträchtigung und 14 (11,8 %) in den Kategorien „bettlägerig“ sowie „schwerstkrank“, die für die Auswertung zusammengefasst wurden.

Die gemessenen Spiegel von IL-1 $\beta$ \*\*<sup>†</sup>, IL-6\*\*\*, IL-10\*\*\*, IL-17a\*\*<sup>†</sup>, HGF\*\*\*, sIL-2R\*\*\*, VEGF\*, CD30\*, IFN- $\gamma$ \* und IP-10\* lagen bei Patienten mit einem schlechteren Allgemeinzustand signifikant höher. Der Zusammenhang zwischen den Zytokinspiegeln und dem Allgemeinzustand ist in Abbildung 9 (S. 40) dargestellt.

### 3.4.3 B-Symptome

Die B-Symptome der Patienten wurden getrennt nach Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust erfasst. Zur Auswertung wurden Patienten, bei denen mindestens ein B-Symptom vorlag, mit Patienten ohne B-Symptomen verglichen. Bei 63 (52,9 %) Patienten lagen ein oder mehrere B-Symptome vor.

Bei Patienten mit B-Symptomen waren die Blutspiegel von IL-6 (Median ohne B-Symptome 0 pg/ml vs. 14,9 pg/ml bei den Patienten mit B-Symptomen;  $p = 0,001$ ), IL-10 (Median 0 pg/ml vs. 37,4 pg/ml;  $p < 0,001$ ), IFN- $\gamma$  (bei 31,7 % der Patienten mit B-Symptomen oberhalb der Nachweisgrenze, bei Patienten ohne B-Symptome in 16,1 % nachweisbar,  $p = 0,040$ ), MIG (Median 272,3 pg/ml vs. 342,8 pg/ml;  $p = 0,046$ ), HGF (Median 2013,3 pg/ml vs. 3086,7 pg/ml;  $p = 0,002$ ), dem löslichen IL-2-Rezeptor (Median 28242,1 pg/ml vs. 145441,8 pg/ml;  $p < 0,001$ ), sCD30 (35553,0 pg/ml vs. 121979,7 pg/ml;  $p = 0,002$ ) und IP-10 (115,5 pg/ml vs. 187,2 pg/ml;  $p = 0,008$ ) signifikant höher als bei Patienten ohne B-Symptomatik.

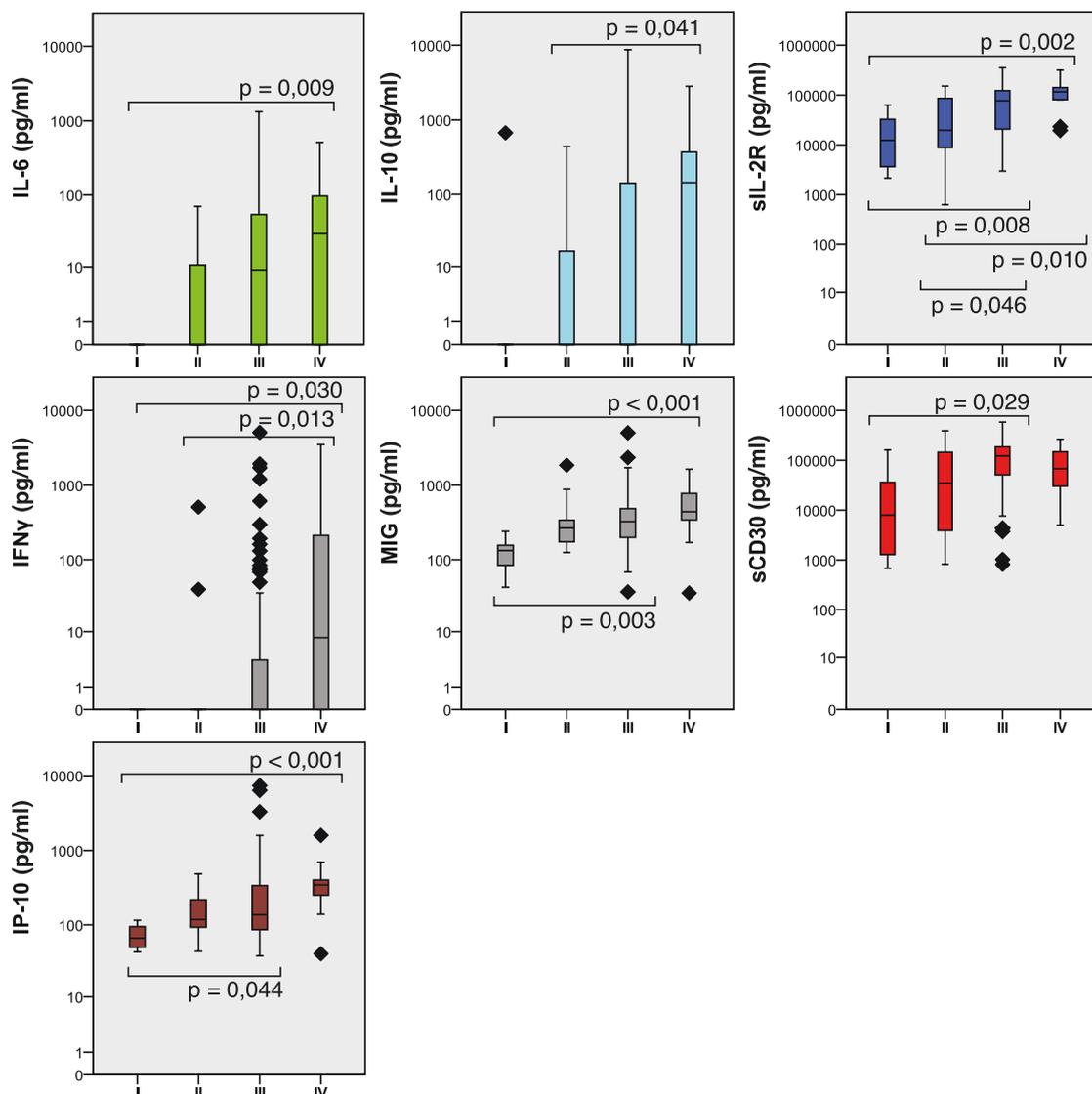
Bei den Patienten mit B-Symptomen hatten 39 von 63 (60,3 %) Interleukin-6-Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze, bei der Gruppe ohne B-Symptome 18 von 56 (32,1 %).

Der mediane Spiegel von G-CSF war in der Gruppe der Patienten mit vorhandenen B-Symptomen geringer (38,0 pg/ml vs. 0 pg/ml;  $p = 0,035$ ).

## 3.4.4 Stadium

Von 116 Patienten lagen Daten bezüglich des Stadium gemäß St. Jude vor. Mit einem höherem klinischen Stadium gingen signifikant erhöhte Werte von IL-6 ( $p = 0,003$ ), IL-10 ( $p = 0,027$ ), IFN- $\gamma$  ( $p = 0,012$ ), MIG ( $p = 0,001$ ), sCD30 ( $p = 0,008$ ), IP-10 ( $p = 0,001$ ) sowie des löslichen Interleukin-2-Rezeptors ( $p < 0,001$ ) einher, siehe Abbildung 10.

Bei Zusammenfassung der Stadien I und II ( $n = 28$ ) sowie von III und IV ( $n = 88$ ) betrug der mediane IL-6-Spiegel 0 pg/ml bzw. 13,7 pg/ml in bei den Patienten mit den Stadien I und II bzw. den Stadien III und IV. Die medianen Spiegel von IL-10 betragen 0 pg/ml bzw. 6,2 pg/ml und von MIG 259,1 pg/ml bzw. 344,3 pg/ml.



**Abbildung 10: IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  und MIG nach Stadium (St. Jude)**

Mit höherem klinischen Stadium (I  $n = 8$ ; II  $n = 20$ ; III  $n = 71$ ; IV  $n = 17$ ) wurden signifikant höhere Messwerte von IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  und MIG gemessen. Logarithmische Darstellung.

Signifikanzniveaus nach Kruskal-Wallis, adjustiert für multiple Vergleiche zwischen den Patientengruppen.

### 3.4.5 Organbeteiligung

Bei 59 (49,6%) Patienten lag eine Beteiligung des Mediastinums vor. Die medianen Werte von IL-6 (0 pg/ml vs. 14,3 pg/ml;  $p = 0,003$ ), IL-10 (0 pg/ml vs. 17,6 pg/ml;  $p = 0,039$ ), MIG (406,8 pg/ml vs. 256,3 pg/ml;  $p = 0,003$ ), HGF (3111,9 pg/ml vs. 2080,2 pg/ml;  $p = 0,008$ ), IP-10 (188,3 pg/ml vs. 115,6 pg/ml;  $p = 0,018$  und des löslichen Interleukin-2-Rezeptors (130878,5 pg/ml vs. 49264,7 pg/ml;  $p < 0,001$ ) lagen bei Patienten mit einer Mediastinalbeteiligung signifikant höher.

Eine Viszeralbeteiligung, die als Einbeziehung von Leber, Milz oder Lunge definiert wurde [39], lag bei 39 (32,7 %) der ALCL-Patienten vor.

In der Gruppe der Patienten mit Viszeralbeteiligung lagen die Spiegel von IL-6 (18,6 pg/ml vs. 0 pg/ml;  $p = 0,017$ ), TNF- $\alpha$  ( $p = 0,013$ ), sIL-2R (123934,9 pg/ml vs. 69053,1 pg/ml;  $p = 0,011$ ) und IP-10 (192,8 pg/ml vs. 116,6 pg/ml;  $p = 0,011$ ) signifikant höher als bei Patienten ohne Viszeralbeteiligung. Die medianen Spiegel von GCSF waren bei Patienten ohne Viszeralbeteiligung geringfügig höher (0,6 pg/ml vs. 0 pg/ml;  $p = 0,048$ ).

Eine Hautbeteiligung lag bei 30 (25,2 %) der ALCL-Patienten vor. Die Spiegel von IL-1 $\beta$  (26,7 % vs. 6,5 % oberhalb der Nachweisgrenze,  $p = 0,002$ ), IL-2 (26,7 % vs. 6,7 % oberhalb der Nachweisgrenze,  $p = 0,003$ ) sowie von IP-10 (282,7 pg/ml vs. 117,7 pg/ml;  $p = 0,026$ ) lagen bei den Patienten mit Hautbefall signifikant höher als bei Patienten ohne eine Hautbeteiligung.

### 3.4.6 Befall des ZNS

2 von 117 darauf untersuchten Patienten hatten einen nachgewiesenen ZNS-Befall. Bei 4 Patienten wurde ein zytomorphologisch fraglicher Befall festgestellt, davon wurden 1 Patient als ZNS-positiv behandelt. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Zytokinpiegel in Abhängigkeit von einem ZNS-Befall erheben. Bei beiden Patienten mit nachgewiesenem ZNS-Befall waren die IL-6-Spiegel mit 170,9 pg/ml bzw. 513,5 pg/ml und die IL-17a-Spiegel mit 2623,3 pg/ml bzw. 1468,3 pg/ml deutlich erhöht (jeweils > 90. Perzentile).

### 3.4.7 Befall des Knochenmarks

Von 119 ALCL-Patienten hatten 16 eine Infiltration des Knochenmarks, definiert als einen zytomorphologischen Nachweis von Blasten. Bei diesen Patienten lagen die medianen Spiegel von IL-6 (30,1 pg/ml vs. 0 pg/ml;  $p = 0,011$ ), IL-10 (236,5 pg/ml vs. 0 pg/ml;  $p = 0,003$ ), IL-13 (43,8 % vs. 17,5 % oberhalb der Nachweisgrenze,  $p = 0,013$ ), IL-17a

(26,2 pg/ml vs. 0 pg/ml;  $p = 0,044$ ), TNF-alpha (3,7 pg/ml vs. 0 pg/ml;  $p = 0,005$ ), IFN- $\gamma$  (8,2 pg/ml vs. 0 pg/ml;  $p = 0,002$ ), IP-10 (343,9 pg/ml vs. 118,3 pg/ml;  $p = 0,002$ ), MIG (441,0 pg/ml vs. 276,4 pg/ml;  $p = 0,006$ ) und sIL-2R (190649,2 pg/ml vs. 82290,2 pg/ml;  $p = 0,010$ ) signifikant höher als bei den Patienten ohne Knochenmarkbefall.

### 3.4.8 Histologie

Für die Auswertung der Histologie wurden Patienten mit einem „common“-Subtyp mit Patienten der anderen Subtypen („non-common“) verglichen. Von 92 Patienten lag ein den aktuellen Kriterien entsprechender histologischer Befund vor, 54 Patienten (58,7 %) hatten einen „common“-Subtyp.

Die medianen Spiegel von IL-6 (14,3 pg/ml vs. 0 pg/ml,  $p = 0,029$ ) und der Anteil der nachweisbaren Spiegel von IL-17a (17/38 vs. 13/54;  $p = 0,020$ ) lagen bei den Patienten mit einer „non-common“-Histologie signifikant über denen einer „common“-Histologie.

### 3.4.9 Laktatdehydrogenase

Bei 65 Patienten lag ein LDH-Wert vom Zeitpunkt der Diagnosestellung vor. Dieser lag bei 44 (67,7 %) über der Grenze von 240 U/l. Patienten mit einem erhöhten Wert hatten signifikant höhere Spiegel von MIG\*\*. Details sind in Tabelle 4 (S. 45) dargestellt.

### 3.4.10 C-reaktives Protein

Das CRP lag bei 64 (59,3 %) von 103 ALCL-Patienten mit vorliegendem CRP-Wert über 4 mg/l. In der Gruppe der Patienten mit einem erhöhten CRP lagen die Spiegel von IL-1\*, des löslichen IL-2-Rezeptors\*\*, Interleukin-6\*\*\*, Interleukin-17a\*\*\*, MCP-1\*, HGF\* und sCD30\* signifikant höher. Details sind in Tabelle 4 (S. 45) dargestellt.

### 3.4.11 Leukozytose

Bei 47 der 119 (39,5 %) ALCL-Patienten lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Leukozytose, hier als  $> 10\,000$  Leukozyten/ $\mu$ l definiert, vor. Zwei Patienten wiesen Leukozytenzahlen über  $100\,000$  Leukozyten/ $\mu$ l auf.

Bei Patienten mit einer Leukozytose lagen die Werte von IL-1 $\beta$ \*, IL-6\*, IL-17a\*\*\* und HGF\*\* signifikant über denen der Patienten ohne Leukozytose. Details sind in Tabelle 4 (S. 45) dargestellt.

## Ergebnisse

**Tabelle 4: Zytokine nach Leukozytose, CRP und LDH**

Dargestellt sind die medianen Zytokinspiegel in pg/ml der ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung gemäß Leukozytenzahl, CRP und LDH. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck gekennzeichnet und entsprechende p-Werte angegeben.

|  | Leukozytose<br>(> 10 000 / $\mu$ l) |               |         | CRP<br>(> 4 mg/l) |                 |         | LDH<br>(> 240 U/l) |              |       |
|--|-------------------------------------|---------------|---------|-------------------|-----------------|---------|--------------------|--------------|-------|
|  | nein                                | ja            | p       | nein              | ja              | p       | nein               | ja           | p     |
|  | n = 72                              | n = 47        |         | n = 39            | n = 64          |         | n = 21             | n = 44       |       |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> <sup>1</sup> | 0                                   | 0             | 0,043   | 0                 | 0               | 0,02    | 0                  | 0            |       |
| <b>IL-2</b>                                | 0                                   | 0             |         | 0                 | 0               |         | 0                  | 0            |       |
| <b>IL-4</b>                                | 0                                   | 0             |         | 0                 | 0               |         | 0                  | 0            |       |
| <b>IL-5</b>                                | 0                                   | 0             |         | 0                 | 0               |         | 0                  | 0            |       |
| <b>IL-6</b>                                | 0                                   | <b>14,9</b>   | 0,01    | 0                 | <b>15,2</b>     | < 0,001 | 0                  | 4,5          |       |
| <b>IL-9</b>                                | 2,2                                 | 5,1           |         | 19,8              | 2,2             |         | 35,0               | 0            |       |
| <b>IL-10</b>                               | 0                                   | 10,3          |         | 0                 | 6,6             |         | 0                  | 0            |       |
| <b>IL-12p70</b>                            | 0                                   | 0             |         | 0                 | 0               |         | 0                  | 0            |       |
| <b>IL-13</b>                               | 0                                   | 0             |         | 0                 | 0               |         | 0                  | 0            |       |
| <b>IL-17A</b> <sup>2</sup>                 | 0                                   | <b>69,3</b>   | < 0,001 | 0                 | 0               | < 0,001 | 0                  | 0            |       |
| <b>IL-22</b>                               | 0                                   | 0             |         | 0                 | 0               |         | 0                  | 0            |       |
| <b>IL-23</b>                               | 0                                   | 0             |         | 0                 | 0               |         | 0                  | 0            |       |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b>              | 0                                   | 0             |         | 0                 | 0               |         | 0                  | 0            |       |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b>             | 0                                   | 0             |         | 0                 | 0               |         | 0                  | 0            |       |
| <b>MIP-1<math>\alpha</math></b>            | 126,1                               | 158,3         |         | 116,2             | 134,4           |         | 154,8              | 156,6        |       |
| <b>MIP-1<math>\beta</math></b>             | 94,8                                | 85,7          |         | 100,9             | 85,4            |         | 82,7               | 98,2         |       |
| <b>MCP-1</b>                               | 487,5                               | 530,9         |         | <b>386,7</b>      | <b>551,9</b>    | 0,047   | 373,9              | 505,7        |       |
| <b>IL-8</b>                                | 50,9                                | 41,6          |         | 49,5              | 49,5            |         | 32,4               | 77,8         |       |
| <b>G-CSF</b>                               | 0                                   | 0             |         | 0                 | 0               |         | 0                  | 20,5         |       |
| <b>MIG</b>                                 | 341,1                               | 276,7         |         | 276,6             | 333,5           |         | <b>242,8</b>       | <b>374,9</b> | 0,001 |
| <b>HGF</b>                                 | <b>2184,7</b>                       | <b>3636,6</b> | 0,003   | <b>2368,5</b>     | <b>3111,9</b>   | 0,013   | 3189,3             | 2836,1       |       |
| <b>sIL-2R</b>                              | 95534,4                             | 85983,0       |         | <b>78842,3</b>    | <b>125883,3</b> | 0,003   | 56253,5            | 124855,9     |       |
| <b>VEGF</b>                                | 873,1                               | 1278,0        |         | 904,5             | 1239,0          |         | 1340,2             | 1046,6       |       |
| <b>sCD30</b>                               | 81300,3                             | 79788,9       |         | <b>63367,9</b>    | <b>123590,3</b> | 0,03    | 105926,9           | 126644,9     |       |
| <b>IP-10</b>                               | 136,9                               | 153,7         |         | 128,3             | 183,8           |         | 153,7              | 218,5        |       |

<sup>1</sup> Bei IL-1 $\beta$  bestand in Bezug auf die Leukozytenzahl kein Unterschied der medianen Spiegel. Bei Patienten mit einer Leukozytose lagen 9/47 oberhalb der Nachweisgrenze, bei Patienten ohne Leukozytose nur 5/72. Bei Patienten mit einem erhöhten CRP lag IL-1 $\beta$  bei 8/64 oberhalb der Nachweisgrenze, bei Patienten ohne erhöhtes CRP bei keinem.

<sup>2</sup> Bei IL-17a bestand in Bezug auf den CRP-Spiegel kein Unterschied der medianen Spiegel. Bei Patienten mit erhöhtem CRP lagen 31/64 oberhalb der Nachweisgrenze, bei Patienten ohne erhöhtem CRP nur 5/39.

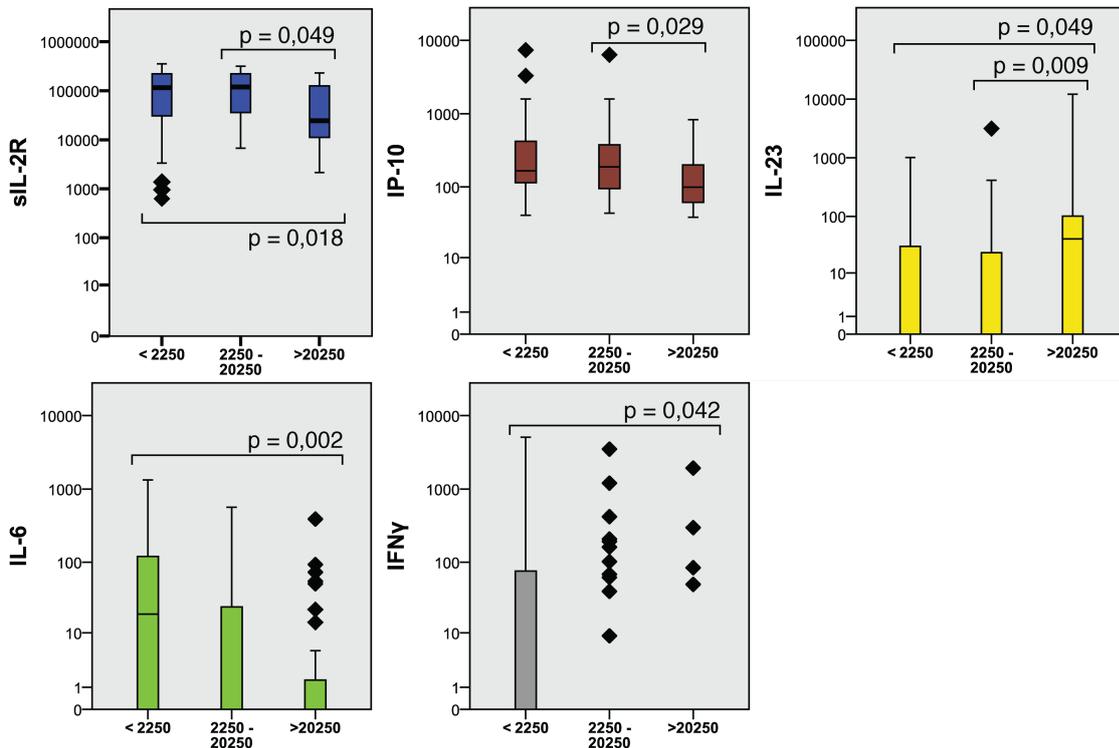
### 3.4.12 Anti-ALK-Antikörpertiter

Von den eingeschlossenen Patienten lag der anti-ALK-Titer zum Zeitpunkt der Diagnostik vor. Dieser wurde in drei Kategorien ( $< 1/2250$ ,  $n = 36$ ;  $1/2250-1/20250$ ,  $n = 51$ ;  $> 1/20250$ ,  $n = 32$ ) eingeteilt.

Signifikant unterschieden sich dabei die medianen Spiegel des löslichen Interleukin-2-Rezeptors\*, sowie von IL-6\*\*, IL-23\*, IFN- $\gamma$ \* und IP-10\* im Vergleich zwischen den Titergruppen.

Der mediane Spiegel des löslichen Interleukin-2-Rezeptors betrug 123 358,1 pg/ml bei einem Titer  $< 1/2250$  verglichen mit 117 545,2 pg/ml bei einem Titer im Bereich von  $1/2250-1/20250$  und 24 559,7 pg/ml bei einem Titer  $> 1/20250$  ( $p = 0,014$ ). Einen Überblick gibt die Abbildung 11.

Der mediane Wert von IL-6 betrug in der Kategorie mit geringem anti-ALK-Titer von  $< 1/2250$  19,5 pg/ml und bei Patienten mit einem höheren Titer 0 pg/ml. Dieser Unterschied war mit  $p = 0,002$  signifikant.



**Abbildung 11: sIL-2R, IL-6, IFN- $\gamma$ , IP-10 und IL-23 in Abhängigkeit vom anti-ALK-Titer**

Logarithmische Darstellung der Zytokinspiegel in Abhängigkeit vom anti-ALK-Titer, eingeteilt in drei Kategorien ( $< 1/2250$ ,  $n = 36$ ;  $1/2250-1/20250$ ,  $n = 51$ ;  $> 1/20250$ ,  $n = 32$ ). Die Spiegel von sIL-2R, IL-6, IFN- $\gamma$  und IP-10 sind bei höheren Titern geringer. IL-23 hat in der Gruppe mit dem höchsten Titer den höchsten medianen Spiegel.

Auch die medianen Spiegel von Interferon- $\gamma$  und IP-10 waren in der Gruppe mit dem höchsten Titer signifikant niedriger. IP-10 hatte einen medianen Spiegel von 165,9 pg/ml bei einem Titer von  $< 1/2250$ , einen Spiegel von 187,8 pg/ml bei einem Titer zwischen  $1/2250$  und  $1/20250$  und einen Spiegel von 99,5 pg/ml bei einem Titer  $> 1/20250$  ( $p = 0,021$ ).

Für IL-23 stellte sich der Zusammenhang umgekehrt da. In den Kategorien mit niedrigerem anti-ALK-Titer ( $\leq 1/20250$ ) betrug der mediane IL-23-Spiegel 0 pg/ml, während die Patienten mit einem Titer  $> 1/20250$  einen medianen Spiegel von 40,7 pg/ml hatten ( $p = 0,009$ ). Der Spiegel des löslichen CD30 korrelierte nicht signifikant mit dem anti-ALK-Titer.

Um mögliche Muster von erhöhten Zytokinen in Abhängigkeit des anti-ALK-Titers zu erkennen, erfolgte der Vergleich mit den Kontrollpatienten.

Im Vergleich der ALCL-Patienten mit der jeweils höchsten ( $> 1/20250$ ,  $n = 32$ ) bzw. niedrigsten Titerstufe ( $< 1/2250$ ,  $n = 36$ ) einerseits und der Kontrollgruppe andererseits waren die Spiegel der Zytokine und löslichen Faktoren IL-9, IL-10, IL-17a, TNF- $\alpha$ , sIL-2R und sCD30 in beiden Titergruppen erhöht gegenüber den Kontrollpatienten.

In der Gruppe der niedrigen anti-ALK-Titern waren außerdem die Spiegel von IL-5, IL-6, IFN- $\gamma$  sowie VEGF erhöht und der Spiegel von IL-23 erniedrigt. In der Gruppe der hohen anti-ALK-Titern lagen die Spiegel von IL-1 $\beta$ , IL-2 und IL-13 erhöht vor.

### 3.4.13 Minimal disseminierte Erkrankung

Ein positiver PCR-Befund mit Nachweis von NPM-ALK-mRNA im Knochenmark oder peripheren Blut wurde als Merkmal der minimalen disseminierten Erkrankung (MDD) gewertet [40, 41]. Von 98 daraufhin untersuchten ALCL-Patienten hatten 44 (45,4 %) einen positiven Knochenmarks-PCR-Befund. Im peripheren Blut hatten 40 von 78 (51,3 %) ALCL-Patienten einen positiven PCR-Befund. Bei 55 von 101 (54,5 %) Patienten lag im Blut oder im Knochenmark (oder in beidem) ein positiver PCR-Befund vor.

Bei den Patienten mit mindestens einem positiven PCR-Befund lagen die medianen Werte von IL-6, IL-10, IL17a, MCP-1, HGF, sCD30, IP-10 und des löslichen IL-2-Rezeptors signifikant höher als in der Gruppe ohne positiven Befund. Einen Überblick gibt die Tabelle 5 (S. 48).

Die medianen Konzentrationen von G-CSF (48,1 pg/ml vs. 0 pg/ml\*) und MIP-1 $\alpha$  (214,2 pg/ml vs. 106,6 pg/ml\*) lagen bei den Patienten mit negativem PCR-Befund höher als bei einem positiven Befund.

## Ergebnisse

Von 97 ALCL-Patienten lag der Befund einer quantitativen PCR aus dem Knochenmark und bei 77 aus dem peripheren Blut in Form einer anhand des ABL-Gens normalisierten Kopienanzahl (*normalized copy number, NCN*) vor. Als Grenzwert wurden 10 Kopien festgelegt [40]. Dabei hatten 20 (20,6 %) Patienten im Knochenmark eine Kopienzahl oberhalb dieser Grenze, 23 (29,8 %) Patienten lagen in den Messungen im peripheren Blut oberhalb dieser Grenze.

Es lag damit von 100 Patienten ein Befund der quantitativen PCR vor, dabei hatten 29 (29,0 %) eine normalisierte Kopienzahl größer als 10 im Blut oder Knochenmark.

Bei Patienten mit einem NCN > 10 im Knochenmark oder im Blut lagen die medianen Spiegel von sIL-2R (159 426,4 pg/ml vs. 30 087,6 pg/ml;  $p < 0,001$ ), IL-6 (20,6 pg/ml vs. 0 pg/ml;  $p = 0,006$ ), IL-10 (37,4 pg/ml vs. 0 pg/ml;  $p = 0,001$ ), IFN- $\gamma$  (9,02 pg/ml vs. 0 pg/ml;  $p = 0,001$ ) und von IP-10 (272,9 pg/ml vs. 108,3 pg/ml;  $p = 0,003$ ) signifikant höher als bei Patienten mit 10 oder weniger normalisierten Kopien.

Bei Interleukin-8 verhielt es sich umgekehrt; Patienten mit einem NCN > 10 im Knochenmark oder Blut hatten mit 52,6 pg/ml einen niedrigeren medianen Spiegel als Patienten mit einem NCN  $\leq 10$ , die einen medianen Spiegel von 75,0 pg/ml hatten ( $p = 0,048$ ).

### Tabelle 5: Zytokine in Abhängigkeit von der MDD

Vergleich der medianen Zytokinspiegel mit signifikanten Unterschieden in Abhängigkeit von der MDD (definiert als positiver PCR-Befund im Knochenmark oder Blut).

|                | PCR positiv    | PCR negativ   | p-Wert      |
|----------------|----------------|---------------|-------------|
|                | n = 55         | n = 46        |             |
| IL-6           | 20,6 pg/ml     | 0 pg/ml       | $p = 0,001$ |
| IL-10          | 37,4           | 0 pg/ml       | $p < 0,001$ |
| MCP-1          | 588,8 pg/ml    | 383,8 pg/ml   | $p = 0,008$ |
| HGF            | 3877,2 pg/ml   | 2101,1 pg/ml  | $p = 0,002$ |
| sCD30          | 137449,2 pg/ml | 51781,1 pg/ml | $p = 0,001$ |
| IP-10          | 272,9 pg/ml    | 108,3 pg/ml   | $p < 0,001$ |
| sIL-2R         | 159428,4 pg/ml | 30087,6 pg/ml | $p < 0,001$ |
| G-CSF          | 0 pg/ml        | 48,1 pg/ml    | $p = 0,041$ |
| MIP-1 $\alpha$ | 106,6 pg/ml    | 214,2 pg/ml   | $p = 0,042$ |

### 3.4.14 Kombinierte biologische Risikofaktoren

In folgender Auswertung wurden die ALCL-Patientin nach der MDD und dem Anti-ALK-Antikörpertiter nach den publizierten biologischen Risikogruppen gruppiert [44]: Patienten mit einem hohen Risiko (bHR, anti-ALK-Titer  $\leq 1/750$  und MDD pos.), Patienten mit einem niedrigen Risiko (bLR, anti-ALK-Titer  $> 1/750$  und MDD neg.) und die übrigen

## Ergebnisse

Patienten mit einem mittleren Risiko (bIR). Nach dieser Einteilung hatten 32 Patienten ein niedriges, 52 Patienten ein mittleres und 17 Patienten ein hohes Risiko. Von 18 Patienten lag kein MDD-Befund vor. Mit höherem Risiko hatten die Patienten signifikant höhere Spiegel von IL-6<sup>\*\*\*</sup>, IL-10<sup>\*\*\*</sup>, MCP-1<sup>\*</sup>, MIG<sup>\*</sup>, sIL-2R<sup>\*\*</sup>, sCD30<sup>\*</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>\*\*</sup>, IP-10<sup>\*\*</sup> und HGF<sup>\*</sup>. Die Spiegel von IL-23<sup>\*</sup> waren in der Gruppe mit dem niedrigsten Risiko am höchsten. In Tabelle 6 sind die medianen Zytokinspiegel nach den Risikogruppen aufgeführt.

**Tabelle 6: Zytokine in Abhängigkeit von der biologischen Risikostratifizierung**

Vergleich der medianen Zytokinspiegel mit signifikanten Unterschieden in Abhängigkeit von der biologischen Risikostratifizierung, Definition siehe Text und vgl. Mussolin et al., 2013 [44]. bLR – niedriges biologisches Risiko, bIR – mittlere biologisches Risiko, bHR – hohes biologisches Risiko. sCD30 und sIL-2R zeigten lediglich einen Trend und waren nicht signifikant unterschiedlich.

|                                | <b>bLR</b>    | <b>bIR</b>     | <b>bHR</b>     | <b>p-Werte</b> |
|--------------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
|                                | n = 32        | n = 52         | n = 17         |                |
| <b>IL-6</b>                    | 0 pg/ml       | 14,1 pg/ml     | 53,1 pg/ml     | p < 0,001      |
| <b>IL-10</b>                   | 0 pg/ml       | 0 pg/ml        | 291,8 pg/ml    | p < 0,001      |
| <b>IL-23</b>                   | 42,2 pg/ml    | 0 pg/ml        | 0 pg/ml        | p = 0,021      |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | 0 pg/ml       | 0 pg/ml        | 7,4 pg/ml      | p = 0,008      |
| <b>MCP-1</b>                   | 367,4 pg/ml   | 581,1 pg/ml    | 530,9 pg/ml    | p = 0,027      |
| <b>MIG</b>                     | 220,6 pg/ml   | 326,3 pg/ml    | 386,5 pg/ml    | p = 0,041      |
| <b>sCD30</b>                   | 58451,3 pg/ml | 125857,4 pg/ml | 137449,2 pg/ml | p = 0,015      |
| <b>sIL-2R</b>                  | 28242,1 pg/ml | 115044,3 pg/ml | 221870,0 pg/ml | p = 0,001      |
| <b>IP-10</b>                   | 98,1 pg/ml    | 203,5 pg/ml    | 241,8 pg/ml    | p = 0,001      |
| <b>HGF</b>                     | 2101,1 pg/ml  | 3061,5 pg/ml   | 4306,8 pg/ml   | p = 0,016      |

### 3.5 Auswertung nach Rezidivhäufigkeit und Überleben

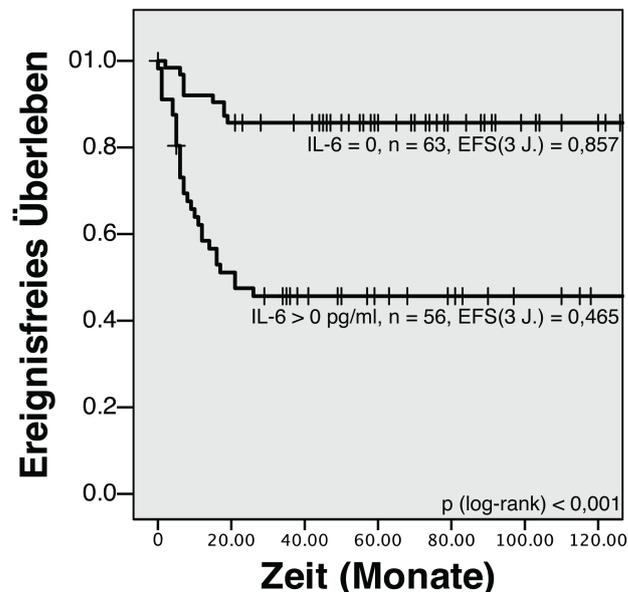
Bei Patienten, die später ein Rezidiv erlitten, waren die prätherapeutischen Spiegel von IL-6 ( $p < 0,001$ ), IL-10 ( $p < 0,001$ ), IL-17a ( $p = 0,018$ ), IFN- $\gamma$  ( $p = 0,002$ ), MCP-1 ( $p = 0,009$ ), HGF ( $p = 0,008$ ), sCD30 ( $p = 0,005$ ), IP-10 ( $p = 0,003$ ) sowie des löslichen IL-2-Rezeptors ( $p = 0,001$ ) im Vergleich zu denen ohne Rezidiv signifikant erhöht.

#### 3.5.1 Univariate Analyse in Bezug auf das ereignisfreie Überleben

Das ereignisfreie Überleben 3 Jahre nach Diagnosestellung betrug für alle ALCL-Patienten 67,6 % (95 %-Konfidenzintervall 59,6 % – 76,6 %).

In einer univariaten Auswertung war die ereignisfreie 3-Jahresüberlebensrate bei Patienten mit Zytokinspiegeln von IL-6, IL-10, IL-17a, IFN- $\gamma$  oberhalb der Nachweisgrenze signifikant niedriger als bei Patienten ohne nachweisbare Spiegel dieser Zytokine. Dies galt auch für Spiegel oberhalb des Medians von MCP-1, HGF und sIL-2R. Ein Trend zeigte sich für TNF- $\alpha$ , MIG, sCD30 und G-CSF, wobei höhere Werte von G-CSF allerdings mit einer höheren 3-Jahres EFS einhergingen.

Tabelle 7 zeigt die Überlebensraten nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der Zytokinpiegel. In Abbildung 12 ist die Überlebenskurve für ALCL-Patienten in Abhängigkeit von Interleukin-6 exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 12: Ereignisfreies Überleben abhängig von IL-6**

Darstellung des kumulierten ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit von Interleukin-6. Die obere Kurve zeigt dabei Patienten mit nicht nachweisbarem IL-6; die untere Patienten mit einem IL-6 oberhalb der Nachweisgrenze. Kreuze geben zensierte Daten wieder.

## Ergebnisse

**Tabelle 7: Ereignisfreies 3-Jahresüberleben in Abhängigkeit vom Zytokinspiegel**

Dargestellt ist das ereignisfreie Überleben 3 Jahre nach Diagnosestellung nach der Methode von Kaplan-Meier und das dazugehörige 95 %-Konfidenzintervall. Für IL-6, IL-10, IL-17a, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  erfolgte der Vergleich zwischen Patienten mit bzw. ohne Nachweis des entsprechenden Zytokins. Für MCP-1, HGF, sIL-2R, IP10, G-CSF und MIG wurde der Vergleich zwischen Zytokinspiegeln unter- bzw. oberhalb des Medians dieser Zytokine durchgeführt.

| Zyto-kin      | nicht nachweisbar / unterhalb des Medians |        |               | oberhalb der Nachweisgrenze / des Medians |        |               | p-Wert   |
|---------------|---|--------|---------------|---|--------|---------------|----------|
|               | n   | EFS    | 95 %-KI       | n   | EFS    | 95 %-KI       | log-rank |
| IL-6          | 63  | 85,7 % | 77,5 %–94,8 % | 56  | 46,5 % | 35,0 %–61,9 % | < 0,001  |
| IL-10         | 75  | 81,1 % | 72,7 %–90,5 % | 45  | 43,2 % | 30,8 %–60,6 % | < 0,001  |
| IL-17a        | 82  | 74,4 % | 65,5 %–84,4 % | 38  | 50,4 % | 36,5 %–69,7 % | 0,002    |
| IFN- $\gamma$ | 90  | 75,5 % | 67,1 %–85,0 % | 30  | 39,9 % | 25,3 %–62,9 % | < 0,001  |
| MCP-1         | 60  | 80,0 % | 70,5 %–90,8 % | 60  | 53,5 % | 42,1 %–68,0 % | 0,004    |
| HGF           | 60  | 80,0 % | 70,5 %–90,8 % | 60  | 53,7 % | 42,3 %–68,2 % | 0,002    |
| sIL-2R        | 60  | 81,4 % | 72,0 %–91,9 % | 60  | 52,4 % | 41,1 %–66,9 % | < 0,001  |
| IP10          | 60  | 78,3 % | 68,6 %–89,5 % | 59  | 54,5 % | 43,0 %–69,1 % | 0,006    |
| TNF- $\alpha$ | 92  | 71,4 % | 62,7 %–81,4 % | 28  | 52,1 % | 36,3 %–74,8 % | 0,065    |
| G-CSF         | 69  | 59,8 % | 49,2 %–72,8 % | 51  | 76,5 % | 65,7 %–89,1 % | 0,084    |
| MIG           | 60  | 74,6 % | 64,3 %–86,6 % | 60  | 59,4 % | 48,0 %–73,3 % | 0,096    |
| sCD30         | 60  | 75,0 % | 64,8 %–86,8 % | 60  | 58,7 % | 47,2 %–72,8 % | 0,075    |

### 3.5.2 Multivariate Analyse in Bezug auf das ereignisfreie Überleben

Die Zytokine, die in der univariaten Analyse einen signifikanten Zusammenhang mit dem ereignisfreien Überleben zeigten, wurden anschließend zunächst jeweils einzeln zusammen mit den beschriebenen Risikofaktoren in einer Regressionsanalyse nach COX ausgewertet.

Die beschriebenen Risikofaktoren (MDD, anti-ALK-Antikörpertiter und die klinische Risikoeinteilung der Studien NHL-BFM 95 und ALCL 99) waren auch in der vorliegenden Patientenauswahl signifikante prognostische Parameter, siehe Tabelle 8. Die Histologie („common“ vs. „non-common“) hatte in dieser Auswertung keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben.

## Ergebnisse

**Tabelle 8: Hazard Ratio nach Cox-Regressionsanalyse**

Die Tabelle zeigt die Hazard Ratios der aufgeführten Parameter in Bezug auf das ereignisfreie Überleben. MDD - minimal disseminated disease.

| Parameter                                       | Hazard Ratio | 95 %-Konfidenzintervall | p-Wert  |
|---|--------------|-------------------------|---------|
| anti-ALK-Titer $\leq$ 750                       | 4,1          | 1,9–8,6                 | < 0,001 |
| MDD (PCR positiv)                               | 7,7          | 2,8–21,0                | < 0,001 |
| Klinische Risikozuordnung<br>(HR bzw. Gruppe 3) | 5,0          | 1,2–16,8                | 0,009   |
| IL-6 (nachweisbar)                              | 3,7          | 1,5–8,8                 | 0,004   |

In multivariaten Auswertungen der Zytokine jeweils zusammen mit dem Vorliegen einer minimalen disseminierten Erkrankung (definiert als positive Knochenmark- oder Blut-PCR), dem anti-ALK-Titer sowie der klinischen Risikozuordnung, behielten nur noch IL-6 (Hazard Ratio (HR) = 3,7;  $p = 0,004$ ) und HGF (HR = 2,6;  $p = 0,025$ ) einen signifikanten Einfluss auf das ereignisfreie Überleben.

In einer schrittweisen multivariaten Auswertung der Zytokine und den genannten Parametern behielt schließlich nur IL-6 mit einer Hazard Ratio von 3,7 (95 %-Konfidenzintervall von 1,5 bis 8,8) als einziges Zytokin einen signifikanten, unabhängigen Einfluss auf das Überleben. Die Überlebenskurve in Abhängigkeit von IL-6 ist in Abbildung 12 dargestellt.

### 3.6 Korrelationen der Zytokinspiegel untereinander

Um mögliche Zusammenhänge und Wechselwirkungen verschiedener Zytokine erkennen zu können, wurden Korrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Im Folgenden werden nur signifikante Korrelationen mit einem Koeffizienten  $> 0,4$  aufgeführt. Folgende Korrelationskoeffizienten ergaben sich für die ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung:

IL-1 $\beta$  korreliert mit TNF- $\alpha$  ( $r = 0,562^{***}$ ) und IL-13 ( $r = 0,426^{***}$ ), TNF- $\alpha$  außerdem mit IL-13 ( $r = 0,466^{***}$ ) sowie IL-22 ( $r = 0,479^{***}$ ). IL-4 korreliert mit IL-5 ( $r = 0,658^{***}$ ) sowie mit IL-12p70 ( $r = 0,582^{***}$ ). IL-5 korreliert ebenfalls mit IL-12p70 ( $r = 0,572^{***}$ ). IL-6 korreliert mit IL-10 ( $r = 0,512^{***}$ ), IL-17a ( $r = 0,525^{***}$ ), IFN- $\gamma$  ( $r = 0,411^{***}$ ), MCP-1 ( $r = 0,489^{***}$ ) und HGF ( $r = 0,560^{***}$ ). IL-8 korreliert mit MIP-1 $\beta$  ( $r = 0,569^{***}$ ). IL-10 korrelierte außerdem mit HGF ( $r = 0,437^{***}$ ), sIL-2R ( $r = 0,548^{***}$ ) und sCD30 ( $r = 0,418^{***}$ ).

MIG korrelierte mit IFN- $\gamma$  ( $r = 0,428^{***}$ ) und IP-10 ( $r = 0,591^{***}$ ). sIL-2R korrelierte außerdem mit sCD30 ( $r = 0,698^{***}$ ) und HGF ( $r = 0,438^{***}$ ).

## Ergebnisse

---

Eine Auswertung von Korrelationen innerhalb weiter stratifizierten Patientengruppen (z. B. nach Höhe der Antikörpertiter) brachte aufgrund der kleinen Fallzahlen keine sinnvollen Ergebnisse.

### 4 Diskussion

Vorliegende Ergebnisse zeigen, dass die Spiegel der Zytokine IL-6, IL-9, IL-10, IL-17a, IFN- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$  bei ALCL-Patienten signifikant höher als bei den Kontrollgruppen lagen. sCD30, sIL-2R und der Wachstumsfaktor HGF lagen bei den ALCL-Patienten ebenfalls signifikant höher als bei den Kontrollgruppen. Die gemessenen Chemokinspiegel lagen im Median mit Ausnahme von G-CSF bei ALCL-Patienten oberhalb der Spiegel der Kontrollgruppen, allerdings war dies nur bei MIP-1 $\alpha$  und MCP-1 signifikant. IL-23 lag bei den ALCL-Patienten initial niedriger als bei den Kontrollen vor dem letzten Chemotherapiekurs.

Es zeigte sich außerdem, dass höhere Spiegel verschiedener Zytokine und löslicher Faktoren, insbesondere von IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  und sIL-2R mit prognostisch ungünstigen klinischen und biologischen Parametern sowie einer geringeren ereignisfreien Überlebensrate einhergehen. Diese Ergebnisse bestätigten in einem mit 119 ALCL-Patienten deutlich größerem Kollektiv teilweise die bereits zuvor bei ALCL-Patienten als erhöht beschriebenen Zytokinspiegel [62, 63, 66, 67] und zeigten die Bedeutung weiterer, bisher bei ALCL-Patienten nicht beschriebener Zytokine.

#### 4.1 Kritische Wertung der Ergebnisse

Tumorerkrankungen sind Systemerkrankungen mit einer Beteiligung des gesamten Organismus, auch bei lokal begrenzten Stadien. Besonders deutlich wird dies beim ALCL durch das häufige Vorliegen von Allgemeinsymptomen [30], dem Nachweis einer minimal disseminierten Erkrankung in Blut oder Knochenmark [41] und dem Vorhandensein einer zellulären und humoralen Immunantwort [42].

Auch wenn die Reaktion des Immunsystems und die Produktion von Zytokinen als Mediatoren der beteiligten Immunzellen zunächst lokale Prozesse sind, spricht folgendes für eine gute Verwertbarkeit und Aussagekraft von im peripheren Blut gemessenen Zytokinspiegeln:

Zum einen erreichen viele Zytokine bei ausreichend hoher (lokaler) Produktion Blutspiegel, die eine hormonähnliche, systemische Wirkung (zum Beispiel zur Vermittlung einer Akute-Phase-Reaktion) haben. Dies wird beispielsweise im Fall von IL-6 und IL-8 klinisch als Laborparameter bei Sepsispatienten genutzt. Zum anderen ist bei einem Teil der ALCL-Patienten mit minimal disseminierter Erkrankung oder einer selteneren manifesten Knochenmarksbeteiligung das Organ Blut auch Ort der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Tumor.

In vorliegender Untersuchung wurde Serum oder Plasma von Patienten nach längerer Lagerung (bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zu mehreren Jahren) untersucht, das zuvor in teilnehmenden Studienkliniken gewonnen wurde. Der Versand erfolgte bei Raumtemperatur und dauerte bis zu 24 Stunden.

Bezüglich der Stabilität der Zytokine nach Lagerung zeigte sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen den gemessenen Spiegeln von GCSF und zunehmender Lagerdauer sowie signifikante Korrelationen zwischen den Spiegeln von TNF- $\alpha$ , IL-22 und IL-13 und der Lagerdauer. Für TNF- $\alpha$  wurde ein Anstieg der Spiegel bei wiederholtem Auftauen und Einfrieren beschrieben [169, 170]. Für zahlreiche weitere Zytokine, insbesondere IL-1, IL-8, IL-10, wurde eine deutliche Abnahme der messbaren Konzentrationen nach Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über 4 Jahre beschrieben [170], dieser Effekt ließ sich in den vorliegenden Ergebnissen allerdings nur für GCSF nachweisen.

Es ist auch anzunehmen, dass die präanalytischen Bedingungen wie Versanddauer, Uhrzeit oder Technik der Blutabnahme den Vergleich mit Zytokinspiegeln, die in der klinischen Routine, Zellkulturen oder anderen klinischen Studien bestimmt werden, erschwert. Auch bei Vergleichen innerhalb des hier untersuchten Kollektivs könnte sich dies auswirken, wahrscheinlich stehen diese präanalytischen Bedingungen aber nicht in Zusammenhang mit klinischen Parametern der Patienten, so dass eine systematische Verfälschung der Ergebnisse unwahrscheinlich ist.

In kritischer Würdigung der Ergebnisse ist der deutliche Zusammenhang der gemessenen Zytokine mit klinischen und biologischen Parametern (siehe Kapitel 3.4, S. 40) ein wichtiger Beleg dafür, dass auch in Blutproben, die im Rahmen einer multizentrischen Studie dezentral gewonnen wurden und bis zu 24h bei Raumtemperatur transportiert wurden, eine verlässliche Zytokinspiegelbestimmung mittels eines Partikel-Immunoassays möglich ist. Insbesondere für die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-22, IL-13 und GCSF sollte allerdings der Einfluss der Lagerung für Vergleiche berücksichtigt werden.

Es ist anzumerken, dass die Messung der Blutspiegel nur mittelbar Rückschlüsse auf lokale Immunreaktionen zum Beispiel gegen Tumorzellen zulassen. So ist es vorstellbar, dass aufgrund von unterschiedlichen und häufig kurzen Halbwertszeiten nur ein Teil der an einer Signalkaskade beteiligten Zytokine zum Zeitpunkt der Blutabnahme im Blut der Patienten nachweisbar ist. Auch können zugleich ablaufende, unterschiedliche Reaktionen des Immunsystems an verschiedenen Orten zu Konstellationen gemessener Zytokine führen, die keinem lokalen biologischen Korrelat entsprechen. Es handelt sich bei

den vorliegenden Messungen um Momentaufnahmen aus einem dynamischen Geschehen. Diese grundsätzlichen Einschränkungen müssen bei der Interpretation der erhobenen Daten berücksichtigt werden.

### 4.1.1 Vergleichbarkeit und Normwerte der gemessenen Zytokine

In der vorliegenden Arbeit wurden als Vergleichsgruppe Proben von Patienten mit reifen B-Zell-NHL sowie Proben von ALCL-Patienten vor dem 6. Kurs gewonnen. Proben von gesunden Kindern standen nicht zur Verfügung. In der Literatur werden ganz verschiedene Angaben zu Zytokiniegeln bei Gesunden, mit einem weiten Bereich möglicher Normwerte, gemacht. Für Zytokine, die nicht in der klinischen Routine verwendet werden, liegt dies in einer erheblichen Methodenvielfalt und fehlenden Standardisierung der Messverfahren begründet. Zudem sind für die wenigsten der Zytokine Untersuchungen an einer größeren Anzahl pädiatrischer Patienten bzw. gesunder Kontrollen durchgeführt worden.

Aus diesen Gründen ist ein Vergleich vorliegender Ergebnisse mit Angaben aus der Literatur daher nur teilweise sinnvoll möglich und auf qualitative Aussagen beschränkt.

## 4.2 sIL-2R/sCD30 als Marker der Tumoraktivität

Die Spiegel des löslichen Interleukin-2-Rezeptors waren bei den ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowohl gegenüber den Vergleichsgruppen als auch den beschriebenen Referenzbereichen [73] deutlich erhöht. Höhere Spiegel des löslichen Rezeptors waren mit weiteren klinischen Parametern korreliert und gingen mit niedrigeren anti-ALK-Antikörper-Titern und dem Vorliegen einer minimal disseminierten Erkrankung einher.

Vereinfacht betrachtet ist der Plasmaspiegel des sIL-2R ein Marker für den Aktivierungsgrad von T-Zellen. Klinisch ist er ein Marker für Sarkoidose, chronische Infektionen und einige Tumoren, unter anderem für M. Hodgkin und akute T-Zellleukämien [171]. Auch für ALCL-Patienten sind erhöhte Spiegel beschrieben worden. Janik et al. maßen bei allen von 7 untersuchten erwachsenen ALK+ALCL-Patienten ebenfalls deutlich erhöhte sIL-2R-Spiegel [75].

sIL-2R korrelierte in der Arbeit von Janik et al. mit dem löslichen CD30 ( $r = 0,97$ ). Dieser Zusammenhang konnte in etwas schwächerem Ausmaß nachvollzogen werden, sIL-2R korrelierte in vorliegenden Messungen signifikant mit sCD30 ( $r = 0,698^{***}$ ).

CD30, zunächst als Ki-1-Antigen bezeichnet, ist ein kennzeichnendes Oberflächenmerkmal von ALCL-Zellen [4] und wird von den Zelloberflächen als löslicher Faktor freigesetzt

[172]. Die lösliche Form von CD30 wurde bereits 1998 in einer Arbeit von Zinzani et al. als deutlich erhöht bei ALCL-Patienten mit *common histology* (n = 38, Median 2840 U/ml) gezeigt. Dabei gingen höhere Spiegel mit höheren Stadien einher und es zeigte sich eine Normalisierung der Spiegel nach der Behandlung [173]. Bei den untersuchten Kollektiv handelte es sich allerdings um erwachsene Patienten mit unbekanntem ALK-Status.

Auch in vorliegender Untersuchung waren die Spiegel von sCD30 bei ALCL initial deutlich erhöht, mit steigenden Spiegeln bei vorhandenen B-Symptomen, höherem Stadium, CRP und einem erhöhten Rezidivrisiko. Es fanden sich ebenfalls höhere sCD30-Spiegel bei Patienten mit einer minimal disseminierten Erkrankung. Anders als für den sIL-2R hing der Spiegel des löslichen CD30 nicht mit dem anti-ALK-Antikörpertiter zusammen. Nur für den Spiegel des sIL-2R zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem ereignisfreien 3-Jahresüberleben (EFS), dabei gingen Zytokinspiegel oberhalb des Medians mit einer reduzierten EFS einher. Dies konnte für sCD30 nicht signifikant gezeigt werden.

Sowohl der Spiegel des sIL-2R als auch des sCD30 geben, wie zuvor beschrieben, auch in unserem Patientenkollektiv wahrscheinlich hauptsächlich das Ausmaß der Erkrankung wieder. Bei einer hohen Zahl von Tumorzellen werden größere Mengen von sIL-2R und sCD30 an den Zellmembranen freigesetzt. Dies zeigt sich auch an dem Zusammenhang dieser beiden Faktoren mit dem Vorhandensein einer minimal disseminierten Erkrankung. Dabei kann der sIL-2R, der auch von aktivierten T-Zellen freigesetzt wird, auch die zelluläre Reaktion des Immunsystems auf die Tumorzellen widerspiegeln.

### 4.3 Zytokinspiegel zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

Die Produktion von Zytokinen und löslichen Faktoren durch Tumoren und insbesondere Non-Hodgkin-Lymphomen ist ein gut dokumentiertes Phänomen [82, 174].

Wie anhand der Vorarbeiten an kleinen Patientenzahlen zu vermuten war, zeigten sich die Spiegel der Zytokine IL-6, IL-9, IL-10, IL-17a, IL-22 und TNF- $\alpha$  bei den untersuchten ALCL-Patienten deutlich gegenüber den Kontrollgruppen erhöht [66, 67, 175].

Durch Tumorzellen oder tumorinfiltrierende Zellen gebildete lösliche Faktoren können die bei Lymphomen häufig auftretenden systemischen Begleiterscheinungen wie B-Symptome erklären. Bei einigen Tumoren sind die Tumorzellen als Produzenten der Zytokine identifiziert worden und Mechanismen wie eine autokrine Wachstumsstimulation und parakrine Beeinflussung beispielsweise von Immunzellen wurden postuliert [174, 176, 177].

Im Folgenden soll auf die Ergebnisse einzelner Zytokine und ihre mögliche Rolle in der Pathogenese des ALCL näher eingegangen werden.

### 4.3.1 Interleukin 6

Von 119 untersuchten ALCL-Patienten hatten 56 (47,1 %) einen nachweisbaren IL-6-Spiegel. Ein nachweisbarer bzw. höherer Spiegel ging mit einem fortgeschrittenen Stadium, Vorhandensein von B-Symptomen, erhöhtem CRP, einer Organbeteiligung, Vorliegen einer minimalen disseminierten Erkrankung und einer schlechteren Prognose einher. Wenig verwunderlich ist der enge Zusammenhang zwischen Interleukin-6 und klinischen Parametern wie dem Allgemeinzustand oder dem Vorhandensein von B-Symptomen und der Erhöhung des CRP.

Interleukin-6 ist ein bekannter Aktivator der Akuten-Phase-Reaktion und Auslöser von Fieber [178]. Der Zusammenhang zwischen Interleukin-6 und Vorhandensein von B-Symptomen wurde für Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome von Kurzrock et al. gezeigt. In deren Untersuchung hatten 17 von 29 Patienten mit B-Symptomen (59 %) erhöhte Interleukin-6-Werte (Nachweisgrenze 22 pg/ml), verglichen mit 3 von 28 Patienten (11 %) ohne B-Symptome [179].

Voorzanger et al. fanden sowohl *in vitro* als auch im Serum der Patienten erhöhte Spiegel von IL-6 bei fast allen von 54 NHL-Patienten [174].

Auch für das diffuse großzellige Lymphom (DLBCL) wurden erhöhte Interleukin-6-Spiegel (dort festgelegt als  $> 1,9$  pg/ml) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe berichtet [81]. Es bestand eine positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein von B-Symptomen, erhöhtem  $\beta$ 2-Mikroglobulin und schlechterem ereignisfreiem Überleben einerseits und einem erhöhten Interleukin-6 andererseits. Die Autoren stellen – ausgehend von dem Befund, dass Interleukin-6 nicht mit dem Vorliegen einer *bulky disease*, erhöhtem LDH-Spiegel oder einem höheren Ann-Arbor-Stadium korreliert – die Vermutung auf, dass Interleukin-6 stärker von den biologischen Eigenschaften des Tumors als von der Tumormasse abhängt.

Eine Interleukin-6-Produktion durch ALCL-Zellen wurde schon 1991 durch Agematsu et al. beschrieben, die einen ALCL-Patienten mit Fieber und Knochendestruktionen beschrieben und eine starke Produktion von Interleukin-6 durch die Tumorzellen *in vitro* beobachteten [64]. Auch ein Fallbericht über einen 44-jährigen Patienten mit einem hepatischen ALCL, der sich mit Arthralgie, Fatigue, Gewichtsverlust, Nachtschweiß und

rezidivierendem Fieber vorstellte, beschrieb eine deutlich erhöhte Interleukin-6 und Interleukin-8-Produktion des Tumors *in vitro* im Vergleich zu normalem Lebergewebe [180].

Auch wenn diese Arbeiten die Produktion von IL-6 durch Tumorzellen selbst nahelegen, bleibt unklar, ob dies auch für die Mehrzahl der Patienten zutreffend ist, oder ob es sich dabei um einen sekundären Effekt handelt.

IL-6 stellte sich als Zytokin mit dem stärksten prognostischen Vorhersagewert heraus und blieb auch in Kombination mit anderen Risikofaktoren in einer multivariaten Analyse ein unabhängiger Risikofaktor (HR 3,7 95 %-KI 1,5–8,8). Als einfach zu erhebender Routinelaborparameter könnte man sich eine Rolle des IL-6 zur Stratifizierung neu diagnostizierter ALCL-Patienten vorstellen. Hierzu sollte aber angemerkt sein, dass die etablierten biologischen Stratifizierungskriterien MDD und anti-ALK-Titer gerade auch im Hinblick auf neue Therapiekonzepte mit ALK-Inhibitoren und einer möglichen Vakzinierungstherapie einen deutlich rationaleren Ansatz darstellen und der diagnostischen Nutzen von IL-6 in weiteren prospektiven Studien zunächst belegt werden müsste.

### 4.3.2 Interleukin-8/CCXL8

Das Chemokin IL-8 oder CXCL8 war in der Arbeit von Savan et al. bei 9 von 11 ALK+-ALCL-Patienten nachgewiesen worden [66]. In vorliegender Arbeit war IL-8 ebenfalls bei 81,8 % der Patienten nachweisbar, dies unterschied sich allerdings nicht signifikant von den Kontrollgruppen. Es zeigte sich in vorliegender Untersuchung kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten zum initialen Zeitpunkt und den Patienten vor dem letzten Chemotherapiekurs. Auch war Interleukin-8 nicht mit weiteren Patientenmerkmalen assoziiert. Lediglich ein inverser Zusammenhang mit der Anzahl der normalisierten NPM-ALK-Kopien in Blut oder Knochenmark konnte beobachtet werden.

Dies widerspricht den Ergebnissen von Dejean et al., die Spiegel von IL-8 bis 200 pg/ml bei 9 von 28 ALK+-ALCL Patienten mit einer disseminierten Erkrankung fanden, aber kein IL-8 im Serum von 7 Patienten ohne disseminierte Erkrankung bzw. bei 5 gesunden Kontrollen nachweisen konnten [181]. Als Quelle für IL-8 postulieren Dejean et al. Keratinozyten, die durch den von ALCL-Zellen produzierten löslichen Faktor High mobility group box 1 (HMGB1) vermittelt IL-8 produzieren [181].

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der zeitlichen Dynamik liegen. Die Produktion von IL-8 in dendritischen Zellen erreicht 3 h nach Stimulation ein Maximum und nimmt im weiteren Verlauf wieder deutlich ab [182]. Daher könnte der genaue Abnahmezeitpunkt deutliche Unterschiede erklären.

### 4.3.3 Interleukin-9

Interleukin-9 war bei 50,4 % der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose nachzuweisen, jedoch nicht bei den Patienten vor dem 6. Kurs und mit einem B-NHL.

IL-9 wird von aktivierten T-Helferzellen [183], insbesondere von T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>9-Zellen produziert [86]. Eine Korrelation mit weiteren T<sub>H</sub>2- oder T<sub>H</sub>9-Zytokinen wie IL-4, IL-6 oder IL-10 bestand in vorliegender Arbeit allerdings nicht.

Eine Expression von IL-9 mRNA wurde bereits 1991 für das ALCL gezeigt [175], allerdings handelte es sich hierbei um Patienten mit unbekanntem ALK-Status.

Qiu et al. wiesen in 3 ALK+-ALCL-Zelllinien eine IL-9-Produktion durch ALCL-Zellen nach. IL-9 förderte wiederum mittels einer autokrinen Stimulation unter anderem über JAK3 die Proliferation der Zellen, ein Effekt der durch Neutralisierung von IL-9 aufgehoben werden konnte [89]. Der Nachweis von IL-9 im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Diagnosestellung steht dazu im Einklang und es kann vermutet werden, dass zumindest ein Teil des nachgewiesenen IL-9 ein Produkt der Tumorzellen ist. Der Plasmaspiegel von Interleukin-9 war in vorliegender Arbeit nicht mit weiteren klinischen oder biologischen Risikofaktoren assoziiert.

Es könnte vermutet werden, dass bei Produktion von IL-9 durch die Tumorzellen ein Zusammenhang mit dem klinischen Stadium, einer Knochenmarksbeteiligung oder einer erhöhten Laktatdehydrogenase bestünde. Allerdings sind diese Faktoren nur teilweise mit der Anzahl der Tumorzellen korreliert, so dass die fehlende Assoziation von IL-9 mit weiteren Parametern dafür sprechen könnte, dass die Produktion von IL-9 als ein grundlegender Bestandteil der Pathogenese bei vielen ALCL-Patienten vorliegt und weniger von Faktoren wie der Reaktion des Immunsystems abhängig ist. Dem gegenüber steht die Beobachtung, dass IL-9 nicht mit dem Vorliegen einer minimal disseminierten Erkrankung zusammenhing.

### 4.3.4 Interleukin-10

Interleukin-10 war bei den ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei einem Teil der Patienten deutlich erhöht und korrelierte mit einem schlechteren Allgemeinzustand, Vorliegen von B-Symptomen, einem höheren Stadium und dem Nachweis einer MDD. Das Rezidivrisiko war bei Patienten mit einem erhöhten IL-10-Spiegel signifikant erhöht.

Interleukin-10 besitzt vor allem immunsuppressive Eigenschaften [94] und kann einerseits eine überschießende Aktivierung des Immunsystems verhindern, andererseits aber

auch im Rahmen von Infektionen und Tumorerkrankungen eine wirkungsvolle Immunantwort verhindern [184, 185].

Voorzanger et al. fanden sowohl in vitro als auch im Serum der Patienten erhöhte Spiegel von IL-10 bei fast allen von 54 erwachsenen NHL-Patienten [174].

In einer Untersuchung von el-Far et al. 2004 lag IL-10 bei 40 erwachsenen Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen ebenfalls erhöht vor und korrelierte mit einer schlechteren Prognose [82]. Beide Arbeiten untersuchten vor allem Patienten mit diffus-großzelligen B-Zelllymphomen, so dass eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf ALCL-Patienten eingeschränkt ist.

In der Untersuchung von Mellgren et al. hatten alle von 6 untersuchten ALCL-Patienten nachweisbare IL-10 Spiegel mit einem Median von 27 pg/ml.

ALCL-Zellen könnten durch Produktion von Interleukin-10 Einfluss auf das lokale Zytokinmilieu nehmen und so möglicherweise Proliferation und Überleben der Zellen erhöhen. Anhalt dafür gibt die Arbeit von Boulland et al., die eine erhöhte Expression von IL-10-mRNA in ALCL zeigte [65]. Regulatorische T-Zellen vermitteln ihre immunsuppressive Funktion ebenfalls zum Teil über IL-10, so dass auch diese Zellen als mögliche Produzenten von IL-10 in Frage kommen.

Aus den vorliegenden Beobachtungen lässt sich der Schluss ziehen, dass die immunsuppressiven Eigenschaften von IL-10 die Ausbreitung des ALCL unterstützen. Diese Interpretation bedarf einer weiteren Überprüfung. Die gefundene Korrelation zwischen IL-10 und IL-6 und weiteren inflammatorischen Zytokinen findet sich bei weiteren Tumoren [186] und nichtmalignen systemischen Inflammationsreaktionen [187]. Daher könnten die hier gefundenen Zusammenhänge auch auf eine generelle, nicht ALCL-spezifische Entzündungsreaktion zurückzuführen sein.

### **4.3.5 Interleukin-17a**

Der Spiegel von Interleukin-17a lag bei 36,0 % der untersuchten ALCL-Patienten oberhalb der Nachweisgrenze und war mit einem reduzierten Allgemeinzustand, einer „non-common“-Histologie und dem Vorliegen einer Leukozytose assoziiert. Der Zusammenhang mit dem Vorliegen einer Leukozytose wurde bereits in Form eines klinischen Fallberichts publiziert. Beschrieben wurde eine erwachsene ALCL-Patientin, die an den Folgen einer Hyperleukozytose kurz nach Diagnosestellung verstarb und bei der hohe IL-17-Spiegel von 1170,1 pg/ml im peripheren Blut gemessen wurden [68]. Diese Befunde stehen im Einklang mit der beschriebenen Rolle von IL-17a bei der Regulation der Granulopoese [110].

Genau wie IL-6 war auch Interleukin-17a in vorliegender Arbeit mit einem erhöhten CRP-Spiegel assoziiert. Interleukin-17a wurde bereits als Aktivator der CRP-Synthese beschrieben [188] und kann so als ein Teil der systemischen inflammatorischen Reaktion bei ALCL-Patienten gewertet werden.

Interleukin-17a ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, dass von T<sub>H</sub>17-Zellen unter anderem im Rahmen von bakteriellen Infektionen produziert wird. Die Spiegel von IL-23 als beschriebener Induktor der T<sub>H</sub>17-Differenzierung und der Interleukin-17-Produktion waren bei vorliegender Untersuchung nicht mit dem IL-17-Spiegel verknüpft.

### 4.3.6 Interleukin-22

14,3 % der ALCL-Patienten hatten einen erhöhten IL-22-Spiegel, dieses Interleukin war bei keinem der Kontrollpatienten nachzuweisen. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant. Ebenfalls bestand kein Zusammenhang zwischen IL-22 und weiteren klinischen Parametern. ALK-positive ALCL-Zelllinien exprimieren den IL-22R, produzieren autokrin wirksames IL-22 und IL-22 wirkt auf diese Zellen proliferationsfördernd [108]. Savan et al. bestätigten die Produktion von IL-22 in ALCL-Zelllinien *in vitro* sowie eine Erhöhung im Serum von 9 von 11 erwachsenen ALK+-ALCL-Patienten sowie eine Rückbildung unter Chemotherapie [66].

Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede liegt im Einfluss der Lagerdauer, der bereits oben diskutiert wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass dieser postulierte Mechanismus bei mindestens einem Teil der Patienten eine Rolle spielen könnte. Berücksichtigt werden sollte hierbei allerdings, dass IL-22 insbesondere auch von aktivierten T-Zellen (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>17, T<sub>H</sub>22) und NK-Zellen produziert wird [189].

### 4.3.7 Interleukin-23

Bei 38,7 % der ALCL-Patienten lagen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung IL-23-Spiegel oberhalb der Nachweisgrenze in einem Bereich bis 12102,7 pg/ml vor. Die gemessenen Werten lagen allerdings mit einem medianen Spiegel von 0 pg/ml unter den für gesunde Probanden in der Literatur angegebenen Werten, wie 28 gesunde Erwachsene mit einem medianen IL-23 Spiegel von 25,6 pg/ml [190] oder 37 gesunde Erwachsene mit einem mittleren Spiegel von 34,8 pg/ml [191].

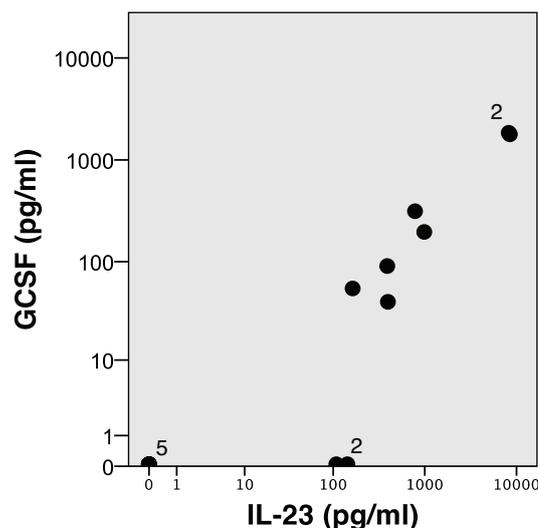
Interessanterweise lagen die medianen Spiegel bei Patienten vor dem 6. Kurs über den initialen (im Median 0 pg/ml vs. 153,2 pg/ml). Diese Beobachtung verwundert zunächst, da IL-23 in der Literatur vor allem als Tumor-förderndes Interleukin beschrieben wurde.

STAT3-Überexpression führt zu einer Erhöhung von Interleukin-23 und einem gesteigerten Tumorwachstum bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom [191-193].

IL-23 wurde auch als Induktor der IL-17 Produktion durch  $T_H$ -17-Zellen beschrieben [111], IL-17 findet sich allerdings in unserer Arbeit nicht bei den Patienten vor dem 6. Kurs und korrelierte in keiner Gruppe mit IL-23.

Als mögliche Erklärung könnte die 2005 von Stark et al. [110] beschriebene IL-23-IL-17-G-CSF-Achse zur Regulation der Neutrophilenzahl eine Rolle spielen: Neutrophile Granulozyten wandern nach kurzer Zirkulation im Blut ins Gewebe ein, wo sie schließlich phagozytiert werden. Die Phagozytose reduziert die Menge des durch Monozyten und dendritische Zellen gebildeten IL-23 und nachfolgend führt dies zu einer Herunterregulation der Bildung von IL-17 und G-CSF. Bei niedrigen Neutrophilenzahlen (wie nach der Verabreichung von Chemotherapie) wird die Produktion von IL-23 gesteigert und führt nachfolgend über die Bildung von IL-17 [111] und G-CSF zur gesteigerten Myelopoese. Damit ist IL-23 Teil einer physiologischen Feedback-Schleife zur Regulation der Neutrophilenzahl [110]. Gut zu dieser Vermutung passt die Beobachtung dass IL-23 und G-CSF in den 15 Patienten vor dem 6. Kurs eine starke Korrelation ( $R=0,932^{***}$ ) zeigen, dargestellt in Abbildung 13. Darin spiegelt sich vermutlich ein Zustand der Knochenmarkregeneration wider, wie vor dem letzten Zyklus der Chemotherapie zu erwarten ist. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bestand kein Zusammenhang zwischen den Spiegeln von IL-23 und G-CSF.

Auf die direkte Korrelation zwischen IL-23 und dem anti-ALK-Titer zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wird weiter unten eingegangen.



**Abbildung 13: Korrelation von IL-23 und G-CSF**

Logarithmische Darstellung der Spiegel von IL-23 und G-CSF bei den Patienten vor dem 6. Chemotherapiekurs. Die deutliche Korrelation ( $r = 0,932$ ,  $p < 0,001$ ) ist ein Hinweis auf die Rolle von IL-23 bei der Regulation der Myelopoese.

### 4.3.8 TNF- $\alpha$

Von den ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hatten 23,5 % ein in einem Bereich bis 224 pg/ml nachweisbares TNF- $\alpha$ .

TNF- $\alpha$  ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das an der akuten Phase-Reaktion beteiligt ist und vor allem von Monozyten, aber auch zahlreichen weiteren Zellen produziert wird. Die Produktion von TNF- $\alpha$  wird vor allem durch bakterielle Lipopolysaccharide und IL-1 stimuliert [194], sein Spiegel kann im Rahmen einer Sepsis innerhalb weniger Stunden auf Werte im Bereich bis 1000 pg/ml ansteigen. In einer Untersuchung von 97 septischen Patienten hatten diese einen medianen TNF- $\alpha$ -Spiegel von 26 pg/ml [195].

In einer Untersuchung von gesunden mexikanischen Kindern (mittleres Alter 11,6 Jahre) hatten 66 normalgewichtige Kinder mittlere TNF- $\alpha$ -Spiegel von 2,3 pg/ml. Der Vergleich mit den Daten aus der Literatur zeigt also für einen Teil der ALCL-Patienten erhöhte Spiegel von TNF- $\alpha$ , die allerdings deutlich unter den erreichten Spiegeln bei septischen Patienten liegen. Interessanterweise ließ sich für TNF- $\alpha$  abgesehen von einem Trend hin zu einem ungünstigeren ereignisfreien Überleben bei erhöhten TNF- $\alpha$ -Spiegeln kein Zusammenhang mit weiteren klinischen oder biologischen Parametern feststellen. Die beobachtete Korrelation mit IL-1 $\beta$  ist gut mit den beschriebenen Abläufen bei einer systemischen Entzündungsreaktion in Einklang zu bringen und TNF- $\alpha$  könnte am ehesten als deren Ausdruck gewertet werden.

### 4.3.9 Interferon- $\gamma$ , MIG und IP-10

Interferon- $\gamma$  als ein typischerweise der T<sub>H</sub>1-Antwort zugeordnetes Interleukin und MIG als durch Interferon- $\gamma$  induziertes Chemokin waren bei den ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose signifikant höher als bei den übrigen Patientengruppen. IP-10 (*Interferon induced protein 10*) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patientengruppen. IFN- $\gamma$ , MIG und IP-10 korrelierten miteinander (Spearman-Rangkorrelationskoeffizient: 0,428-0,591\*\*\*) und waren mit einer LDH-Erhöhung (MIG), dem Vorhandensein von B-Symptomen und einer Mediastinalbeteiligung (MIG und IP-10), einem höheren Stadium und dem Vorliegen eines Knochenmarkbefalls (IFN- $\gamma$ , MIG und IP-10) sowie einem niedrigen anti-ALK-Titer, dem Vorliegen einer MDD und einem erhöhten Rezidivrisiko (IFN- $\gamma$  und IP-10) verbunden. Sowohl MIG und IP-10 wurden als durch Interferon- $\gamma$  induzierte Chemokine beschrieben und benannt [114, 116]. Die hier beobachteten Zusammenhänge sind damit gut in Einklang zu bringen. Auch wenn die Produktion

von IP-10 und MIG nicht vollständig von IFN- $\gamma$  abhängt, lässt sich die Vermutung aufstellen, dass IFN- $\gamma$  hier im Sinne einer T<sub>H</sub>1-Signalkaskade wirkt.

### 4.3.10 HGF und VEGF

Die Spiegel des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (HGF) lagen bei den ALCL-Patienten initial deutlich über den Kontrollen. Höhere Spiegel des HGF waren verknüpft mit einem schlechteren Allgemeinzustand, einer Mediastinalbeteiligung, einem erhöhten CRP-Spiegel, einer Leukozytose, dem Vorliegen einer MDD und einem ungünstigeren ereignisfreien Überleben.

HGF ist ein Wachstumsfaktor, der physiologischerweise an der Embryogenese verschiedener Organe, der Wundheilung und Hämatopoese beteiligt ist [196]. HGF und der HGF-Rezeptor, das Proto-Onkogen c-Met, sind in der Pathogenese verschiedener maligner Tumore beteiligt und der HGF/MET-Signalweg kann unter anderem infiltratives Tumorstadium, Metastasierung und Angiogenese vermitteln [196].

Ein erhöhtes HGF wurde unter anderem bei Hodgkin-Lymphomen, DLBCL und weiteren Patientenserien mit NHL gefunden und ging bei einem Teil der Untersuchungen mit höheren klinischen Stadien und einer schlechteren Prognose einher [197-199]. Es wurden Burkitt-Lymphom-Zelllinien mit einer Überexpression von c-Met beschrieben, bei denen die Gabe von HGF das Überleben der Tumorzellen erhöhte [200]. In einer Untersuchung an vier ALCL-Zelllinien zeigten drei eine Expression von HGF und c-met [201]. Die Arbeit von Mellgren et al. zeigte erhöhte Serumspiegel von HGF bis zu 669 pg/ml bei 31 pädiatrischen NHL-Patienten, von denen 6 ein ALK+ALCL hatten [67].

Eine mögliche Erklärung für die Bedeutung von HGF bei zahlreichen Tumorerkrankungen könnte auch bei ALCL-Patienten in der Interaktion zwischen Fibroblasten und Tumorzellen liegen. *In vitro* führte die Anwesenheit von Fibroblasten, die HGF produzieren, zu einer gesteigerten Infiltration von Tumorzellen. Zusätzliche Gabe von NK4, einem kompetitiven c-Met-Antagonist, hob diesen Effekt auf [202]. So könnten Bindegewebszellen zu einem aggressiveren Verhalten und einer schlechteren Prognose beitragen. Gleichzeitig könnten lösliche Faktoren, die von Tumorzellen oder Zellen des Immunsystems gebildet werden, parakrin auf Fibroblasten wirken und diese zur Produktion von HGF anregen [203].

Von Interesse ist HGF möglicherweise auch im Hinblick auf eine Behandlung von ALCL-Patienten mit Tyrosinkinaseinhibitoren wie Crizotinib, einem ALK-Inhibitor, der ebenfalls ein potenter Inhibitor des HGF-Rezeptors ist [204].

Eine ähnliche Rolle könnte auch dem Gefäßwachstumsfaktor VEGF zukommen, der die Gefäßversorgung von wachsenden Tumoren verbessern und so zu einem aggressiveren Verlauf beitragen könnte. Erhöhte prätherapeutische VEGF-Spiegel wurden bei NHL und Hodgkin-Lymphomen beschrieben und hatten bei letzteren eine prognostische Bedeutung [205]. Dejean et al. beschrieben eine gesteigerte VEGF-Produktion durch ALK-positive ALCL-Zellen [206].

In vorliegender Arbeit hatten ALCL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einen medianen VEGF-Spiegel von 979,7 pg/ml. Dieser liegt damit oberhalb des medianen Spiegels der B-NHL-Patienten und oberhalb beschriebener Normwerte [207]. VEGF war bei Patienten mit einem niedrigen anti-ALK-Titer höher, allerdings bestand kein Zusammenhang mit weiteren Parametern. Der Zusammenhang mit dem anti-ALK-Titer ist ein Hinweis auf eine mögliche Rolle des VEGF beim ALCL, die aber hiermit nicht näher eingeordnet werden kann. Das Vorliegen höherer VEGF-Spiegel bei Patienten vor dem letzten Kurs bleibt ebenfalls unklar. Möglicherweise spielen aber auch präanalytische Einflüsse und die Thrombozytenzahl eine Rolle, da diese einen starken Einfluss auf die Serumspiegel von VEGF haben können [208].

### 4.3.11 MCP-1 / CCL2

Die Spiegel von MCP-1, oder nach neuer Nomenklatur CCL2, lagen bei den ALCL-Patienten mit einem medianen Wert von 511,8 pg/ml zum Zeitpunkt der Diagnosestellung höher als vor dem 6. Kurs. Zu den Patienten mit B-NHL bestand kein signifikanter Unterschied. Ein höherer Spiegel von MCP-1 ging mit dem Vorliegen einer MDD und einem kürzeren ereignisfreien Überleben einher. MCP-1 ist ein Chemokin, dass vor allem die Migration von Monozyten, aber auch die Chemokinese von T-Lymphozyten vermittelt [209]. Die Bildung erfolgt in einer Vielzahl von Zellen, als Hauptquelle werden Monozyten vermutet [123].

Eine große Auswertung von Teilnehmern an der Framingham Heart Study zeigte für Patienten mit einem mittleren Alter von  $61 \pm 9$  Jahren mittlere MCP-1-Spiegel im Blut von  $328 \pm 124$  pg/ml [210]. In der oben (Kapitel 4.3.8) genannten Untersuchung von mexikanischen Kindern hatten 66 normalgewichtige Kinder mittlere MCP-1 Spiegel von 360 pg/ml [211]. Bei allen genannten Einschränkungen, die für die Vergleiche der Spiegel gelten, liegen damit die Werte der ALCL- und B-NHL-Patienten deutlich über diesen Normalwerten und die Werte vor dem 6. Kurs im Bereich dieser Normwerte.

Bei der Entstehung von Tumoren spielt MCP-1 möglicherweise eine Rolle in der Angiogenese und kann damit das Tumorstadium begünstigen [212]. Über die Rolle von

MCP-1 bei Non-Hodgkin-Lymphomen ist wenig bekannt. In einer Untersuchung der mRNA-Expression zeigte sich eine tendenziell höhere Expression in reaktivem lymphatischem Gewebe als bei 20 NHL-Patienten [213].

### 4.3.12 Weitere Chemokine

In der Auswertung der übrigen Zytokine zeigte sich nur für MIP-1 $\alpha$  ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen, mit höheren Werten bei ALCL-Patienten im Vergleich zu den B-NHL-Patienten. Diese Beobachtung deckt sich mit den von Mellgren et al. erhobenen Ergebnissen, die ebenfalls deutlich höhere Spiegel bei ALCL-Patienten im Vergleich zu B-NHL zeigten [67]. Dies lässt sich am ehesten in das allgemeine Bild einer gesteigerten inflammatorischen Reaktion bei ALCL-Patienten einordnen. Für MIP-1 $\alpha$  zeigte sich ansonsten kein Zusammenhang mit weiteren Parametern oder dem Rezidivrisiko.

## 4.4 Zytokinspiegel und minimal disseminierte Erkrankung

Von 101 Patienten, bei denen eine qualitative PCR auf NPM-ALK im Blut oder im Knochenmark durchgeführt wurde, lag bei 54,5 % ein positiver Befund vor. Dies ist als Marker der minimal disseminierten Erkrankung mit einer erhöhten Rezidivrate verbunden [40].

Patienten mit einer positiven NPM-ALK-PCR hatten signifikant erhöhte mediane Spiegel der Zytokine IL-6, IL-10, MCP-1, MIG, HGF, sCD30, IP-10, sIL-2R und MIP-1 $\alpha$ .

Diese Beobachtung kann von verschiedenen Seiten interpretiert werden. Zum einen entspricht eine disseminierte Erkrankung in vielen Fällen einer höheren Anzahl an Tumorzellen, die als mögliche Produzenten der Zytokine und löslichen Faktoren in Frage kommen, siehe z. B. sIL-2R und sCD30. Auch ist von einer erhöhten Anzahl von aktivierten Immunzellen auszugehen, die ebenfalls als Produzenten der Zytokine in Frage kommen. Auf der anderen Seite ist das Vorliegen einer minimal disseminierten Erkrankung auch als Unvermögen des Immunsystems, eine Ausbreitung von Tumorzellen wirkungsvoll zu bekämpfen, zu verstehen. Dabei könnten beispielsweise immunsuppressorische Zytokine wie IL-10 eine Rolle spielen. In dieser Arbeit kann diese Frage nicht abschließend beantwortet werden und es erscheint am ehesten gerechtfertigt, wiederum von einer generellen inflammatorischen Reaktion, die mit einer zunehmenden Tumorausbreitung einhergeht, zu sprechen. Ob möglicherweise einzelne Zytokine, die eine gesteigerte Invasivität vermitteln können, wie z. B. HGF, im Besonderen an der Entwicklung einer minimal disseminierten Erkrankung beteiligt sind, bleibt dabei eine zu klärende Frage.

### 4.5 Zytokinspiegel und Höhe der anti-ALK-Antikörperantwort

In der Auswertung nach Untergruppen mit einem hohen bzw. niedrigen anti-ALK-Antikörperspiegel zeigten sich Unterschiede der gemessenen Zytokinspiegel. So unterschieden sich die Spiegel von sIL-2R, IL-6, IL-23, IFN- $\gamma$  und IP-10 signifikant zwischen den Gruppen mit einem hohen ( $> 1/20250$ ) bzw. einem niedrigen ( $< 1/2250$ ) Antikörperspiegel.

Der mediane IL-23-Spiegel korrelierte dabei direkt mit den Antikörperspiegeln, die medianen Spiegel von sIL-2R, IL-6, IFN- $\gamma$  und IP-10 korrelierten invers.

Die Frage nach einem spezifischen Muster der Zytokinantwort bei verschiedenen anti-ALK-Titern ist nicht eindeutig zu beantworten. Der Zusammenhang zwischen den Spiegeln von sIL-2R und IL-6 einerseits und dem Antikörperspiegel andererseits ist wahrscheinlich am ehesten als Ausdruck einer erhöhten Tumorlast zu sehen. Ein niedriger anti-ALK-Titer geht mit einer schlechteren Kontrolle des Tumors und nachfolgend einer stärkeren Ausbreitung sowie einer schlechteren Prognose einher [43]. Bei bereits beschriebener Produktion von IL-6 durch Tumorzellen und Freisetzung von sIL-2R ist die Erhöhung dieser Zytokine dann als Folge der insuffizienten Immunantwort anzusehen und spiegelt weniger die Mechanismen der Immunantwort wieder.

Der Zusammenhang mit IFN- $\gamma$  und IP-10 könnte von größerer Bedeutung sein. IFN- $\gamma$  spiegelt eine  $T_H1$ -Antwort und Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen wieder. IP-10 wird dabei nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  in Makrophagen gebildet. Auf diese mögliche  $T_H1$ -Antwort wird weiter unten eingegangen.

Interleukin 23 war als einziges Zytokin mit einem höheren anti-ALK-Antikörperspiegel korreliert, es bestand allerdings kein Zusammenhang mit dem biologischen Risiko oder der Prognose. Es wurde beschrieben, dass IL-23 in der Regulation der IgM und IgG-Produktion von Plasmazellen beteiligt ist, allerdings eher im Sinne einer initialen Produktion von IgM und einer Hemmung von IgG [214]. IL-23 ist allerdings in der Induktion einer  $T_H17$ -Antwort beteiligt [111], darauf soll im folgenden Abschnitt eingegangen werden.

### 4.6 Beteiligte T-Helferzellen

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, anhand der gemessenen Zytokinspiegel Rückschlüsse auf die beteiligten Zellen des Immunsystems und insbesondere die T-Helferzellen zu ziehen. In der Literatur sind für verschiedene Zelltypen kennzeichnende Zytokine beschrieben worden, so zum Beispiel die Bildung von IFN- $\gamma$  durch  $T_H1$ -Zellen [127].

### *T<sub>H</sub>1*

IFN- $\gamma$  war bei 29 von 119 ALCL-Patienten nachzuweisen, ein möglicher Hinweis auf die Beteiligung von T<sub>H</sub>1-Zellen. Auch der Zusammenhang mit IP-10 und MIG lässt sich in diese Richtung interpretieren. Weitere für eine T<sub>H</sub>1-Antwort typische, aber nicht spezifische Zytokine, wie IL-2 (14/119) und G-CSF (57/119) waren ebenfalls bei einem Teil der Patienten nachzuweisen, allerdings bestanden zwischen diesen und IFN- $\gamma$  in einer Korrelationsauswertung kein Zusammenhang. Diese Zytokine werden allerdings auch durch T<sub>H</sub>2-Zellen produziert.

Einen Hinweis auf die Beteiligung einer T<sub>H</sub>1-Antwort bei ALCL-Patienten wurde bereits durch Ait-Tahar et al. gezeigt [59]. In einer Untersuchung an Zellen von 6 ALCL-Patienten zeigten dabei 5 ein typisches T<sub>H</sub>1-Profil mit Produktion von IFN- $\gamma$  auf eine Stimulation mit ALK-Peptiden.

In der Literatur wird ein positiver Effekt einer T<sub>H</sub>1-Antwort mit effektiver Tumorabwehr beschrieben. Lee et al. beschreiben ein murines B-Zell-Tumormodell, bei dem eine Produktion von T<sub>H</sub>1-assoziierten Zytokinen mit einer verbesserten Resistenz gegen den Tumor verbunden war [215]. Auch für weitere solide Tumoren ist diese Art der zellulären Immunantwort als prognostischer Parameter beschrieben worden, wie zum Beispiel für das kolorektale Karzinom, bei dem Patienten mit einer höheren Expression von T<sub>H</sub>1-assoziierten Genen ein längeres Überleben hatten [216].

In vorliegender Untersuchung ließ sich hierfür kein Beleg finden, im Gegenteil: Die Spiegel von Interferon- $\gamma$  und IP-10 waren bei Patienten in der Gruppe mit dem höchsten biologischen Risiko deutlich erhöht. Möglicherweise spielt hier die „Erschöpfung“ (exhaustion) von T-Zellen eine Rolle [217], um zu erklären, warum es im Verlauf nach einer zunächst wirksamen Tumorkontrolle schließlich zu einer zunehmenden Tumorausbreitung kommt.

### *T<sub>H</sub>2*

IL-4 und IL-5 als typische T<sub>H</sub>2-Interleukine [127] lagen nur bei jeweils 3 Patienten erhöht vor, bei 2 Patienten waren beide zugleich erhöht. Bei einem dieser Patienten zeigte sich das klinische Bild eines „Zytokinsturmes“, mit einer massiven Erhöhung aller gemessenen Zytokine. MCP-1 (CCL2), ein Chemokin dass die T<sub>H</sub>2-Antwort fördert [124], war bei den Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhöht und mit dem Vorliegen einer MDD sowie dem Rezidivrisiko korreliert. Auch die Zytokine IL-6, IL-9, IL-10 lagen erhöht vor, diese werden allerdings auch durch zahlreiche andere Zellen des Immunsystems gebildet.

### *T<sub>H</sub>17*

T<sub>H</sub>17-Zellen produzieren nach Induktion durch IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  und IL-23 das kennzeichnende Zytokin IL-17. Dabei wird durch IL-6 und eine bestimmte Konzentration von TGF- $\beta$  die initiale Differenzierung vorgegeben und durch IL-23 eine funktionelle Ausreifung und Differenzierung zu inflammatorischen T<sub>H</sub>17-Zellen erreicht [143-148, 186, 218]. T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 unterdrücken die Induktion von T<sub>H</sub>17-Zellen [143, 144].

In vorliegenden Ergebnissen sind IL-6, IL-23 sowie IL-17a bei einem Teil der Patienten erhöht, allerdings bestand zwischen diesen keine Korrelation.

Ohne den funktionellen Zusammenhang damit näher zu erleuchten, könnte die reziproke Hemmung von T<sub>H</sub>17, T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2-Zellen das gegensätzliche Verhalten von IFN- $\gamma$  und IP-10 einerseits und IL-23 andererseits in Bezug auf die anti-ALK-Antikörpertiter erklären. Allerdings können T<sub>H</sub>17-Zellen unter bestimmten Stimulationsbedingungen (unter anderem IL-1 $\beta$ ) auch IFN- $\gamma$  sezernieren [219].

Die Rolle von T<sub>H</sub>17-Zellen in der Tumorummunologie wird kontrovers diskutiert. Teilweise haben T<sub>H</sub>17-Zellen tumorfördernder Eigenschaften, zum Teil sind sie aber mit einer besseren Tumorkontrolle durch das Immunsystem verknüpft [103, 152].

Interessant ist dabei unter anderem, dass T<sub>H</sub>17-Zellen, die nicht mit IL-23 stimuliert werden, einen regulatorischen Phänotyp annehmen, gekennzeichnet durch die Produktion von IL-10 [220, 221].

Dies könnte eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang zwischen den hohen anti-ALK-Antikörpertitern und den Spiegeln von IL-23 sein, da die Hemmung der Immunantwort durch regulatorische T-Zellen abgeschwächt wird.

### *T<sub>REG</sub>*

Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle und Suppression einer überschießenden Immunantwort, können aber auch eine wirksame Kontrolle eines Pathogens oder Tumors verhindern [157, 222].

In vorliegender Arbeit war IL-10 erhöht und mit ungünstigen klinischen Eigenschaften verknüpft, wie oben beschrieben. IL-10 ist ein vor allem immunsuppressives Zytokin und wird sowohl von regulatorischen T-Zellen, weiteren T<sub>H</sub>-Zellklassen wie T<sub>H</sub>2, aber auch von ALCL-Tumorzellen gebildet [65].

Die Infiltration von regulatorischen T-Zellen in die Tumorumgebung wurde auch für das ALCL bereits gezeigt [223]. Die Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$  sowie die Expression von FoxP3 in vier ALCL-Tumorzelllinien wurde beschrieben und die Vermutung aufgestellt, dass die Tumorzellen selbst einen regulatorischen Phänotyp besitzen [35].

Ob die Immunsuppression eher durch die Tumorzellen selbst oder durch eingewanderte bzw. induzierte regulatorische T-Zellen vermittelt wird, lässt sich aus vorliegenden Ergebnissen nicht abschließend beantworten.

Abgesehen von Hinweisen für eine mögliche Rolle einer  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Antwort und Beteiligung von regulatorischen T-Zellen lässt sich aus den vorliegenden Daten kein Beleg für ein übergreifendes, bestimmendes Reaktionsmuster bei pädiatrischen ALK-positiven ALCL-Patienten ableiten.

Wie oben beschrieben, gibt es zahlreiche Hinweise, dass die Art des zellulären Reaktionsmusters für den Verlauf und die Prognose von Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Gut vorstellbar ist es, dass dies auch bei ALCL-Patienten eine Rolle spielt. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich allerdings für keines der untersuchten Zytokine ein „protektiver Effekt“ in Hinblick auf Prognose oder weiteren klinischen Risikofaktoren. Dabei kann allerdings eine generelle Inflamationsreaktion mit höheren Zytokinpiegeln, die mit einer schlechteren Prognose aufgrund der schon fortgeschrittenen Erkrankung verbunden ist, solche Effekte auch maskieren. Hier könnte eine Auswertung von Genexpressionsmustern von tumorinfiltrierenden Zellen weitere Erkenntnisse bringen [216].

### 4.7 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass zum Diagnosezeitpunkt bei ALCL-Patienten bestimmte Zytokinpiegel erhöht vorliegen, diese mit klinischen und biologischen Merkmalen assoziiert sind und Hinweise auf ein erhöhtes Rezidivrisiko geben können.

Damit wurden in einer größeren Patientengruppe und bei weiteren, zuvor nicht im Zusammenhang mit dem ALCL beschriebenen Zytokinen vorhergehende Arbeiten zu Plasmazytokinpiegeln bei Non-Hodgkin-Lymphomen und dem anaplastisch großzelligem Lymphom weitgehend bestätigt und weitere Hinweise auf die Bedeutung der Interaktion zwischen Tumorzellen und den umgebenden Zellen gefunden.

Die Ergebnisse sind im Kontext zahlreicher weiterer Arbeiten zum Tumorerkrankungen und Zytokinen zu sehen, die vor allem die Bedeutung der Zytokine IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  in zahlreichen Tumorentitäten herausgestellt haben [224]. Das auch bei ALCL-Patienten vorliegende Muster einer einerseits massiv gesteigerten Immunantwort mit hohen Spiegel inflammatorischer Zytokine (IL-6, IFN- $\gamma$  und IL-17a) und

## Diskussion

---

andererseits einer unzureichenden Immunabwehr gegen die Tumorzellen mit ebenfalls erhöhten Spiegeln antiinflammatorischer Zytokine (IL-10) scheint dabei typisch für verschiedene Tumore zu sein [224].

Die Hypothese einer polarisierten T-Zellantwort mit einem spezifischen Muster ließ sich anhand vorliegender Arbeit weder eindeutig beantworten noch widerlegen. Dies wäre in Bezug auf die Stärke einer Immunantwort gegen ALK aufschlussreich gewesen. So wäre vorstellbar, dass ein bestimmtes zelluläres Reaktionsprofil mit einer besseren bzw. schlechteren Immunkontrolle der Erkrankung verbunden ist.

Bei der offenkundigen klinischen und biologischen Bedeutung der Immunantwort beim ALCL, deren Stärke einen wichtigen prognostischen Faktor darstellt, bleibt zusammenfassend die zelluläre Immunantwort ein noch weiter zu erhellender Aspekt dieser Erkrankung. Dies ist auch im Hinblick auf neue Therapieansätze, wie einer möglichen Tumorzell-Vakzinierung, von unmittelbarer Bedeutung für das Outcome der ALCL-Patienten.

### 5 Zusammenfassung

Das anaplastisch-großzellige Lymphom (ALCL) macht etwa 15 % der kindlichen Non-Hodgkin-Lymphome aus und hat unter Behandlung eine Rezidivrate von ca. 30 %. Es wurden verschiedene Risikofaktoren für ein Rezidiv identifiziert, unter anderem der histologische Typ, die minimale systemische Erkrankung und die Stärke des anti-ALK-Autoantikörpertiters. Die Immunreaktion gegen ALK ist in Hinblick auf zukünftige Therapien von großem Interesse.

In vorliegender Arbeit wurden die Fragen untersucht, welche Zytokine als Mediatoren des Immunsystems im peripheren Blut bei unbehandelten ALCL-Patienten erhöht sind, ob sich diese von anderen Tumorentitäten unterscheiden und ob ein Zusammenhang zwischen einzelnen oder einer Kombination mehrerer Zytokine einerseits und klinischen, biologischen oder histologischen Merkmalen sowie dem Rezidivrisiko andererseits besteht. Außerdem wurde untersucht, ob eine spezifische T-Helferzellklasse an der Immunantwort beteiligt ist.

Es wurden bei 119 neudiagnostizierten ALCL-Patienten Spiegel von 24 verschiedenen Zytokinen und löslichen Faktoren aus peripherem Blut, das vor Beginn der Therapie gewonnen wurde, mittels eines Partikel-Immunoassays bestimmt. Die Patienten wurden nach dem NHL-BFM-95- und ALCL 99-Protokoll einheitlich behandelt. Als Vergleichsgruppe wurde bei 15 Patienten eine Messung an Blut, das vor dem letzten Chemotherapiezyklus entnommen wurde, durchgeführt. Als weitere Gruppe wurden Zytokinmessungen bei Patienten mit einem neudiagnostiziertem B-NHL durchgeführt.

Die Spiegel der Zytokine IL-6, IL-9, IL-10, IL-17a, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  lagen bei ALCL-Patienten über denen der Kontrollgruppen. Auch die löslichen Faktoren sIL-2R, sCD30, HGF und MCP-1 lagen erhöht vor. Die erhöhten Zytokinpiegel normalisierten sich bei den Patienten vor dem letzten Chemotherapiezyklus, mit der Ausnahme von IL-23, das bei diesen Patienten in höheren Konzentrationen vorlag. Höhere Spiegel von IL-6, IL-10, IL-17a, IFN- $\gamma$ , HGF und sIL-2R waren mit einem schlechteren Allgemeinzustand, einem höheren Stadium, B-Symptomen, minimaler systemischer Erkrankung und einer schlechteren Prognose der Patienten verbunden. Ein Zusammenhang mit der Höhe des anti-ALK-Titers zeigte sich für die Spiegel von IL-6, IL-23, IFN- $\gamma$ , IP-10 und sIL-2R.

Vorliegende Ergebnisse zeigen erstmals an einer großen ALCL-Patientengruppe den Zusammenhang verschiedener, vor allem pro-inflammatorischer, Zytokine mit klinischen Risikofaktoren und dem Rezidivrisiko. Eine Zuordnung von Patientengruppen zu spezifischen T-Helferzellklassen ist nicht eindeutig möglich.

### 6 Summary

The anaplastic large cell lymphoma constitutes approximately 15 % of non-Hodgkin lymphomas in childhood. With chemotherapy it still has a relapse rate of 30 %. Several risk factors have been identified, including histological type, minimal systemic disease and anti-ALK antibody titer. With regard to possible future therapeutic interventions, the immune reaction against ALK is of great interest.

Present work examined which cytokines are elevated in previously untreated ALCL patients and if they differ significantly from other tumors. Furthermore, possible correlations between single cytokines or combinations of cytokines on the one hand and clinical, biological, histological findings and relapse risk on the other were analyzed. Possible involvement of a certain T helper cell class in the immune response was also studied.

Cytokine levels were measured in peripheral blood of 119 newly diagnosed ALCL patients, taken before start of treatment, using a particle immunoassay. The patients were uniformly treated according to the NHL-BFM 95 and ALCL99-protocol. Blood taken from 15 ALCL patients before start of the last chemotherapy course was analyzed as control. Another control group consisted of 11 newly diagnosed B-NHL patients.

Levels of the cytokines IL-6, IL-9, IL-10, IL-17a, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  were higher in ALCL patients as compared to controls. The soluble factors sIL-2R, sCD30, HGF, and MCP-1 were also elevated. Elevated cytokine levels normalized during treatment in patients before the last chemotherapy course, with exception of IL-23, which was higher in those patients. Higher levels of IL-6, IL-10, IL-17a, IFN- $\gamma$ , HGF, and sIL-2R were associated with a worse general condition, higher stage, presence of B-symptoms, minimal disseminated disease and a worse prognosis. A correlation with the strength of anti-ALK-titer was found for IL-6, IL-23, IFN- $\gamma$ , IP-10, and sIL-2R.

The result showed the relationship between diverse, mainly proinflammatory cytokines with clinical risk factors and relapse risk for the first time in a large cohort of uniformly treated ALCL patients. The cytokines produced were not clearly linked to the activation of a specific T helper cell subset.

### 7 Abkürzungsverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| ALCL           | <i>Anaplastic large cell lymphoma</i> , anaplastisch-großzelliges Lymphom   |
| ALK            | anaplastic lymphoma kinase  |
| BFM            | Berlin-Frankfurt-Münster (Studiengruppe)  |
| BSA            | <i>bovine serum albumin</i> , bovines Serumalbumin  |
| CD             | cluster of differentiation  |
| CCL2           | <i>CC ligand 2</i> ➔ MCP1   |
| CCL3           | <i>CC ligand 3</i> ➔ MIP-1 $\alpha$   |
| CCL4           | <i>CC ligand 4</i> ➔ MIP-1 $\beta$  |
| CXCL8          | <i>CXC ligand 8</i> ➔ Interleukin-8   |
| CXCL9          | <i>CXC ligand 9</i> ➔ MIG   |
| CXCL10         | <i>CXC ligand 10</i> ➔ IP-10  |
| CTL            | zytotoxische T-Zelle  |
| DLBCL          | <i>diffuse large B-cell lymphoma</i> , diffus-großzelliges B-Zelllymphom  |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| EFS            | <i>Event-free survival</i> , ereignisfreies Überleben   |
| FSC            | <i>Forward scatter</i> , Vorwärtsstreuung   |
| G-CSF          | Granulocyte-colony stimulating factor   |
| HGF            | Hepatocyte growth factor  |
| HR             | Hazard ratio  |
| ICD            | <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i> , Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme |
| IFN            | Interferon  |
| iNOS           | inducible Nitric oxide synthase   |
| IP-10          | Interferon- $\gamma$ -induced protein 10 ➔ CXCL10   |
| Jak            | Janus kinase  |
| 3-JÜR          | 3-Jahresüberlebensrate  |
| KI             | Konfidenzintervall  |
| LASER          | Light amplification by stimulated emission of radiation   |
| MCP-1          | Monocyte chemoattractant protein 1 ➔ CCL2   |
| MDD            | <i>Minimal disseminated disease</i> , minimal disseminierte Erkrankung  |
| MFI            | <i>Mean fluorescence intensity</i> , mittlere Fluoreszenzintensität   |
| MIP-1 $\alpha$ | Macrophage inflammatory proteine-1 $\alpha$ ➔ CCL3  |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|               |  |
|---------------|--|
| MIP-1 $\beta$ | Macrophage inflammatory proteine-1 $\beta$ • CCL4                        |
| MIG           | Monokine induced by $\gamma$ -Interferon • CXCL9                         |
| NCN           | <i>Normalized copy number</i> , normalisierte Kopienanzahl               |
| NHL           | Non-Hodgkin Lymphom  |
| NPM           | Nucleophosmin  |
| PBS           | <i>Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung         |
| PE            | Phycoerythrin  |
| REAL          | The Revised European American Lymphoma Classification                    |
| SSC           | <i>Sideway scatter</i> , Seitwärtsstreuung                               |
| STAT          | Signal transducer and activator of transcription                         |
| TAA           | Tumor-assoziiertes Antigen   |
| TNF           | Tumor necrosis factor  |
| TFG           | TRK fused gene   |
| TGF- $\beta$  | Transforming growth factor $\beta$                                       |
| TSLP          | Thymic stromal-derived lymphopoetin                                      |
| trk           | Tropomyosin receptor kinase  |
| VEGF          | <i>Vascular endothelial growth factor</i> , Gefäßendothelwachstumsfaktor |

## 8 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Differenzierung von T-Helferzellen .....  | 14 |
| Abbildung 2: Funktionsweise eines Durchflusszytometers .....                                       | 23 |
| Abbildung 3: Datenauswertung mit FlowCytomix Pro .....   | 26 |
| Abbildung 4: Interleukine, TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ bei ALCL-Patienten und Kontrollen ..... | 28 |
| Abbildung 5: Der lösliche IL-2-Rezeptor .....  | 29 |
| Abbildung 6: Chemokine im Vergleich zwischen den Patientengruppen .....                            | 33 |
| Abbildung 7: CD30 im Vergleich zwischen den Patientengruppen .....                                 | 35 |
| Abbildung 8: Zytokinspiegel zur Diagnosestellung und in Remission .....                            | 36 |
| Abbildung 9: Zytokinspiegel in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand .....                             | 40 |
| Abbildung 10: IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ und MIG nach Stadium (St. Jude) .....                     | 42 |
| Abbildung 11: sIL-2R, IL-6, IFN- $\gamma$ , IP-10, IL-23 in Abhängigkeit vom anti-ALK-Titer ...    | 46 |
| Abbildung 12: Ereignisfreies Überleben abhängig von IL-6 .....                                     | 50 |
| Abbildung 13: Korrelation von IL-23 und G-CSF .....  | 63 |

## 9 Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: T-Zellklassen und zugehörige Zytokine .....                               | 17 |
| Tabelle 2: Klinische und biologische Parameter der Patienten .....                   | 21 |
| Tabelle 3: Übersicht der Messergebnisse .....  | 38 |
| Tabelle 4: Zytokine nach Leukozytose, CRP und LDH .....                              | 45 |
| Tabelle 5: Zytokine in Abhängigkeit von der MDD .....                                | 48 |
| Tabelle 6: Zytokine in Abhängigkeit von der biologischen Risikostratifizierung ..... | 49 |
| Tabelle 7: Ereignisfreies 3-Jahresüberleben in Abhängigkeit vom Zytokinpiegel .....  | 51 |
| Tabelle 8: Hazard Ratio nach Cox-Regressionsanalyse .....                            | 52 |

## 10 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch P, S.C., *German Childhood Cancer Registry - Report 2012 (1980-2012)*. 2013, Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University: Mainz.
2. Lennert, K., *Morphology and classification of malignant lymphomas and so-called reticulososes*. Acta Neuropathol Suppl, 1975. **Suppl 6**: p. 1-16.
3. World Health Organization, S.H. Swerdlow, and International Agency for Research on Cancer, *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4. ed. World Health Organization classification of tumours. 2008, Lyon: Internat. Agency for Research on Cancer. 439 S.
4. Stein, H., et al., *The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells*. Blood, 1985. **66**(4): p. 848-58.
5. Wright, D., P. McKeever, and R. Carter, *Childhood non-Hodgkin lymphomas in the United Kingdom: findings from the UK Children's Cancer Study Group*. J Clin Pathol, 1997. **50**(2): p. 128-34.
6. Morris, S.W., et al., *Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma*. Science, 1994. **263**(5151): p. 1281-4.
7. Touriol, C., et al., *Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like)*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3204-7.
8. Cools, J., et al., *Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large-cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor*. Genes Chromosomes Cancer, 2002. **34**(4): p. 354-62.
9. Trinej, M., et al., *A new variant anaplastic lymphoma kinase (ALK)-fusion protein (ATIC-ALK) in a case of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma*. Cancer Res, 2000. **60**(4): p. 793-8.
10. Hernandez, L., et al., *TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations*. Blood, 1999. **94**(9): p. 3265-8.
11. Lamant, L., et al., *A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation*. Blood, 1999. **93**(9): p. 3088-95.
12. Lamant, L., et al., *Non-muscle myosin heavy chain (MYH9): a new partner fused to ALK in anaplastic large cell lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. **37**(4): p. 427-32.
13. Benharroch, D., et al., *ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology*. Blood, 1998. **91**(6): p. 2076-84.
14. Falini, B., et al., *ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum*. Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 875-86.
15. Perkins, S.L., et al., *Childhood anaplastic large cell lymphoma has a high incidence of ALK gene rearrangement as determined by immunohistochemical staining and fluorescent in situ hybridisation: a genetic and pathological correlation*. Br J Haematol, 2005. **131**(5): p. 624-7.
16. Damm-Welk, C., et al., *Distribution of NPM1-ALK and X-ALK fusion transcripts in paediatric anaplastic large cell lymphoma: a molecular-histological correlation*. British journal of haematology, 2009. **146**(3): p. 306-9.
17. Chiarle, R., et al., *The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer*. Nature reviews. Cancer, 2008. **8**(1): p. 11-23.

18. Ferreri, A.J., et al., *Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative*. Crit Rev Oncol Hematol, 2013. **85**(2): p. 206-15.
19. Savage, K.J., et al., *ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5496-504.
20. Sibon, D., et al., *Long-term outcome of adults with systemic anaplastic large-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte trials*. J Clin Oncol, 2012. **30**(32): p. 3939-46.
21. Gascoyne, R.D., et al., *Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma*. Blood, 1999. **93**(11): p. 3913-21.
22. Medeiros, L.J. and K.S. Elenitoba-Johnson, *Anaplastic Large Cell Lymphoma*. Am J Clin Pathol, 2007. **127**(5): p. 707-22.
23. Burkhardt, B., et al., *The impact of age and gender on biology, clinical features and treatment outcome of non-Hodgkin lymphoma in childhood and adolescence*. British journal of haematology, 2005. **131**(1): p. 39-49.
24. Murphy, S.B., *Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults*. Semin Oncol, 1980. **7**(3): p. 332-9.
25. Reiter, A., et al., *Successful treatment strategy for Ki-1 anaplastic large-cell lymphoma of childhood: a prospective analysis of 62 patients enrolled in three consecutive Berlin-Frankfurt-Munster group studies*. J Clin Oncol, 1994. **12**(5): p. 899-908.
26. Brugieres, L., et al., *CD30(+) anaplastic large-cell lymphoma in children: analysis of 82 patients enrolled in two consecutive studies of the French Society of Pediatric Oncology*. Blood, 1998. **92**(10): p. 3591-8.
27. Seidemann, K., et al., *Short-pulse B-non-Hodgkin lymphoma-type chemotherapy is efficacious treatment for pediatric anaplastic large cell lymphoma: a report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM 90*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3699-3706.
28. Williams, D.M., et al., *Anaplastic large cell lymphoma in childhood: analysis of 72 patients treated on The United Kingdom Children's Cancer Study Group chemotherapy regimens*. Br J Haematol, 2002. **117**(4): p. 812-20.
29. Brugieres, L., et al., *Impact of the methotrexate administration dose on the need for intrathecal treatment in children and adolescents with anaplastic large-cell lymphoma: results of a randomized trial of the EICNHL Group*. J Clin Oncol, 2009. **27**(6): p. 897-903.
30. Greer, J.P., et al., *Clinical features of 31 patients with Ki-1 anaplastic large-cell lymphoma*. J Clin Oncol, 1991. **9**(4): p. 539-47.
31. Schwab, U., et al., *Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells*. Nature, 1982. **299**(5878): p. 65-7.
32. Stein, H., et al., *CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3681-95.
33. Delsol, G., et al., *Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive*, in *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, S.H. Swerdlow, et al., Editors. 2008, IARC Lyon. p. 312-316.
34. Lamant, L., et al., *Prognostic Impact of Morphologic and Phenotypic Features of Childhood ALK-Positive Anaplastic Large-Cell Lymphoma: Results of the ALCL99 Study*. J Clin Oncol, 2011.

35. Kasprzycka, M., et al., *Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(26): p. 9964-9969.
36. Roncador, G., et al., *FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma*. Leukemia, 2005. **19**(12): p. 2247-2253.
37. Moti, N., et al., *Anaplastic large cell lymphoma-propagating cells are detectable by side population analysis and possess an expression profile reflective of a primitive origin*. Oncogene, 2014.
38. Lowe, E.J., et al., *Intensive chemotherapy for systemic anaplastic large cell lymphoma in children and adolescents: final results of Children's Cancer Group Study 5941*. Pediatr Blood Cancer, 2009. **52**(3): p. 335-9.
39. Le Deley, M.C., et al., *Prognostic factors in childhood anaplastic large cell lymphoma: results of a large European intergroup study*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1560-6.
40. Damm-Welk, C., et al., *Prognostic significance of circulating tumor cells in bone marrow or peripheral blood as detected by qualitative and quantitative PCR in pediatric NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma*. Blood, 2007. **110**(2): p. 670-7.
41. Mussolin, L., et al., *Prevalence and clinical implications of bone marrow involvement in pediatric anaplastic large cell lymphoma*. Leukemia, 2005. **19**(9): p. 1643-7.
42. Pulford, K., et al., *Immune response to the ALK oncogenic tyrosine kinase in patients with anaplastic large-cell lymphoma*. Blood, 2000. **96**(4): p. 1605-7.
43. Ait-Tahar, K., et al., *Correlation of the autoantibody response to the ALK oncoantigen in pediatric anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma with tumor dissemination and relapse risk*. Blood, 2010. **115**(16): p. 3314-9.
44. Mussolin, L., et al., *Use of minimal disseminated disease and immunity to NPM-ALK antigen to stratify ALK-positive ALCL patients with different prognosis*. Leukemia, 2013. **27**(2): p. 416-22.
45. Clifford, G.M., et al., *Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy*. Journal of the National Cancer Institute, 2005. **97**(6): p. 425-432.
46. Vajdic, C.M. and M.T. van Leeuwen, *Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation*. International Journal of Cancer, 2009. **125**(8): p. 1747-1754.
47. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-867.
48. Disis, M.L., *Immune regulation of cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(29): p. 4531-8.
49. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
50. Oudejans, J.J., R.L. ten Berge, and C.J. Meijer, *Immune escape mechanisms in ALCL*. J Clin Pathol, 2003. **56**(6): p. 423-5.
51. ten Berge, R.L., et al., *Adverse effects of activated cytotoxic T lymphocytes on the clinical outcome of nodal anaplastic large cell lymphoma*. Blood, 1999. **93**(8): p. 2688-96.
52. Mann, G. and H. Gadner, *Comment on HLH in a child with anaplastic large cell lymphoma (ALCL)*. J Pediatr Hematol Oncol, 2008. **30**(10): p. 721-2.
53. Passoni, L. and C. Gambacorti-Passerini, *ALK a novel lymphoma-associated tumor antigen for vaccination strategies*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**(10): p. 1675-81.

54. Pulford, K., et al., *Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1394-404.
55. Nouri-Shirazi, M., et al., *Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 3797-803.
56. Passoni, L., et al., *ALK as a novel lymphoma-associated tumor antigen: identification of 2 HLA-A2.1-restricted CD8+ T-cell epitopes*. Blood, 2002. **99**(6): p. 2100-6.
57. Ait-Tahar, K., et al., *B and CTL responses to the ALK protein in patients with ALK-positive ALCL*. Int J Cancer, 2006. **118**(3): p. 688-95.
58. Passoni, L., et al., *In vivo T-cell immune response against anaplastic lymphoma kinase in patients with anaplastic large cell lymphomas*. Haematologica, 2006. **91**(1): p. 48-55.
59. Ait-Tahar, K., M.C. Barnardo, and K. Pulford, *CD4 T-helper responses to the anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein in patients with ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 1898-901.
60. Oudejans, J.J., et al., *Activated cytotoxic T cells as prognostic marker in Hodgkin's disease*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1376-82.
61. Dinarello, C.A., *Historical insights into cytokines*. Eur J Immunol, 2007. **37 Suppl 1**: p. S34-45.
62. Ansell, S.M., et al., *Pretreatment Serum Cytokines Predict Early Disease Relapse and A Poor Prognosis In Newly Diagnosed Classical Hodgkin Lymphoma (cHL) Patients*. ASH Annual Meeting Abstracts, 2011. **118**(21): p. 429-.
63. Saberi Hosnijeh, F., et al., *Plasma cytokines and future risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL): a case-control study nested in the Italian European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(6): p. 1577-84.
64. Agematsu, K., et al., *Spontaneous production of interleukin-6 by Ki-1-positive large-cell anaplastic lymphoma with extensive bone destruction*. Blood, 1991. **77**(10): p. 2299-301.
65. Boulland, M.L., et al., *Human interleukin-10 expression in T/natural killer-cell lymphomas: association with anaplastic large cell lymphomas and nasal natural killer-cell lymphomas*. Am J Pathol, 1998. **153**(4): p. 1229-37.
66. Savan, R., et al., *A novel role for IL-22R1 as a driver of inflammation*. Blood, 2011. **117**(2): p. 575-84.
67. Mellgren, K., et al., *Plasma cytokine profiles at diagnosis in pediatric patients with non-hodgkin lymphoma*. J Pediatr Hematol Oncol, 2012. **34**(4): p. 271-5.
68. Sueki, Y., et al., *Anaplastic large cell lymphoma with paraneoplastic neutrophilia: an association between IL-17 elevation and aggressive disease progression*. Int J Hematol, 2014. **99**(6): p. 773-6.
69. Gordon, J. and L.D. MacLean, *A lymphocyte-stimulating factor produced in vitro*. Nature, 1965. **208**(5012): p. 795-6.
70. Morgan, D.A., F.W. Ruscetti, and R. Gallo, *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows*. Science, 1976. **193**(4257): p. 1007-8.
71. Baker, P.E., et al., *The effect of T cell growth factor on the generation of cytolytic T cells*. J Immunol, 1978. **121**(6): p. 2168-73.
72. Robb, R.J., A. Munck, and K.A. Smith, *T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance*. J Exp Med, 1981. **154**(5): p. 1455-74.

73. Morris, J.C. and T.A. Waldmann, *Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment*. Ann Rheum Dis, 2000. **59 Suppl 1**: p. i109-14.
74. Miles, R.R., et al., *Immunophenotypic identification of possible therapeutic targets in paediatric non-Hodgkin lymphomas: a children's oncology group report*. Br J Haematol, 2007. **138**(4): p. 506-12.
75. Janik, J.E., et al., *Elevated serum-soluble interleukin-2 receptor levels in patients with anaplastic large cell lymphoma*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3355-7.
76. Volk, H.-D., G. Keyßer, and G.-R. Burmester, *Zytokine und Zytokinrezeptoren, in Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*, L. Thomas, Editor. 2008, TH-Books-Verlags-Gesellschaft: Frankfurt/Main. p. 1039-1051.
77. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
78. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334 ( Pt 2)**: p. 297-314.
79. Wei, L.H., et al., *Interleukin-6 in cervical cancer: the relationship with vascular endothelial growth factor*. Gynecol Oncol, 2001. **82**(1): p. 49-56.
80. Azevedo, A., et al., *IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development*. World J Clin Oncol, 2011. **2**(12): p. 384-96.
81. Seymour, J.F., et al., *Serum interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large-cell lymphoma*. J Clin Oncol, 1995. **13**(3): p. 575-82.
82. el-Far, M., et al., *Serum IL-10 and IL-6 levels at diagnosis as independent predictors of outcome in non-Hodgkin's lymphoma*. J Physiol Biochem, 2004. **60**(4): p. 253-8.
83. Wang, X., et al., *[Plasma interleukin-6 and interleukin-10 levels in different subtypes of lymphoma and their clinical significance]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2011. **31**(8): p. 1360-4.
84. Hodge, D.R., E.M. Hurt, and W.L. Farrar, *The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2502-12.
85. Nowak, E.C. and R.J. Noelle, *Interleukin-9 as a T helper type 17 cytokine*. Immunology, 2010. **131**(2): p. 169-73.
86. Noelle, R.J. and E.C. Nowak, *Cellular sources and immune functions of interleukin-9*. Nature reviews. Immunology, 2010. **10**(10): p. 683-7.
87. Goswami, R. and M.H. Kaplan, *A brief history of IL-9*. Journal of immunology, 2011. **186**(6): p. 3283-8.
88. Shimbara, A., et al., *IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(1 Pt 1): p. 108-15.
89. Qiu, L., et al., *Autocrine release of interleukin-9 promotes Jak3-dependent survival of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma cells*. Blood, 2006. **108**(7): p. 2407-15.
90. Del Prete, G., et al., *Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production*. Journal of immunology, 1993. **150**(2): p. 353-60.
91. Trinchieri, G., *Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control*. J Exp Med, 2007. **204**(2): p. 239-43.
92. Saraiva, M., et al., *Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 209-19.
93. Taga, K., H. Mostowski, and G. Tosato, *Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth*. Blood, 1993. **81**(11): p. 2964-71.
94. Akdis, C.A. and K. Blaser, *Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression*. Immunology, 2001. **103**(2): p. 131-6.

## Literaturverzeichnis

---

95. Riley, J.K., et al., *Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action.* J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16513-21.
96. Hsu, P., et al., *IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1.* J Immunol, 2015. **195**(8): p. 3665-74.
97. Gupta, M., et al., *Elevated serum IL-10 levels in diffuse large B-cell lymphoma: a mechanism of aberrant JAK2 activation.* Blood, 2012. **119**(12): p. 2844-53.
98. Blay, J.Y., et al., *Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor.* Blood, 1993. **82**(7): p. 2169-74.
99. Rouvier, E., et al., *CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene.* J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5445-56.
100. Fossiez, F., et al., *T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines.* J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2593-603.
101. Van Kooten, C., et al., *Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection.* J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(8): p. 1526-34.
102. Ye, P., et al., *Interleukin-17 and lung host defense against Klebsiella pneumoniae infection.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**(3): p. 335-40.
103. Maniati, E., R. Soper, and T. Hagemann, *Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment.* Oncogene, 2010. **29**(42): p. 5653-62.
104. Steiner, G.E., et al., *Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate.* Prostate, 2003. **56**(3): p. 171-82.
105. Matsuyama, H., et al., *miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma.* Blood, 2011.
106. Dumoutier, L., J. Louahed, and J.C. Renauld, *Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9.* J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1814-9.
107. Liang, S.C., et al., *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides.* J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2271-9.
108. Bard, J.D., et al., *Aberrant expression of IL-22 receptor 1 and autocrine IL-22 stimulation contribute to tumorigenicity in ALK+ anaplastic large cell lymphoma.* Leukemia, 2008. **22**(8): p. 1595-603.
109. Oppmann, B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12.* Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.
110. Stark, M.A., et al., *Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17.* Immunity, 2005. **22**(3): p. 285-94.
111. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17.* J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
112. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
113. Chan, E.D. and D.W. Riches, *IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line.* Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(3): p. C441-50.
114. Farber, J.M., *A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5238-42.

115. Luster, A.D., J.C. Unkeless, and J.V. Ravetch, *Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins*. *Nature*, 1985. **315**(6021): p. 672-6.
116. Luster, A.D. and J.V. Ravetch, *Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site*. *Mol Cell Biol*, 1987. **7**(10): p. 3723-31.
117. Bonecchi, R., et al., *Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s*. *J Exp Med*, 1998. **187**(1): p. 129-34.
118. Qin, S., et al., *The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(4): p. 746-54.
119. Gangur, V., F.E. Simons, and K.T. Hayglass, *Human IP-10 selectively promotes dominance of polyclonally activated and environmental antigen-driven IFN-gamma over IL-4 responses*. *FASEB J*, 1998. **12**(9): p. 705-13.
120. Angiolillo, A.L., et al., *Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo*. *J Exp Med*, 1995. **182**(1): p. 155-62.
121. Liu, M., S. Guo, and J.K. Stiles, *The emerging role of CXCL10 in cancer (Review)*. *Oncol Lett*, 2011. **2**(4): p. 583-589.
122. Moriai, S., et al., *Production of interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 and its role as an autocrine invasion factor in nasal natural killer/T-cell lymphoma cells*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(22): p. 6771-9.
123. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. *J Interferon Cytokine Res*, 2009. **29**(6): p. 313-26.
124. Gu, L., et al., *Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1*. *Nature*, 2000. **404**(6776): p. 407-11.
125. Rink, L., A. Kruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. 2012, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
126. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. *J Immunol*, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
127. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 145-73.
128. Romagnani, S., *Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more*. *Immunol Today*, 1991. **12**(8): p. 256-7.
129. Del Prete, G.F., et al., *Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(1): p. 346-50.
130. Lee, Y.K., et al., *Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage*. *Immunity*, 2009. **30**(1): p. 92-107.
131. Nakayamada, S., et al., *Helper T cell diversity and plasticity*. *Curr Opin Immunol*, 2012: p. 1-6.
132. Anderson, C.F., et al., *CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis*. *J Exp Med*, 2007. **204**(2): p. 285-97.
133. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. *Science*, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
134. Bradley, L.M., D.K. Dalton, and M. Croft, *A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development*. *The journal of Immunology*, 1996. **157**(4): p. 1350-1358.

135. Abehsira-Amar, O., et al., *IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells*. J Immunol, 1992. **148**(12): p. 3820-9.
136. Bradley, L.M., et al., *Islet-Specific Th1, But Not Th2, Cells Secrete Multiple Chemokines and Promote Rapid Induction of Autoimmune Diabetes*. The Journal of Immunology, 1999. **162**(5): p. 2511-2520.
137. Czerkinsky, C.C., et al., *A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 109-21.
138. Wynn, T.A., *IL-13 effector functions*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 425-56.
139. Swain, S.L., et al., *IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors*. J Immunol, 1990. **145**(11): p. 3796-806.
140. Gajewski, T.F. and F.W. Fitch, *Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones*. The Journal of Immunology, 1988. **140**(12): p. 4245-52.
141. Veldhoen, M., et al., *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1341-6.
142. Schmitt, E., M. Klein, and T. Bopp, *Th9 cells, new players in adaptive immunity*. Trends in Immunology. **35**(2): p. 61-68.
143. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
144. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
145. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
146. Chung, Y., et al., *Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 576-87.
147. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
148. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 641-9.
149. Nurieva, R., et al., *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
150. Rutz, S., C. Eidschenk, and W. Ouyang, *IL-22, not simply a Th17 cytokine*. Immunological Reviews, 2013. **252**(1): p. 116-132.
151. Wilson, N.J., et al., *Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 950-7.
152. Bailey, S.R., et al., *Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 276.
153. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
154. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
155. Watanabe, N., et al., *Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1181-1185.

156. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
157. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in tumor immunity*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 759-67.
158. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
159. Levings, M.K., et al., *IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5530-9.
160. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
161. Asseman, C., et al., *An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 995-1004.
162. Radhakrishnan, S., et al., *Reprogrammed FoxP3+ T regulatory cells become IL-17+ antigen-specific autoimmune effectors in vitro and in vivo*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3137-47.
163. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
164. Sawitzki, B., et al., *IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo*. J Exp Med, 2005. **201**(12): p. 1925-35.
165. Team, R.D.C., *R: A language and environment for statistical computing*. 2012, R Foundation for Statistical Computing: Wien, Österreich.
166. Dunn, O.J., *Multiple Comparisons Using Rank Sums*. Technometrics, 1964. **6**(3): p. 241-252.
167. Kaplan, E.L. and P. Meier, *Nonparametric-Estimation from Incomplete Observations*. Journal of the American Statistical Association, 1958. **53**(282): p. 457-481.
168. Cox, D., *Regression models and life tables*. Journal of the Royal Statistical Society B, 1972. **34**(2): p. 187-220.
169. Flower, L., et al., *Effects of sample handling on the stability of interleukin 6, tumour necrosis factor-alpha and leptin*. Cytokine, 2000. **12**(11): p. 1712-6.
170. de Jager, W., et al., *Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays*. BMC Immunol, 2009. **10**: p. 52.
171. Thomas, L., *Löslicher IL-2-Rezeptor alpha*, in *Labor und Diagnose*, L. Thomas, Editor. 2012, TH-Books: Frankfurt. p. 1328-1331.
172. Josimovic-Alasevic, O., et al., *Ki-1 (CD30) antigen is released by Ki-1-positive tumor cells in vitro and in vivo. I. Partial characterization of soluble Ki-1 antigen and detection of the antigen in cell culture supernatants and in serum by an enzyme-linked immunosorbent assay*. Eur J Immunol, 1989. **19**(1): p. 157-62.
173. Zinzani, P.L., et al., *Clinical implications of serum levels of soluble CD30 in 70 adult anaplastic large-cell lymphoma patients*. J Clin Oncol, 1998. **16**(4): p. 1532-7.
174. Voorzanger, N., et al., *Interleukin (IL)-10 and IL-6 are produced in vivo by non-Hodgkin's lymphoma cells and act as cooperative growth factors*. Cancer Res, 1996. **56**(23): p. 5499-505.
175. Merz, H., et al., *Interleukin-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma*. Blood, 1991. **78**(5): p. 1311-7.
176. Chen, Q., et al., *Production of IL-10 by melanoma cells: Examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma*. International Journal of Cancer, 1994. **56**(5): p. 755-760.

177. Conze, D., et al., *Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(24): p. 8851-8.
178. Castell, J.V., et al., *Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes*. *FEBS Lett*, 1989. **242**(2): p. 237-9.
179. Kurzrock, R., et al., *Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms*. *Cancer Res*, 1993. **53**(9): p. 2118-22.
180. Siebert, S., et al., *Cytokine production by hepatic anaplastic large-cell lymphoma presenting as a rheumatic syndrome*. *Semin Arthritis Rheum*, 2007. **37**(1): p. 63-7.
181. Dejean, E., et al., *ALK+ALCL induce cutaneous HMGB-1-dependent interleukin-8/CXCL8 production by keratinocytes through NF-kappaB activation*. *Blood*, 2012.
182. Sallusto, F., et al., *Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(5): p. 1617-25.
183. Renaud, J.C., et al., *Human P40/IL-9. Expression in activated CD4+ T cells, genomic organization, and comparison with the mouse gene*. *Journal of immunology*, 1990. **144**(11): p. 4235-41.
184. Halak, B.K., H.C. Maguire, Jr., and E.C. Lattime, *Tumor-induced interleukin-10 inhibits type 1 immune responses directed at a tumor antigen as well as a non-tumor antigen present at the tumor site*. *Cancer Res*, 1999. **59**(4): p. 911-7.
185. Ng, T.H., et al., *Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 129.
186. Kovacs, E., *Interleukin-6 leads to interleukin-10 production in several human multiple myeloma cell lines. Does interleukin-10 enhance the proliferation of these cells?* *Leuk Res*, 2010. **34**(7): p. 912-6.
187. Friedman, G., et al., *Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock*. *Journal of critical care*, 1997. **12**(4): p. 183-187.
188. Patel, D.N., et al., *Interleukin-17 stimulates C-reactive protein expression in hepatocytes and smooth muscle cells via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NF-kappaB and C/EBPbeta activation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(37): p. 27229-38.
189. Wolk, K., et al., *Biology of interleukin-22*. *Semin Immunopathol*, 2010. **32**(1): p. 17-31.
190. Kim, J.W., et al., *Plasma Levels of IL-23 and IL-17 before and after Antidepressant Treatment in Patients with Major Depressive Disorder*. *Psychiatry Investig*, 2013. **10**(3): p. 294-9.
191. Ljujic, B., et al., *Elevated serum level of IL-23 correlates with expression of VEGF in human colorectal carcinoma*. *Arch Med Res*, 2010. **41**(3): p. 182-9.
192. Stewart, C.A. and G. Trinchieri, *Reinforcing suppression using regulators: a new link between STAT3, IL-23, and Tregs in tumor immunosuppression*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(2): p. 81-3.
193. Kortylewski, M., et al., *Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(2): p. 114-23.
194. Dinarello, C.A., *Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock*. *Chest*, 1997. **112**(6 Suppl): p. 321S-329S.
195. Casey, L.C., R.A. Balk, and R.C. Bone, *Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome*. *Ann Intern Med*, 1993. **119**(8): p. 771-8.
196. Nakamura, T., et al., *Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011. **26 Suppl 1**: p. 188-202.
197. Hsiao, L.T., et al., *High serum hepatocyte growth factor level in patients with non-Hodgkin's lymphoma*. *Eur J Haematol*, 2003. **70**(5): p. 282-9.

198. Kawano, R., et al., *Prognostic significance of hepatocyte growth factor and c-MET expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma*. Br J Haematol, 2004. **127**(3): p. 305-7.
199. Etto, L., et al., *Clinical correlations and prognostic relevance of HGF, VEGF AND FGF expression in Brazilian patients with non-Hodgkin lymphoma*. Leuk Lymphoma, 2008. **49**(2): p. 257-64.
200. Skibinski, G., A. Skibinska, and K. James, *Hepatocyte growth factor (HGF) protects c-met-expressing Burkitt's lymphoma cell lines from apoptotic death induced by DNA damaging agents*. Eur J Cancer, 2001. **37**(12): p. 1562-9.
201. Pons, E., C.C. Uphoff, and H.G. Drexler, *Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines*. Leuk Res, 1998. **22**(9): p. 797-804.
202. Date, K., et al., *Inhibition of tumor growth and invasion by a four-kringle antagonist (HGF/NK4) for hepatocyte growth factor*. Oncogene, 1998. **17**(23): p. 3045-54.
203. Matsumoto, K. and T. Nakamura, *Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions*. Int J Cancer, 2006. **119**(3): p. 477-83.
204. Zou, H.Y., et al., *An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms*. Cancer Res, 2007. **67**(9): p. 4408-17.
205. Giles, F.J., et al., *Clinical relevance of circulating angiogenic factors in patients with non-Hodgkin's lymphoma or Hodgkin's lymphoma*. Leuk Res, 2004. **28**(6): p. 595-604.
206. Dejean, E., et al., *Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas*. Leukemia, 2011. **25**(12): p. 1882-90.
207. Chiarelli, F., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) in children, adolescents and young adults with Type 1 diabetes mellitus: relation to glycaemic control and microvascular complications*. Diabet Med, 2000. **17**(9): p. 650-6.
208. George, M.L., et al., *Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet scavenging?* Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3147-52.
209. Carr, M.W., et al., *Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3652-6.
210. McDermott, D.H., et al., *CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study*. Circulation, 2005. **112**(8): p. 1113-20.
211. Breslin, W.L., et al., *Obese Mexican American children have elevated MCP-1, TNF-alpha, monocyte concentration, and dyslipidemia*. Pediatrics, 2012. **129**(5): p. e1180-6.
212. Salcedo, R., et al., *Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression*. Blood, 2000. **96**(1): p. 34-40.
213. Valkovic, T., et al., *Macrophage chemotactic protein-1 mRNA levels in non-Hodgkin lymphoma*. Clin Exp Med, 2010. **10**(4): p. 229-35.
214. Cocco, C., F. Morandi, and I. Airoidi, *Interleukin-27 and interleukin-23 modulate human plasmacell functions*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(5): p. 729-34.
215. Lee, P.P., et al., *T helper 2-dominant antilymphoma immune response is associated with fatal outcome*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1611-7.
216. Tosolini, M., et al., *Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(4): p. 1263-71.

## Literaturverzeichnis

---

217. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492-9.
218. Zúñiga, L.A., et al., *Th17 cell development: from the cradle to the grave*. Immunological Reviews, 2013. **252**(1): p. 78-88.
219. Zielinski, C.E., et al., *Pathogen-induced human T(H)17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta*. Nature, 2012.
220. Weaver, C.T. and R.D. Hatton, *Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective*. Nature reviews. Immunology, 2009. **9**(12): p. 883-9.
221. Heinemann, C., et al., *IL-27 and IL-12 oppose pro-inflammatory IL-23 in CD4+ T cells by inducing Blimp1*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3770.
222. Tanchot, C., et al., *Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance*. Cancer Microenvironment, 2013. **6**(2): p. 147-157.
223. Gjerdrum, L.M., et al., *FOXP3 positive regulatory T-cells in cutaneous and systemic CD30 positive T-cell lymphoproliferations*. Eur J Haematol, 2008. **80**(6): p. 483-9.
224. Lippitz, B.E., *Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review*. Lancet Oncol, 2013. **14**(6): p. e218-28.

# 11 Anhang

## 11.1 Material- und Geräteliste

| Bezeichnung   | Hersteller                           |
|---|--------------------------------------|
| Durchflusszytometer <i>FACSCalibur</i>                    | Fa. Becton Dickson, Heidelberg       |
| Software <i>CellQuest Pro 4.0.2</i>                       | Fa. Becton Dickson, Heidelberg       |
| Software <i>FlowCytoMix Pro 2.4</i>                       | Fa. eBioscience, Frankfurt           |
| Software <i>SPSS Version 22</i>                           | IBM Deutschland, Ehningen            |
| Vakuumpumpe <i>Flow Cytomix Vacuum Manifold</i>           | Fa. eBioscience, Frankfurt           |
| Zentrifuge <i>Mikro 22 R</i>                              | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen      |
| Zentrifuge <i>Galaxy Mini</i>                             | VWR International, Darmstadt         |
| Rüttler <i>Roto-Shake Genie</i>                           | Scientific Industries, New York, USA |
| Vortexmischer <i>VF2</i>                                  | IKA-Labortechnik, Staufen            |
| Mehrkanalpipette <i>Research pro</i>                      | Eppendorf, Hamburg                   |
| Kit <i>Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex FlowCytomix</i> | Fa. eBioscience, Frankfurt           |
| Kit <i>Human Chemokine 6plex FlowCytomix</i>              | Fa. eBioscience, Frankfurt           |
| Kit <i>Human Basic FlowCytomix</i>                        | Fa. eBioscience, Frankfurt           |
| Kit <i>Human IL-23 FlowCytomix Simplex</i>                | Fa. eBioscience, Frankfurt           |
| Kit <i>Human HGF FlowCytomix Simplex</i>                  | Fa. eBioscience, Frankfurt           |
| Kit <i>Human sCD30 FlowCytomix Simplex</i>                | Fa. eBioscience, Frankfurt           |
| Kit <i>Human sIL-2R FlowCytomix Simplex</i>               | Fa. eBioscience, Frankfurt           |
| Kit <i>Human IP-10 FlowCytomix Simplex</i>                | Fa. eBioscience, Frankfurt           |
| Kit <i>Human VEGF-A FlowCytomix Simplex</i>               | Fa. eBioscience, Frankfurt           |

## 11.2 Inhalt der Kits zur Zytokinmessung

### 11.2.1 In beiden Multiplex- und im Basiskit enthalten

| Bezeichnung                    | Menge       | Beschreibung  |
|--------------------------------|-------------|---|
| <i>Assay Buffer</i>            | 50 ml       | PBS mit 10 % BSA, Konzentrat zur Herstellung einer gebrauchsfertigen Lösung nach Zugabe von 450 ml Aqua dest. |
| <i>Reagent Dilution Buffer</i> | 13 ml       | gebrauchsfertige Lösung   |
| Streptavidin-Phycoerythrin     | 200 $\mu$ l | gebrauchsfertige Lösung   |
| Mikrofilterplatte              | 1           | Filterplatte mit 96 Vertiefungen (Wells)  |
| <i>Setup Beads</i>             | 1           | Mikropartikel zur Kompensationseinstellung des Zytometers   |

### 11.2.2 Zusätzlich im Kit "Human T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>9/T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>22 13plex FlowCytomix" enthalten

| Bezeichnung  | Menge          | Beschreibung   |
|--|----------------|--|
| 13 Fläschchen Fluoreszenzgefärbte Mikropartikel ( <i>Beads</i> ) | je 175 $\mu$ l | jeweils für spezifisch für eines der folgenden humanen Zytokine:<br>IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, IL-22, TNF- $\alpha$   |
| 2 x 13 Fläschchen verschiedene Standardlösungen                  |                | gefriergetrocknet, nach Lösen in Aqua dest. folgende Konzentrationen:<br>IL-9 (40 ng/ml), IL-17A (200 ng/ml); IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 p70, IL-13, TNF- $\alpha$ (alle jeweils 400 ng/ml), IL-22 (1600 ng/ml) |
| 13 Fläschchen verschiedene Biotin-konjugierten Antikörper        | 350 $\mu$ l    | jeweils für spezifisch für eines der folgenden humanen Zytokine:<br>IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, IL-22, TNF- $\alpha$   |

## Anhang

### 11.2.3 Zusätzlich im Kit „Human Chemokine 6plex FlowCytomix“ enthalten

| Bezeichnung  | Menge          | Beschreibung  |
|--|----------------|---|
| 6 Fläschchen Fluoreszenz-gefärbte Mikropartikel ( <i>Beads</i> ) | je 175 $\mu$ l | jeweils für spezifisch für eines der folgenden humanen Zytokine:<br>G-CSF, IL-8, MCP-1, MIG, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$   |
| 2 x 6 Fläschchen verschiedene Standardlösungen                   |                | gefriergetrocknet, nach Lösen in Aqua dest. folgende Konzentrationen:<br>MIP-1 $\beta$ (60 ng/ml) MIG (100 ng/ml), IL-8 (200 ng/ml), MIP-1 $\alpha$ (200 ng/ml), G-CSF (500 ng/ml), MCP-1 (600 ng/ml) |
| 6 Fläschchen verschiedene Biotin-konjugierten Antikörper         | 350 $\mu$ l    | jeweils für spezifisch für eines der folgenden humanen Zytokine:<br>G-CSF, IL-8, MCP-1, MIG, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$   |

### 11.2.4 Zusätzlich in den Simplex-Kits enthalten

| Bezeichnung  | Menge          | Beschreibung  |
|--|----------------|---|
| Jeweils 1 Fläschchen fluoreszenz-gefärbte Mikropartikel ( <i>Beads</i> ) | je 175 $\mu$ l | jeweils für spezifisch für eines der folgenden humanen Zytokine:<br>IL-23, HGF, sCD30, sIL-2R, IP-10, VEGF-A  |
| Jeweils 1 Fläschchen Standardlösung                                      |                | gefriergetrocknet, nach Lösen in Aqua dest. folgende Konzentrationen:<br>IL-23 (1 $\mu$ g/ml), HGF (3000 ng/ml), sCD30 (5 $\mu$ g/ml), sIL-2R (2000 ng/ml), IP-10 (250 ng/ml), VEGF-A (400 ng/ml) |
| Jeweils 1 Fläschchen Biotin-konjugierten Antikörper                      | 350 $\mu$ l    | jeweils für spezifisch für eines der folgenden humanen Zytokine.<br>IL-23, HGF, sCD30, sIL-2R, IP-10, VEGF-A  |

### 11.2.5 Herstellerangaben zur unteren Nachweisgrenze der Zytokinmessung

sIL-2R (59,03 pg/ml), IL-23 (21,9 pg/ml), sCD30 (3 pg/ml), IP-10 (6 pg/ml), HGF (52 pg/ml), VEGF-A (7,2 pg/ml), IL-1 $\beta$  (4,2 pg/ml), IL-2 (16,4 pg/ml), IL-4 (20,8 pg/ml), IL-5 (1,6 pg/ml), IL-6 (1,2 pg/ml), IL-9 (1,5 pg/ml), IL-10 (1,9 pg/ml), IL-12 (1,5 pg/ml), IL-13 (4,5 pg/ml), IL-17A (2,5 pg/ml), IL-22 (43,3 pg/ml), IFN- $\gamma$  (1,6 pg/ml), TNF $\alpha$  (3,2 pg/ml), G-CSF (3,4 pg/ml), IL-8 (2,2 pg/ml), MCP-1 (2,2 pg/ml), MIG (0,9 pg/ml), MIP-1 $\alpha$  (1 pg/ml), MIP-1 $\beta$  (1 pg/ml)

## 12 Publikationen und Vorträge

### 12.1 Vorträge

Knörr, F., Damm-Welk, C., Lisfeld, J., Werner, S., Zimmermann, M., Reiter, A., Woessmann, W. *Pretreatment Plasma Cytokine Levels in Children with Anaplastic Large Cell Lymphoma* in Fourth International Symposium on Childhood, Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin's Lymphoma. 2012. New York. Abstract in: British journal of haematology.

### 12.2 Poster

Knörr, F., Kreuder, J.G., Rohde, M. *Einsatz von studentischen Prüfern in komplexeren OSCE-Prüfungen* in Jahrestagung der Gesellschaft für Medizinische Ausbildung. 2012. Aachen. Jahrestagung der Gesellschaft für Medizinische Ausbildung.

Knörr F, Weber S, Singh V, Woessmann W, Damm-Welk C. *NPM-ALK epitopes recognized by anti-ALK-antibodies in ALCL patients* in Fifth International Symposium on Childhood, Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin Lymphoma. 2015. Varese.

## 13 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, den 08.04.2016

### 14 Danksagung

Die Erstellung dieser Dissertationsschrift wäre nicht möglich gewesen ohne die Hilfe und Unterstützung zahlreicher Personen, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Ich danke Herrn Professor Reiter und Herrn Professor Wößmann für die Überlassung des Themas sowie für die hervorragende klinische und wissenschaftliche Ausbildung und Anleitung in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit.

Frau Dr. Christine Damm-Welk gilt mein ganz besonderer Dank für die sehr gute Betreuung, Unterstützung bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit, Rat und Tat zu den biologischen Hintergründen und praktischen Fragen sowie der ausführlichen Kritik und Korrektur des Manuskripts.

Herzlichen Dank gilt auch Herrn Dr. M. Zimmermann, der an der statistischen Auswertung mitgewirkt hat und Frau U. Meyer, die mir bei der Erstellung der Datenbank eine große Hilfe war.

Ich möchte mich bei allen weiteren Mitarbeitern des NHL-Labors und der Studienzentrale in Gießen bedanken, die mich vor allem bei der praktischen Durchführung unterstützt und in die alltägliche Laborarbeit eingeführt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Patienten und ihren Eltern, die vorliegende Untersuchung durch Teilnahme an einer der NHL-BFM-Studien überhaupt erst möglich gemacht haben sowie den behandelnden Kliniken.