

Aus dem Charité Centrum für Tumormedizin
Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Vergleich verschiedener Kulturbedingungen für die Differenzierung
leukämischer Blasten zu dendritischen Zellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sina Süßmilch

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Salama
2. Prof. Dr. med. H. Schrezenmeier
3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Westermann

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 <i>Dendritische Zellen und ihre Schlüsselrolle im Immunsystem</i>	1
1.1.1 Kurze Historie.....	1
1.1.2 Herkunft und Subtypen.....	2
1.1.3 Lebenszyklus dendritischer Zellen	3
1.1.4 Einleitung und Koordinierung der Immunantwort.....	5
1.1.5 Die Bedeutung der Migration dendritischer Zellen	6
1.1.6 Wodurch werden reife dendritische Zellen charakterisiert?	8
1.2 <i>Tumorimmunologische Grundlagen für eine Immuntherapie mit dendritischen Zellen</i>	9
1.3 <i>Grundlagen und Epidemiologie der Leukämien</i>	10
1.4 <i>Veränderungen dendritischer Zellen bei Patienten mit Leukämie</i>	12
1.5 <i>Möglichkeiten der Differenzierung von dendritischen Zellen in vitro</i>	13
1.5.1 Zellkulturmedien und Zusätze	14
1.5.2 Für die Differenzierung von dendritischen Zellen verwendete Zytokine	15
2 Themenstellung	19
3 Material und Methoden	20
3.1 <i>Material</i>	20
3.1.1 Patientenblasten	20
3.1.2 Reagenzien.....	22
3.1.3 Puffer und Lösungen.....	23
3.1.4 Antikörper.....	24
3.1.5 ELISA Kit (Humaner Interleukin 12 Immunoassay).....	24
3.1.6 Verbrauchsmaterialien	25
3.1.7 Geräte.....	26
3.1.8 Software.....	27
3.2 <i>Methoden</i>	27
3.2.1 Allgemeine Arbeitstechniken	27
3.2.2 Isolierung der leukämischen Blasten	28
3.2.3 Zellkultur	29
3.2.4 Morphologische Beurteilung	30
3.2.5 Durchflusszytometrische Analyse des Immunphänotyps	30

3.2.6	T-Zell-Proliferation in der gemischten Lymphozytenkultur.....	33
3.2.7	Migrationsfähigkeit im Transmigrations-Assay	34
3.2.8	Nachweis von Interleukin 12 im Sandwich-ELISA.....	35
3.2.9	Statistische Auswertung.....	36
4	Ergebnisse	37
4.1	<i>Differenzierung von dendritischen Zellen aus AML-Blasten</i>	<i>37</i>
4.1.1	Morphologie	37
4.1.2	Gesamtzellzahl und Vitalität.....	38
4.1.3	Immunphänotypische Charakterisierung	39
4.1.4	Stimulationsfähigkeit allogener T-Zellen	47
4.1.5	Migrationsfähigkeit.....	49
4.1.6	Produktion und Sekretion von Interleukin 12	50
4.2	<i>Differenzierung von dendritischen Zellen aus ALL-Blasten</i>	<i>51</i>
4.2.1	Morphologie	51
4.2.2	Gesamtzellzahl und Vitalität.....	52
4.2.3	Immunphänotypische Charakterisierung	53
4.2.4	Stimulationsfähigkeit allogener T-Zellen	59
4.2.5	Migrationsfähigkeit.....	60
4.2.6	Produktion und Sekretion von Interleukin 12	62
4.3	<i>Vergleich der aus AML- und ALL-Blasten generierten Zellen</i>	<i>62</i>
4.3.1	Morphologie	62
4.3.2	Gesamtzellzahl und Vitalität.....	62
4.3.3	Immunphänotypische Charakterisierung	63
4.3.4	Stimulationsfähigkeit allogener T-Zellen	66
4.3.5	Migrationsfähigkeit.....	66
4.3.6	Produktion und Sekretion von Interleukin 12	66
5	Diskussion	67
5.1	<i>Kultivierungsprotokolle zur Generierung dendritischer Zellen aus leukämischen Blasten... 67</i>	
5.1.1	Zytokine für die Differenzierung von AML-Blasten zu dendritischen Zellen.....	67
5.1.2	Zytokine für die Differenzierung von ALL-Blasten zu dendritischen Zellen.....	68
5.2	<i>Beurteilung der differenzierten dendritischen Zellen</i>	<i>69</i>
5.2.1	Morphologie	69
5.2.2	Gesamtzellzahl und Vitalität.....	70
5.2.3	Immunphänotypische Charakterisierung	71
5.2.4	Stimulationsfähigkeit allogener T-Zellen	80
5.2.5	Migrationsfähigkeit.....	81
5.2.6	Produktion und Sekretion von Interleukin 12	83

5.3	<i>Grundmedien für die Kultivierung leukämischer Blasten.....</i>	85
5.4	<i>Für die Differenzierung leukämischer Blasten benötigte Zeitspanne.....</i>	86
5.5	<i>Ausblick: Vakzinierungstherapien mit dendritischen Zellen.....</i>	87
6	Zusammenfassung.....	90
7	Appendix	92
7.1	<i>Literaturverzeichnis</i>	92
7.2	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	105
7.3	<i>Tabellenverzeichnis.....</i>	105
7.4	<i>Formelverzeichnis.....</i>	106
7.5	<i>Danksagung</i>	107
7.6	<i>Lebenslauf.....</i>	108
7.7	<i>Publikationsliste.....</i>	109
7.8	<i>Erklärung</i>	110

Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphoblastische Leukämie
ALL-DC	aus ALL-Blasten differenzierte dendritische Zellen
AML	akute myeloische Leukämie
AML-DC	aus AML-Blasten differenzierte dendritische Zellen
BCR-ABL	breakpoint cluster region – humanes Abelson Protoonkogen
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
CLL	chronische lymphoblastische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CPM	counts per minute
DC	dendritische Zelle(n)
d.h.	das heißt
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAB	French-American-British-Group Klassifikation
FBS	fetal bovine serum, fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt-3L	fms-like tyrosine kinase 3 ligand
FSC	forward scatter
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
GMP	good manufacturing practice, gute klinische Praxis
HLA	humane(s) Leukozyten-Antigen(e)
HS	Humanserum
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
MCP	macrophage chemoattractant protein
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP	macrophage inflammatory protein
MLC	mixed lymphocyte culture, gemischte Lymphozytenkultur
MRD	minimal residual disease, minimale Resterkrankung

PBS	phosphate buffered solution
PE	Phycoerythrin
RHAMM	Rezeptor für Hyaluronan-mediated-motility
SCF	Stammzellfaktor
SDF-1 α	stromal cell derived factor 1 alpha
SEM	standard error of the mean
SSC	side scatter
TGF β	Tumor-growth-factor beta
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
u.a.	unter anderem
WT1	Wilms-Tumor-Antigen

1 Einleitung

Maligne Erkrankungen, wie die Leukämien, sind weiterhin eine Herausforderung für die moderne Medizin. Trotz der Erweiterung des Wissens um die Pathogenese und Therapiemöglichkeiten onkologischer Erkrankungen sind Heilungen in vielen Fällen noch nicht möglich. Insbesondere nach Auftreten eines Rezidivs versagen häufig die konventionellen Therapieschemata. Deshalb stellen immuntherapeutische Strategien, deren Ziel es ist, die Immuntoleranz gegenüber den entarteten Zellen zu durchbrechen und eine systemische Immunantwort zu initiieren, eine große Hoffnung in der Leukämietherapie dar. Dendritische Zellen (DC) sind die fähigsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. Sie besitzen, verglichen mit anderen antigenpräsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten und Monozyten, eine zehn- bis hundertfach höhere Anzahl von Haupthistokompatibilitätsmolekülen (*major histocompatibility complex*, MHC-Moleküle) (Banchemau & Steinman, 1998). Außerdem nehmen sie eine Schlüsselrolle in der Aktivierung und Koordinierung der Immunantwort ein. Aus diesem Grund sind sie eine interessante Alternative für die Entwicklung einer klinisch anwendbaren Zellvakzine gegen onkologische Erkrankungen.

1.1 Dendritische Zellen und ihre Schlüsselrolle im Immunsystem

1.1.1 Kurze Historie

Die erste Beschreibung von DC erfolgte 1868 durch den Medizinstudenten Paul Langerhans, der sie aufgrund ihrer Morphologie für Nervenzellen der Haut hielt (Langerhans, 1868). Fast ein Jahrhundert später entdeckten Steinman und Cohn (Steinman & Cohn, 1973) sie in der Milz von Mäusen und gaben ihnen den Namen „dendritische Zellen“ (griechisch dendron = Baum). Steinman vermutete schon damals eine Funktion dieser Zellen in der Antigenpräsentation. Die weitere Erforschung der DC wurde durch ihre geringe Zahl und zum damaligen Zeitpunkt unbekanntes Markermoleküle erschwert. Es zeigte sich, dass DC in den verschiedensten lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben zu finden sind und dass die von Langerhans und die von Steinman und Cohn entdeckten Zellen verschiedene Subpopulationen von DC darstellen (Steinman, 1991). Durch die Entwicklung verbesserter Kultivierungstechniken und die Möglichkeit, DC aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (Caux et al., 1992) und Monozyten (Sallusto & Lanzavecchia, 1994) zu züchten, konnte eine große Anzahl an DC generiert und für Untersuchungen genutzt werden. Außerdem wurde CD83 als Markermolekül für DC identifiziert (Zhou & Tedder, 1995). Damit wurde nicht nur

die weitere Erforschung und Charakterisierung dieser bedeutenden Zellen möglich, sondern auch ihre klinische Anwendung. So erfolgte im Jahre 1995 die erste Vakzinierung mit DC bei Melanompatienten (*Mukherji et al., 1995*).

1.1.2 Herkunft und Subtypen

DC sind mit Ausnahme der folliculären DC, welche in den Keimzentren der Lymphknoten mit B-Zellen interagieren (*Banchereau & Steinman, 1998; Tew et al., 2001*), von hämatopoetischen Stammzellen abstammende Leukozyten (*Katz et al., 1979; Banchereau et al., 2000*). Es lassen sich zwei Arten von im Blut zirkulierenden Vorläuferzellen unterscheiden, die myeloischen und die plasmazytoiden DC-Vorläuferzellen (*Abb. 1*).

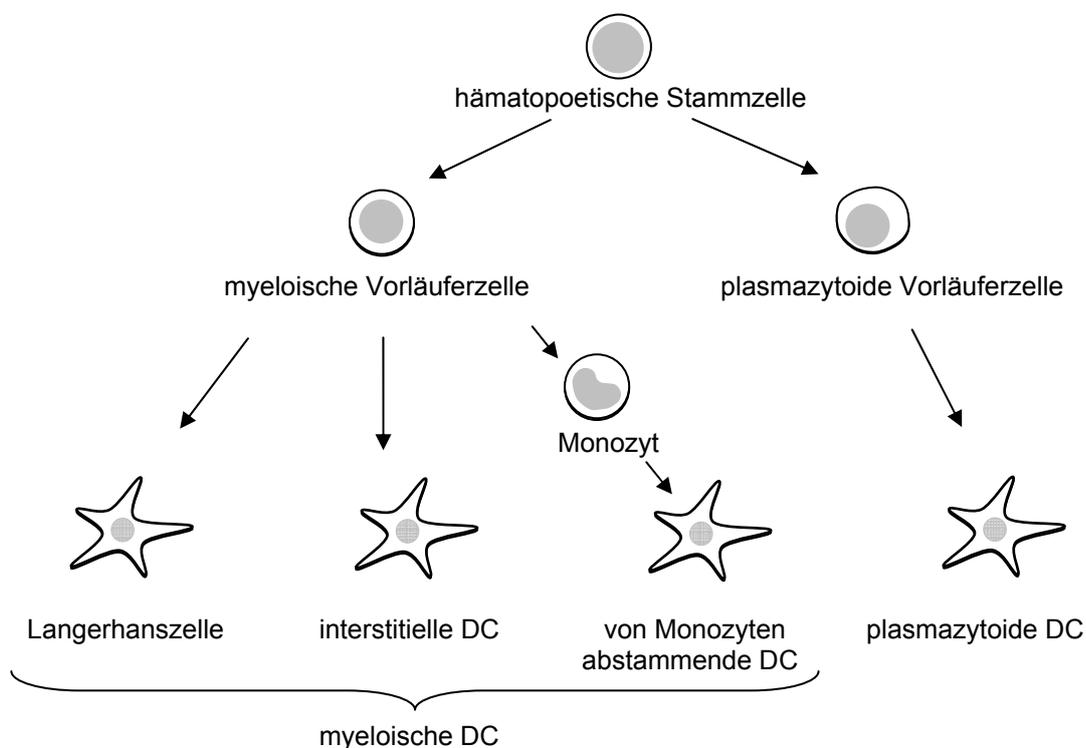


Abb. 1: Herkunft der DC-Subtypen

Die myeloischen und plasmazytoiden DC stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab (*Banchereau et al., 2000; Shortman & Liu, 2002; Goldsby et al., 2003; Ratzinger et al., 2004; Steinman & Banchereau, 2007*).

Von den plasmazytoiden Vorläuferzellen wird eine lymphozytäre Abstammung angenommen, ihre Morphologie ähnelt der von Plasmazellen (*Shortman & Liu, 2002; Rossi & Young, 2005*). Sie differenzieren sich zu plasmazytoiden DC, welche eine besondere Rolle in der Immunantwort gegen virale Infektionen spielen (*Barchet et al., 2005*). Die myeloischen Vorläuferzellen können sich zum einen direkt in DC vom Typ der Langerhanszellen bzw. in interstitielle DC differenzieren, zum anderen ist die Differenzierung von Monozyten in DC möglich (*Banchereau et al., 2000; Goldsby et al., 2003*). Unstimulierte DC ruhen in beinahe

allen Geweben des Körpers (*Hart, 1997*), insbesondere aber in jenen, die Kontakt zur Umwelt haben, wie der Haut (*Valladeau & Saeland, 2005*), dem Gastrointestinaltrakt (*Niess & Reinecker, 2006*) und der Lunge (*Holt et al., 1999*). Es finden sich zwei sessile Subtypen von DC verteilt im Organismus. Die Langerhanszellen sind lokalisiert in den epithelialen Oberflächen des Organismus. Die interstitiellen DC finden sich in den subepithelialen Geweben wie der Dermis der Haut und im Interstitium der Organe (*Hart, 1997; Rossi & Young, 2005*). Die Langerhanszellen besitzen als charakteristisches Kennzeichen die Birbeck Granula im Zytoplasma, welche wahrscheinlich Endosomen mit Funktion bei der Antigenprozessierung darstellen. Außerdem exprimieren sie E-Cadherin und CD (*cluster of differentiation*) 1a (*Ratzinger et al., 2004; Valladeau & Saeland, 2005*). Die CD1 Moleküle, die in 5 Isoformen vorkommen, sind strukturell den MHC-Klasse-I-Molekülen ähnlich und dafür verantwortlich, lipidhaltige Antigene zu präsentieren (*Delves et al., 2006*). Die Langerhanszellen scheinen besonders effiziente Aktivatoren von zytotoxischen T-Lymphozyten zu sein (*Banchereau et al., 2000; Ratzinger et al., 2004*). Die interstitiellen DC hingegen lassen sich durch die Expression des Gerinnungsfaktors XIIIa und des Oberflächenmolekül CD11b (*Banchereau et al., 2000*) charakterisieren. Die interstitiellen DC sind im Gegensatz zu den Langerhanszellen fähig, die Differenzierung von naiven B-Zellen in Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen zu induzieren (*Caux et al., 1997; Banchereau et al., 2000*).

1.1.3 Lebenszyklus dendritischer Zellen

Unreife und unstimulierte DC sind spezialisiert auf die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen. Die Aufnahme der Antigene kann durch Makropinozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose via C-Typ Lektin Rezeptor (Mannose-Rezeptor, DEC-205) oder Fc γ -Rezeptoren des Typs I (CD64) und des Typs II (CD32) sowie durch Phagozytose von apoptotischen oder nekrotischen Zellfragmenten, Viren, Bakterien und intrazellulären Parasiten erfolgen (*Banchereau et al., 2000*). Die Reifung der DC kann initiiert werden durch Aufnahme der Antigene, Bakterienbestandteile oder inflammatorische Zytokine (*Cella et al., 1997; Reis e Sousa, 2001*). Es erfolgen morphologische Veränderungen wie eine Reorganisation des Zytoskeletts und ein Verlust adhäsiver Strukturen, wodurch eine höhere zelluläre Bewegungsfähigkeit und verbesserte Migrationskapazität resultiert. Die so aktivierten DC verlassen die peripheren Gewebe und erreichen die anliegenden Lymphknoten (*Banchereau et al., 2000*) (*Abb. 2*). Dort wird durch ihre Interaktion mit den T-Zellen die Reifung vollendet. Im Laufe dieses Prozesses verlieren die DC ihre endozytotischen und phagozytotischen Rezeptoren und es erfolgt eine Hochregulation von MHC- und kostimulatorischen Molekülen

sowie von CD83 (Hart, 1997; Banchereau et al., 2000). Die reifen DC sind auf die Präsentation von Antigenen spezialisierte und hoch potente T-Zell-Stimulatoren (Banchereau et al., 2000).

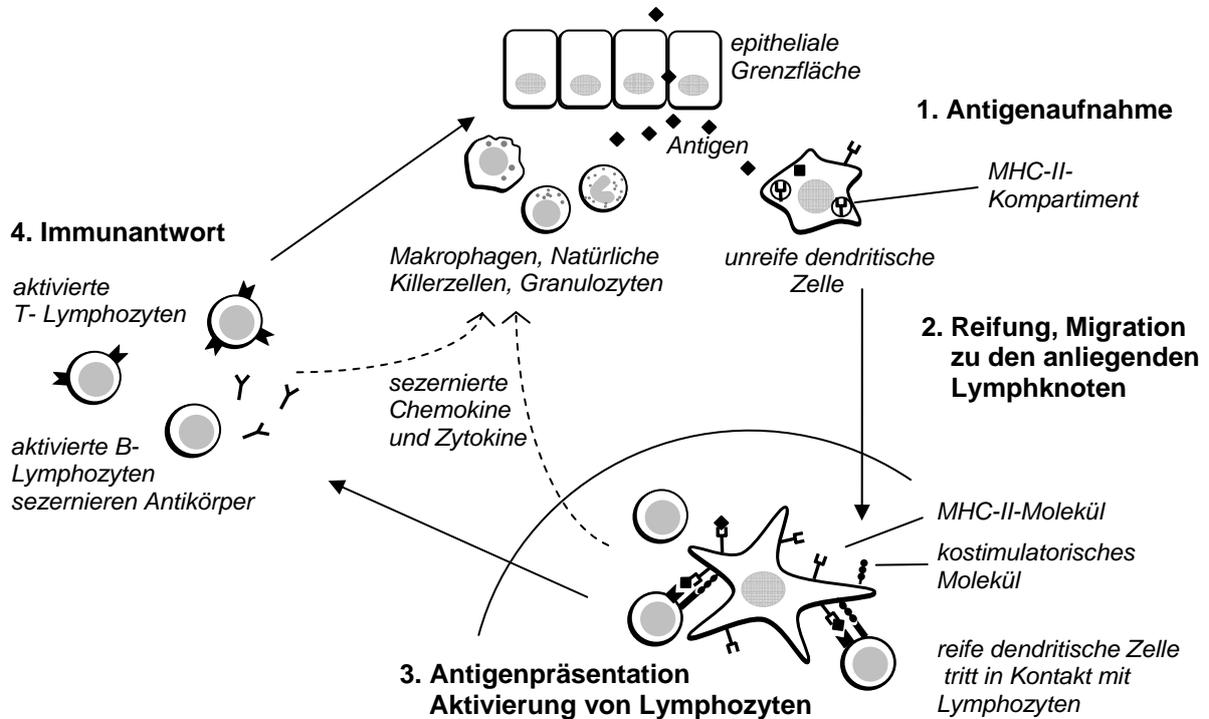


Abb. 2: Lebenszyklus der DC

Unstimulierte DC ruhen in den Geweben und im Blut. Nach der Antigenaufnahme werden die in speziellen intrazellulären Lysosomen, den MHC-II-Kompartimenten, gespeicherten MHC-II-Moleküle mit den Antigenen beladen und auf der Zelloberfläche exprimiert (1). Die DC reifen zu kompetenten antigenpräsentierenden Zellen und wandern zu den anliegenden Lymphknoten (2). Dort präsentieren sie die Antigene in Verbindung mit einer hohen Anzahl an kostimulatorischen Molekülen und aktivieren dadurch ruhende Lymphozyten (3). Sowohl die Lymphozyten als auch die DC sezernieren inflammatorische Chemokine und Zytokine, um weitere Immunzellen zu aktivieren und an den Ort der Entzündung zu locken (4). MHC: Major histocompatibility complex. (Banchereau & Steinman, 1998; Banchereau et al., 2000; Janeway et al., 2005; Rossi & Young, 2005).

Die Antigenpräsentation wird durch MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Zelloberfläche vermittelt. Unreife DC besitzen MHC-Klasse-II-Moleküle in den MHC-II-Kompartimenten. Dies sind spezielle intrazelluläre Lysosomen (Abb. 2). Bei der Reifung werden die MHC-Klasse-II-Moleküle mit den Antigenen beladen und verlassen die Lysosomen. Nach Transport durch Klasse-II-Vesikel werden die Antigen-MHC-II-Komplexe auf der Zelloberfläche exprimiert (Cella et al., 1997; Banchereau & Steinman, 1998; Wilson

et al., 2005). Die Beladung der MHC-Klasse-I-Moleküle erfolgt auf dem endogenen Weg durch in der Zelle selbst synthetisierte Peptide oder intrazelluläre Pathogene. Zusätzlich ist die direkte Präsentation von exogenen Antigenen oder Immunkomplexen via MHC-Klasse-I-Molekülen möglich (*Wilson et al.*, 2005). Dieser Weg wird Kreuzpräsentation genannt und spielt durch die Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten bei der Immunantwort gegen Tumoren, transplantierte Antigene und Viren eine besondere Rolle (*Banchereau et al.*, 2000).

1.1.4 Einleitung und Koordinierung der Immunantwort

DC spielen eine Schlüsselrolle in der Aktivierung und Koordinierung des Immunsystems. Sie agieren als entscheidende Verbindungsstelle zwischen dem angeborenen, unspezifischen Immunsystem und der spezifischen adaptiven Immunantwort. Sie exprimieren Toll-Rezeptoren, mit denen sie Bakterienbestandteile und andere Pathogene aufnehmen können (*Jarrossay et al.*, 2001; *Reis e Sousa*, 2001). Die aufgenommenen Moleküle werden verarbeitet und den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentiert. Anders als Makrophagen, die Bakterien phagozytieren und deren Bestandteile ebenfalls via MHC-Klasse-II-Molekülen präsentieren können, sind DC als einzige Zellen fähig, naive T-Lymphozyten zu primen und damit eine adaptive Immunantwort einzuleiten (*Banchereau et al.*, 2000; *Clark et al.*, 2000). Außerdem produzieren sie Chemokine, welche gezielt weitere inflammatorische Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems an den Ort der Entzündung locken (*Lebre et al.*, 2005). Darüber hinaus sind DC in der Lage, die Art der initiierten adaptiven Immunantwort zu beeinflussen. Durch die Sekretion von Interleukin (IL) 12 sind reife DC fähig, die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten entweder in Typ 1 (Th1) oder Typ 2 (Th2) T-Helferzellen zu bewirken (*Hunter*, 2005). In Gegenwart großer Mengen IL-12 differenzieren sich T-Zellen in Richtung Th1, sezernieren Interferon-gamma und IL-2 und rufen durch die Aktivierung von Makrophagen und Anregung der Proliferation von zytotoxischen T-Lymphozyten eine zellvermittelte Immunität hervor. Eine niedrige Konzentration von IL-12 hingegen veranlasst T-Zellen sich in Richtung Th2-Zellen zu differenzieren, welche IL-4 und IL-10 sezernieren und die Differenzierung von B-Zellen zu immunglobulinsezernierenden Plasmazellen induzieren. Damit wird eine humorale Immunantwort ausgelöst (*Belardelli & Ferrantini*, 2002; *Burmester & Pezzutto*, 2003; *Janeway et al.*, 2005). DC können auch direkt, d.h. ohne T-Zell-Hilfe naive B-Zellen aktivieren (*Wykes & MacPherson*, 2000; *Litinskiy et al.*, 2002). DC spielen jedoch nicht nur eine Rolle in der Aktivierung des Immunsystems, sondern auch in der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen. Nehmen sie unter entzündungsfreien Bedingungen Antigene aus ihrer Umgebung wie beispielsweise von sterbenden Zellen auf, so

präsentieren sie diese ohne die Präsenz kostimulatorischer Moleküle oder der Produktion inflammatorischer Zytokine. Dadurch wird eine Anergie der T-Zellen diesen Antigenen gegenüber und damit eine Toleranz induziert (*Liu et al.*, 2002; *Mahnke et al.*, 2002; *Steinman et al.*, 2003). Aufgrund dieser Fähigkeiten sind sie sowohl an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses (*Ding et al.*, 2006) als auch allergischer Reaktionen wie dem extrinsischen Asthma (*Hammad & Lambrecht*, 2006) beteiligt.

1.1.5 Die Bedeutung der Migration dendritischer Zellen

Die Fähigkeit zur Migration ist eine wichtige Eigenschaft von DC und bedeutsam für die Initiierung einer gerichteten Immunantwort. Zunächst müssen die Vorläuferzellen der DC aus dem Blut in die peripheren Gewebe einwandern, um dort ihre Wächterfunktion wahrzunehmen oder gezielt den Ort einer Entzündung zu erreichen. Des Weiteren müssen die reifen DC nach Antigenaufnahme die Gewebe verlassen und über die Lymphgefäße die drainierenden Lymphknoten erreichen. Dort interagieren sie mit antigenspezifischen T-Lymphozyten und leiten die Immunantwort ein (*Dieu-Nosjean et al.*, 1999; *Banchereau et al.*, 2000). Die DC erreichen die peripheren Gewebe, Lymphgefäße und T-Zell-Regionen der Lymphknoten durch Chemotaxis. Das bedeutet, dass sie entlang eines chemotaktischen Gradienten wandern. Chemokine (kurz für chemoattraktive Zytokine) sind 6 bis 14 kiloDalton große, strukturell verwandte Polypeptide (*Zlotnik & Yoshie*, 2000), die vielfältige Funktionen im Organismus wahrnehmen. Sie kontrollieren die Migration von Leukozyten und regulieren die Hämatopoese, Angiogenese und Organogenese (*D'Ambrosio et al.*, 2003). Chemokine können nach ihrer Hauptfunktion in inflammatorische und homöostatische Chemokine eingeteilt werden (*Rossi & Zlotnik*, 2000). Inflammatorische Chemokine wie zum Beispiel MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein*) werden von verschiedenen Zelltypen, wie Endothelzellen, Epithelzellen, Stromazellen und Leukozyten auf inflammatorische Stimuli hin produziert und locken Leukozyten an den Ort der Entzündung (*Tabelle 1*). Homöostatische Chemokine wie MIP-3 β (*macrophage inflammatory protein 3 beta*) hingegen werden konstitutiv exprimiert und koordinieren die Zirkulation der Leukozyten durch lymphatische und periphere Gewebe (*Sallusto et al.*, 2000).

Tabelle 1: Chemokine und Chemokinrezeptoren

Übersicht über die *in vivo* für die Migration von DC wichtigen Chemokine und Chemokinrezeptoren.

SDF: Stromal-cell derived factor, MCP: Macrophage chemoattractant protein, MIP: Macrophage inflammatory protein (Dieu-Nosjean et al., 1999; Rossi & Zlotnik, 2000; Janeway et al., 2005).

Chemokin	Produziert von	Rezeptor	Chemoattraktiv auf	Hauptwirkung
CXCL12 (SDF-1)	Stromazellen von Thymus, Knochenmark, Lymphknoten	CXCR4	reife & unreife DC, Naive T-Zellen, B-Zellen, Stammzellen	homöostatisch, Homing von Lymphozyten und Stammzellen, Überlebensfaktor für Stammzellen
CCL2 (MCP-1)	Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten	CCR2B	unreife DC, Monozyten, NK und T-Zellen, Basophile	inflammatorisch, Anlocken von Leukozyten an den Ort der Entzündung, Makrophagenaktivierung, Histaminfreisetzung aus Basophilen, Th2-Immunantwort
CCL3 (MIP- 1 α)	Monozyten, T-Zellen, Mastzellen, Fibroblasten	CCR1, CCR3, CCR5	unreife DC, Monozyten, NK und T-Zellen, Basophile	inflammatorisch, Anlocken von Leukozyten an den Ort der Entzündung, antiviral, Th1-Immunantwort
CCL4 (MIP- 1 β)	Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Endothelzellen	CCR1, CCR3, CCR5	unreife DC, Monozyten, NK und T-Zellen	inflammatorisch, Anlocken von Leukozyten an den Ort der Entzündung
CCL5 (RANTES)	T-Zellen, Endothelzellen, Thrombozyten	CCR1, CCR3, CCR5	unreife DC, Monozyten, NK und T-Zellen, Basophile, Eosinophile	inflammatorisch, Anlocken von Leukozyten an den Ort der Entzündung, Degranulation von Basophilen, T-Zell-Aktivierung
CCL19 (MIP- 3 β)	Endothel- und Stromazellen von Lymphgefäßen und -knoten, Tonsillen, Thymus	CCR7	reife DC, naive T-Zellen, B-Zellen	homöostatisch, Homing von DC und T-Zellen in die T-Zell-Zonen der Lymphknoten
CCL20 (MIP- 3 α)	Neutrophile, Stromazellen von Thymus und Lymphknoten	CCR6	unreife DC, Monozyten, Granulozyten, T- und B-Zellen	inflammatorisch, Anlocken von Leukozyten an den Ort der Entzündung
CCL21 (6Kine)	Endothel- und Stromazellen von Lymphgefäßen und -knoten, Tonsillen, Milz	CCR7	reife DC, naive T-Zellen, B-Zellen	homöostatisch, Homing von DC und T-Zellen in die T-Zell-Zonen der Lymphknoten

Die Sensitivität der DC den Chemokinen gegenüber verändert sich während ihrer Reifung. Ruhende DC exprimieren vor allem Rezeptoren für inflammatorische Chemokine. Während des Reifeprozesses werden diese Rezeptoren herunter reguliert und CCR7 hoch reguliert. CCR7 ist der Rezeptor für die Chemokine MIP-3 β und 6Kine (Yanagihara *et al.*, 1998) und als Hauptfaktor dafür verantwortlich, dass DC in die Lymphgefäße und die T-Zell-Regionen der drainierenden Lymphknoten wandern. Dort interagieren sie mit antigenspezifischen T-Lymphozyten und initiieren die adaptive Immunantwort (Dieu-Nosjean *et al.*, 1999; Martin-Fontecha *et al.*, 2003; Ohl *et al.*, 2004).

1.1.6 Wodurch werden reife dendritische Zellen charakterisiert?

Unreife DC sind auf die Aufnahme von Antigenen spezialisiert. Reife DC hingegen stellen sehr fähige antigenpräsentierende Zellen dar, die T-Lymphozyten aktivieren und eine spezifische Immunantwort einleiten können. Aus diesem Grund ist die Beurteilung des Reifegrades von DC bedeutsam für ihre Anwendung im Rahmen von Immuntherapien.

	Unreife DC 	Reife DC 
Morphologie	zytoplasmatische Fortsätze ↓	zytoplasmatische Fortsätze ↑
Immunphänotyp	MHC-Klasse-II-Moleküle ↓ kostimulatorische Moleküle ↓ kein CD83	MHC-Klasse-II-Moleküle ↑ kostimulatorische Moleküle ↑ CD83 ↑
Antigenpräsentation	Antigenaufnahme ↑ Antigenprozessierung ↑	Antigenpräsentation ↑
Migrationsfähigkeit	Migration auf MCP-1, MIP-1 α , SDF-1 α	Migration auf MIP-3 β , SDF-1 α
Immunantwort	T-Zell-Stimulation ↓ Induktion von Toleranz	T-Zell-Stimulation ↑ Sekretion von IL-12

Abb. 3: Zusammenfassender Vergleich zwischen unreifen und reifen DC

IL: Interleukin, MCP: Macrophage chemoattractant protein, MHC: Major histocompatibility complex, MIP: Macrophage inflammatory protein, SDF: Stromal-cell derived factor.

Reife DC sind gekennzeichnet durch ihre typische Morphologie mit einem sternartig verzweigten Zellkörper und feinen zytoplasmatischen Fortsätzen (Abb. 3). Diese Fortsätze werden Dendriten genannt und gaben den Zellen ihren Namen. Sie dienen der Vergrößerung der Zelloberfläche und bieten damit eine größere Kontaktfläche für die Interaktion mit T-Lymphozyten. Außerdem dienen sie durch Extension und Retraktion der Fortbewegung

(*Banchereau & Steinman, 1998*). Immunphänotypisch zeichnen sich reife DC durch ihre hohe Anzahl von MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche aus. Des Weiteren besitzen sie reichlich kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD58, CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) (*Banchereau et al., 2000*). CD80 und CD86 agieren als Liganden für die auf T-Zellen exprimierte Oberflächenmoleküle CD28 und CD152 (*zytotoxisches T – Lymphozytenantigen 4, CTLA-4*). CD28 ist ein entscheidender Rezeptor für die Aktivierung von T-Lymphozyten (*Janeway et al., 2005*). Die Bindung an CD152 hingegen bewirkt eine Anergie der T-Zellen (*Carreno & Collins, 2002*). Entgegen früherer Annahmen unterscheiden sich die immunmodulatorischen Funktionen von CD80 und CD86. CD80 scheint bevorzugt mit CD152 zu interagieren und an der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz beteiligt zu sein (*Sansom et al., 2003; Smith et al., 2008*). CD86 wird von reifen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und bewirkt eine Aktivierung der Immunantwort (*Sansom et al., 2003*). CD83 gilt als Markermolekül für reife DC. Es handelt sich um ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie (*Zhou & Tedder, 1995*), welches eine Rolle in der Immunmodulation spielt (*Lechmann et al., 2002*). Es nimmt kostimulatorische Funktionen wahr (*Scholler et al., 2002*) und ist insbesondere an der Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten beteiligt (*Scholler et al., 2001*).

1.2 Tumorimmunologische Grundlagen für eine Immuntherapie mit dendritischen Zellen

Die Verwendung von DC stellt eine Therapiemöglichkeit für die Behandlung maligner Erkrankungen dar, welche auf einer Modulation des Immunsystems beruht. Viele Tumorantigene sind unspezifisch, d.h. sie werden auch auf nicht entartetem Gewebe exprimiert und so als körpereigen erkannt. Lymphozyten sind aber fähig, maligne Zellen, welche spezifische Tumorantigene exprimieren, als fremd zu erkennen (*Janeway et al., 2005*). Doch die prinzipiell immunogenen malignen Zellen können sich durch verschiedene Mechanismen einer Immunantwort entziehen. Mittels unzureichender, durch die MHC-Moleküle vermittelter Expression der Tumorantigene können die malignen Zellen für das Immunsystem unsichtbar bleiben (*Tabelle 2*). Entartete Zellen können auch blockierende oder Apoptose auslösende Substanzen sezernieren oder bestimmte Oberflächenmoleküle exprimieren und dadurch eine Unterdrückung der Immunantwort bewirken.

Diese Erkenntnisse bieten Ansatzpunkte für immuntherapeutische Strategien gegen maligne Erkrankungen. Die Entwicklung einer auf DC basierenden Zellvakzine ermöglicht es, die spezifischen Tumorantigene dem Immunsystem durch spezialisierte antigenpräsentierende

Zellen darbieten zu können. Durch die Verabreichung von *ex vivo* generierten, reifen DC kann das Problem der ungenügenden Ausreifung und damit unzureichenden Aktivierung des Immunsystems *in vivo* umgangen werden.

Tabelle 2: Mechanismen, durch die maligne Zellen einer Immunantwort entgehen

IL: Interleukin, MHC: major histocompatibility complex, TGF: tumor growth factor, TNF: Tumor-Nekrose-Faktor, TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand, VEGF: vascular endothelial growth factor.

Tumor-immun-escape-Mechanismen		Referenz
Geringe Immunogenität der malignen Zellen	Geringe Expression der <i>MHC-Klasse-I-Moleküle</i>	(Koopman et al., 2000; Chang et al., 2006)
	Persistenz der <i>MHC-Klasse-II</i> assoziierten invarianten Kette an der antigenbindenden Stelle verhindert die Präsentation der Tumorantigene durch AML-Blasten	(Chamuleau et al., 2004)
	Geringe Präsentation <i>kostimulatorischer Moleküle</i>	(Buggins et al., 1999; Notter et al., 2001)
Durch die malignen Zellen induzierte Immunsuppression	Sezernierung von <i>TGFβ</i> , welches T-Lymphozyten hemmt	(Tada et al., 1991)
	Sezernierung von <i>IL-10</i> , welches in DC Toleranz induziert	(Steinbrink et al., 1999)
	Expression des <i>Fas-Liganden</i> , der in Fas-Rezeptor tragenden Zellen wie den Lymphozyten Apoptose auslöst	(Villunger et al., 1997)
	Expression des <i>TRAIL</i> , der in Zielzellen Apoptose auslöst	(Inoue et al., 2002)
	Freisetzung von <i>exosomenähnlichen Mikrovesikeln</i> , die den <i>Fas-Liganden</i> oder <i>TRAIL</i> tragen und damit ohne Zell-Zell-Kontakt Apoptose in Lymphozyten auslösen können	(Huber et al., 2005; Kim et al., 2005)
	Sezernierung von <i>VEGF</i> , welches die Reifung von DC verhindert	(Gabrilovich et al., 1999)
	Vermehrte Expression des Proteins <i>S100A9</i> , welches die Differenzierung von DC hemmt	(Cheng et al., 2008)

1.3 Grundlagen und Epidemiologie der Leukämien

Leukämie ist eine onkologische Erkrankung des blutbildenden Systems, bei der es zu einer ungenügenden Ausreifung und unregulierten Proliferation unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen kommt. Basierend auf den beteiligten Zelltypen werden myeloische von lymphoblastischen Leukämien unterschieden sowie nach dem klinischen Verlauf jeweils akute von chronischen Formen abgegrenzt (Baenkler et al., 2001; Tabelle 3).

Die akuten Leukämien sind charakterisiert durch eine reduzierte bis fehlende normale Hämatopoese mit Vermehrung unreifer Blasten im Knochenmark und/oder peripheren Blut. Im Blutbild findet sich eine Anämie, Granulozytopenie sowie Thrombozytopenie. Die Patienten leiden unter Müdigkeit und Schwäche, Fieber, Infektanfälligkeit sowie der Neigung zu Blutungen (Baenkler et al., 2001).

Tabelle 3: Übersicht der epidemiologischen Daten der verschiedenen Leukämien

Die Daten basieren auf den Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Statistiken des National Cancer Institute der USA (Ries et al., 2008). 5-Jahresüberlebensrate: Überlebensrate von Leukämiepatienten fünf Jahre nach Diagnosestellung im Vergleich zu der Überlebensrate der Normalbevölkerung.

	ALL	AML	CLL	CML
Inzidenz (pro 100.000 Einwohner pro Jahr)	1,6	3,6	4	1,5
Mittleres Alter bei Diagnosestellung	13	67	72	66
Mortalität (pro 100.000 Einwohner pro Jahr)	0,5	2,8	1,5	0,4
Relative 5-Jahresüberlebensrate	64,7%	21,9%	75,9%	50,2%

Die akute myeloische Leukämie (AML) wird nach morphologischen Kriterien anhand der French-American-British-Group (FAB)-Klassifikation eingeteilt (Smith et al., 2004) (Tabelle 4). Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) lässt sich anhand der Abstammung der malignen Zellen von der lymphozytären B- oder T-Zelllinie klassifizieren (Baenkler et al., 2001) (Tabelle 5).

Tabelle 4: FAB-Klassifikation der AML nach morphologischen Kriterien

AML-Subtypen	Morphologie
M0	minimal differenzierte AML
M1	AML ohne Ausreifung
M2	AML mit Ausreifung
M3	akute Promyelozyten-Leukämie
M4	akute myelomonozytäre Leukämie
M5	akute monozytäre Leukämie
M6	akute Erythroleukämie
M7	akute megakaryozytäre Leukämie

Tabelle 5: Einteilung der ALL nach B- oder T-Zell-Linie

Einteilung nach B- oder T-Zell-Linie	Subtyp
B-Linien-ALL	Pro-B-ALL
	Common (c)-ALL
	Prä-B-ALL
	Reife B-ALL
T-Linien-ALL	Pro-T-ALL
	Prä-T-ALL
	Intermediäre T-ALL
	Reife T-ALL

Die ALL ist vor allem eine Erkrankung des Kindesalters und trägt zu ca. 81% aller in der Kindheit diagnostizierten Leukämien bei (Coebergh et al., 2006). Ein zweiter Altersgipfel findet sich bei den über 80-Jährigen. Bei Kindern können durch die Induktions-Chemotherapie komplette Remissionen in 96% bis 99% der Fälle erreicht werden (Pui et al., 2001). Durch das Risiko eines Rezidivs schwanken die Heilungsraten allerdings zwischen 74% und 87% (Pui et al., 2001).

AML-Patienten können durch eine Standardinduktions- und Konsolidierungstherapie zu 40% bis 80% eine komplette Remission erreichen. Von diesen Patienten erleiden allerdings 50% bis 80% im späteren Verlauf ein Rezidiv (*Smith et al., 2004*). Betrug die Dauer der kompletten Remission weniger als zwölf Monate, so liegt die Wahrscheinlichkeit durch eine weitere Chemotherapie eine erneute komplette Remission zu erreichen unter 33% (*Smith et al., 2004*). Selbst nach allogener Stammzelltransplantation beträgt das Rezidivrisiko weiterhin 20% bis 25%. Die Gesamtüberlebensraten von AML-Patienten mit einem Rezidiv liegen bei heutigen Therapiestandards unter zehn Prozent (*Smith et al., 2004*).

Die chronischen Leukämien verlaufen symptomarm und langsamer. Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist charakterisiert durch eine klonale Proliferation myeloischer Zellen mit erhaltener Fähigkeit zur Differenzierung. Nach drei bis fünf Jahren symptomloser oder -armer Krankheitsdauer kommt es zu einer Zunahme der Proliferation mit Vermehrung von unreifen Granulozytenvorstufen im Blut sowie Anämie und Thrombozytopenie. Man spricht dann von der akzelerierten Phase. Schließlich folgt die Blastenkrise und der Übergang in eine AML (*Baenkler et al., 2001*). Die chronische lymphoblastische Leukämie (CLL) entspricht einem niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphom. Wie auch bei der ALL können die malignen Zellen von der lymphozytären B- oder der T-Zelllinie abstammen. Zu 95 % sind die Vorläuferzellen der CLL B-Lymphozyten (*Baenkler et al., 2001*). Die CLL äußert sich häufig durch Lymphknotenschwellungen und Hepatosplenomegalie. In späteren Stadien kann sie in ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom übergehen, das häufig therapierefraktär ist (*Baenkler et al., 2001*).

Neue Methoden für die Detektion von minimalen Resterkrankungen (*minimal residual disease, MRD*) (*Kern et al., 2004; Malec et al., 2004*), d.h. einem Anteil an Restblasten im Blut nach durchgeführter Chemotherapie, erlauben die Identifikation von Patienten mit einem hohen Risiko für ein Rezidiv (*Smith et al., 2004; Spinelli et al., 2007*). Insbesondere für Patienten im Stadium des MRD könnte eine Immuntherapie mit DC die Heilungsraten verbessern.

1.4 Veränderungen dendritischer Zellen bei Patienten mit Leukämie

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass DC von Patienten mit Leukämie verändert und in ihren Fähigkeiten beeinträchtigt sein können. Dies kann als Ausdruck der hämatologischen Grunderkrankung verstanden werden, da die DC zum Teil von den entarteten Zellen abstammen. Mohty et al. zeigten, dass sowohl die myeloischen als auch plasmazytoiden DC der untersuchten AML-Patienten die originalen leukämischen Chromosomenaberrationen aufweisen und bewiesen damit deren leukämische Abstammung (*Mohty et al., 2001*). Auch

die myeloischen DC von Patienten mit CML besitzen zu 98% das für die CML typische BCR-ABL Fusionsprotein (*Dong et al.*, 2003).

Bei AML-Patienten finden sich beispielsweise quantitative Veränderungen der DC in Form einer Vermehrung nur der myeloischen oder plasmazytoiden oder aber beider DC-Subtypen (*Mohty et al.*, 2001). Bei vier der untersuchten 37 Patienten mit AML konnten sogar keine DC im Blut gefunden werden (*Mohty et al.*, 2001). Zusätzlich wurden qualitative Veränderungen festgestellt. Die untersuchten plasmazytoiden DC von Patienten mit AML reifen *in vitro* nicht aus, es werden weder CD83 noch kostimulatorische Moleküle exprimiert und sie haben eine verringerte allogene T-Zell-Stimulationsfähigkeit und verminderte Produktion von Interferon alpha (*Mohty et al.*, 2001). Auch bei Patienten mit ALL konnten quantitative Veränderungen der DC festgestellt werden. So zeigte sich, dass die Anzahl der myeloischen und plasmazytoiden DC von Patienten mit B-ALL reduziert sind (*Maecker et al.*, 2006). Im Blut der Patienten mit T-ALL konnte hingegen eine deutlich erhöhte Anzahl von myeloischen DC nachgewiesen werden (*Maecker et al.*, 2006). Quantitative Veränderungen finden sich ebenfalls bei der chronischen myelomonozytären Leukämie in Form einer Verminderung der DC (*Vuckovic et al.*, 1999). Bei CML-Patienten zeigen die untersuchten myeloischen DC eine verringerte Antigenaufnahme und -prozessierung sowie eine verminderte Migration auf MIP-1 α . Beide Merkmale könnten auf die Veränderungen im Zytoskelett zurückzuführen sein, welche mit dem BCR-ABL Fusionsprotein zusammenhängen (*Dong et al.*, 2003).

Diese quantitativen Veränderungen und qualitativen Defizite der DC von Patienten mit Leukämie könnten an der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber den malignen Zellen beteiligt sein. Eine Vakzinierung unter Verwendung reifer DC stellt aus diesem Grund eine erfolgsversprechende Therapiemöglichkeit für Patienten mit Leukämie dar.

1.5 Möglichkeiten der Differenzierung von dendritischen Zellen *in vitro*

Die Herstellung von DC für eine klinische Anwendung gelingt über die Kultivierung von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (*Caux et al.*, 1992), Monozyten (*Sallusto & Lanzavecchia*, 1994) und leukämischen Blasten (*Cignetti et al.*, 1999). Als Quelle für die Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen kann Nabelschnurblut (*Moldenhauer et al.*, 2007), eine Knochenmarkspunktion oder eine mehrstündige Blutapherese (*Korbling*, 1999) dienen. Die Monozyten können mit nur geringem Aufwand durch Dichtegradientenzentrifugation aus dem peripheren Blut gewonnen werden (*Moldenhauer et al.*, 2003). Die aus Monozyten oder hämatopoetischen Stammzellen generierten DC werden für eine Immuntherapie mit Tumorpeptiden, Tumorlysaten, Tumor-DNA/RNA beladen oder

mit Tumorzellen fusioniert, um die spezifischen Tumorantigene zu präsentieren (*Zhou et al., 2002*). Leukämische Blasten behalten nach Differenzierung zu DC die Expression der leukämischen Antigene bei (*Panoskaltzis et al., 2002; Li et al., 2005; Luczynski et al., 2009*). Diese Strategie bietet den Vorteil, alle relevanten Tumorantigene dem Immunsystem präsentieren zu können, einschließlich noch unbekannter Antigene. Zudem entfällt die aufwändige Beladung der DC mit Tumormaterial. Die leukämischen Blasten können aus dem peripheren Blut oder im Rahmen einer Knochenmarkspunktion gewonnen werden. In den meisten Generierungsprotokollen für leukämische DC wird die gesamte Fraktion der mononukleären Zellen des Blutes oder des Knochenmarks für die Differenzierung verwandt (*Houtenbos et al., 2003; Cignetti et al., 2004; Lee et al., 2004b; Pospisilova et al., 2005*). Eine Entfernung der T-Lymphozyten oder eine alleinige Verwendung der adhärenenten Zellen dieser Fraktion scheint keine Vorteile zu erbringen (*Kufner et al., 2005b*).

1.5.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Ein häufig für die Differenzierung von DC verwandtes (*Panoskaltzis et al., 2002; Li et al., 2006; Westermann et al., 2007*) und auch in dieser Studie untersuchtes Zellkulturmedium ist RPMI 1640. Es ist ein chemisch definiertes Medium, welches vom Roswell Park Memorial Institute (Buffalo, New York) entwickelt wurde und sich vor allem für die Züchtung von Lymphozyten bewährte (*Lindl, 2002*). Es enthält anorganischer Salze, Puffersubstanzen, verschiedene Aminosäuren und Vitamine. RPMI 1640 wird häufig unter Zusatz von 10% (*Charbonnier et al., 1999; Lee et al., 2004b; Pospisilova et al., 2005*) oder 20% (*Woiciechowsky et al., 2001; Houtenbos et al., 2003*) fetalem Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS) verwendet. FBS wird aus dem Blut von Rinderfeten zwischen dem dritten und siebten Trächtigkeitsmonat gewonnen. Das fetale Blut gerinnt und wird zentrifugiert, wodurch sich das Serum im Überstand sammelt (*Lindl, 2002*). Es enthält zahlreiche bekannte und unbekannte Inhaltsstoffe wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Proteine, Aminosäuren, Salze, Vitamine und Spurenelemente (*Lindl, 2002*). Sie bieten u.a. einen xenogenen Stimulus für die Differenzierung und Reifung von DC. Panoskaltzis et al. konnten sogar zeigen, dass die leukämischen Blasten in FBS-haltigem Medium auch ohne die Zugabe weiterer Wachstumsfaktoren zu DC differenzieren (*Panoskaltzis et al., 2002*). Die Verwendung artfremder Seren birgt allerdings die Gefahr einer Xenosensibilisierung und anaphylaktischer Reaktionen bei der Applikation der generierten Zellen (*Mackensen et al., 2000*). Außerdem besteht bei FBS das Risiko der Übertragung der bovinen spongiformen Enzephalopathie (*Asher, 1999*). Daher ist die Entwicklung von Kulturverfahren, welche ohne den Zusatz von tierischen Seren auskommen, von Bedeutung. Die Verwendung von allogenem Humanserum

(HS) anstelle von FBS stellt eine Alternative dar (*Oehler et al.*, 2000; *Li et al.*, 2005). Eine weitere Möglichkeit ist die Zugabe von autologem Serum oder Plasma. Dieses könnte allerdings bei Patienten mit Leukämie einen hemmenden Einfluss auf die DC-Differenzierung ausüben (*Kufner et al.*, 2005b). Neuerdings werden serumfreie Medien entwickelt, welche durch den Zusatz verschiedener Makromoleküle und Wachstumsfaktoren ohne den Zusatz von Seren auskommen. Vor allem Insulin, Transferrin und Selenit haben sich als geeigneter Serumersatz erwiesen (*Lindl*, 2002). Da die verschiedenen Zellarten unterschiedliche Substanzen als Serumersatz benötigen, sind diese Medien zumeist sehr zellspezifisch. Ein speziell für die Kultivierung hämatopoetischer Vorläuferzellen entwickeltes Medium ist das QBSF 60, welches anders als RPMI 1640 humane Proteine als Zusatz enthält. Die enthaltenen Komponenten sollen die Proliferation und Differenzierung der Zellen verbessern, die genaue Rezeptur wurde nicht veröffentlicht.

1.5.2 Für die Differenzierung von dendritischen Zellen verwendete Zytokine

Zur *ex vivo* Generierung von DC aus Monozyten, hämatopoetischen Stammzellen oder leukämischen Blasten wurden verschiedene Protokolle entwickelt. Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF), Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) und IL-4 bilden meist die Grundlage für die Differenzierung (*Herbst et al.*, 1997; *Banchereau et al.*, 2000; *Dauer et al.*, 2003; *Kufner et al.*, 2005b; *Moldenhauer et al.*, 2006).

1.5.1.1 Tumor-Nekrose-Faktor alpha

TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches u.a. von aktivierten Monozyten, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten sowie Fibroblasten sezerniert wird (*Fitzgerald et al.*, 2001). Es vermittelt seine Signale durch zwei Rezeptoren, TNF-Rezeptor I (CD120a) und II (CD120b) (*Fitzgerald et al.*, 2001). Bis auf wenige Ausnahmen, wie beispielsweise Erythrozyten und ruhende T-Lymphozyten, exprimieren beinahe alle Zellen des Körpers TNF-Rezeptoren. Der TNF-I Rezeptor ist auf den meisten Zelltypen zu finden. Der TNF-II Rezeptor wird vor allem von hämatopoetischen Zellen exprimiert (*Fitzgerald et al.*, 2001). TNF α hat eine zytotoxische Wirkung auf eine Vielzahl von Tumorzellen (*Mocellin & Nitti*, 2008). Es erhielt seinen Namen aufgrund seiner Fähigkeit, im Tiermodell hämorrhagische Nekrosen in soliden Tumoren zu induzieren (*Carswell et al.*, 1975). TNF α besitzt außerdem immunregulatorische Fähigkeiten (*Xanthoulea et al.*, 2004). Es spielt eine essentielle Rolle in der Immunantwort gegen bakterielle Infektionen und ist u.a. in die Entstehung des septischen Schocks (*Xanthoulea et al.*, 2004) und von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden

Arthritis (*Chang & Girgis, 2007*) involviert. Außerdem ist es an Zellwachstum und Differenzierung einer Vielzahl von Zelltypen beteiligt. Für TNF konnte eine konzentrationsabhängige Wirkung auf hämatopoetische Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Es wirkt proliferationsstimulierend in niedrigen und -inhibierend in hohen Konzentrationen (*Rusten et al., 1994*). TNF ist ein wichtiger Faktor für die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in DC (*Banchereau et al., 2000; Rossi & Young, 2005*). Er wird in den meisten Protokollen für die Generierung von DC aus Monozyten, hämatopoetischen Stammzellen und leukämischen Blasten verwendet (*Caux et al., 1997; Oehler et al., 2000; Moldenhauer et al., 2003; Kufner et al., 2005b; Pospisilova et al., 2005; Moldenhauer et al., 2006*).

1.5.1.2 Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

GM-CSF ist ein Überlebens- und Wachstumsfaktor für hämatopoetische Vorläuferzellen. Außerdem ist er an der Differenzierung und Aktivierung von Granulozyten und Monozyten beteiligt und wirkt für Endothelzellen, Zellen der Erythrozytenlinie, Megakaryozyten und T-Zellen als Wachstumsfaktor (*Fitzgerald et al., 2001*). Er wird von Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und T-Lymphozyten produziert (*Fitzgerald et al., 2001*).

GM-CSF induziert in vivo und in vitro die Expansion myeloischer DC-Vorläuferzellen und deren Differenzierung (*Banchereau et al., 2000; Waller, 2007*). Er ist Bestandteil der meisten Protokolle für die in vitro Generierung von DC (*Caux et al., 1997; Dauer et al., 2003; Moldenhauer et al., 2003; Eisendle et al., 2005; Kufner et al., 2005b; Pospisilova et al., 2005; Houtenbos et al., 2006*).

1.5.1.3 Stammzellfaktor

Stammzellfaktor (*stem cell factor, SCF; c-kit ligand*) ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der u.a. von Stromazellen des Knochenmarks und von Fibroblasten produziert wird. Seine Wirkung wird durch den c-Kit Rezeptor (CD117) vermittelt (*Fitzgerald et al., 2001*). SCF und c-Kit sind essenziell für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen. Durch die Bindung von SCF und die nachfolgende Induktion intrazellulärer Signalkaskaden wird u.a. die Transkriptionsrate erhöht und die Einleitung der Apoptose verhindert (*Smith et al., 2001*). Des Weiteren besitzt SCF eine direkte Wirkung auf die Differenzierung myeloischer und lymphatischer Zellen sowie synergistische Effekte mit anderen Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, Erythropoetin und IL-7 (*Fitzgerald et al., 2001*). Die Zugabe von SCF zu Zellkulturmodellen für die Differenzierung von DC dient einem verbesserten Überleben der

Zellen. Außerdem induziert SCF die Expansion von DC-Vorläuferzellen und steigert dadurch die Anzahl generierter DC (Arrighi *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2001; Moldenhauer *et al.*, 2003; Fadilah *et al.*, 2007).

1.5.1.4 Fms-like tyrosine kinase-3 Ligand

Fms-like tyrosine kinase-3 Ligand (Flt-3L) ist ein Wachstumsfaktor, welcher durch Aktivierung des Tyrosinkinaserzeptors Flt-3 die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen reguliert (Fitzgerald *et al.*, 2001; Karsunky *et al.*, 2003). Flt-3L stimuliert Wachstum und Differenzierung nicht direkt, sondern entfaltet seine proliferationssteigernde Wirkung synergistisch mit anderen Wachstumsfaktoren und Interleukinen (Fitzgerald *et al.*, 2001). Er spielt eine wichtige Rolle für die Generierung von reifen Leukozyten wie u.a. den DC (McKenna *et al.*, 2000; Karsunky *et al.*, 2003) und erhöht die Anzahl der DC in vivo (Lyman & Jacobsen, 1998; Maraskovsky *et al.*, 2000). Auch in in-vitro-Kulturmodellen lässt sich die Anzahl generierter DC durch die Zugabe von Flt-3L steigern (Strobl *et al.*, 1997; Arrighi *et al.*, 1999; Woiciechowsky *et al.*, 2001; Kufner *et al.*, 2005b).

1.5.1.5 Interleukin-3

IL-3 ist ein Wachstumsfaktor, der das Überleben, die Differenzierung und die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen reguliert. Er fördert die Koloniebildung von Erythrozyten, Megakaryozyten, Granulozyten, Mastzellen und Monozyten (Fitzgerald *et al.*, 2001). IL-3 wird von aktivierten T-Lymphozyten, Mastzellen und Eosinophilen produziert und entfaltet seine Wirkung vor allem im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen (Fitzgerald *et al.*, 2001). Seine Fähigkeit, B-Zellen zur Proliferation anzuregen und Monozyten zu aktivieren, weist auf eine zusätzliche immunmodulatorische Rolle von IL-3 hin (Fitzgerald *et al.*, 2001; Delves *et al.*, 2006). IL-3 scheint DC zur Expansion anzuregen (Caux *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 2004) und insbesondere an der Differenzierung von Vorläuferzellen plasmazytoider DC beteiligt zu sein (Banchereau *et al.*, 2000; Shortman & Liu, 2002; Encabo *et al.*, 2004). IL-3 wird in einigen Zellkulturmodellen zur Generierung von DC eingesetzt (Houtenbos *et al.*, 2003; Fadilah *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2009).

1.5.1.6 Interleukin-4

Das Zytokin IL-4 reguliert die Immunantwort einschließlich Proliferation, Überleben und Genexpression von Lymphozyten. Es wird von Mastzellen, T-Lymphozyten und Stromazellen des Knochenmarks produziert (Fitzgerald *et al.*, 2001) und vermittelt die Differenzierung naiver T-Zellen in Th2-Zellen (Grunig *et al.*, 2005). IL-4 bewirkt eine Differenzierung

myeloischer Vorläuferzellen in DC (*Banchereau et al.*, 2000; *Rossi & Young*, 2005) und ist Bestandteil der meisten in vitro Kultivierungsverfahren (*Dauer et al.*, 2003; *Moldenhauer et al.*, 2003; *Eisendle et al.*, 2005; *Kufner et al.*, 2005b; *Pospisilova et al.*, 2005; *Houtenbos et al.*, 2006).

1.5.1.7 CD40 Ligand

CD40 Ligand (CD40L, CD154) ist ein Transmembranprotein der TNF-Ligandenfamilie und wird hauptsächlich von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten exprimiert (*Fitzgerald et al.*, 2001). Eine proteolytisch entstandene und biologisch aktive lösliche Form des CD40L ist ebenfalls beschrieben (*Graf et al.*, 1995). Der CD40 Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten und ist bedeutsam für den Immunglobulinklassenwechsel (*Fitzgerald et al.*, 2001). Eine fehlende Expression von CD40L führt zu dem Hyper-IgM-Immundefekt, bei dem eine erhöhte Konzentration von Immunglobulin (Ig) M bei gleichzeitig fehlender Produktion von IgG, IgA und IgE besteht (*Conley et al.*, 1994). Die Bindung von CD40L an seinen Rezeptor CD40, der u.a. von B-Lymphozyten und DC exprimiert wird, liefert ein entscheidendes Signal für die Aktivierung der CD4⁺ T-Lymphozyten und damit für die Einleitung der Immunantwort. Die Zugabe von CD40L verbessert das Überleben der DC und induziert ihre Reifung zu kompetenten antigenpräsentierenden Zellen mit Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und vermehrter Produktion von IL-12 (*van Kooten & Banchereau*, 2000). Es wird in einigen Zellkulturmodellen für die Generierung reifer DC eingesetzt (*Cignetti et al.*, 2004; *Lee et al.*, 2004b; *Pospisilova et al.*, 2005).

Resultierend aus diesen Überlegungen wurden verschiedene Zytokinkombinationen für die Differenzierung von AML- und ALL-Blasten zu DC entwickelt. In Vorversuchen unserer Forschungsgruppe zeigte sich die Kombination aus TNF α , GM-CSF, SCF und Flt-3L als für AML- und ALL-Blasten geeignet. Bei den AML-Kulturen erwies sich die zusätzliche Zugabe von IL-3 und IL-4 und bei den ALL-Blasten von IL-4 und CD40L zu den oben genannten Zytokinen als vorteilhaft.

2 Themenstellung

Die Erweiterung des Wissens um die molekularen, genetischen und zellulären Grundlagen bei der Entstehung maligner Erkrankungen ermöglicht die Entwicklung innovativer immuntherapeutischer Ansätze zur Optimierung der Therapieergebnisse onkologischer Erkrankungen. Ziel ist es, die Immuntoleranz gegenüber den entarteten Zellen zu durchbrechen und eine systemische, dauerhafte Immunantwort zu initiieren. DC sind die fähigsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. Die Entwicklung einer Zellvakzine mit DC gegen onkologische Erkrankungen wie Leukämien ist eine interessante Alternative zur konventionellen Chemotherapie.

Ziel der vorliegenden Studie war es, für die Generierung von DC aus AML- und ALL-Blasten geeignete Kulturbedingungen unter Verzicht auf fetales Kälberserum zu entwickeln. Als Quellzellen dienten die Blasten von 16 AML- und 21 ALL-Patienten, welche zu DC differenziert wurden. Verglichen wurden die Grundmedien RPMI 1640 unter Zusatz von 20% FBS, RPMI 1640 versetzt mit 5% Humanserum sowie QBSF 60 versetzt mit 5% Humanserum. Des Weiteren erwiesen sich in Vorversuchen sowohl bei AML- als auch bei ALL-Kulturen jeweils zwei Zytokinkombinationen als vorteilhaft, welche für die Identifizierung der optimalen Kulturbedingungen genauer verglichen werden sollten. Ein weiteres Anliegen stellte die Ermittlung der optimalen Zeitspanne für die Differenzierung der DC dar. Zu diesem Zweck wurden die generierten DC nach ein und zwei Wochen der Kultivierung anhand ihrer Morphologie, Vitalität, Gesamtzellzahl und ihrem Immunphänotyp beurteilt. Als Funktionstests für die differenzierten Zellen wurden zur Beurteilung der immunstimulatorischen Fähigkeiten die gemischte Lymphozytenkultur und die Bestimmung des inflammatorischen Zytokins IL-12 durchgeführt. Eine Einschätzung der migratorischen Kapazität der Zellen wurde mittels Transmigrations-Assay vorgenommen.

Ausgehend von diesen Untersuchungen sollte ein abschließendes Urteil über die Eignung der getesteten Grundmedien und Zytokinkombinationen für die Generierung der DC aus den leukämischen Blasten gefällt werden können. Zudem sollte die optimale Zeitspanne für die Differenzierung bestimmt und Aussagen zum empfohlenen Applikationsweg getroffen werden können. Die vorliegende Studie soll einen Beitrag zur Optimierung von Generierungsprotokollen für DC im Hinblick auf ihren künftigen klinischen Einsatz leisten, mit dem Ziel, die Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit Leukämie zu verbessern.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientenblasten

Die leukämischen Blasten wurden von ALL- und AML-Patienten bei Erstdiagnose oder im Rezidiv im Rahmen von Routineuntersuchungen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut gewonnen.

Tabelle 6: Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

BFM: Berlin-Frankfurt-Münster multizentrische Studie, ED: Erstdiagnose, m: männlich, Rez.: Rezidiv, w: weiblich

Patient	Alter	Geschlecht	FAB-Klass.	Erstdiagnose/Rezidiv	Vorheriges Therapieregime
1	51	w	M2	ED	-
2	13	W	M1	ED	-
3	15	M	M2	ED	-
4	7	m	M4	ED	-
5	74	w	M1	ED	-
6	24	w	M1	ED	-
7	16	w	M1	ED	-
8	50	w	M5	2. Rez.	Dresdner Protokoll + allogene Stammzelltransplantation; Rezidivchemotherapie MitoFLAG-Protokoll
9	4	w	M5	1. Rez.	ALL-BFM 2004
10	55	w	M2	ED	-
11	39	w	M0	ED	-
12	16	m	M4	1. Rez.	AML-BFM 2004
13	11	w	M2	ED	-
14	17	w	M5	ED	-
15	14	m	M5	ED	-
16	3	m	M4/5	1. Rez.	AML-BFM 2004

Das durchschnittliche Alter der AML-Patienten betrug $25,6 \pm 5,2$ (*standard error of the mean, SEM*) Jahre. Die Blasten waren im Mittel $4,8 \pm 0,82$ (*SEM*) Monate eingefroren, bevor sie in Kultur gesetzt wurden. Die Werte variieren zwischen 0 und 27 Monaten.

Tabelle 7: Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie

BFM: Berlin-Frankfurt-Münster multizentrische Studie, ED: Erstdiagnose, m: männlich, Rez.: Rezidiv, w: weiblich

Patient	Alter	Geschlecht	Immunphänotyp	Erstdiagnose/Rezidiv	Vorheriges Therapieregime
1	2	W	prä-B-ALL	1. Rez.	ALL-BFM 2000
2	9	W	c-ALL	1. Rez.	ALL-BFM 2000
3	5	W	biphänotypisch	2. Rez.	ALL-BFM 2000; ALL-RezBFM
4	15	M	prä-T-ALL	1. Rez.	ALL-BFM 1996
5	12	M	c-ALL	1. Rez.	ALL-BFM 2000
6	17	W	c-ALL	1. Rez.	ALL-BFM 1999
7	0,5	M	pro-B-ALL	ED	-
8	12	w	pro-B-ALL	ED	-
9	10	m	c-ALL	1. Rez.	Co-ALL 06-97
10	6	m	c-ALL	ED	-
11	3	m	c-ALL	ED	-
12	3	w	prä-B-ALL	2. Rez.	ALL-BFM 2000; ALL-Rez. BFM; allogene
13	5	m	c-ALL	1. Rez.	ALL-BFM 2000
14	10	m	T-ALL	ED	-
15	13	w	T-ALL	ED	-
16	9	m	T-ALL	ED	-
17	8	m	prä-B-ALL	1. Rez.	ALL-BFM 2000
18	4	m	T-ALL	ED	-
19	17	w	c-ALL	1. Rez.	ALL-BFM 2000
20	9	w	c-ALL	1. Rez.	ALL-BFM 2000
21	7	m	c-ALL	1. Rez.	ALL-BFM 2000

Das durchschnittliche Alter der ALL-Patienten betrug $8,4 \pm 1$ (SEM) Jahre. Die mittlere Einfrierdauer der Blasten vor Beginn der Zellkultur lag bei $3,2 \pm 0,44$ (SEM) Monaten und variierte zwischen 0 und 8 Monaten. Die Blasten von zwei Patienten (Patienten Nr. 2 und 10) waren TEL/AML1-positiv, alle anderen negativ.

3.1.2 Reagenzien

3.1.2.1 Chemokine

Chemokin

MCP-1 (20µg/ml)

MIP-1α (20µg/ml)

MIP-3α (20µg/ml)

MIP-3β (20µg/ml)

SDF-1α (10µg/ml)

Hersteller

alle rekombinant human von
PeproTech EC Ltd., London, UK

3.1.2.2 Zytokine

Zytokin

Interleukin 3

spezifische Aktivität

$\geq 1 \times 10^6$ U/mg

Hersteller

rekombinant human von
Sigma, Taufkirchen, D

CD40-Ligand

$\geq 1 \times 10^5$ U/mg

alle rekombinant human von

Flt-3L

$> 1 \times 10^6$ U/mg

PeproTech EC Ltd., London, UK

GM-CSF

$\geq 1 \times 10^7$ U/mg

Interleukin 4

$> 5 \times 10^6$ U/mg

Stem cell factor

$> 5 \times 10^5$ U/mg

TNFα

$> 2 \times 10^7$ U/mg

3.1.2.3 Medien und Zusätze

Substanz

Fetal Bovine Serum (FBS) Superior

L-Glutamin

Penicillin/Streptomycin

QBSF 60 (serum-free medium)

RPMI 1640 Medium

X-Vivo 10 (serum-free medium)

Hersteller

Biochrom AG, Berlin, D

Biochrom AG, Berlin, D

PAA Laboratories GmbH, Linz, A

Quality Biological, Inc.,

Gaithersburg, MD, USA

Biochrom AG, Berlin, D

Cambrex Bio Science Verviers,

Verviers, B

3.1.2.4 Sonstige Reagenzien

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
1-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO, 33%)	Apotheke Charité Campus Virchow-Klinikum, Berlin, D
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Liquemin N5000	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, D
Methyl- ³ H- Thymidin	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Staphylokokken Enterotoxin B	Servo Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Trypanblau 0,5%	Biochrom AG, Berlin, D

3.1.3 Puffer und Lösungen

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
10x Phosphate buffered solution (PBS)	80g Natriumchlorid 2g Kaliumchlorid 2g Kaliumhydrogenphosphat 14,4g diNatriumhydrogenphosphat 1000ml destilliertes Wasser
<i>Lösung</i>	<i>Hersteller</i>
Ficoll: Biocoll Separating Solution (Dichte 1.077g/ml)	BioChrom AG, Berlin, D
FACS Flow (Elektrolytlösung)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg, D

Lösung

FACS Clean

FACS Lysing Solution (Fixierlösung)

Diff-Quik Färbelösung-Set

Hersteller

Becton Dickinson, Heidelberg, D

BD Biosciences, San Jose,
CA, USADade Behring Holding GmbH,
Liederbach, D**3.1.4 Antikörper****Tabelle 8: Für die durchflusszytometrischen Messungen verwendete Antikörper***FITC: Fluoresceinisothiocyanat, Ig: Immunglobulin, PE: Phycoerythrin*

Antikörper	Markierung	Klon	Hersteller
Mouse IgG1	FITC	MCG1	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, D
Mouse IgG1	PE	203	
Antihuman CD1a	PE	HI149	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA
Antihuman CD14	FITC	M5E2	
Antihuman CD80	FITC	BB1	
Antihuman CD86	PE	2331 (FUN-1)	
Antihuman CD184 (CXCR4)	PE	12G5	
Antihuman HLA-DR	FITC	L234	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Antihuman CD83	PE	HB15a	Beckman Coulter GmbH, Marseille, F
Antihuman CD197(CCR7)	FITC	150503	R&D Systems, MN, USA

3.1.5 ELISA Kit (Humaner Interleukin 12 Immunoassay)*Reagenzien und Lösungen*

mit IL-12 beschichtete Mikrotiterplatte (96-Well)

polyklonaler IL-12 Antikörper

IL-12 Standard (rekombinant human)

Assay Diluent Lösung RD1F

Calibrator Diluent RD5C Konzentrat

Waschpufferkonzentrat

Farbreagenz A (Hydrogenperoxid)

Farbreagenz B (Tetramethylbenzidine)

Stop Solution

Hersteller

alle R&D Systems, MN, USA

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Material

Falcon Einmalpipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)
Falcon Multiwell Platte (6, 24-Well)
Falcon Konisches Röhrchen (15ml, 50ml)
Falcon Rundbodenröhrchen (5ml)
Falcon Zellkulturflasche (250ml)
Filter Cards
Kryoröhrchen Cryo Tube (1ml)
Kanüle (0,9 x 40mm)
Melt-on Scintillator Sheets
(Meltilex A 1450-441, Größe 73)
Micro Tube 1,5ml Safe Seal
Mikrotiterplatten (96-Well)

Neubauer Zählkammer 0,1mm Tiefe

Objektträger 76 x 26mm
Pipettenspitzen (200 μ l, 1000 μ l)
Pipettenspitzen epTIPS Reloads (0,5-20 μ l, 50-1000 μ l)
Printed Filtermat A (1450-421, 90 x 120mm)

Sample Bag (1450-432, 90 x 120mm)

Spritze (20ml)
Spritze mit Kanüle (1ml)
Sterilfilter Porengröße 0,2 μ m
Transferpipette steril (3,5ml)
Transwell 8,0 μ m Pore Size, 6,4mm Diameter

Hersteller

Becton Dickinson, Heidelberg, D
Thermo Shandon, Pittsburgh, USA
Nunc A/S, Roskilde, DK
Becton Dickinson, Heidelberg, D
Wallac Oy, jetzt Perkin Elmer
LAS, Turku, FIN
Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Greiner Bio-One GmbH,
Frickenhausen, D
LO Laboroptik GmbH,
Friedrichsdorf, D
Langenbrinck, Emmendingen, D
Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Eppendorf, Hamburg, D
Wallac Oy, jetzt Perkin Elmer
LAS, Turku, FIN
Wallac Oy, jetzt Perkin Elmer
LAS, Turku, FIN
Becton Dickinson, Heidelberg, D
Terumo Europe N.V., Leuven, B
Sartorius AG, Göttingen, D
Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Corning Incorporated,
New York, USA

3.1.7 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
Bestrahlungsgerät	STS OB 29/4 111000 GBq	Strahlungstechnik und Strahlungsschutz GmbH, Braunschweig, D
Brutschrank	5% CO ₂ , 37°C	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Cytospin Zentrifuge	Cytospin 4	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA
Durchflusszytometer	FACScan	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Harvester		Tomtec, Hamden, CT, USA
Kamera	Meta View 3,6a	Visitron Systems GmbH, Puchheim, D
Kryobox 1°C Freezing Container	5100	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, NY, USA
Lichtmikroskop	M 20	Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, CH
Lichtmikroskop	Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D
Lichtmikroskop	Leica DMRBE	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, D
Liquid Scintillation Counter	1450 Microbeta Plus	Wallac, jetzt Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau-Rüdesheim, D
Mikropipetten	0,5-10µl, 2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Microsealer (Einschweißer)	1495-021	Wallac, jetzt Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau-Rüdesheim, D
Pinzette	CE Cimex Rostfrei	Feinlager des Logistikzentrums Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin, D
Pipettierhilfe	Easypet 4420	Eppendorf, Hamburg, D
Präzisionswaage	EW 600-2M	Kern & Sohn GmbH, Albstadt, D
Vortexer	Genie 2 (G 560E)	Scientific Industries Inc., New York, USA
Werkbank	Lamin Air HB 2472	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D

<i>Gerät</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Zentrifuge	Biofuge 13	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D

3.1.8 Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>
CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg, D
GraphPad Prism Version 3.0	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Micro Beta Windows Workstation	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA
Spot Advanced	Visitron Systems, West Chester, PA, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Arbeitstechniken

3.2.1.1 Sterile Arbeitstechnik

Die Zellkulturen inklusive der Isolierung der leukämischen Blasten sowie alle Manipulationen vor Durchführung der Experimente wurden unter der sterilen Werkbank Lamin Air HB 2472 durchgeführt unter Verwendung von sterilen Utensilen und einer sterilen Arbeitstechnik (*Lindl, 2002*).

3.2.1.2 Bestimmung von Gesamtzellzahl und Vitalität

Die Zellen wurden manuell mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer ausgezählt. Dafür wurden 10µl der entsprechenden Zellsuspension mit 10µl Trypanblau gemischt. Avitale Zellen verlieren ihre Membranbarriere, wodurch der Farbstoff von diesen Zellen aufgenommen wird und sie lichtmikroskopisch dunkelblau bis schwarz erscheinen (*Lindl, 2002*). Vitale Zellen mit intakter Membranbarriere sind dagegen farblos. Da Trypanblau zytotoxisch wirkt, nimmt mit zunehmender Inkubationsdauer die Anzahl avitaler Zellen zu (*Lindl, 2002*). Es wurden sofort nach der Mischung mit dem Farbstoff die lebenden und toten Zellen in vier Großquadranten ausgezählt und die Gesamtzellzahl sowie die Vitalität wie folgt berechnet:

$$gesZZ = \frac{gezZZ}{4} \cdot V \cdot VF \cdot 10^4$$

Formel 1: Berechnung der Gesamtzellzahl

gesZZ.....Gesamtzellzahl je Milliliter
 gezZZ..... gezählte Zellzahl vitaler Zellen
 V.....Volumen der Zellsuspension
 VF..... Verdünnungsfaktor

$$Vitalität = \frac{vitaleZZ}{gesZZ} \cdot 100$$

Formel 2: Berechnung der Vitalität

vitaleZZ.....Zellzahl vitaler Zellen
 gesZZ..... Gesamtzellzahl

3.2.1.3 Waschen der Zellen

Um ungewünschte Substanzen wie Zytokine, farbige Medien etc. von den Zellsuspensionen zu entfernen, wurden die entsprechenden Zellen in sterile Röhrchen überführt und bei 1800 Umdrehungen/Minute (frische leukämische Blasten, isolierte T-Lymphozyten) oder 1400 Umdrehungen/Minute (Zellkulturen) für sieben Minuten zentrifugiert, dekantiert sowie in neuem Medium oder *phosphate buffered solution* (PBS) resuspendiert.

3.2.2 Isolierung der leukämischen Blasten

Die Isolierung der leukämischen Blasten erfolgte mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichte auf den Boden des Röhrchens, während die mononuklearen Zellen des Blutes, zu denen die leukämischen Blasten gehören, an der Grenzschicht zwischen Plasma und Ficoll einen weißlichen Ring bilden, den sogenannten Buffy Coat. Diese Schicht wurde mit einer sterilen Transferpipette abgenommen und mit PBS gewaschen. Durch einen zehnmütigen Waschschrift bei 1000 Umdrehungen/Minute ohne Bremse wurden die Thrombozyten ausgewaschen. Die mononuklearen Zellen wurden in Medium resuspendiert und entweder sofort in Zellkultur gesetzt oder mit RPMI 1640 versetzt mit 20% FBS und 150µl der 33%igen Dimethylsulfoxid-Lösung in Kryoröhrchen eingefroren. Dies entspricht einer Endkonzentration von 5% Dimethylsulfoxid. Die Kryoröhrchen wurden in die mit 250ml 1-Propanol gefüllte und bei 4°C vorgekühlte Kryobox gesetzt und bei -80°C eingefroren.

Alle zwei bis drei Tage wurde 500µl frisches Medium sowie 5µl Glutamin (200mM) und Zytokine in den entsprechenden Konzentrationen zugefügt. Die Beurteilung der differenzierten Zellen erfolgte in einem Zeitrahmen von vier bis sechs (im Folgenden mit *einer Woche* bezeichnet) sowie sieben bis neun Tagen (im Folgenden mit *zwei Wochen* bezeichnet).

3.2.4 Morphologische Beurteilung

Die morphologische Beurteilung der differenzierten DC erfolgte anhand von Ausstrichpräparaten. Zu diesem Zweck wurden aus jedem Well 100 - 150µl Zellsuspension entnommen. Die Objektträger wurden zunächst mit 100µl PBS bei 800 Umdrehungen/Minute für eine Minute in der Cytospin-Zentrifuge angefeuchtet. Anschließend erfolgte die Zugabe der Zellsuspensionen und eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 800 Umdrehungen/Minute. Die Objektträger wurden über Nacht an der Luft getrocknet und am folgenden Tag mit dem Diff-Quick Färbelösung-Set gefärbt. Die Präparate wurden mit der Kamera Meta View 3,6a und der Software Spot Advanced (beides Visitron Systems) fotografiert.

3.2.5 Durchflusszytometrische Analyse des Immunphänotyps

Um die differenzierten DC zu charakterisieren und ihren Anteil an der Gesamtpopulation zu ermitteln, wurde ihr Immunphänotyp bestimmt. Es wurde die Expression der Oberflächenmoleküle humanes Lymphozyten-Antigen (HLA) -DR, CD1a, CD14, CD83, CD80, CD86, sowie der Rezeptoren CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7) untersucht.

3.2.5.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Labortechnik, die sowohl in der medizinischen und biologischen Forschung als auch in der Diagnostik hämatologischer und immunologischer Erkrankungen eingesetzt wird und die Analyse des Immunphänotyps suspendierter lebender Zellen erlaubt. Durch die Zugabe fluoreszenzmarkierter Antikörper kann die Expression von Oberflächen- sowie intrazellulären Molekülen quantitativ bestimmt werden.

Die Einzelzellen werden durch eine dünne Messküvette gesaugt und dabei von einem Laserlicht angestrahlt. Trifft dieses auf eine Zelle, so entsteht Streulicht. Abhängig von dem Winkel des Streulichts erhält man unterschiedliche Informationen. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) wird entlang der Richtung des einfallenden Lichtes gemessen und hängt von der Größe der den Laserstrahl kreuzenden Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) hingegen wird rechtwinklig vom einfallenden Lichtstrahl gemessen und steigt

mit dem Grad der Granularität der Zelle. So ist die Abgrenzung einzelner Zellpopulationen möglich (Luttmann *et al.*, 2006).

Zusätzlich absorbieren die angestrahlten fluoreszierenden Antikörper, mit denen die Zellen markiert werden, bestimmte Wellenlängenbereiche des Lichts, wodurch Elektronen des Farbstoffs angeregt und auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Unter Abgabe von Energie in Form von Wärme und Photonen fallen sie auf das Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration kann als Licht einer bestimmten Wellenlänge durch optische Detektoren registriert werden. Sie ist proportional zu der Menge an gebundenen Antikörpern je Zelle. Häufig werden das mit einer Wellenlänge von 519nm grün fluoreszierende Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) sowie das gelb-rötlich leuchtende Phycoerythrin (PE) mit einem Emissionsmaximum bei 578nm verwendet (Luttmann *et al.*, 2006).

3.2.5.2 Aufbereitung und Markierung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Die entnommenen Zellsuspensionen wurden in 5ml Falcon Rundbodenröhrchen gefüllt, abzentrifugiert, dekantiert und anschließend mit einem Milliliter PBS gewaschen. Nach Resuspension des Zellpellets mit 100µl PBS erfolgte die Zugabe von jeweils 1,8µl FITC- sowie PE-markierten Antikörpern. Die Suspensionen wurden gemischt und im Kühlschrank bei 4°C für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Sollten die Zellen fixiert werden, erfolgte als zusätzlicher Arbeitsschritt die Zugabe von zwei Millilitern der mit PBS in einem Verhältnis von 1:10 verdünnten FACS Lysing Solution und Inkubation bei Raumtemperatur für sieben Minuten. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, dekantiert, erneut mit einem Milliliter PBS gewaschen und mit 200µl PBS resuspendiert.

Die Zellen wurden bis zur Messung am Durchflusszytometer abgedunkelt im Kühlschrank gelagert. Durch die Fixierung war die Messung auch noch in den folgenden zwei Wochen möglich, ohne diese erfolgte sie am selben Tag.

3.2.5.3 Auswertung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms CellQuest Pro. In einem ersten Dot Plot, einem Koordinatensystem in dem auf der Abszisse die FSC-Werte und der Ordinate die SSC-Werte aufgetragen werden, wurde zunächst die zu beurteilende Zellpopulation durch Setzen eines Analysenfensters eingegrenzt, d.h. gated. In einem weiteren Dot Plot wurden die erfassten Fluoreszenzen dargestellt, Fluoreszenz 1 (FL1: FITC) auf der Abszisse sowie Fluoreszenz 2 (FL2: PE) auf der Ordinate. Durch zwei orthogonal gesetzte Führungslinien wurden die erfassten Zellen jeweils als einfach positiv, doppelt positiv oder

doppelt negativ definiert. Der prozentuale Anteil der Zellen in den entsprechenden Quadranten wurde durch das Programm errechnet (Abb. 4).

Das Analysefenster wurde bei jeder Messung an einer Negativkontrolle mit Mouse-Immunglobulin (FITC und PE; IgG-Kontrolle) markierten Zellen justiert. Bei der Auswertung wurden die Werte der Negativkontrolle von den Messwerten der Proben abgezogen.

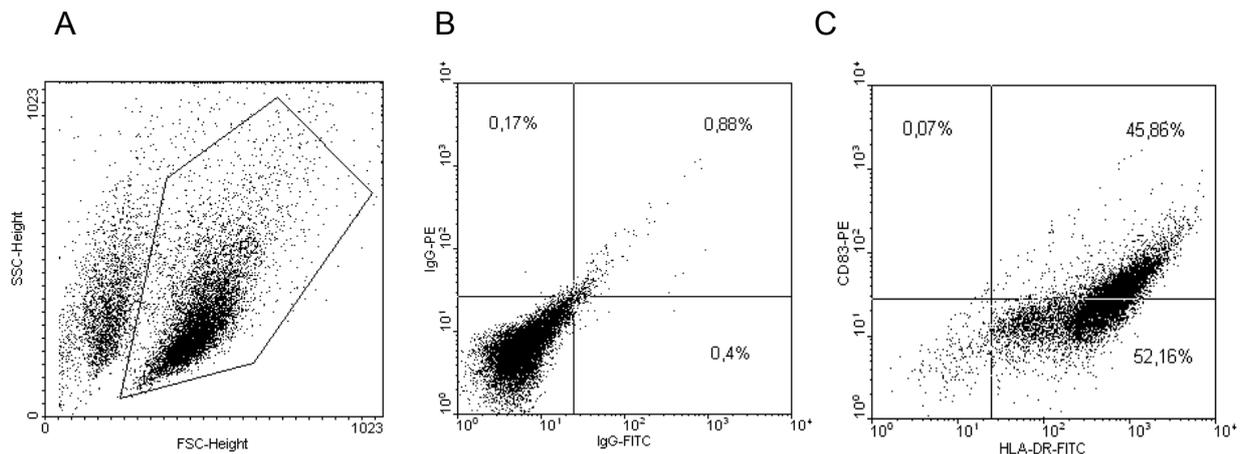


Abb. 4: Dot Plots zur Auswertung der Durchflusszytometrie

FITC: Fluoresceinisothiocyanat, FSC: forward scatter, Ig: Immunglobulin, PE: Phycoerythrin, SSC: side scatter

- A: FSC-SSC Darstellung mit der gegateten Zielpopulation
- B: Dot Plot der Fluoreszenzen (IgG-Kontrolle)
- C: Dot Plot der Fluoreszenzen (Beispiel einer Messung Anti-CD83-PE gegen Anti-HLA-DR-FITC)

Es wurde die Prozentzahl generierter DC ausgewertet und die absolute und kumulative Zellzahl wie folgt berechnet:

$$absZZ = \frac{ApZ \cdot gesZZ}{100}$$

Formel 3: Berechnung der absoluten Zellzahl

absZZ.....absolute Zellzahl

ApZ.....Anteil positiver Zellen in %

gesZZ.....Gesamtzellzahl

$$\text{kumZZ} = \text{kumZZ}(\text{vor}) + \text{absZZ}(\text{aktuell})$$

Formel 4: Berechnung der kumulativen Zellzahl

kumZZ vor.....kumulative Zellzahl des vorherigen Zeitraumes

absZZ aktuell.....absolute Zellzahl des aktuellen Zeitraumes

3.2.6 T-Zell-Proliferation in der gemischten Lymphozytenkultur

Um die immunstimulatorischen Fähigkeiten der differenzierten DC zu ermitteln, wurde eine gemischte Lymphozytenkultur (*mixed lymphocyte culture*, MLC) durchgeführt.

DC aktivieren allogene, d.h. von einem anderen Individuum stammende, T-Zellen durch das Vorhandensein nicht identischer MHC-Klasse-II-Moleküle und induzieren ihre Proliferation. Diese Proliferation kann in der MLC gemessen werden.

Dazu wurden die DC in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:15/1:30 – 1:480; Stimulator : Responder-Ratio) mit jeweils 150.000 T-Zellen in Kultur gesetzt. Auf jeder 96-Well Mikrotiterplatte wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente 0,5ng/ml Staphylokokken Enterotoxin B. Dies ist ein bakterielles Toxin, welches die T-Zellen zu starker Proliferation anregt. Als Negativkontrolle wurden die T-Zellen ohne DC in Kultur gesetzt.

3.2.6.1 Gewinnung der T-Lymphozyten für die MLC

Die benötigten Lymphozyten wurden nach Spende von 100ml Blut eines freiwilligen und gesunden Probanden durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Durch Inkubation der isolierten mononuklearen Zellen für zwei Stunden im Brutschrank in einer 250ml Falcon Zellkulturflasche in RPMI versetzt mit 10% FBS und Glutamin (200mM) wurden die adhären Zellen entfernt. Anschließend erfolgte die manuelle Zählung der Lymphozyten im Überstand.

3.2.6.2 Gewinnung und Aufbereitung der dendritischen Zellen für die MLC

Die differenzierten DC wurden in 15ml Falcon- Röhren geerntet, zweimal mit RPMI versetzt mit 10% FBS sowie Glutamin (200mM) gewaschen, resuspendiert und manuell gezählt. Anschließend wurden sie radioaktiv bestrahlt (120 Gray, Strahlungsquelle: CS 137), um ihnen die Fähigkeit zur Proliferation zu nehmen.

3.2.6.3 Ansatz und Auswertung der MLC

In eine 96-Well Mikrotiterplatte wurden jeweils 100µl RPMI 10% FBS versetzt mit Glutamin (200mM), 100µl DC in einer Verdünnungsreihe und 100µl Lymphozyten sowie Positiv- und Negativkontrolle pipettiert und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am sechsten Tag der Kultur erfolgte die Zugabe des radioaktiv markierten ³H-Thymidins (1µCi/Well). 18 Stunden später wurde die Radioaktivitätsmessung in Counts pro Minute (*counts per minute*, cpm) mittels Harvester (Tomtec™) durchgeführt. Das radioaktiv markierte Thymidin wird in die DNA eingebaut und ist somit ein Maß für die Proliferation der Lymphozyten.

3.2.7 Migrationsfähigkeit im Transmigrations-Assay

Der Transmigrations-Assay ist ein Funktionstest, der die Migration der DC infolge einer Rezeptor-Liganden-Interaktion verschiedener Chemokine ermittelt (*Moldenhauer et al.*, 2006). Dazu wird in das obere Kompartiment die Zellsuspension mit definierter Zellzahl eingefüllt. Im unteren Kompartiment befindet sich serumfreies Medium mit 125ng/ml des entsprechenden Chemokins (*Abb. 5*). Nach vier Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wird die Anzahl transmigrierter Zellen ermittelt.

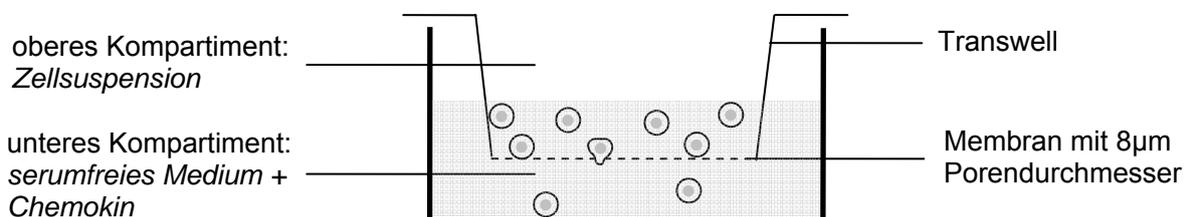


Abb. 5: Schematische Darstellung des Transmigrations-Assays

Die entnommenen Zellsuspensionen wurden in konische 15ml Falcon-Röhrchen gefüllt, zentrifugiert, dekantiert und mit einem Milliliter serumfreien Medium gewaschen. Seit dem 14.12.05 benutzen wir X Vivo 10, zuvor wurde QBSF 60 verwendet. Die Zellen wurden mit 500µl desselben Mediums resuspendiert und manuell gezählt.

In eine 24-Well Falcon Multiwell Platte wurden jeweils 600µl serumfreies Medium mit Zusatz von 3 bzw. 6µl (125ng/ml) des entsprechenden Chemokins sowie 6µl PBS als Negativkontrolle pipettiert. Es wurden jeweils mindestens 1×10^5 Zellen in 100µl Zellsuspension in das obere Kompartiment der 8µm Pore Size Transwells eingefüllt und diese mit einer sterilen Pinzette in die vorbereitete 24-Well Platte gehoben. Die Inkubation erfolgte

für vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurde die Zellzahl im unteren Kompartiment manuell bestimmt und der prozentuale Anteil transmigrierter Zellen durch folgende Gleichung berechnet:

$$\text{Transmigrationsrate} = \frac{a}{b} \cdot 100$$

Formel 5: **Berechnung der Transmigrationsrate in %**

aAnzahl transmigrierter Zellen

b.....Anzahl eingesetzter Zellen

3.2.8 Nachweis von Interleukin 12 im Sandwich-ELISA

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein quantitativer Immunoassay zur Konzentrationsbestimmung von Molekülen basierend auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Sandwich-ELISA ist eine Mikrotiterplatte mit einem ersten Antikörper (Fängerantikörper), welcher spezifisch das Antigen in der Probe bindet, kovalent beschichtet. Ein zweiter Antikörper, welcher ein anderes Epitop desselben Antigens bindet, wird zugegeben (*Abb. 6*). Dieser sogenannte Detektionsantikörper ist an ein Enzym gekoppelt, welches ein zugegebenes Substrat in einen Farbstoff umsetzt. Der Grad der Verfärbung der Probe ist proportional zu der Menge an gebundenen Antigenen und kann photometrisch bestimmt werden (*Luttmann et al., 2006*).

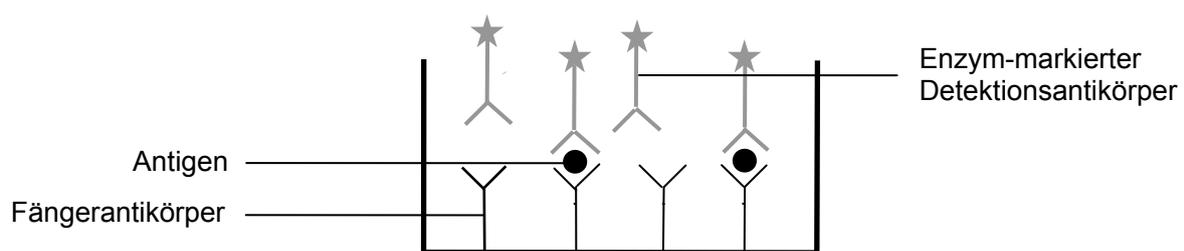


Abb. 6: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA

3.2.8.1 Gewinnung der Zellkulturüberstände für den ELISA

In der vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, ob die differenzierten DC das inflammatorische Zytokin IL-12 sezernieren. Zu diesem Zweck wurde nach Zentrifugation der geernteten Ansätze bei 1400 Umdrehungen/Minute der Zellkulturüberstand entnommen und bis zur Durchführung des ELISA bei -20°C eingefroren.

3.2.8.2 Gewinnung der Zelllysate für den ELISA

Zudem sollte bestimmt werden, ob IL-12 intrazellulär in den DC vorkam, d.h. ob es produziert, aber noch nicht sezerniert wurde. Dafür wurden die DC in einem Milliliter destilliertem Wasser eingefroren, um ihre Membran zu zerstören. Durch zweimaliges Auftauen und Einfrieren der Proben wurde eine mittels Trypanblaufärbung ermittelte Vitalität von weniger als fünf Prozent erreicht.

3.2.8.3 Durchführung des ELISA

Der ELISA wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen erhoben. Nach Vorbereitung der Reagenzien nach Herstellerangaben wurde wie folgt verfahren:

- Zugabe von 50µl Assay Diluent Lösung RD1F je Well
- Zugabe von 200µl Standard, Kontrolle oder Probe je Well
- Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur
- dreifacher Waschschrift
- Zugabe von 200µl Konjugat je Well
- Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur
- dreifacher Waschschrift
- Zugabe von 200µl Substratlösung je Well
- Inkubation für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur
- Zugabe von 50µl Stopplösung je Well

Die photometrische Messung erfolgte innerhalb von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 450nm, eine weitere Messung mit der Korrekturwellenlänge 550nm wurde von den ermittelten Messwerten abgezogen. Bei jeder Messung wurden Werte für eine Standardkurve mitgeführt, anhand derer die IL-12-Konzentration ermittelt werden konnte.

3.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 3.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA. Es wurden abhängig von den jeweiligen Daten der T-Test für unverbundene und normalverteilte Stichproben, der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene und nicht normalverteilte Stichproben, der T-Test für verbundene, normalverteilte Stichproben sowie der Wilcoxon-Rangsummentest für verbundene, nicht normalverteilte Daten angewandt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet. Die beschriebenen Werte im Text beziehen sich auf den Mittelwert und SEM (*Standard error of the mean*).

4 Ergebnisse

4.1 Differenzierung von dendritischen Zellen aus AML-Blasten

4.1.1 Morphologie

Die Morphologie der differenzierten DC wurde anhand von Cytospin-Ausstrichpräparaten beurteilt. Von den 15 untersuchten Patientenblasten konnten 13 zu Zellen mit typischer DC-Morphologie differenziert werden. In den Ansätzen mit Zytokinen waren nach wenigen Tagen nichtadhärente, vergrößerte Zellen mit dendritischen Ausstülpungen die dominante Zellpopulation (*Abb. 7*). Zwei Kulturen behielten hingegen das für leukämische Blasten typische Aussehen (AML-Blasten Nummer 1 und 10, beide FAB-Typ M2). Morphologische Unterschiede zwischen den mit fetalem Kälberserum und den mit Humanserum versetzten Medien waren nicht erkennbar. Des Weiteren konnten keine Unterschiede zwischen den beiden eingesetzten Zytokinkombinationen festgestellt werden.

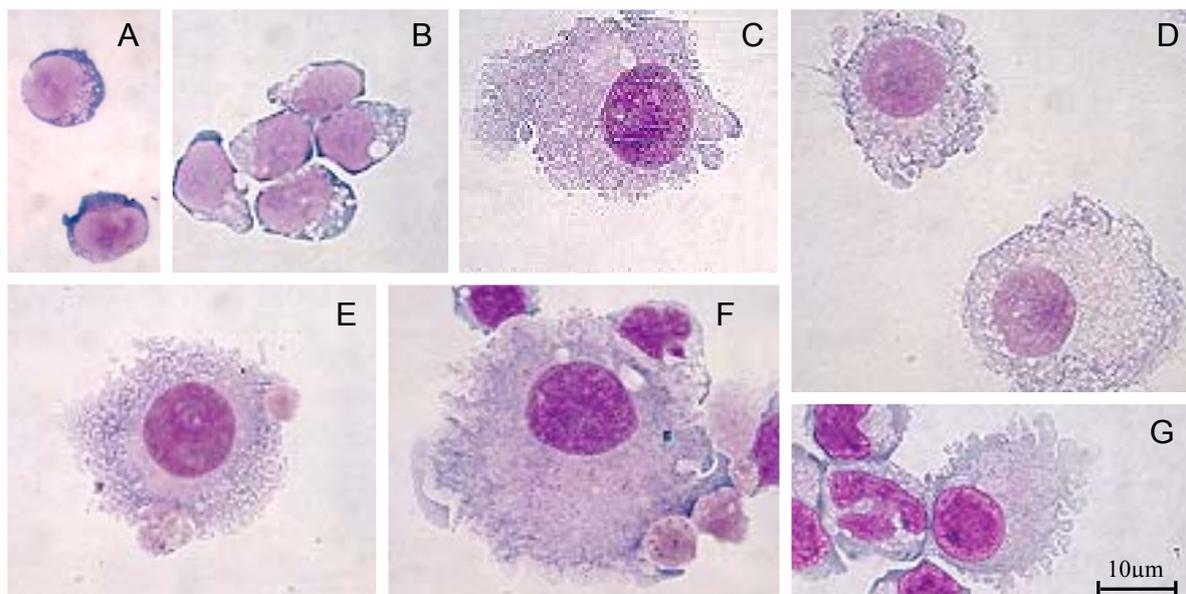


Abb. 7: Fotografien von Ausstrichpräparaten aus AML-Blasten differenzierter DC
1000fache Vergrößerung

A: undifferenzierte leukämische Blasten nach 5 Tagen Kultivierung in RPMI 20% FBS

B: undifferenzierte leukämische Blasten nach 5 Tagen Kultivierung in QBSF 5% HS

C: DC nach 5 Tagen Kultivierung in RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L

D: DC nach 5 Tagen Kultivierung in QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L

E: DC nach 5 Tagen Kultivierung in RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4

F: DC nach 8 Tagen Kultivierung in QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4

G: DC nach 7 Tagen Kultivierung in RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4

4.1.2 Gesamtzellzahl und Vitalität

4.1.2.1 Gesamtzellzahl

Die Blasten 16 verschiedener AML-Patienten wurden hinsichtlich ihrer Gesamtzellzahl nach einer und zwei Wochen der Kultivierung untersucht. Es wurden jeweils ca. 100×10^4 Zellen in Kultur gesetzt. Nach einer Woche der Kultivierung ließen sich mittlere Zellzahlen von $83,6 \pm 11,5 \times 10^4$ in RPMI 20% FBS bis $156,3 \pm 46,2 \times 10^4$ in QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 ermitteln. Nach zwei Wochen variierten die Mittelwerte zwischen $73,3 \pm 25,6 \times 10^4$ in RPMI 5% HS und $193,3 \pm 50,7 \times 10^4$ in QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4. Die große Variabilität der Werte lässt sich auf die starke Proliferation der Zellen einiger Kulturansätze zurückführen. In den Konditionen mit Zytokinen konnten Werte bis auf das siebenfache der Ausgangszellzahl festgestellt werden (Abb. 8). Nur eine Zellkultur zeigte eine Proliferation auch in den drei Konditionen ohne Zytokine ($395,2$ bis $571,2 \times 10^4$ Zellen). Die Gesamtzellzahlen der verschiedenen Kulturbedingungen waren vergleichbar.

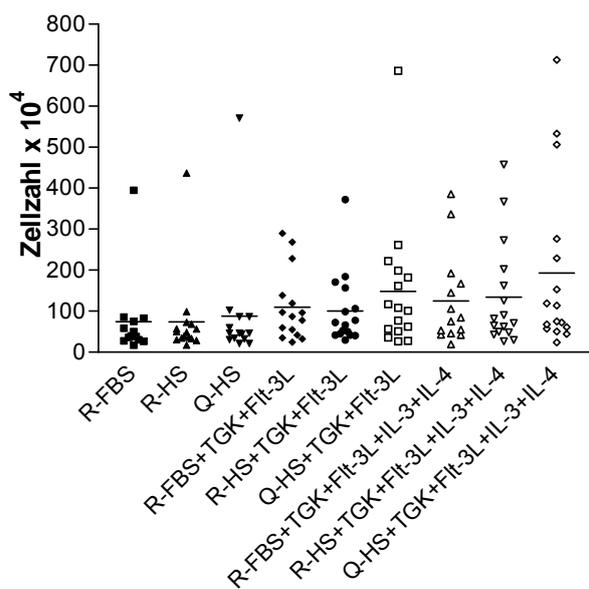


Abb. 8: Gesamtzellzahlen der AML-Kulturen nach zwei Wochen (n = 14 - 16)

Ausgehend von den 100×10^4 in Kultur gesetzten Zellen zeigte sich eine starke Proliferation einiger Zellkulturansätze vor allem in den Konditionen mit Zytokinen.

Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden. Der Mittelwert ist eingezeichnet.

4.1.2.2 Vitalität

Die Bestimmung der Vitalität von 16 AML-Blasten erfolgte mittels Trypanblaufärbung und Mikroskopie mit der Neubauer Zählkammer nach ein und zwei Wochen der Kultivierung. Die Mittelwerte der Vitalität der kultivierten Zellen variierten unter den verschiedenen Kulturbedingungen nach einer Woche zwischen $93,7 \pm 1,9\%$ und $96,5 \pm 0,6\%$ und nach zwei Wochen zwischen $92,3 \pm 1,1\%$ und $97,4 \pm 0,34\%$. Nach zwei Wochen der Kultivierung fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen (Abb. 9).

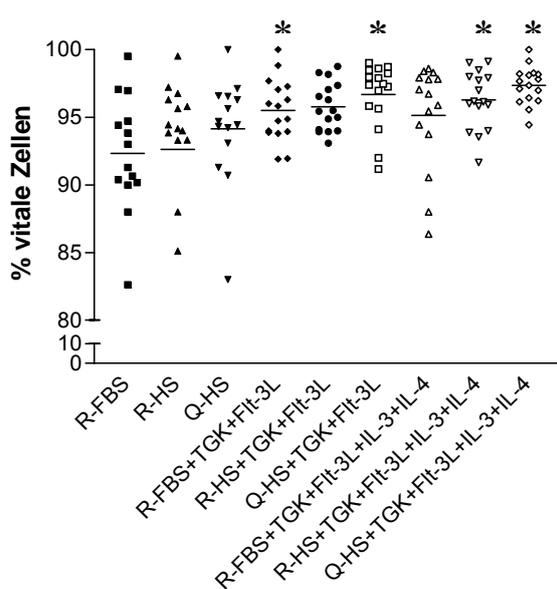


Abb. 9: Vitalität der kultivierten AML-Blasten nach zwei Wochen in Prozent (n = 14 - 16).

Vier Konditionen zeigten eine signifikante Verbesserung der Vitalität bei Kultivierung mit Zytokinen im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle ohne Zytokine. Der Mittelwert ist eingezeichnet.

* bedeutet signifikant gegenüber der Kontrollkultur desselben Mediums ohne Zytokine.

Die mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L kultivierten AML-Zellen wiesen eine höhere Vitalität auf als die jeweilige Kontrollkultur desselben Mediums ohne Zytokine in dem Grundmedium RPMI 20% FBS ($92,3 \pm 1,1\%$ in der Kontrollkultur vs. $95,5 \pm 0,56\%$; $p < 0,05$) und in QBSF 5% HS ($94,2 \pm 1,1\%$ in der Kontrollkultur vs. $96,7 \pm 0,57\%$; $p < 0,05$). Eine höhere Vitalität im Vergleich mit der entsprechenden Kontrolle zeigte sich ebenfalls bei der Zytokinkombination TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 in RPMI 5% HS ($92,6 \pm 1,7\%$ in der Kontrollkultur vs. $96,3 \pm 0,52\%$; $p < 0,05$) sowie in QBSF 5% HS ($94,2 \pm 1,0\%$ in der Kontrollkultur vs. $97,4 \pm 0,34\%$; $p < 0,05$).

4.1.3 Immunphänotypische Charakterisierung

Zur Charakterisierung der generierten Zellen wurden die Anteile der Oberflächenmoleküle CD83 (Markermolekül für reife DC), HLA-DR (MHC-Klasse-II-Moleküle mit Funktion in der Antigenpräsentation), CD80 und CD86 (kostimulatorische Moleküle), CD1a (kostimulatorisches Molekül und Marker für unreife DC), CD14 (Marker für Monozyten) und der Chemokinrezeptoren CXCR4 (Rezeptor für SDF-1 α) und CCR7 (Rezeptor für MIP-3 β) ermittelt.

4.1.3.1 Immunphänotypisches Profil der AML-Blasten vor der Kultivierung

Vor der Kultivierung wurde der Immunphänotyp von zehn AML-Blasten bestimmt. Die Analyse der Chemokinrezeptoren erfolgte anhand von fünf AML-Blasten. Die eingesetzten Zellen zeigten eine geringe Koexpression von CD83 und HLA-DR ($1,4 \pm 0,5\%$) und waren fast negativ für CD1a ($0,6 \pm 0,15\%$).

Eine große Variationsbreite hingegen fand sich bei der Präsentation von CD86 ohne Koexpression von CD80, CD14 sowie den Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 (Abb. 10).

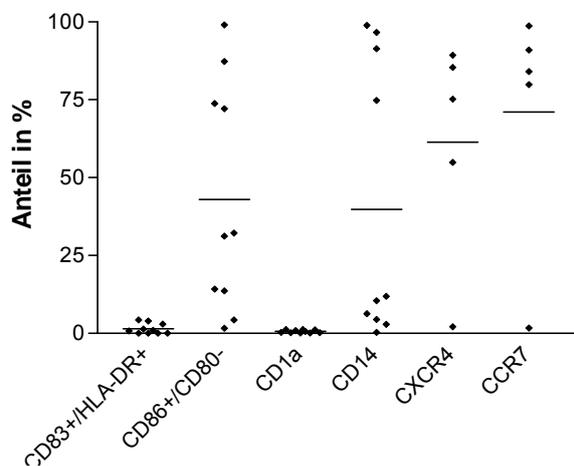


Abb. 10: Immunprofil der eingesetzten AML-Blasten vor der Kultivierung

Dargestellt ist der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil der AML-Blasten in Prozent, welche vor der Kultivierung die jeweiligen Oberflächenmoleküle exprimieren. Der Mittelwert ist eingezeichnet.

4.1.3.2 Untersuchung der CD83/HLA-DR Koexpression der AML-Kulturen

Reife DC werden charakterisiert durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD83 und HLA-DR (Banchereau et al., 2000). Um sowohl den Anteil als auch die absolute Zellzahl der generierten DC zu bestimmen, wurden diese Markermoleküle nach ein und zwei Wochen der Kultivierung durchflusszytometrisch bestimmt.

Grundlage für die Untersuchung waren Blasten von 15 verschiedenen AML-Patienten. Nach der Kultivierung mit Zytokinen zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Oberflächenmoleküle CD83 und HLA-DR im Vergleich mit den Kontrollkulturen. Ohne Zytokine wurden beide Moleküle kaum exprimiert, die Mittelwerte variierten nach einer Woche zwischen $0,34 \pm 0,16\%$ und $1,5 \pm 0,51\%$ ($0,36 \pm 0,2$ bis $1,5 \pm 0,7 \times 10^4$ Zellen) und nach zwei Wochen zwischen $0,7 \pm 0,23\%$ und $2,3 \pm 1\%$ ($0,36 \pm 0,14$ bis $1,5 \pm 0,79 \times 10^4$ Zellen; Tabelle 9). Nach einer Woche der Kultivierung mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L stieg der Anteil positiver Zellen auf $9,3 \pm 4,6\%$ bis $12,4 \pm 5,2\%$ ($9,6 \pm 3,5$ bis $12,1 \pm 3,9 \times 10^4$ Zellen). Nach zwei Wochen hingegen zeigte sich eine geringere ($5,3 \pm 1,6\%$ bis $8,8 \pm 2,1\%$), dennoch aber bezüglich des prozentualen Anteils in den Medien RPMI 20% FBS sowie RPMI 5% HS signifikant erhöhte Expression dieser Moleküle. Die absoluten Zellzahlen nach zwei Wochen der Kultivierung mit TGK + Flt-3L waren mit Werten zwischen $9,1 \pm 4$ bis $12,2 \pm 3,9 \times 10^4$ Zellen in allen drei Grundmedien ca. zehnmal höher als in den entsprechenden Kontrollkulturen ($p < 0,05$).

Tabelle 9: CD83 und HLA-DR Koexpression der AML-Kulturen (n = 13 - 15)

% CD83⁺/HLA-DR⁺: prozentualer Anteil der Zellen mit Koexpression der Oberflächenmoleküle CD83 und HLA-DR; abs.ZZ CD83⁺/HLA-DR⁺: Anzahl der Zellen mit Koexpression der Oberflächenmoleküle CD83 und HLA-DR $\times 10^4$; Mittelwert \pm SEM wird dargestellt; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber der entsprechenden Kontrolle ohne Zytokine sind mit * gekennzeichnet; eine Signifikanz von $p < 0,001$ gegenüber der entsprechenden Kontrolle ohne Zytokine ist mit ** gekennzeichnet.

		Woche 1		Woche 2	
		% CD83 ⁺ /HLA-DR ⁺	abs.ZZ $\times 10^4$ CD83 ⁺ /HLA-DR ⁺	% CD83 ⁺ /HLA-DR ⁺	abs.ZZ $\times 10^4$ CD83 ⁺ /HLA-DR ⁺
Kon- trolle	RPMI 20%FBS	1,1 \pm 0,48	0,61 \pm 0,26	0,88 \pm 0,43	0,36 \pm 0,14
	RPMI 5%HS	0,34 \pm 0,16	0,36 \pm 0,2	0,7 \pm 0,23	0,36 \pm 0,15
	QBSF 5%HS	1,5 \pm 0,51	1,5 \pm 0,7	2,3 \pm 1	1,5 \pm 0,79
TGK + Flt-3L	RPMI 20%FBS	9,3 \pm 4,6*	9,6 \pm 3,5*	5,3 \pm 1,6*	9,1 \pm 4*
	RPMI 5%HS	12,4 \pm 5,2**	11,4 \pm 3,6*	8,8 \pm 2,1*	9,2 \pm 2,6*
	QBSF 5%HS	9,7 \pm 3,9*	12,1 \pm 3,9*	7,1 \pm 2	12,2 \pm 3,9*
TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4	RPMI 20%FBS	11,1 \pm 4,8*	14,5 \pm 5,3*	6,3 \pm 1,7*	9,3 \pm 3,4*
	RPMI 5% HS	12,4 \pm 4,7*	14,9 \pm 5,3*	6,1 \pm 2,1*	7,4 \pm 2,9*
	QBSF 5%HS	10,3 \pm 4*	11,6 \pm 3,5*	7,8 \pm 1,8*	12,7 \pm 3,5*

Die mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 kultivierten Blasten ließen ebenfalls nach ein und zwei Wochen eine signifikante Hochregulation dieser Markermoleküle erkennen. Die Werte waren mit jenen der anderen Zytokinkombination vergleichbar ($p > 0,05$; *Tabelle 9*). Im immunphänotypischen Profil der unkultivierten AML-Blasten wurde eine mittlere Koexpression von CD83 und HLA-DR von $1,4 \pm 0,5\%$ ermittelt (*Abb. 10, S. 40*), womit sie etwa der Expression beider Moleküle in den Kontrollkulturen entspricht. In den Zellkulturansätzen mit Zytokinen fanden sich nach einer Woche sechs- bis achtfach und nach zwei Wochen ca. drei- bis sechsfach höhere Expressionsraten von CD83 und HLA-DR verglichen mit den Werten vor der Kultivierung (*Tabelle 9*).

Insgesamt konnte eine große Variabilität in der Expression beider Oberflächenmoleküle zwischen den getesteten Patientenblasten und Konditionen festgestellt werden. Die Werte der einzelnen Ansätze erstreckten sich zwischen 0% und 81,5%. Die Aufteilung der jeweiligen Kulturkondition, mit welcher die höchsten Prozentzahlen an für CD83 und HLA-DR positiven Zellen bei den verschiedenen Ansätzen erreicht werden konnten, gestaltete sich dabei relativ gleichmäßig. Die höchsten Prozentzahlen positiver Zellen konnten nach einer Woche bei zwei Patientenblasten mit RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L, bei drei mit RPMI 5%

HS + TGK + Flt-3L, bei vier mit QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L, bei einem mit RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4, bei drei mit RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 sowie bei zwei Patientenblasten mit QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 erreicht werden. Die entsprechende Verteilung nach zwei Wochen der Kultivierung war ähnlich. Die Blasten von nur einem Patienten zeigten unter allen untersuchten Kulturbedingungen eine Koexpression von CD83 und HLA-DR unter 2% (Patient 1, FAB-Typ M2). Zwischen den sechs untersuchten Patientenblasten vom FAB-Typ M4/M5 und den neun Blasten anderer FAB-Klassifikation konnten keine Unterschiede in der Koexpression von CD83 und HLA-DR festgestellt werden ($p > 0,05$). Die Unterschiede zwischen den beiden Zeiträumen, d.h. die um ca. 1,5fach höheren prozentualen Expressionsraten und Zellzahlen in den Kulturkonditionen mit Zytokinen nach einer Woche verglichen mit den Werten nach zwei Wochen erwiesen sich als nicht signifikant. Die drei verwendeten Grundmedien und die beiden Zytokinkombinationen waren gleichwertig ($p > 0,05$).

4.1.3.3 Kumulative Zellzahl aus AML-Blasten gezüchteter DC

Um die gesamte Anzahl der generierten DC nach zwei Wochen zu ermitteln, wurde die kumulative Zellzahl der für CD83 und HLA-DR positiven Zellen berechnet (*Formel 4, S. 33*). Die Zellzahl am Tag eins betrug $0,16 \pm 0,5 \times 10^4$ Zellen und bezog sich auf den im Immunprofil der unkultivierten Blasten ermittelten Anteil der für CD83 und HLA-DR positiven Zellen bezogen auf die Anzahl der in Kultur gesetzten Blasten. Der Anstieg der kumulativen Zellzahl im Vergleich mit der Zellzahl am Tag eins war in allen untersuchten Kulturkonditionen sowohl nach einer als auch nach zwei Wochen der Kultivierung signifikant. Nach einer Woche ließen sich in den Kontrollen kumulative Zellzahlen zwischen $0,36 \pm 0,2 \times 10^4$ und $1,5 \pm 0,7 \times 10^4$ Zellen ermitteln. In den Konditionen mit Zytokinen waren die Werte im Mittel 15mal höher und variierten nach einer Woche zwischen $9,6 \pm 3,5 \times 10^4$ Zellen in RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L und $14,9 \pm 5,3 \times 10^4$ Zellen in RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 ($p < 0,01$; *Abb. 11*). Nach zwei Wochen betrugen die kumulativen Zellzahlen der Kontrollen zwischen $0,81 \pm 0,3 \times 10^4$ und $2,8 \pm 0,84 \times 10^4$ Zellen. In den Konditionen unter Verwendung von Zytokinen waren die Werte verglichen mit den jeweiligen Kontrollen desselben Mediums ca. 14mal höher und variierten zwischen $18,3 \pm 5,7 \times 10^4$ Zellen in RPMI 20% HS + TGK + Flt-3L und $24,5 \pm 5,6 \times 10^4$ Zellen in QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L.

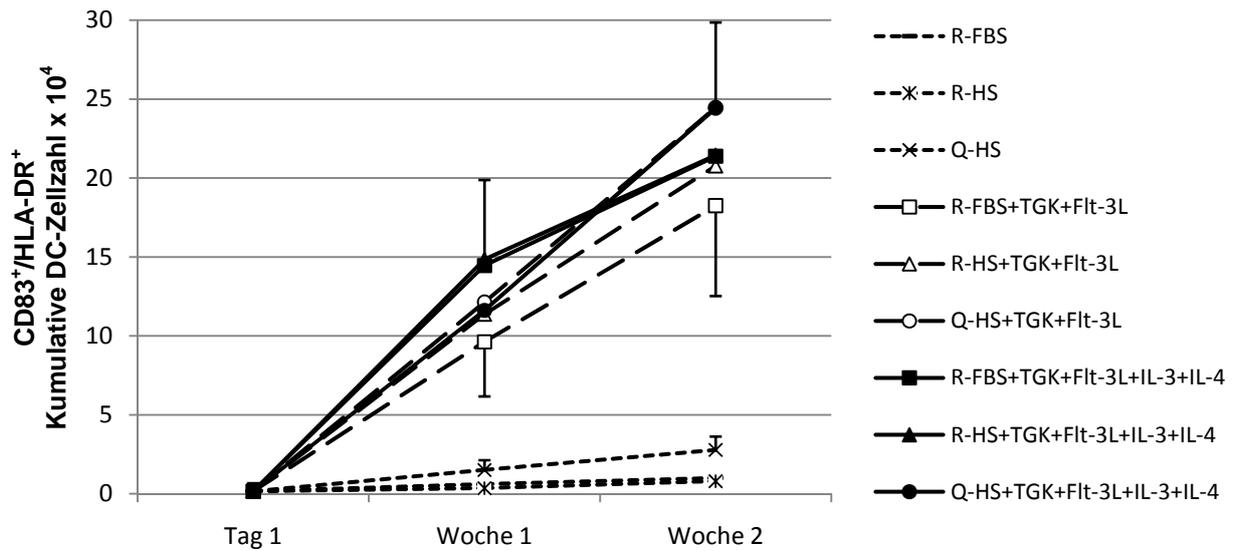


Abb. 11: Kumulative CD83⁺/HLA-DR⁺ Zellzahl aus AML-Blasten differenzierter DC

(n = 13 - 15)

Die kumulative DC-Zellzahl wurde aus den absoluten Zellzahlen der für CD83 und HLA-DR positiven Zellen errechnet. Die Zellzahl am Tag eins wurde anhand des durchflusszytometrisch bestimmten Immunprofils vor der Kultivierung ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte, SEM ist eingezeichnet.

Die nach zwei Wochen ermittelten kumulativen Zellzahlen waren ca. 1,8mal höher als die nach einer Woche der Kultivierung ermittelten Werte ($p < 0,008$). Die höchsten kumulativen Zellzahlen wurden nach zwei Wochen mit dem Grundmedium QBSF 5% HS erreicht (TGK + Flt-3L: $24,5 \pm 5,6 \times 10^4$ Zellen; TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4: $24,4 \pm 5,4 \times 10^4$ Zellen). Allerdings ließen sich weder nach einer noch nach zwei Wochen signifikante Unterschiede zwischen den drei verwendeten Grundmedien oder den beiden Zytokinkombinationen feststellen.

4.1.3.4 Untersuchung der CD86-Expression der AML-Blasten

Reife DC exprimieren das kostimulatorische Molekül CD86 bei fehlender Expression von CD80 (Banchereau et al., 2000; Sansom et al., 2003). Um die generierten Zellen näher charakterisieren zu können, wurde nach ein und zwei Wochen eine durchflusszytometrische Messung dieser beiden Oberflächenmoleküle durchgeführt. Dadurch konnten der prozentuale Anteil und die absolute Zellzahl der für CD86 positiven Zellen bei gleichzeitiger fehlender Expression von CD80 bestimmt werden. Untersucht wurde die Expression von CD86 anhand von Blasten 14 verschiedener AML-Patienten. Abhängig von der Anzahl vorhandener Zellen konnten zur Verifizierung der Einzelwerte einige Messungen mehrfach bestimmt werden. Die Anzahl der in die Auswertung eingehenden Werte variierte daher in den verschiedenen

Konditionen zwischen 14 und 22. Nach einer Woche der Kultivierung ließ sich in den drei Kontrollkulturen ohne Zytokine eine Expression von CD86 ohne Koexpression von CD80 zwischen $22,1 \pm 8,2\%$ ($25,9 \pm 14,7 \times 10^4$ Zellen) in RPMI 20% FBS und $33,3 \pm 8,5\%$ ($42,7 \pm 18,9 \times 10^4$ Zellen) in QBSF 5% HS ermitteln. Die Messwerte in den Versuchsansätzen unter Verwendung von Zytokinen variierten zwischen $24,4 \pm 6,3\%$ und $31,7 \pm 6,4\%$ bzw. $24,3 \pm 5,5 \times 10^4$ und $46,8 \pm 12,6 \times 10^4$ CD86 positiver Zellen und zeigten damit keine Hochregulation dieses kostimulatorischen Moleküls. Auch nach zwei Wochen ließen sich Messwerte in derselben Größenordnung ermitteln (Tabelle 10).

Tabelle 10: CD86-Expression der AML-Kulturen (n = 13 - 15)

% CD86⁺/CD80⁻: prozentualer Anteil der Zellen mit Expression des Oberflächenmoleküls CD86 ohne Koexpression von CD80; abs.ZZ CD86⁺/CD80⁻: Anzahl der Zellen mit CD86-Expression ohne Koexpression von CD80 $\times 10^4$; Mittelwert \pm SEM wird dargestellt.

		Woche 1		Woche 2	
		% CD86 ⁺ /CD80 ⁻	abs.ZZ $\times 10^4$ CD86 ⁺ /CD80 ⁻	% CD86 ⁺ /CD80 ⁻	abs.ZZ $\times 10^4$ CD86 ⁺ /CD80 ⁻
Kon- trolle	RPMI 20%FBS	22,1 \pm 8,2	25,9 \pm 14,7	22,8 \pm 7,4	35,2 \pm 23,1
	RPMI 5%HS	27,1 \pm 8,5	29,6 \pm 12,2	23,4 \pm 7,5	42,2 \pm 31,2
	QBSF 5%HS	33,3 \pm 8,5	42,7 \pm 18,9	32,1 \pm 9,3	58,6 \pm 42,4
TGK + Flt-3L	RPMI 20%FBS	26,4 \pm 5,6	29,7 \pm 6,5	23,4 \pm 5,4	29,4 \pm 8,4
	RPMI 5%HS	24,4 \pm 6,3	24,3 \pm 5,5	21,1 \pm 5,6	22,3 \pm 6,3
	QBSF 5%HS	26,3 \pm 6,8	34,1 \pm 9,6	22,6 \pm 5,8	25,7 \pm 7
TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4	RPMI 20%FBS	30,2 \pm 6,2	42,3 \pm 12,4	31,1 \pm 6,3	38,6 \pm 10,2
	RPMI 5% HS	28,1 \pm 6,7	35,4 \pm 9,3	28,9 \pm 5,5	41,4 \pm 13
	QBSF 5%HS	31,7 \pm 6,4	46,8 \pm 12,6	31,9 \pm 6,5	49,8 \pm 15

Es konnten keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil der Expression oder in den Zellzahlen zwischen den drei verwendeten Grundmedien oder den beiden eingesetzten Zytokinkombinationen nachgewiesen werden. Ebenso waren die Messwerte der beiden untersuchten Zeiträume ähnlich. Im Immunprofil der unkultivierten AML-Blasten betrug die mittlere Expression von CD86 ohne Koexpression von CD80 $43 \pm 11\%$ und unterschied sich damit nicht von den Messwerten, die nach ein und zwei Wochen ($p > 0,05$) der Kultivierung in den verschiedenen Konditionen nachgewiesen wurden.

4.1.3.5 Untersuchung der CD1a-Expression

Das kostimulatorische Oberflächenmolekül CD1a dient der Präsentation von lipidhaltigen Antigenen und befindet sich auf der Zelloberfläche unreifer DC (*Banchereau et al.*, 2000). Damit ist dieses Markermolekül geeignet, den Anteil an unreifen DC an der Gesamtheit der generierten Zellen zu ermitteln. Es wurde nach ein und zwei Wochen durchflusszytometrisch bestimmt ($n = 12 - 13$). Durch Wiederholungsmessungen von Patientenblasten, von denen eine genügende Anzahl vorhanden war, konnten 13 - 16 Werte in die Untersuchung einbezogen werden. Die CD1a-Expression war in den Kontrollkulturen und den Ansätzen mit Zytokinen vergleichbar. Auch ließen sich keine Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Grundmedien und den zwei verwendeten Zytokinkombinationen feststellen. Die Expressionsraten von CD1a in den beiden Zeiträumen waren ähnlich. Sie variierten nach einer Woche zwischen $0,9 \pm 0,38\%$ in QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L und $4,9 \pm 2,2\%$ in RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 und nach zwei Wochen zwischen $1,1 \pm 0,47\%$ in QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L und $6,6 \pm 2,6\%$ in RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4. In den durchflusszytometrischen Messungen der unkultivierten AML-Blasten wurde eine mittlere Expression von CD1a von $0,6 \pm 0,14\%$ ermittelt. Es gab keine Unterschiede zwischen diesem Wert und den nach ein und zwei Wochen der Kultivierung ermittelten Expressionsraten der AML-Kulturen ($p > 0,05$).

4.1.3.6 Untersuchung der CD14-Expression

Um den prozentualen Anteil an Monozyten in den Zellkulturen nach ein und zwei Wochen der Differenzierung beurteilen zu können, wurde das Oberflächenmolekül CD14 (*Andreesen et al.*, 1990) in Versuchsansätzen von 13 verschiedenen AML-Patienten ($n = 12 - 13$) durchflusszytometrisch bestimmt. Durch Doppelbestimmungen zur Verifizierung der Einzelwerte konnten 13 - 16 Werte in die Analyse eingehen. Die Ergebnisse der einzelnen Kulturbedingungen waren vergleichbar. Nach einer Woche variierte der Anteil der für CD14 positiven Zellen zwischen $1,6 \pm 0,5\%$ in QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 und $16,7 \pm 5,9\%$ in RPMI 20 % FBS + TGK + Flt-3L. Nach zwei Wochen fanden sich Messwerte zwischen $2,2 \pm 1,4\%$ in RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 und $14 \pm 7,1\%$ in RPMI 20% FBS. Es herrschte eine große Variabilität bei den einzelnen Messwerten. Betrachtete man daher den Median anstelle des Mittelwertes, so fanden sich weitaus geringere Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturbedingungen. Der Median variierte nach einer Woche zwischen 1,2% und 5,8% und nach zwei Wochen zwischen 0,26% und 4,8%. In der immunphänotypischen Charakterisierung der unkultivierten AML-Blasten ließ sich eine mittlere Expression von CD14 von $39,8 \pm 13,3\%$ feststellen. Es zeigte sich nach einer Woche

der Kultivierung eine signifikant niedrigere CD14-Expression in allen Konditionen ($p < 0,05$) außer der Kontrolle mit dem Grundmedium RPMI 20% FBS ($13,3 \pm 7\%$; $p = 0,09$) und RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L ($16,7 \pm 5,9\%$; $p = 0,12$). Nach zwei Wochen ergaben sich bis auf die Kontrolle mit RPMI 20% FBS ($14 \pm 7,1\%$; $p = 0,1$) und die Kulturkondition mit QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 ($11,7 \pm 5,9$; $p = 0,07$) signifikant niedrigere Expressionsraten verglichen mit den unkultivierten AML-Blasten ($p < 0,05$).

Vor der Kultivierung wurden vier Patientenblasten ermittelt, welche CD14 zu einem sehr hohen Anteil exprimierten (74,8%, 91,4%, 96,6% und 98,8%; FAB-Subtypen M1, M4, M5 und M4/5). In allen vier Kulturen wurde dieses Oberflächenmolekül herunterreguliert. Nach einer Woche variierte die mittlere Expression von CD14 in den Kontrollkulturen dieser vier Patientenblasten zwischen $8,9 \pm 5,3\%$ und $21,7 \pm 15,8\%$ und in den Ansätzen mit Zytokinen zwischen $1,6 \pm 0,8\%$ und $27,4 \pm 15,2\%$. Die Messwerte nach zwei Wochen waren ähnlich ($2,5 \pm 0,67\%$ bis $32,2 \pm 11,2\%$; $p > 0,05$).

4.1.3.7 Untersuchung der Expression des Chemokinrezeptors CXCR4

Um die Migrationsfähigkeit der differenzierten DC ergänzend zu den Transmigrationsexperimenten anhand des Vorhandenseins der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 einschätzen zu können, wurden beide Oberflächenmoleküle nach fünf bis acht Tagen der Kultivierung bestimmt. Diese durchflusszytometrische Messung erfolgte zum Teil mit den Zellen der Transmigrationsexperimente nach deren Auszählung und zum Teil von Parallelkulturen. CXCR4 (CD184) ist der Rezeptor für das homöostatische Chemokin SDF-1 α , welches von Stromazellen von Lymphknoten, Knochenmark und Thymus produziert wird und die Zirkulation von Stammzellen und Lymphozyten durch den Körper leitet (*Janeway et al.*, 2005). Er wird außerdem von reifen und unreifen DC exprimiert (*Dieu-Nosjean et al.*, 1999). Es wurden Blasten 13 verschiedener AML-Patienten auf ihre Expression von CXCR4 untersucht. Die Zellen zeigten eine mittlere Expressionsrate von CXCR4 zwischen $6,8 \pm 2\%$ in RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L und $31,4 \pm 9\%$ in QBSF 5% HS. Der Mittelwert der Expression war stets in QBSF 5% HS am höchsten und RPMI 20% FBS am niedrigsten (*Abb. 12*). Die unkultivierten AML-Blasten wiesen im Immunprofil eine mittlere CXCR4-Expression von $61,4 \pm 14,3\%$ auf. Eine signifikant niedrigere Expression verglichen mit diesem Wert konnte in der Kontrolle mit RPMI 20% FBS ($10,6 \pm 2,3\%$), in den Konditionen mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L und den Medien RPMI 20% FBS ($6,8 \pm 2\%$) und RPMI 5% HS ($13,7 \pm 2,6\%$) sowie in allen drei Grundmedien und der Zytokinkombination TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 ($8,4 \pm 3,6\%$ in RPMI 20% FBS bis $18,4 \pm 4,9\%$ in QBSF 5% HS) nachgewiesen werden.

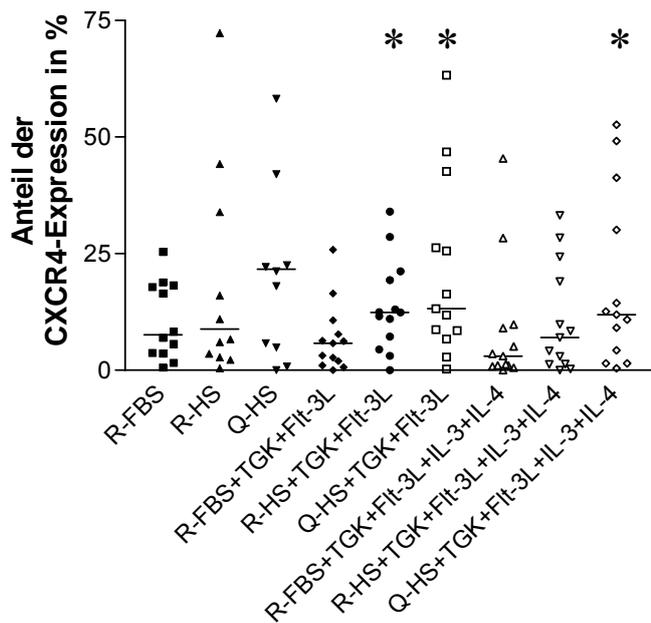


Abb. 12: Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 in den AML-Kulturen (n = 12 – 13)

Darstellung des prozentualen Anteils der Expression des Chemokinrezeptors CXCR4. Erkennbar ist die jeweils geringere CXCR4-Expression in den Konditionen mit dem Grundmedium RPMI 20% FBS. Der Mittelwert ist eingezeichnet. * bedeutet signifikant gegenüber der Kultur derselben Zytokinkombination mit dem Grundmedium RPMI 20% FBS. Der Mittelwert ist eingezeichnet.

4.1.3.8 Untersuchung der Expression des Chemokinrezeptors CCR7

CCR7 (CD197) ist der Rezeptor für die homöostatischen Chemokine MIP-3 β und 6Kine. Er spielt eine wichtige Rolle für die Migration von reifen DC zu den anliegenden Lymphknoten, wo die DC-T-Zell Interaktion stattfindet und die Immunantwort eingeleitet wird (Dieu-Nosjean et al., 1999). Die Blasten von 13 verschiedenen AML-Patienten wurden hinsichtlich ihrer CCR7-Expression durchflusszytometrisch untersucht. Die Mittelwerte der Expression dieses Oberflächenmoleküls in den verschiedenen Konditionen variierten zwischen $4,4 \pm 1,3\%$ in RPMI 5% HS und $15,2 \pm 5,4\%$ in RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L. Die Expressionen der einzelnen Konditionen unterlagen dabei einer starken Variabilität, die von 0% bis 57,5% reichte. Alle neun untersuchten Kulturbedingungen zeigten ähnliche Resultate ($p > 0,05$). Die mittlere Expression von CCR7 der unkultivierten Blasten war mit $71 \pm 15,8\%$ im Mittel siebenfach höher im Vergleich mit den Messwerten, die nach der Kultivierung in den verschiedenen Kulturbedingungen ermittelt wurden ($p < 0,05$).

4.1.4 Stimulationsfähigkeit allogener T-Zellen

Um die immunstimulatorischen Fähigkeiten der differenzierten DC beurteilen zu können, wurde die gemischte Lymphozytenkultur (MLC) als Funktionstest durchgeführt (Moldenhauer et al., 2006). In diesem wurde ermittelt, inwieweit die DC fähig sind, allogene T-Zellen zu stimulieren und zur Proliferation anzuregen. Die Messung erfolgte mit Hilfe der Zugabe von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin, welches in die DNA eingebaut wird und somit ein Maß für die Proliferation der Lymphozyten darstellt. Grundlage für die Versuche

waren fünf AML-Kulturen nach vier bis acht Tagen der Differenzierung. Es zeigte sich eine von der Anzahl der eingesetzten DC abhängige Steigerung der Proliferation der allogenen T-Lymphozyten (Abb. 13).

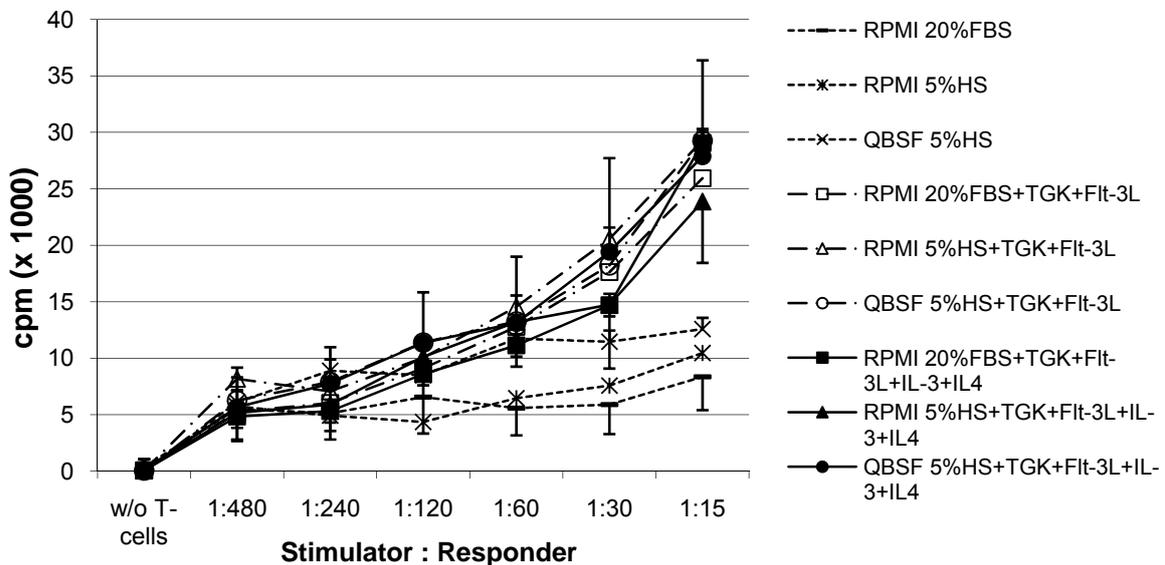


Abb. 13: Zusammenfassende Darstellung der MLCs aus AML-Blasten differenzierter DC (n = 5)

Cpm: counts per minute; w/o t-cells: Negativkontrolle ohne Zugabe von T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der fünf Versuche, SEM ist eingezeichnet. Eine von der Anzahl der eingesetzten DC abhängige Proliferationssteigerung der Lymphozyten in den Versuchsansätzen unter Verwendung von Zytokinen wird deutlich.

Eine signifikante Proliferationssteigerung in den Kulturbedingungen mit Zytokinen im Vergleich mit der entsprechenden Kontrolle desselben Grundmediums ohne Zytokine fand sich in den Verdünnungsstufen 1:60 und 1:30 und der Kondition RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L sowie 1:15 und den Konditionen RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L, RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4 und RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4. Es wurden die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen verwendet, wobei die einzelnen Werte einer großen Variabilität unterlagen (SEM der Konditionen mit T-Lymphozyten zwischen 2,3 und 11,4). Die drei untersuchten Grundmedien und die beiden Zytokinkombinationen erwiesen sich als gleichwertig ($p > 0,05$).

4.1.5 Migrationsfähigkeit

Um die Migrationsfähigkeit der unkultivierten leukämischen Blasten und der differenzierten DC beurteilen zu können, wurden Transmigrations-Assays durchgeführt (*Moldenhauer et al.*, 2006). Es wurden die Chemokine SDF-1 α , MIP-1 α , MCP-1 sowie MIP-3 β untersucht. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit serumfreiem Medium unter Zugabe von PBS.

4.1.5.1 Migrationsfähigkeit der AML-Blasten vor der Kultivierung

Es wurden die Blasten von fünf verschiedenen AML-Patienten nach ihrer Isolierung bzw. dem Auftauen der Zellen untersucht. Der Mittelwert des prozentualen Anteils transmigrierter Zellen betrug im Kontrollansatz $12,1 \pm 3,3\%$. In den Ansätzen mit Chemokinen variierten die Transmigrationsraten zwischen $13,4 \pm 2,5\%$ nach Zusatz von MIP-3 β und $16,4 \pm 3,2\%$ nach Zusatz von MIP-1 α (*Tabelle 11*). Die Migrationsraten der verschiedenen Ansätze waren vergleichbar ($p > 0,05$).

4.1.5.2 Migrationsfähigkeit der differenzierten DC

Nach fünf bis acht Tagen der Kultivierung wurde die Migrationsfähigkeit der aus den AML-Blasten differenzierten DC auf die Chemokine SDF-1 α , MIP-1 α , MCP-1 sowie MIP-3 β mit Hilfe des Transmigrations-Assays untersucht. Die Untersuchung erfolgte anhand von Zellkulturen 12 verschiedener AML-Patientenblasten. Es wurde die Transmigration der mittels der verschiedenen Generierungsprotokolle gezüchteten Zellen als Reaktion auf die einzelnen Chemokine jeweils mit der unspezifischen Migration des Kontrollansatzes ohne Verwendung eines Chemokins verglichen (*Tabelle 11*). Dabei zeigte sich, dass die in den drei Grundmedien ohne Zytokine kultivierten Zellen eine Migration auf die Chemokine MCP-1 und MIP-1 α um $10,4 \pm 1,6\%$ bis $14,2 \pm 2,6\%$ aufwiesen ($p < 0,05$). Vergleich man die neun verschiedenen Kulturkonditionen untereinander jeweils hinsichtlich ihrer Migration auf diese beiden betrachteten Zytokine, so bestätigte sich die signifikant vermehrte Migration der Kulturen ohne Zytokine im Vergleich mit jenen mit Zytokinen. Als Reaktion auf die Chemokine SDF-1 α und MIP-3 β im Vergleich mit dem jeweiligen Ansatz ohne Chemokin konnten signifikante Transmigrationsraten in einigen Kulturkonditionen mit Zytokinen nachgewiesen werden ($p < 0,05$; *Tabelle 11*).

Betrachtete man die neun Kulturkonditionen und verglich sie untereinander hinsichtlich der Migration auf SDF-1 α und MIP-3 β , so konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Vergleich man die Migrationsraten der jeweiligen Zellkulturansätze mit denen der unkultivierten AML-Blasten, so wurde eine im Mittel um ca. 1,7fach höhere prozentuale Migration vor der Kultivierung deutlich (*Tabelle 11*).

Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse der Transmigration der AML-Blasten

($n = 5$ für die unkultivierten Blasten, $n = 10 - 12$ für die verschiedenen Kulturkonditionen)

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des Anteils transmigrierter Zellen in Prozent. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber der entsprechenden Kontrolle ohne Chemokinzusatz sind mit * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede gegenüber der Migration der unkultivierten AML-Blasten sind mit # gekennzeichnet.

		Kontrolle ohne Chemokin	Chemokine			
			MCP-1	MIP-1 α	SDF-1 α	MIP-3 β
Unkultivierte AML-Blasten		12,1 \pm 3	14,7 \pm 3,4	16,4 \pm 3,2	14,3 \pm 3	13,4 \pm 2,5
Kontrolle	RPMI 20%FBS	6 \pm 0,8 [#]	14,2 \pm 2,6*	13,3 \pm 2*	9,2 \pm 1,4	6,8 \pm 0,96 [#]
	RPMI 5%HS	6,5 \pm 0,85 [#]	13 \pm 1,8*	15,2 \pm 2,3*	11,3 \pm 2,1	8,5 \pm 1,4
	QBSF 5%HS	6,6 \pm 0,73 [#]	10,4 \pm 1,6*	11,4 \pm 1,3*	8,5 \pm 1,4	7,1 \pm 0,87 [#]
TGK + Flt-3L	RPMI 20%FBS	5 \pm 0,72 [#]	5,5 \pm 0,5 [#]	5,4 \pm 0,7 [#]	8,6 \pm 1,4*	9,4 \pm 1*
	RPMI 5%HS	7,4 \pm 0,91	7,6 \pm 0,74 [#]	8,4 \pm 1,3 [#]	8,2 \pm 1,1 [#]	11,4 \pm 1,6
	QBSF 5%HS	6,5 \pm 0,91 [#]	5,8 \pm 0,95 [#]	6,8 \pm 0,74 [#]	8,6 \pm 0,95 [#]	8,5 \pm 1
TGK + Flt-3L + IL-3 + IL-4	RPMI 20%FBS	5,1 \pm 0,64 [#]	4,9 \pm 0,3 [#]	4,7 \pm 0,57 [#]	7,9 \pm 1,6	9,8 \pm 1,5*
	RPMI 5% HS	6,4 \pm 1 [#]	7,9 \pm 1 [#]	7,9 \pm 1,6 [#]	10,1 \pm 1,3*	12,9 \pm 2,6*
	QBSF 5%HS	6,2 \pm 0,87 [#]	6,2 \pm 0,77 [#]	8,1 \pm 1,5 [#]	8,1 \pm 1,3	10,7 \pm 1,6*

4.1.6 Produktion und Sekretion von Interleukin 12

Um zu überprüfen, ob die differenzierten DC das inflammatorische Zytokin IL-12 produzieren, wurde ein Sandwich-ELISA mit anschließender photometrischer Messung durchgeführt. Es wurden die Zellkulturüberstände untersucht, um eine IL-12 Sekretion zu detektieren. Außerdem wurden Zelllysate hergestellt und getestet, um das intrazelluläre Vorkommen von IL-12 und damit eine Produktion dieses Zytokins festzustellen.

Getestet wurden zwei AML-Kulturen nach fünf bzw. acht Tagen der Kultivierung, die parallel zu Zellkulturen angesetzt wurden, mit denen eine MLC durchgeführt wurde. Weder die AML-Kultur mit 2ml Medium, noch die mit 500 μ l Medium (d.h. mit einer geringeren Verdünnung eines eventuell sezernierten IL-12) ergab Messwerte oberhalb des Messbereiches. Das bedeutet, es konnte kein IL-12 nachgewiesen werden.

4.2 Differenzierung von dendritischen Zellen aus ALL-Blasten

4.2.1 Morphologie

Die morphologische Beurteilung der generierten DC erfolgte mit Hilfe von Ausstrichpräparaten. Bei allen getesteten ALL-Blasten zeigte die Mehrheit der Zellen in Kultur nach ein und zwei Wochen der Differenzierung morphologische Kennzeichen von reifen DC. Es wurde eine Zunahme der Zellgröße und die Ausbildung dendritischer Zellfortsätze festgestellt (Abb. 14). Es konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen den in den drei verschiedenen Grundmedien oder den beiden verwendeten Zytokinkombinationen kultivierten Zellen gesehen werden. Des Weiteren waren die morphologischen Veränderungen unabhängig davon, ob es sich um T- oder B-Zell ALL-Blasten handelte.

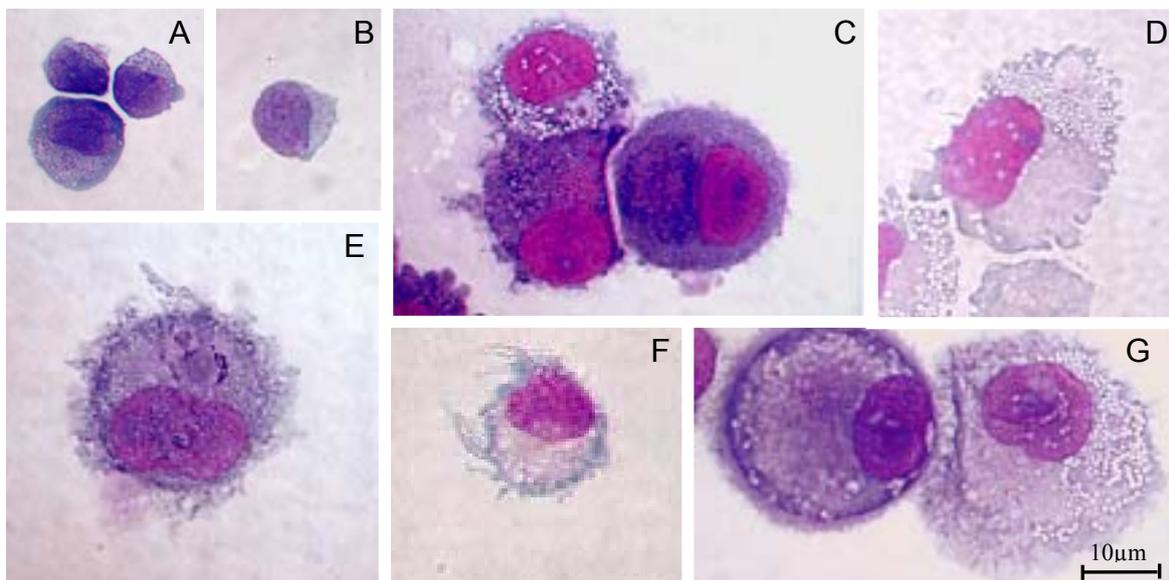


Abb. 14: Fotografien von Ausstrichpräparaten aus ALL-Blasten differenzierter DC

1000fache Vergrößerung

A: undifferenzierte ALL-Blasten nach 9 Tagen der Kultivierung in QBSF 5% HS

B: undifferenzierter ALL-Blast nach 9 Tagen der Kultivierung in RPMI 5% HS

C: DC nach 9 Tagen Kultivierung in RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L

D: DC nach 6 Tagen Kultivierung in QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L

E: DC nach 9 Tagen Kultivierung in RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L

F: DC nach 5 Tagen Kultivierung in QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L

G: DC nach 9 Tagen Kultivierung in QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L

4.2.2 Gesamtzellzahl und Vitalität

4.2.2.1 Gesamtzellzahl

Es wurden die Gesamtzellzahlen von Zellkulturen 19 verschiedener ALL-Patienten bestimmt. Die Zellzahlen der 100×10^4 in Kultur gesetzten Blasten sanken nach einer Woche auf Mittelwerte zwischen $71,9 \pm 4,8 \times 10^4$ und $84,6 \pm 4,5 \times 10^4$ Zellen (Abb. 15-A). Nach zwei Wochen zeigte sich eine weitere Abnahme der Zellzahlen (Abb. 15-B). Die Unterschiede der Gesamtzellzahlen zwischen den beiden Zeiträumen waren in allen neun Konditionen signifikant. Dahingegen waren die Messwerte der verschiedenen Kulturbedingungen vergleichbar.

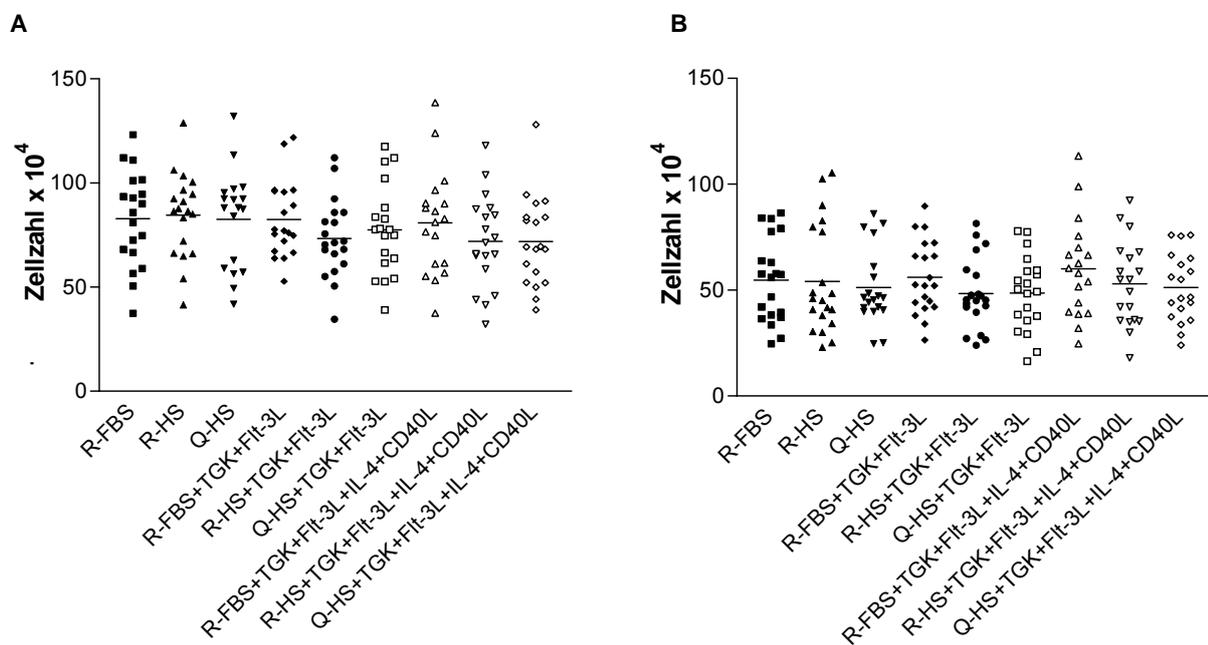


Abb. 15: Gesamtzellzahlen der ALL-Kulturen nach A) einer Woche und B) zwei Wochen der Kultivierung ($n = 18 - 19$)

Nach zwei Wochen der Kultivierung ließ sich eine signifikante Abnahme der Zellzahlen in allen Kulturkonditionen verglichen mit den nach einer Woche ermittelten Werten feststellen. Der Mittelwert ist eingezeichnet.

4.2.2.2 Vitalität

Nach ein und zwei Wochen der Kultivierung wurde die Vitalität der Kulturen 19 verschiedener ALL-Blasten bestimmt ($n = 18 - 19$). Die mittels Trypanblaufärbung ermittelte Vitalität der ALL-Kulturen variierte nach einer Woche zwischen $92 \pm 1,1\%$ und $95,6 \pm 0,56\%$ und nach 2 Wochen zwischen $93,1 \pm 0,78\%$ und $96,2 \pm 0,48\%$.

Nach einer Woche ließ sich in der Zellkultur mit RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L eine höhere Vitalität im Vergleich mit der Kontrollkultur desselben Mediums feststellen ($92 \pm 1,1\%$ in der Kontrollkultur vs. $94,7 \pm 0,59\%$; $p < 0,05$). Das gleiche gilt für die Zellkultur mit QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L und die Kultur desselben Mediums ohne Zytokine ($93,6 \pm 0,71\%$ in der Kontrollkultur vs. $95,6 \pm 0,56\%$; $p < 0,05$).

4.2.3 Immunphänotypische Charakterisierung

Die generierten Zellen wurden durch die durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmoleküle CD83, HLA-DR, CD80, CD86, CD1a, CD14 und der Chemokinrezeptoren CXCR4 (Rezeptor für SDF-1 α) und CCR7 (Rezeptor für MIP-3 β) näher charakterisiert.

4.2.3.1 Immunphänotypisches Profil der ALL-Blasten vor der Kultivierung

Es wurde der Immunphänotyp von 16 ALL-Blasten vor der Kultivierung bestimmt. Die Analyse der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 erfolgte anhand von sieben ALL-Blasten. Die eingesetzten Zellen zeigten eine geringe Koexpression von CD83 und HLA-DR ($5,1 \pm 1,4\%$) und kaum Expression von CD1a ($1,3 \pm 0,46\%$) und CD14 ($4,5 \pm 1,8\%$). In der Expression von CD86 ohne Koexpression von CD80 sowie der Chemokinrezeptoren ließen sich hingegen beträchtliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientenblasten feststellen (Abb. 16).

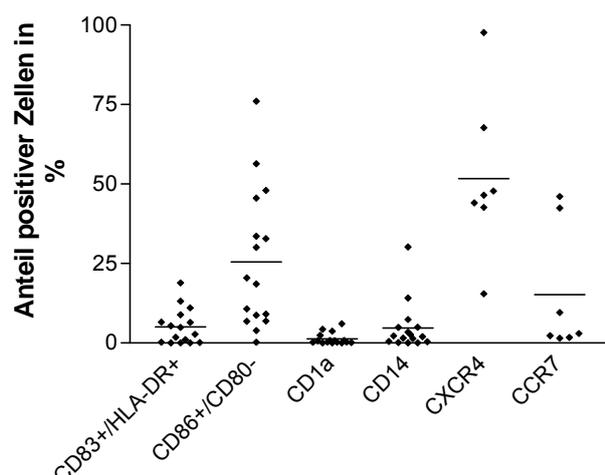


Abb. 16: Immunprofil der eingesetzten ALL-Blasten vor der Kultivierung

Dargestellt ist der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil der leukämischen Blasten in Prozent, welche vor der Kultivierung die jeweiligen Oberflächenmoleküle exprimierten. Der Mittelwert ist eingezeichnet.

4.2.3.2 Untersuchung der CD83/HLA-DR Koexpression der ALL-Kulturen

Der Anteil an der Gesamtpopulation und die absolute Zellzahl der generierten DC wurden anhand der CD83 und HLA-DR-Koexpression bestimmt (Banchereau et al., 2000).

Versuchsansätze von 14 verschiedenen ALL-Patienten mit 12 bis 20 Einzelwerten gingen in die Untersuchung ein. Die mittlere Koexpression beider Moleküle variierte in den Kontrollen zwischen $3 \pm 0,66\%$ und $6 \pm 2,4\%$ ($2,7 \pm 0,63 \times 10^4$ bis $5,2 \pm 2,3 \times 10^4$ Zellen) nach einer Woche und $0,67 \pm 0,21\%$ und $2 \pm 0,88\%$ ($0,47 \pm 0,18$ bis $4,2 \pm 3 \times 10^4$ Zellen) nach zwei Wochen (Tabelle 12).

Tabelle 12: CD83 und HLA-DR -Koexpression der ALL-Kulturen (n = 12-14)

% CD83⁺/HLA-DR⁺: Anteil der Zellen mit Koexpression der Oberflächenmoleküle CD83 und HLA-DR; abs.ZZ CD83⁺/HLA-DR⁺: Anzahl der Zellen mit Koexpression der Oberflächenmoleküle CD83 und HLA-DR $\times 10^4$; Mittelwert \pm SEM wird dargestellt; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber der entsprechenden Kontrolle ohne Zytokine sind mit * gekennzeichnet; eine Signifikanz von $p < 0,001$ gegenüber der entsprechenden Kontrolle ohne Zytokine ist mit ** gekennzeichnet.

		Woche 1		Woche 2	
		% CD83 ⁺ /HLA-DR ⁺	abs.ZZ $\times 10^4$ CD83 ⁺ /HLA-DR ⁺	% CD83 ⁺ /HLA-DR ⁺	abs.ZZ $\times 10^4$ CD83 ⁺ /HLA-DR ⁺
Kontrolle	RPMI 20% FBS	$6 \pm 2,4$	$5,2 \pm 2,3$	$2 \pm 0,88$	$1,5 \pm 0,75$
	RPMI 5% HS	$3 \pm 0,66$	$2,7 \pm 0,63$	$0,67 \pm 0,21$	$0,47 \pm 0,18$
	QBSF 5% HS	$5,5 \pm 1,7$	$4,7 \pm 1,4$	$1,8 \pm 0,64$	$4,2 \pm 3$
TGK + Flt-3L	RPMI 20% FBS	$21,2 \pm 5,4^*$	$16,4 \pm 4,4^*$	$6,5 \pm 1,2^*$	$4,3 \pm 0,95^*$
	RPMI 5% HS	$20,8 \pm 4,8^{**}$	$15,5 \pm 4,4^{**}$	$10,2 \pm 2,6^{**}$	$6,4 \pm 1,9^*$
	QBSF 5% HS	$22,8 \pm 6,1^*$	$17,4 \pm 5^*$	$8,3 \pm 1,7^{**}$	$4,7 \pm 1,1^*$
TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L	RPMI 20% FBS	$26,1 \pm 7,4^{**}$	$20,8 \pm 6,6^*$	$9,8 \pm 2,9^*$	$7,5 \pm 2,4^*$
	RPMI 5% HS	$30 \pm 6,3^{**}$	$20,8 \pm 4,8^{**}$	$21,7 \pm 6,4^{**}$	$12,5 \pm 4,1^{**}$
	QBSF 5% HS	$29,7 \pm 7,3^*$	$21 \pm 5,5^*$	$18 \pm 3,8^{**}$	$9,6 \pm 2^*$

In den Kulturansätzen mit Zytokinen ließen sich im Mittel fünf- bis achtfach höhere Expressionsraten verglichen mit den jeweiligen Kontrollkulturen feststellen ($p < 0,05$). Nach einer Woche der Kultivierung betrug der Anteil positiver Zellen zwischen $20,8 \pm 4,8\%$ und $30 \pm 6,3\%$ ($15,5 \pm 4,4 \times 10^4$ bis $21 \pm 5,5 \times 10^4$ Zellen), nach zwei Wochen zwischen $6,5 \pm 1,2\%$ und $21,7 \pm 6,4\%$ ($4,3 \pm 0,95 \times 10^4$ bis $12,5 \pm 4,1 \times 10^4$ Zellen; Tabelle 12). In den Untersuchungen zum Immunphänotyp der unkultivierten ALL-Blasten konnte eine mittlere Koexpression von CD83 und HLA-DR von $5,1 \pm 1,4\%$ ermittelt werden. Vergleich man diesen Wert mit dem prozentualen Anteil positiver Zellen nach der Kultivierung, so ergaben sich nach einer Woche signifikant höhere Expressionsraten in allen Konditionen unter Verwendung von Zytokinen. Nach zwei Wochen war die Koexpression beider Oberflächenmoleküle in den Konditionen mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L + IL-4 +

CD40L in den Grundmedien RPMI 5% HS ($21,7 \pm 6,4\%$; $p = 0,005$) und QBSF 5% HS ($18 \pm 3,8\%$; $p = 0,006$) signifikant höher als im Immunprofil der Blasten vor der Kultivierung. Es ließen sich beträchtliche Unterschiede in den Expressionsraten der einzelnen ALL-Kulturen feststellen (Koexpression von CD83 und HLA-DR nach einer Woche: 1,3% bis 90,2%; nach zwei Wochen: 1,1% bis 88,2%). Die höchsten Prozentzahlen positiver Zellen konnten nach einer Woche bei zwei Patientenblasten mit RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L, bei einem Ansatz mit RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L, bei drei mit QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L, bei vier mit RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L sowie bei drei Patientenblasten mit QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L erreicht werden. Die entsprechende Verteilung nach zwei Wochen zeigte dabei keine relevanten Unterschiede.

Die drei eingesetzten Grundmedien erwiesen sich bezüglich der Expression von CD83 und HLA-DR als gleichwertig ($p > 0,05$). Mit der Zytokinkombination bestehend aus TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L konnten nach einer Woche ca. 1,3fach und nach zwei Wochen etwa doppelt so hohe Prozent- und absolute Zellzahlen im Vergleich mit der Zytokinkombination ohne die Zugabe von IL-4 und CD40L erreicht werden. Diese Unterschiede zwischen beiden Zytokinkombinationen waren allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$). Die prozentualen Anteile wie auch die Zellzahlen waren nach einer Woche ca. zwei bis zweieinhalbfach höher als nach zwei Wochen der Kultivierung (*Tabelle 12*). Signifikant waren diese Unterschiede unter Verwendung der Zytokinkombination TGK + Flt-3L in allen drei Grundmedien.

4.2.3.3 Kumulative Zellzahl aus ALL-Blasten gezüchteter DC

Die kumulative Zellzahl der generierten DC nach ein und zwei Wochen wurde anhand der Formel vier berechnet (*Formel 4*, S. 33). Die Zellzahl am Tag eins beträgt $0,56 \pm 1,4 \times 10^4$ Zellen und wurde anhand des im Immunprofil der unkultivierten Blasten ermittelten Anteils der für CD83 und HLA-DR positiven Zellen bestimmt. In allen Kulturkonditionen ließen sich nach ein und zwei Wochen der Kultivierung signifikant höhere Zellzahlen im Vergleich zum Tag eins feststellen ($p < 0,0004$). In den Kontrollen variierten die kumulativen Zellzahlen nach einer Woche zwischen $3,2 \pm 0,63 \times 10^4$ und $5,8 \pm 2,3 \times 10^4$ Zellen und nach zwei Wochen zwischen $3,5 \pm 0,66 \times 10^4$ und $8,4 \pm 2,8 \times 10^4$ Zellen (*Abb. 17*). In den Konditionen mit Zytokinen wurden nach einer Woche kumulative Zellzahlen zwischen $16,1 \pm 4,4 \times 10^4$ und $21,5 \pm 5,5 \times 10^4$ Zellen und nach zwei Wochen zwischen $20,2 \pm 4,3 \times 10^4$ und $31,5 \pm 5,6 \times 10^4$ Zellen ermittelt. Diese im Mittel um ca. 1,3fach höheren Werte nach zwei Wochen im Vergleich zu jenen nach einer Woche waren in allen untersuchten Kulturkonditionen signifikant. Sowohl nach einer als auch nach zwei Wochen waren die kumulativen Zellzahlen in den Konditionen mit Zytokinen verglichen mit den jeweiligen

Kontrollen ca. viermal höher ($p < 0,01$). Die höchsten Zellzahlen wurden nach zwei Wochen mit den Grundmedien RPMI 5% HS ($31,5 \pm 5,6 \times 10^4$ Zellen) und QBSF 5% HS ($28,9 \pm 5 \times 10^4$ Zellen) unter Zugabe der Zytokinkombination TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L erreicht (Abb. 17). Allerdings konnten zu keinem Zeitpunkt statistische Unterschiede zwischen den untersuchten Medien oder Zytokinkombinationen festgestellt werden ($p > 0,05$).

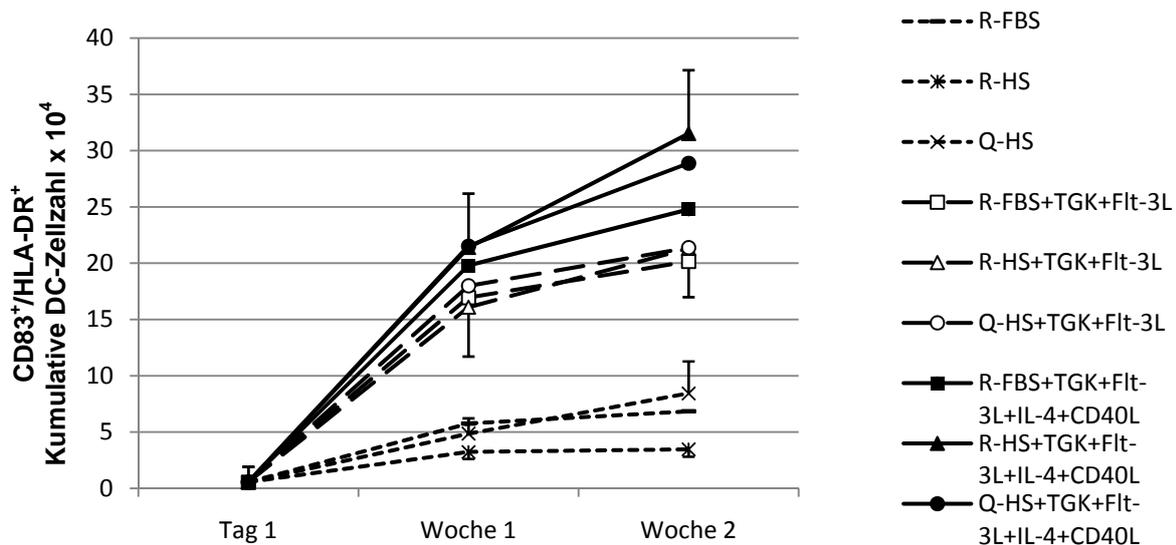


Abb. 17: Kumulative CD83⁺/HLA-DR⁺ Zellzahl aus ALL-Blasten differenzierter DC

Dargestellt ist die aus den absoluten Zellzahlen errechnete kumulative Zellzahl der für CD83 und HLA-DR positiven DC. Die Zellzahlen am Tag eins beziehen sich auf den im Immunprofil der unkultivierten ALL-Blasten ermittelten Anteil CD83 und HLA-DR positiver Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der 12-14 ALL-Kulturen, der SEM ist eingezeichnet.

4.2.3.4 Untersuchung der CD86-Expression der ALL-Blasten

Die Expression von CD86 bei fehlender Koexpression von CD80 ist charakteristisch für reife DC (Banchereau et al., 2000; Sansom et al., 2003) und wurde anhand von 14 verschiedenen ALL-Patienten untersucht. Durch Mehrfachbestimmungen zur Verifizierung der Einzelwerte variierte die Anzahl der eingehenden Werte zwischen 13 und 19. Nach einer Woche ließ sich keine vermehrte Expression von CD86 in den Versuchsansätzen mit Zytokinen ($27,2 \pm 9\%$ bis $37,1 \pm 9,3\%$ bzw. $21 \pm 6,2 \times 10^4$ bis $30,1 \pm 9,3 \times 10^4$ Zellen) im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollkulturen ohne Zytokine ($15,2 \pm 6,5\%$ bis $31,4 \pm 8,5\%$ bzw. $16,6 \pm 8 \times 10^4$ bis $27,4 \pm 8,4 \times 10^4$ Zellen) ermitteln (Tabelle 13). Nach zwei Wochen variierten die Expressionsraten von CD86 in den Kontrollen zwischen $11,7 \pm 6,2\%$ ($8 \pm 4,4 \times 10^4$ Zellen) und $24,5 \pm 6,9\%$ ($15,6 \pm 5,1 \times 10^4$ Zellen). Eine signifikante Expressionssteigerung von CD86 im Vergleich mit der entsprechenden Kontrolle ohne Zytokine konnte nach zwei Wochen für die Konditionen

RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L, RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L und RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L nachgewiesen werden. Im Immunprofil der unkultivierten ALL-Blasten betrug die mittlere Expression von CD86 ohne Koexpression von CD80 $25,5 \pm 5,3\%$. Dieser Wert unterschied sich nicht von jenen Messergebnissen, die nach einer Woche der Kultivierung in den verschiedenen Konditionen festgestellt wurden ($p > 0,05$). Die Zugabe von IL-4 und CD-40L zu der Kombination aus TGK + Flt-3L erhöhte die CD86-Expression geringfügig nach einer Woche um das 1,1fach und nach zwei Wochen um das 1,4fache ($p > 0,05$).

Tabelle 13: CD86-Expression der ALL-Kulturen (n = 12 - 14)

% CD86⁺/CD80⁻: prozentualer Anteil der Zellen mit Expression des Oberflächenmoleküls CD86 ohne Koexpression von CD80; abs.ZZ CD86⁺/CD80⁻: Anzahl der Zellen mit CD86-Expression ohne Koexpression von CD80 $\times 10^4$; Mittelwert \pm SEM wird dargestellt. * bedeutet signifikant im Vergleich mit dem entsprechenden Kontrollansatz ohne Zytokine.

		Woche 1		Woche 2	
		% CD86 ⁺ /CD80 ⁻	abs.ZZ $\times 10^4$ CD86 ⁺ /CD80 ⁻	% CD86 ⁺ /CD80 ⁻	abs.ZZ $\times 10^4$ CD86 ⁺ /CD80 ⁻
Kon- trolle	RPMI 20% FBS	15,2 \pm 6,5	16,6 \pm 8	11,7 \pm 6,2	8 \pm 4,4
	RPMI 5% HS	20,2 \pm 6,8	17,5 \pm 6,3	15,2 \pm 6,4	10,8 \pm 4,4
	QBSF 5% HS	31,4 \pm 8,5	27,4 \pm 8,4	24,5 \pm 6,9	15,6 \pm 5,1
TGK + Flt-3L	RPMI 20% FBS	27,2 \pm 9	23,6 \pm 8,6	22,9 \pm 7,1*	15,7 \pm 5,4*
	RPMI 5% HS	28,2 \pm 8,1	21 \pm 6,2	24,1 \pm 7,6	16,8 \pm 6,1
	QBSF 5% HS	36,1 \pm 9,8	30,1 \pm 9,3	35 \pm 8,2	21 \pm 5,9
TGK + Flt-3L + IL-4 +CD40L	RPMI 20% FBS	32,6 \pm 8,9	29,6 \pm 8,9	36,1 \pm 8,4*	27,1 \pm 7,8*
	RPMI 5% HS	32,2 \pm 8,1	23,7 \pm 6,2	38,4 \pm 8,7*	24,1 \pm 6,2*
	QBSF 5% HS	37,1 \pm 9,3	27,7 \pm 7,5	43,4 \pm 8,9	26 \pm 5,7

4.2.3.5 Untersuchung der CD1a-Expression

CD1a ist ein kostimulatorisches Molekül, welches durch unreife DC exprimiert wird (Banchereau et al., 2000). Um den Anteil unreifer DC an der Gesamtpopulation zu ermitteln, wurde dieses Oberflächenmolekül nach ein und zwei Wochen durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurden Blasten 13 verschiedener ALL-Patienten (n = 11-13) auf ihre CD1a-Expression untersucht. Nach einer Woche konnten bei einem Anteil von für CD1a positiven Zellen zwischen $0,56 \pm 0,25\%$ in RPMI 5% HS und $4,6 \pm 1,8\%$ in RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L keine signifikanten Unterschiede zwischen den neun untersuchten Kulturbedingungen

festgestellt werden. Auch nach zwei Wochen war die Expression von CD1a zwischen den verschiedenen Konditionen ähnlich und variierte zwischen $0,06 \pm 0,04\%$ in RPMI 5% HS und $4,1 \pm 1,2\%$ in RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L. Die immunphänotypische Charakterisierung der unkultivierten ALL-Blasten ergab eine mittlere Expression von CD1a von $1,3 \pm 0,44\%$ und war damit mit den ermittelten Expressionsraten der verschiedenen Kulturkonditionen vergleichbar.

4.2.3.6 Untersuchung der CD14-Expression

Um den Anteil an Monozyten an der Gesamtheit der gezüchteten Zellen beurteilen zu können, wurde das Oberflächenmolekül CD14 (*Andreesen et al., 1990*) nach ein und zwei Wochen durchflusszytometrisch bestimmt. Untersucht wurden die Blasten von 13 verschiedenen ALL-Patienten ($n = 11 - 13$). Die Expressionsraten der verschiedenen Kulturbedingungen waren ähnlich und variierten nach einer Woche zwischen $2,5 \pm 0,94\%$ in RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L und $8,4 \pm 4,5\%$ in RPMI 5% HS. Nach zwei Wochen ließen sich Werte zwischen $0,55 \pm 0,31\%$ in RPMI 20% FBS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L und $2,7 \pm 0,67\%$ in RPMI 20 % FBS + TGK + Flt-3L ermitteln. Die Expressionsraten beider Zeiträume waren vergleichbar ($p > 0,05$). Im Immunprofil der Blasten vor der Kultivierung wurde eine mittlere CD14-Expression der ALL-Blasten von $4,7 \pm 1,9\%$ festgestellt. Weder nach ein noch nach zwei Wochen der Kultivierung ließen sich Unterschiede zwischen diesem Wert und den CD14-Expressionsraten der verschiedenen Kulturkonditionen nachweisen ($p > 0,05$).

4.2.3.7 Untersuchung der Expression des Chemokinrezeptors CXCR4

CXCR4 (CD184), der Rezeptor für das homöostatische Chemokin SDF-1 α , wird von reifen und unreifen DC exprimiert (*Dieu-Nosjean et al., 1999*). Die Blasten 13 verschiedener ALL-Patienten ($n = 12 - 13$) wurden auf ihre Expression von CXCR4 untersucht. Die Bestimmung erfolgte nach fünf bis acht Tagen der Differenzierung. Die Expressionsrate variierte zwischen $36,8 \pm 6,3\%$ und $54,2 \pm 6,8\%$ und war in allen neun Kulturkonditionen vergleichbar ($p > 0,05$). Im Immunprofil der naiven ALL-Blasten betrug die mittlere CXCR4-Expression $51,7 \pm 8,9\%$. Sie unterschied sich nicht von den Messwerten, die nach der Kultivierung in den verschiedenen Konditionen ermittelt wurden.

4.2.3.8 Untersuchung der Expression des Chemokinrezeptors CCR7

CCR7 (CD197) ist der Rezeptor für die homöostatischen Chemokine MIP-3 β und 6Kine. Er wird von reifen DC exprimiert (*Yanagihara et al., 1998*) und ist wichtig für die Migration der DC zu den anliegenden Lymphknoten (*Janeway et al., 2005*). Die Blasten von 13

verschiedenen ALL-Patienten wurden nach fünf bis acht Tagen hinsichtlich ihrer CCR7-Expression durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl in den Kontrollen als auch den Kulturen mit Zytokinen jeweils der Anteil der für CCR7 positiven Zellen in dem Grundmedium RPMI 20% FBS nur ca. ein viertel des Anteils der CCR7-exprimierenden Zellen in den anderen beiden Kulturmedien betrug (Abb. 18). Die im Immunprofil ermittelte mittlere CCR7-Expression der unkultivierten ALL-Blasten betrug $15,2 \pm 7\%$ und unterschied sich nicht von den Messwerten, die nach der Kultivierung in den verschiedenen Konditionen nachgewiesen wurden ($p > 0,05$).

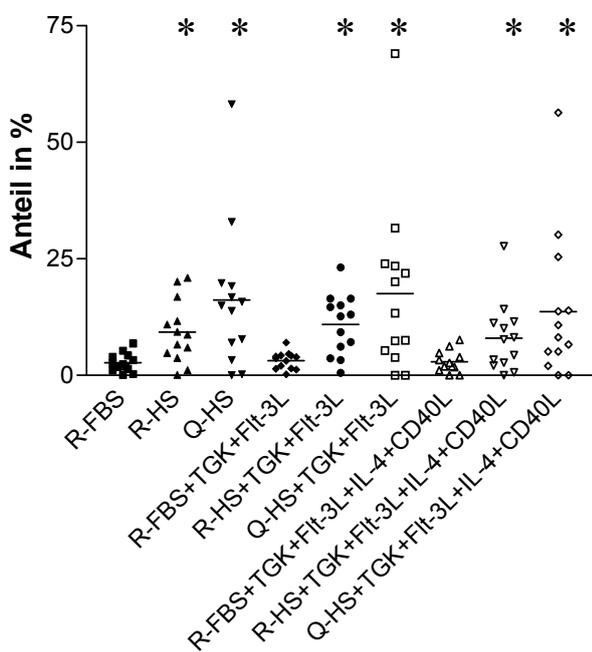


Abb. 18: Expression des Chemokinrezeptors CCR7 in den ALL-Kulturen ($n = 12 - 13$)

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Expression des Chemokinrezeptors CCR7. Die jeweils geringere Expression in den Konditionen des Grundmediums RPMI 20% FBS wird deutlich. Der Mittelwert ist eingezeichnet. * bedeutet signifikant gegenüber der Kultur mit denselben Bedingungen und dem Grundmedium RPMI 20% FBS.

4.2.4 Stimulationsfähigkeit allogener T-Zellen

Die immunstimulatorischen Fähigkeiten der differenzierten DC wurden anhand der Stimulation allogener T-Zellen in der MLC beurteilt (Moldenhauer et al., 2006). Grundlage für die Versuche bildeten fünf ALL-Kulturen nach vier bis acht Tagen der Differenzierung. Es konnte eine stärkere Lymphozytenproliferation in den Konditionen mit Zytokinen im Vergleich mit den drei Kontrollen festgestellt werden (Abb. 19). Eine statistische Signifikanz ließ sich aufgrund der Variabilität der Werte nur in den Verdünnungsstufen 1:120 und 1:30 in den Konditionen unter Verwendung beider Zytokinkombinationen jeweils in RPMI 5% HS und QBSF 5% HS sowie in der Verdünnungsstufe 1:15 in RPMI 5% HS + TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L nachweisen. Die drei verwendeten Grundmedien und die beiden getesteten Zytokinkombinationen erwiesen sich bezüglich der T-Zell-Stimulationsfähigkeit als gleichwertig ($p > 0,05$).

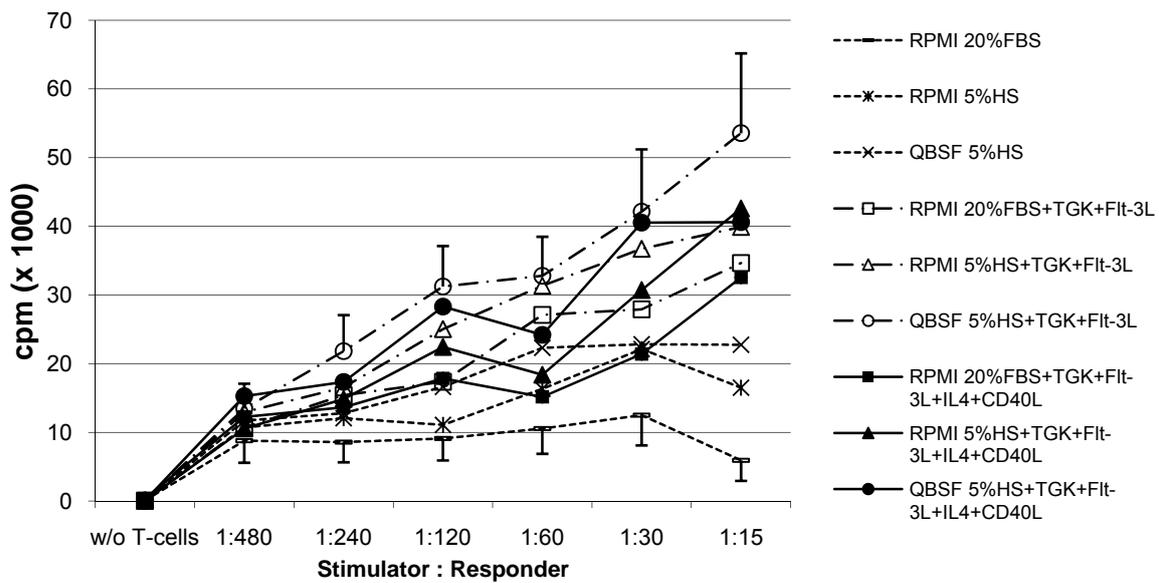


Abb. 19: Zusammenfassende Darstellung der MLCs aus ALL-Blasten differenzierter DC
(n = 5)

Cpm: counts per minute; w/o t-cells: Negativkontrolle ohne Zugabe von T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der fünf Versuche, SEM ist eingezeichnet. Eine von der Anzahl der eingesetzten DC abhängige Proliferationssteigerung der Lymphozyten in den Versuchsansätzen unter Verwendung von Zytokinen wird deutlich.

4.2.5 Migrationsfähigkeit

4.2.5.1 Migrationsfähigkeit der ALL-Blasten vor der Kultivierung

Die Blasten von sieben ALL-Patienten wurden nach ihrer Isolierung bzw. dem Auftauen der Zellen hinsichtlich ihrer Migrationsfähigkeit im Transmigrations-Assay untersucht (Moldenhauer et al., 2006). Der Mittelwert des prozentualen Anteils transmigrierter Zellen betrug im Kontrollansatz $11,6 \pm 2,3\%$. In den Ansätzen mit Chemokinen variierte die Migrationsrate zwischen $12,2 \pm 1,7\%$ mit MIP-3 β und $17 \pm 3,9\%$ mit MIP-1 α . Es konnten keine Unterschiede im Anteil der migrierten Zellen in den Ansätzen mit den chemoattraktiven Substanzen SDF-1 α , MIP-1 α , MCP-1 und MIP-3 β im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle ohne Chemokin festgestellt werden (Tabelle 14).

4.2.5.2 Migrationsfähigkeit der differenzierten DC

Untersucht wurde das Transmigrationsverhalten von Blasten 12 verschiedener ALL-Patienten nach fünf bis acht Tagen der Kultivierung. Die Migrationsraten variierten in der Kontrolle

ohne Chemokin zwischen $5 \pm 0,39\%$ und $8,8 \pm 1,3\%$ und in den Ansätzen mit den verschiedenen Chemokinen zwischen $5 \pm 0,52\%$ und $11,7 \pm 1,5\%$ (Tabelle 14).

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Transmigration der ALL-Blasten

(n = 10 – 12)

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des Anteils transmigrierter Zellen in Prozent. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber der entsprechenden Kontrolle ohne Chemokinzusatz sind mit * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede gegenüber der Migration der unkultivierten AML-Blasten sind mit # gekennzeichnet.

		Kontrolle ohne Chemokin	Chemokine			
			MCP-1	MIP-1 α	SDF-1 α	MIP-3 β
Unkultivierte ALL-Blasten		11,6 \pm 2,1	15,1 \pm 2,5	17 \pm 3,9	16,3 \pm 2	12,2 \pm 1,7
Kontrolle	RPMI 20%FBS	7,9 \pm 1,4	9,3 \pm 1,4	11,5 \pm 2,4	10,4 \pm 0,97 [#]	8,3 \pm 0,97
	RPMI 5%HS	8,8 \pm 1,3	8,9 \pm 1,3 [#]	10,1 \pm 2,4	9,6 \pm 1,8 [#]	9,4 \pm 1,6
	QBSF 5%HS	8,2 \pm 0,64	9,2 \pm 1,1 [#]	11,7 \pm 1,5	9,2 \pm 1 [#]	10 \pm 0,98
TGK + Flt-3L	RPMI 20%FBS	6,9 \pm 0,61 [#]	6,8 \pm 0,96 [#]	7,2 \pm 0,75 [#]	9,2 \pm 1 [#]	9 \pm 0,73*
	RPMI 5%HS	6,1 \pm 0,62 [#]	5,9 \pm 0,64 [#]	6,8 \pm 0,68 [#]	6,9 \pm 0,62 [#]	9,1 \pm 1,1*
	QBSF 5%HS	6,8 \pm 0,52 [#]	7 \pm 0,67 [#]	7,2 \pm 1,1 [#]	8,6 \pm 1 [#]	9,7 \pm 1,4
TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L	RPMI 20%FBS	5,6 \pm 0,62 [#]	6 \pm 0,59 [#]	6,5 \pm 0,58 [#]	7,8 \pm 0,55* [#]	9,5 \pm 1,2*
	RPMI 5% HS	5 \pm 0,39 [#]	6,2 \pm 0,61 [#]	5 \pm 0,52 [#]	6,8 \pm 0,42* [#]	8,4 \pm 0,81* [#]
	QBSF 5%HS	6,2 \pm 0,49 [#]	7,8 \pm 0,74 [#]	7,8 \pm 0,98 [#]	9,1 \pm 0,98* [#]	10,5 \pm 1,3*

Im Vergleich der Versuchsansätze ohne Zusatz eines Chemokins mit jenen mit Chemokinen konnten signifikante Unterschiede in der Migration auf die Chemokine SDF-1 α und MIP-3 β ermittelt werden. Es zeigte sich eine etwa eineinhalbfach höhere Transmigrationsrate mit SDF-1 α bei der Zytokinkombination TGK + Flt-3L + IL-4 + CD40L in allen drei Grundmedien gegenüber dem Versuchsansatz mit PBS anstelle eines Chemokins. Auch als Reaktion auf MIP-3 β konnte eine um ca. eineinhalbfach höhere Transmigration im Vergleich zur Kontrolle mit PBS in allen Konditionen mit Zytokinen ($p < 0,05$) bis auf QBSF 5% HS + TGK + Flt-3L ($p = 0,07$) festgestellt werden. Vergleich man hingegen die neun Kulturbedingungen hinsichtlich ihrer Migration auf die getesteten Chemokine untereinander, so konnten keine Unterschiede ermittelt werden. Im Vergleich der Migrationsraten der jeweiligen Zellkulturansätze mit denen der unkultivierten ALL-Blasten wurde eine im Mittel um ca. 1,8fach geringere Migration nach der Kultivierung deutlich (Tabelle 14).

4.2.6 Produktion und Sekretion von Interleukin 12

Die Fähigkeit der differenzierten DC zur Produktion des inflammatorischen Zytokins IL-12 wurde anhand von Sandwich-ELISAs untersucht. Zum einen wurden die Zellkulturüberstände untersucht, um eine IL-12 Sekretion zu detektieren. Zum anderen wurden Zellysate hergestellt und getestet, um das intrazelluläre Vorkommen von IL-12 und damit eine Produktion dieses Zytokins festzustellen. Es wurden zwei Zellkulturansätze nach sechs Tagen der Kultivierung getestet, welche parallel zu Zellkulturen angesetzt wurden, mit denen eine MLC durchgeführt wurde. Eine dieser Kulturen wurde mit 2ml Medium, die andere mit 500µl Medium (d.h. mit einer geringeren Verdünnung eines möglicherweise sezernierten IL-12) angesetzt. Beide ergaben Messwerte unterhalb des Messbereiches, d.h. es konnte kein IL-12 nachgewiesen werden.

4.3 Vergleich der aus AML- und ALL-Blasten generierten Zellen

Um die aus AML- und aus ALL- Blasten differenzierten Zellen vergleichen zu können, wurden die in den Untersuchungen ermittelten Werte statistisch verglichen. Dabei wurden jeweils die Zellkulturansätze derselben Bedingungen miteinander verglichen, d.h. die Kontrollansätze mit den drei Grundmedien ohne Zytokine sowie die Ansätze mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L.

4.3.1 Morphologie

Sowohl aus AML- als auch aus ALL-Blasten wurden reife dendritische Zellen mit zytoplasmatischen Zellfortsätzen generiert. Die Morphologie war vergleichbar.

4.3.2 Gesamtzellzahl und Vitalität

4.3.2.1 Gesamtzellzahl

Betrachtete man die Gesamtzellzahl der Kontrollansätze ohne Zytokine, so waren die Werte nach ein und zwei Wochen der Kultivierung ähnlich ($p > 0,05$). Dahingegen unterschieden sich die Gesamtzellzahlen in den Konditionen mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L. Sie waren in den AML-Kulturen nach einer Woche um ca. 1,6fach und nach zwei Wochen um ca. 2,3fach höher als in den jeweiligen Kulturen der ALL-Blasten ($p < 0,05$; *Tabelle 15*).

4.3.2.2 Vitalität

Alle Zellkulturansätze der AML- und ALL-Blasten hatten eine Vitalität zwischen $92 \pm 1,1\%$ und $97,4 \pm 0,34\%$. Die Vitalität der verschiedenen Zellkulturen war vergleichbar.

Tabelle 15: Gesamtzellzahlen der Zellkulturansätze von AML- und ALL-Blasten

Dargestellt sind die Gesamtzellzahlen $\times 10^4$ der aus den AML- und ALL-Blasten differenzierten DC nach ein und zwei Wochen der Kultivierung. Die Mittelwerte \pm SEM werden aufgelistet. * bedeutet signifikant gegenüber dem entsprechenden Zellkulturansatz mit AML-Blasten.

		AML-Kulturen		ALL-Kulturen	
		Woche 1	Woche 2	Woche 1	Woche 2
Kontrolle	RPMI 20%FBS	83,6 \pm 11,5	74,1 \pm 26,4	82,8 \pm 5,1	54,7 \pm 4,3
	RPMI 5% HS	93,7 \pm 8,7	73,7 \pm 25,6	84,6 \pm 4,5	54,2 \pm 5,6
	QBSF 5% HS	99,2 \pm 15,9	87,7 \pm 36,4	82,6 \pm 5,4	51,3 \pm 4
TGK + Flt-3L	RPMI 20%FBS	126,5 \pm 19,9	110 \pm 21,4	82,5 \pm 4,1*	56,1 \pm 3,7*
	RPMI 5% HS	110,8 \pm 14	100,1 \pm 21,2	77,4 \pm 4,9*	48,4 \pm 3,6*
	RPMI 5% HS	137,2 \pm 23,9	148,5 \pm 39	80,9 \pm 5,8*	48,8 \pm 3,8*

4.3.3 Immunphänotypische Charakterisierung

4.3.3.1 Immunphänotypisches Profil der AML- und ALL-Blasten vor der Kultivierung

Im Immunphänotyp der naiven AML- und ALL-Blasten fanden sich signifikante Unterschiede in der Expression von CD14 (AML: 39,8 \pm 14%; ALL: 4,7 \pm 1,9%) und des Chemokinrezeptors CCR7 (AML: 71 \pm 17,6%; ALL: 15,2 \pm 7,6%). Bezüglich der Expression von CD1a, CD86⁺/CD80⁻ und CXCR4 sowie der Koexpression von CD83⁺/HLA-DR⁺ waren die AML- und ALL-Blasten vergleichbar ($p > 0,05$).

4.3.3.2 Untersuchung der CD83⁺/HLA-DR⁺-Koexpression

Sowohl in den AML- als auch den ALL-Kulturen zeigte sich in den Konditionen mit Zytokinen eine signifikante Hochregulation der Oberflächenmoleküle CD83 und HLA-DR (Tabelle 9, S. 41 bzw. Tabelle 12, S. 54). Die ALL-Blasten exprimierten beide Oberflächenmoleküle in den Kontrollkulturen zu einem höheren Anteil als die AML-Blasten (AML: 0,34 \pm 0,16% bis 1,5 \pm 0,51%, ALL: 3 \pm 0,7% bis 6 \pm 2,4%, $p < 0,05$). Auch in den Zellkulturansätzen unter Verwendung der Zytokinkombination TGK + Flt-3L exprimierten die ALL-Kulturen nach einer Woche beide Moleküle zu einem höheren Anteil als die AML-Kulturen (AML: 9,3 \pm 4,6% bis 12,4 \pm 5,2%; ALL: 20,8 \pm 4,8% bis 22,8 \pm 6,1%; $p < 0,05$). Nach zwei Wochen hingegen ließen sich weder in den Kontrollansätzen noch in den Zellkulturen mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L Unterschiede in den Expressionsraten von CD83⁺/HLA-DR⁺ zwischen den AML- und ALL-Kulturen feststellen. Betrachtet man die absoluten Zellzahlen der für CD83 und HLA-DR positiven Zellen, so fanden sich in den drei

Kontrollansätzen ohne Zytokine nach einer Woche höhere Zellzahlen in den ALL- im Vergleich mit den AML-Kulturen (AML: $0,36 \pm 0,2$ bis $1,5 \pm 0,7 \times 10^4$ Zellen; ALL: $2,7 \pm 0,63$ bis $5,2 \pm 2,3 \times 10^4$ Zellen; $p < 0,05$). In den Ansätzen mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L hingegen waren die absoluten Zellzahlen ähnlich (AML: $9,6 \pm 3,5$ bis $12,1 \pm 3,9 \times 10^4$ Zellen; ALL: $15,5 \pm 4,4$ bis $17,4 \pm 5 \times 10^4$ Zellen; $p > 0,05$). Nach zwei Wochen fanden sich weder in den Kontrollansätzen noch in den Ansätzen mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L Unterschiede zwischen den AML- und den ALL-Kulturen.

4.3.3.3 Kumulative Zellzahl aus AML- und ALL-Blasten gezüchteter DC

Die kumulative Zellzahl der für CD83 und HLA-DR positiven Zellen war nach ein und zwei Wochen der Kultivierung in den Kontrollansätzen der ALL-Kulturen signifikant höher als in den entsprechenden Kontrollen der AML-Blasten. Nach einer Woche variierte die kumulative Zellzahl in den Kontrollen der AML-Kulturen zwischen $0,36 \pm 0,18 \times 10^4$ und $1,5 \pm 0,62 \times 10^4$ Zellen und in den ALL-Kontrollen zwischen $3,2 \pm 0,63 \times 10^4$ und $5,8 \pm 2,3 \times 10^4$ Zellen ($p < 0,01$; *Abb. 11, S. 43 bzw. Abb. 17, S. 56*). Nach zwei Wochen ließen sich in den AML-Kontrollen kumulative Zellzahlen zwischen $0,81 \pm 0,3 \times 10^4$ und $2,8 \pm 0,84 \times 10^4$ Zellen feststellen. In den ALL-Kulturen variierten die Werte zwischen $3,5 \pm 0,66 \times 10^4$ und $8,4 \pm 2,8 \times 10^4$ Zellen ($p < 0,01$). In den Konditionen mit Zytokinen konnten hingegen weder nach einer noch nach zwei Wochen signifikante Unterschiede zwischen den AML- und ALL-Kulturen festgestellt werden ($p > 0,05$).

4.3.3.4 Untersuchung der CD86-Expression

Es gab keinen Unterschied zwischen den AML- und den ALL-Kulturen im prozentualen Anteil oder der absoluten Zellzahl der für CD86 positiven Zellen bei fehlender Koexpression von CD80 ($p > 0,05$). Die Expression dieses Oberflächenmoleküls variierte nach einer Woche in den Kontrollen der AML-Kulturen zwischen $22,1 \pm 8,2\%$ ($25,9 \pm 14,7 \times 10^4$ Zellen) und $33,3 \pm 8,5\%$ ($42,7 \pm 18,9 \times 10^4$ Zellen, *Tabelle 10, S. 44*) und in den ALL-Kulturen zwischen $15,2 \pm 6,5\%$ ($16,6 \pm 8 \times 10^4$ Zellen) und $31,4 \pm 8,5\%$ ($27,4 \pm 8,4 \times 10^4$ Zellen, *Tabelle 13, S. 57*). In den Konditionen mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L betrug der Anteil positiver Zellen nach einer Woche bei den AML-Kulturen $24,4 \pm 6,3\%$ ($24,3 \pm 5,5 \times 10^4$ Zellen) bis $26,4 \pm 5,6\%$ ($34,1 \pm 9,6 \times 10^4$ Zellen) und in den ALL-Kulturen $27,2 \pm 9\%$ ($21 \pm 6,2 \times 10^4$ Zellen) und $36,1 \pm 9,8\%$ ($30,1 \pm 9,3 \times 10^4$ Zellen). Nach zwei Wochen exprimierten in den Kontrollen $22,8 \pm 7,4\%$ ($35,2 \pm 23,1 \times 10^4$ Zellen) bis $32,1 \pm 9,3\%$ ($58,6 \times 42,4 \times 10^4$ Zellen) der Zellen der AML-Kulturen sowie $11,7 \pm 6,2\%$ ($8 \pm 4,4 \times 10^4$ Zellen) bis $24,5 \pm 6,9\%$ ($15,6 \pm 5,1 \times 10^4$ Zellen) der Zellen der ALL-Kulturen dieses Oberflächenmolekül. Der

Anteil der für CD86 positiven Zellen betrug nach zwei Wochen der Kultivierung mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L bei den AML-Kulturen $21,1 \pm 5,6\%$ ($22,3 \pm 6,3 \times 10^4$ Zellen) bis $23,4 \pm 7,5\%$ ($29,4 \pm 8,4 \times 10^4$ Zellen) und bei den ALL-Kulturen $22,9 \pm 7,1\%$ ($15,7 \times 10^4$ Zellen) bis $35 \pm 8,2\%$ ($21 \pm 5,9 \times 10^4$ Zellen).

4.3.3.5 Untersuchung der Expression von CD1a und CD14

Die generierten DC der AML- und ALL-Kulturen der Kontrollen und der Konditionen unter Verwendung der Zytokinkombination TGK + Flt-3L unterschieden sich weder nach einer (AML: $0,9 \pm 0,38\%$ bis $3,9 \pm 2,4\%$; ALL: $0,56 \pm 0,25\%$ bis $4,6 \pm 1,8\%$; $p > 0,05$) noch auch nach zwei Wochen der Kultivierung (AML: $1,1 \pm 0,47\%$ bis $5,5 \pm 3\%$, ALL: $0,06 \pm 0,04\%$ bis $4,1 \pm 1,3\%$; $p > 0,05$) in der Expression von CD1a.

Auch bezüglich des Anteils der für CD14 positiven Zellen waren die Expressionsraten der Kontrollen und der Konditionen mit Zytokinen in den AML- und ALL-Kulturen vergleichbar. Nach einer Woche variierten die Expressionsraten von CD14 in den AML-Kulturen zwischen $3,7 \pm 1,5\%$ und $16,7 \pm 5,9\%$ und in den ALL-Kulturen zwischen $4,5 \pm 1,5\%$ und $8,4 \pm 4,5\%$ ($p > 0,05$). Nach zwei Wochen ließen sich Werte zwischen $4,4 \pm 1,5\%$ und $14 \pm 7,1\%$ in den AML- Kulturen sowie $1,2 \pm 0,59\%$ und $2,7 \pm 0,67\%$ in den ALL-Kulturen ($p > 0,05$) ermitteln.

4.3.3.6 Untersuchung der Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7

Der Anteil der für den Chemokinrezeptor CXCR4 positiven Zellen war sowohl in den Kontrollen ohne Zytokine (AML: $10,6 \pm 2,3\%$ bis $31,4 \pm 9\%$, ALL: $48,7 \pm 6,5$ bis $54,2 \pm 6,8\%$; $p < 0,05$) als auch in den Ansätzen mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L (AML: $6,8 \pm 2\%$ bis $21 \pm 5,1\%$, ALL: $38,9 \pm 7,1\%$ bis $50,5 \pm 7\%$; $p < 0,05$) in den ALL-Kulturen höher als in den AML-Kulturen.

Dahingegen war die Expression von CCR7 der AML- und ALL-Kulturen vergleichbar. Der prozentuale Anteil der für diesen Chemokinrezeptor positiven Zellen variierte in den Kontrollen zwischen $4,4 \pm 1,3\%$ und $6,1 \pm 2\%$ in den AML-Kulturen und zwischen $2,7 \pm 0,53\%$ und $16,1 \pm 4,2\%$ in den ALL-Kulturen ($p > 0,05$). Unter Zusatz der Zytokinkombination TGK + Flt-3L ließen sich Werte zwischen $7,8 \pm 2,2\%$ und $15,2 \pm 5,4\%$ in den AML-Kulturen sowie $3,2 \pm 0,49\%$ und $17,5 \pm 4,9\%$ in den ALL-Kulturen ($p > 0,05$) ermitteln.

4.3.4 Stimulationsfähigkeit allogener T-Zellen

Sowohl die aus AML- als auch die aus ALL-Blasten gezüchteten DC stimulierten die Proliferation allogener T-Lymphozyten. Vergleich man die verschiedenen Verdünnungsstufen miteinander, so konnten keine Unterschiede zwischen den AML- und den ALL-Kulturen nachgewiesen werden.

4.3.5 Migrationsfähigkeit

Die prozentuale Transmigration der AML- und ALL-Blasten war sowohl vor als auch nach der Kultivierung vergleichbar ($p > 0,05$). Sie variierte bei den unkultivierten AML-Blasten zwischen $12,1 \pm 3\%$ und $16,4 \pm 3,2\%$ und bei den ALL-Blasten zwischen $11,6 \pm 2,1\%$ und $17 \pm 3,9\%$. In den Kontrollen und den Ansätzen mit der Zytokinkombination TGK + Flt-3L ließen sich in den Ansätzen mit Chemokinen Migrationsraten zwischen $5 \pm 0,72\%$ und $15,2 \pm 2,3\%$ bei den AML-Kulturen und zwischen $5,9 \pm 0,64\%$ und $11,7 \pm 1,5\%$ bei den ALL-Kulturen nachweisen (*Tabelle 11, S. 49 bzw. Tabelle 14, S. 61*).

4.3.6 Produktion und Sekretion von Interleukin 12

Weder die aus AML-, noch die aus ALL-Blasten gezüchteten Zellen produzierten IL-12.

5 Diskussion

Das Immunsystem spielt nicht nur für die Abwehr und Kontrolle von Infektionskrankheiten, sondern auch von onkologischen Erkrankungen eine wichtige Rolle (*Janeway et al.*, 2005). Gründe für die unzureichende Immunantwort gegen maligne Erkrankungen wie die Leukämien sind u.a. eine geringe Immunogenität der entarteten Zellen, zum Beispiel durch eine verminderte Expression von MHC- (*Chamuleau et al.*, 2004) und kostimulatorischen Molekülen (*Buggins et al.*, 1999). Eine zelluläre Immuntherapie mit *ex vivo* generierten reifen DC, welche die tumorassoziierten Antigene präsentieren, stellt daher einen vielversprechenden Ansatz für die Behandlung onkologischer Erkrankungen dar. In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Kultivierungsverfahren für die Differenzierung von DC aus leukämischen Blasten evaluiert und miteinander verglichen.

5.1 Kultivierungsprotokolle zur Generierung dendritischer Zellen aus leukämischen Blasten

5.1.1 Zytokine für die Differenzierung von AML-Blasten zu dendritischen Zellen

Es existiert eine große Variation zwischen den verschiedenen Protokollen zur Differenzierung von DC aus leukämischen Blasten hinsichtlich der verwendeten Zytokine. Insbesondere zur Generierung von DC aus AML-Blasten gibt es eine Vielzahl veröffentlichter Studien, ohne dass bislang ein Standard etabliert werden konnte. Die meisten Protokolle basieren auf Kombinationen aus GM-CSF, TNF α und IL-4 (*Charbonnier et al.*, 1999; *Oehler et al.*, 2000; *Kufner et al.*, 2005a; *Li et al.*, 2005), welche auch in der vorliegenden Studie Anwendung fanden. GM-CSF ist ein Überlebens- und Wachstumsfaktor für hämatopoetische Vorläuferzellen (*Fitzgerald et al.*, 2001) und induziert *in vivo* und *in vitro* die Expansion myeloischer DC-Vorläuferzellen sowie deren Differenzierung (*Banchereau et al.*, 2000; *Waller*, 2007). TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches ebenso wie das immunmodulatorische Zytokin IL-4 die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in DC bewirkt (*Banchereau et al.*, 2000; *Rossi & Young*, 2005). Weitere in der vorliegenden Arbeit verwendete Zytokine sind SCF und Flt-3L, durch deren proliferationssteigernde Wirkung in anderen Studien die Anzahl generierter DC erhöht werden konnte (*Woiciechowsky et al.*, 2001; *Panoskaltzis et al.*, 2002; *Kufner et al.*, 2005b). SCF fungiert außerdem als Überlebensfaktor, indem es durch die Hemmung der Apoptoseeinleitung die Vitalität der Zellen verbessert (*Smith et al.*, 2001). Basierend auf der Literaturrecherche wurde in der vorliegenden Studie eine Kombination der Zytokine TNF α , GM-CSF, SCF und Flt-3L

für die Differenzierung der AML-Blasten zu DC eingesetzt. Außerdem wurde die zusätzliche Verwendung von IL-3 und IL-4 untersucht. IL-3 ist ein Wachstumsfaktor, welcher hämatopoetische Vorläuferzellen (*Fitzgerald et al.*, 2001) und DC zur Expansion anzuregen scheint (*Caux et al.*, 1996; *Suzuki et al.*, 2004). IL-4 induziert die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in DC. Außerdem könnte es aufgrund seines hemmenden Einflusses auf die monozytäre Differenzierung (*Jansen et al.*, 1989; *Canque et al.*, 1998) Vorteile für die Generierung von DC besitzen. Beide Zytokinkombinationen erwiesen sich in der vorliegenden Arbeit als gleichwertig für die Differenzierung von DC aus AML-Blasten. Es konnten keine Unterschiede im Immunphänotyp der DC oder in den Funktionstests festgestellt werden. Das bedeutet, dass die Zugabe von IL-3 und IL-4 zu der Kombination bestehend aus TNF α , GM-CSF, SCF und Flt-3L keinen Vorteil für die Differenzierung der DC aus AML-Blasten erbrachte und daher darauf verzichtet werden kann.

5.1.2 Zytokine für die Differenzierung von ALL-Blasten zu dendritischen Zellen

Während für die Differenzierung von AML-Blasten zu DC viel Literatur erhältlich ist, gibt es weniger Publikationen die sich mit der Generierung von DC aus ALL-Blasten befassen. Einige dieser Protokolle basieren ausschließlich auf den Zytokinen IL-4 und CD40L für die Differenzierung der ALL-Blasten (*Cignetti et al.*, 1999; *Mohty et al.*, 2002; *Luczynski et al.*, 2006). Cardoso et al. konnten zeigen, dass bereits die alleinige Zugabe von CD40L fähig ist, die antigenpräsentierenden Eigenschaften von ALL-Blasten zu verbessern (*Cardoso et al.*, 1997). CD40L ist ein Transmembranprotein der TNF-Ligandenfamilie, welches u.a. von CD4⁺ T-Lymphozyten exprimiert wird (*Fitzgerald et al.*, 2001) und auch in löslicher Form vorkommt (*Graf et al.*, 1995). CD40 ist der Rezeptor für CD40L und wird u.a. von B-Lymphozyten und DC exprimiert. Der CD40-Signalweg stellt einen wichtigen Faktor für die Aktivierung der CD4⁺ T-Lymphozyten und damit für die Einleitung der Immunantwort dar. Die Zugabe von CD40L zu Zellkulturmodellen verbessert das Überleben der DC und induziert ihre Reifung (*van Kooten & Banchereau*, 2000). Aber auch andere Zytokine erwiesen sich als geeignet für die Differenzierung von DC aus ALL-Blasten. Pospisilova et al. gaben zusätzlich zu IL-4 und CD40L die Zytokine GM-CSF und TNF α hinzu (*Pospisilova et al.*, 2005). Andere Forschungsgruppen verzichteten sogar ganz auf die Zugabe von IL-4 und CD40L. Panoskaltsis et al. testeten verschiedene Zytokine, die u.a. GM-CSF, SCF, IL-4, TNF α , IL-3 und Flt-3L in verschiedenen Kombinationen enthielten und ermittelten die Zusammensetzung aus GM-CSF, Flt-3L und SCF als die geeignetste für die getesteten AML-, prä-B-ALL- und CML-Patientenblasten (*Panoskaltsis et al.*, 2002). Diese drei Zytokine wurden in der vorliegenden Studie für die Differenzierung der ALL-DC verwendet.

Auch Blair et al. setzten neben G-CSF, IL-3, IL-6 und TGF β die Zytokine GM-CSF, Flt-3L und SCF ein. Zusätzlich wurde in den letzten 48 Stunden der Kultivierung TNF α als Reifungsstimulus für die DC zugegeben (Blair et al., 2001). In dem Generierungsprotokoll der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls TNF α hinzugegeben. Die Zugabe erfolgte allerdings gleich von Beginn an mit dem Ziel, eine möglichst hohe Anzahl reifer DC in möglichst kurzer Zeit zu differenzieren. Aufgrund der Resultate der Literaturrecherche und basierend auf den Ergebnissen unserer Forschungsgruppe anhand der ALL-Zelllinie REH (Moldenhauer et al., 2004) sowie Vorversuchen an Patientenblasten wurde in der vorliegenden Studie eine Kombination der vier Zytokine GM-CSF, SCF, TNF α und Flt-3L untersucht. Ein Differenzierungsvorteil durch die ergänzende Verwendung von IL-4 und CD40L zu den oben genannten Zytokinen wurde evaluiert. Es zeigte sich, dass nach Zugabe von IL-4 und CD40L nach einer Woche ca. 1,3fach höhere und nach zwei Wochen ca. doppelt so hohe Prozent- und Zellzahlen an für CD83 und HLA-DR positiven DC erreicht werden. Die Expression beider Oberflächenmoleküle charakterisiert reife DC (Banchereau et al., 2000). Daher könnten die höheren Prozent- und Zellzahlen der für CD83 positiven Zellen mit einer durch IL-4 vermittelten vermehrten Differenzierung von Vorläuferzellen in DC, mit einer durch CD40L vermittelten verstärkten Reifung, oder aber einer Kombination aus beiden Effekten zusammenhängen. Aufgrund der erhöhten Ausbeute reifer DC ist daher für die Differenzierung von ALL-Blasten zu DC die Verwendung der Zytokine TNF α , GM-CSF, SCF, Flt-3L, IL-4 und CD40L zu empfehlen.

5.2 Beurteilung der differenzierten dendritischen Zellen

Die aus den leukämischen Blasten differenzierten DC wurden anhand verschiedener Parameter hinsichtlich ihrer phänotypischen und funktionellen Reife beurteilt.

5.2.1 Morphologie

Sowohl die AML- als auch die ALL-Blasten konnten zu morphologisch reifen DC differenziert werden, die die typischen zytoplasmatischen Zellfortsätze tragen. Wie in anderen DC-Generierungsstudien veröffentlicht, stellten nach wenigen Tagen der Kultivierung in Clustern oder in Suspension schwimmende, vergrößerte Zellen mit unregelmäßiger Zelloberfläche und zytoplasmatischen Zellausläufern die vorherrschende Zellpopulation dar (Blair et al., 2001; Mohty et al., 2002; Houtenbos et al., 2003; Schmidt et al., 2009).

5.2.2 Gesamtzellzahl und Vitalität

5.2.2.1 Gesamtzellzahl

Da bei der Blut- und Knochenmarkentnahme nur eine begrenzte Anzahl an Blasten für die Kultivierung und Untersuchungen gewonnen werden kann, wäre eine Expansion der Zellen in den Zellkulturen wünschenswert. Die eingesetzten 1×10^6 Zellen expandierten in den AML-Kulturen in den Ansätzen mit Zytokinen bis auf das 1,6fache nach einer Woche sowie das 1,9fache nach zwei Wochen. Diese Zellexpansion ist darauf zurückzuführen, dass die in unserer Studie verwendeten Zytokinkombinationen Wachstumsfaktoren enthalten, welche myeloische Zelllinien zur Proliferation anregen, wie GM-CSF und Flt-3L (*Delves et al.*, 2006). Eine Zellproliferation bei Kultivierung von AML-Blasten unter Verwendung von GM-CSF (*Oehler et al.*, 2000; *Harrison et al.*, 2001) bzw. GM-CSF und Flt-3L (*Panoskaltzis et al.*, 2002) haben auch andere Arbeitsgruppen festgestellt. Die ALL-Blasten hingegen ließen sowohl in den Kontrollen als auch in den Ansätzen mit Zytokinen einen Abfall der Gesamtzellzahl um 15% bis 30% nach einer Woche und um 40% bis 50% nach zwei Wochen erkennen. Diese Unterschiede in den Gesamtzellzahlen zwischen AML- und ALL-Blasten sind statistisch signifikant und könnten darauf beruhen, dass die verwendeten Zytokine vor allem myeloische Zellen zur Proliferation anregen (*Delves et al.*, 2006). Es exprimieren beispielsweise nicht alle ALL-Blasten die Rezeptoren für GM-CSF und Flt-3L. Die Forschungsgruppe von Kita et al. konnten eine Expression der mRNA des GM-CSF-Rezeptors nur bei zwei der getesteten sieben B-ALL-Patienten nachweisen (*Kita et al.*, 1993). Der Rezeptor für Flt-3L kann im Mittel bei nur 64% der B-ALL- und 27% der T-ALL-Blasten durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (*Drexler*, 1996). Doch auch von den ALL-Blasten, die den Rezeptor für Flt-3L exprimieren, zeigt die Mehrzahl keine Proliferation nach Zugabe dieses Zytokins (*Drexler*, 1996). Lee et al. stellten in ihrer Studie sogar fest, dass die nachlassende Proliferation von drei ALL-Patientenblasten sowie der Zellen verschiedener ALL-Zelllinien mit der zytokinvermittelten Differenzierung zu DC korreliert (*Lee et al.*, 2004a). Ein weiterer Grund für die abfallenden Zellzahlen der ALL-Blasten könnte die Einleitung der Apoptose darstellen. Diese würde sich allerdings in einer niedrigeren Vitalität niederschlagen. Außerdem ist zu bedenken, dass jeweils nach einer Woche die Hälfte der Zellen für Messungen zum Beispiel des Immunphänotyps entnommen wurde. Aus diesem Grund sind die niedrigeren Zellzahlen nach zwei Wochen vor allem als fehlende bzw. geringe Proliferation und nicht als Zelluntergang zu werten. Insgesamt ist die stattfindende Proliferation der AML-Blasten in den Kulturen als positiv zu bewerten, da eine erhöhte Zellzahl für Untersuchungen und Anwendung der Zellen zur Verfügung steht. Dahingegen

könnten die niedrigeren Gesamtzellzahlen der ALL-Kulturen wenn nötig zum Beispiel durch eine erhöhte Ausgangszellzahl ausgeglichen werden.

5.2.2.2 Vitalität

Die Zellen der AML- und ALL-Kulturen zeigen nach ein und zwei Wochen der Kultivierung in allen Konditionen einen mittels Trypanblaufärbung ermittelten niedrigen Prozentsatz avitaler Zellen (< 8%). In einigen Zellkulturansätzen konnte eine verbesserte Vitalität unter Zugabe der Zytokine im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Dies kann durch die antiapoptotische Wirkung von SCF (*Smith et al.*, 2001) erklärt werden, welches in den verwendeten Zytokinkombinationen enthalten war. Die Vitalitätsmessung mittels Trypanblaufärbung hat den Nachteil, dass der Farbstoff zytotoxisch wirkt und damit die Anzahl avitaler Zellen mit zunehmender Inkubationsdauer ansteigt (*Lindl*, 2002). Aus diesem Grund wurde die Auszählung jeweils sofort nach der Mischung der Zellsuspension mit Trypanblau vorgenommen.

5.2.3 Immunphänotypische Charakterisierung

5.2.3.1 Expression von CD83 und HLA-DR

Der prozentuale Anteil reifer DC sowie die absoluten DC-Zellzahlen wurden in dieser Studie anhand der Koexpression von CD83 und HLA-DR bestimmt. CD83 gilt als Markermolekül für reife DC (*Banchereau et al.*, 2000). HLA-DR gehört zu den MHC-Klasse-II-Molekülen und wird ebenfalls zu einem hohen Anteil durch reife DC exprimiert (*Banchereau et al.*, 2000).

5.2.3.1.1 Expression von CD83 und HLA-DR durch AML-DC

Die Zellen der AML-Kulturen konnten durch Kultivierung mit den Zytokinen TNF α , GM-CSF, SCF und Flt-3L zu einer signifikanten Expressionssteigerung beider Oberflächenmoleküle im Vergleich zu den Kontrollen angeregt werden. Die zusätzliche Verwendung von IL-3 und IL-4 zu dieser Kombination erbrachte keine erhöhte DC-Ausbeute und ist damit verzichtbar. Auch erwiesen sich die drei getesteten Grundmedien bezüglich der CD83/HLA-DR-Expression als gleichwertig. Beide Oberflächenmoleküle wurden in den Kontrollkulturen kaum exprimiert (0,34% bis 2,3%), der Anteil der für CD83 und HLA-DR positiven Zellen stieg nach einer Woche auf das 11fache und nach zwei Wochen auf das fünffache. Diese Ergebnisse decken sich mit jenen von Houtenbos et al., die ebenfalls AML-Blasten mit einer Kombination aus TNF α , GM-CSF, SCF, Flt-3L, IL-3 und IL-4 kultivierten und eine mittlere Expression von CD83 um 5% erreichten (*Houtenbos et al.*, 2003). Lee et al.

hingegen ermittelten höhere Prozentzahlen. Abhängig von den verwendeten Zytokinen (Kombinationen aus GM-CSF, TNF α , IL-4 und CD40L) erreichten sie Prozentzahlen von für CD83 positiven Zellen zwischen 28% und 38% (*Lee et al.*, 2004b). Allerdings exprimierten hier die leukämischen Blasten bereits ohne den Zusatz von Zytokinen CD83 zu ca. 17%, womit eine 1,7- bis 2,2fache Expressionssteigerung erreicht wurde. Im Gegensatz dazu gelang in unserer Studie aufgrund der geringen CD83/HLA-Expression der eingesetzten Blasten (vor der Kultivierung im Mittel zu 1,4%; in den Kontrollkulturen im Mittel zu 1,1%) eine bis um das 11fach erhöhte Expression beider Oberflächenmoleküle.

In der vorliegenden Studie konnte eine große Variation zwischen den einzelnen Messwerten der verschiedenen Zellkulturansätze (zwischen 0% und 81,5%) sowie der jeweiligen Kulturkondition, mit der die höchsten Prozentzahlen positiver Zellen erreicht werden können, festgestellt werden. Nur die Blasten eines Patienten zeigten unter allen untersuchten Kulturbedingungen eine Koexpression von CD83 und HLA-DR unter 2% (Patient 1, FAB-Typ M2). Auch andere Arbeitsgruppen stellten fest, dass nicht alle AML-Blasten durch jede Zytokinkombination zur Expression von CD83 angeregt werden können. In der Studie von Charbonnier et al. exprimierten nur acht der getesteten zehn Patientenblasten CD83 (*Charbonnier et al.*, 1999). Oehler et al. konnten bei nur zwei der untersuchten 15 AML-Blasten eine Hochregulation von CD83 ermitteln (*Oehler et al.*, 2000). Dies könnte daran liegen, dass nicht alle Blasten die Rezeptoren für die eingesetzten Zytokine exprimieren bzw. die Rezeptordichte variiert. Houtenbos et al. stellten beispielsweise fest, dass die 33 untersuchten AML-Patientenblasten den Rezeptor für GM-CSF im Mittel nur zu 54%, für SCF zu 30%, für Flt-3L zu 70%, den TNF-Rezeptor I bzw. II zu 17% bzw. 8% sowie den Rezeptor für IL-3 zu 81% und für IL-4 zu unter 2% tragen (*Houtenbos et al.*, 2004). Aus diesem Grund könnte eine individuelle Zytokinkombination, die dem jeweiligen Rezeptorprofil der Blasten angepasst ist, von Vorteil sein. Kufner et al. stellten weiterhin fest, dass die Kultivierung von AML-Blasten der FAB-Subtypen M4/M5, also einer eher monozytären Differenzierung der Blasten, eine höhere DC-Ausbeute im Vergleich mit den anderen FAB-Subtypen erzielt (*Kufner et al.*, 2005a). Dies können wir in unserer Studie nicht bestätigen, die neun AML-Blasten anderer FAB-Subtypen erwiesen sich als ebenso geeignet für die Differenzierung wie die sechs Patientenblasten der FAB-Klassifikation M4/5.

In der vorliegenden Arbeit konnten nach einer Woche um ca. 1,5fach höhere prozentuale Expressionsraten von CD83 und HLA-DR (9,3% bis 12,4%) verglichen mit zwei Wochen der Kultivierung (5,3% bis 8,8%) erreicht werden. Die Expressionsabnahme könnte mit Apoptosemechanismen der Zellen erklärt werden, allerdings würde man in diesem Fall

abnehmende Gesamtzellzahlen und Vitalitäten erwarten, welche nicht eingetreten sind. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass die u.a. durch TNF α induzierte Reifung einen reversiblen Prozess darstellt, bei dem die DC nach dem zwischenzeitlichen Erwerb eines reifen Phänotyps mit Expression des Markers CD83 wieder zu einem unreifen Status zurückkehren (*Nelson et al.*, 1999).

Zusammenfassend konnten die AML-Blasten zur Expression von CD83 und HLA-DR angeregt, d.h. in DC differenziert werden und die höchsten Prozentzahlen und somit die höchste Reinheit wurde nach einer Kultivierungszeit von einer Woche erreicht. Betrachtet man hingegen die kumulative DC-Zellzahl, so können nach zwei Wochen ca. 1,8fach höhere DC-Zellzahlen verglichen mit einer Differenzierungszeit von einer Woche erlangt werden. Dies kann auf die Proliferation der Zellen zurückgeführt werden, welche im Anstieg der Gesamtzellzahlen deutlich wird. Wird also eine hohe Zellzahl von DC benötigt, so ist eine Kultivierungszeit von zwei Wochen empfehlenswert.

5.2.3.1.2 Expression von CD83 und HLA-DR durch ALL-DC

Auch die ALL-Blasten konnten durch beide getesteten Zytokinkombinationen zu einer signifikanten Expressionssteigerung von CD83 und HLA-DR im Vergleich mit den Kontrollen angeregt werden. Während die unkultivierten ALL-Blasten eine mittlere Koexpression beider Oberflächenmoleküle von 5,1% und die Blasten der Kontrollkulturen von im Mittel 3,2% aufwiesen, stieg dieser Anteil nach Kultivierung mit den Zytokinen TNF α , GM-CSF, SCF und Flt-3L auf im Mittel 21,6% nach einer und 8,3% nach zwei Wochen. Die Zugabe von IL-4 und CD40L erhöhte diesen Anteil im Vergleich mit der ersten Zytokinkombination weiter auf das 1,3fache (im Mittel 28,6%) nach einer bzw. das doppelte (im Mittel 16,5%) nach zwei Wochen. IL-4 bewirkt die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in DC (*Banchereau et al.*, 2000) und unterdrückt dabei die Differenzierung zu Monozyten und Makrophagen (*Jansen et al.*, 1989; *Canque et al.*, 1998). CD40L kann die Reifung von DC induzieren (*van Kooten & Banchereau*, 2000). Ähnliche Prozentzahlen für CD83 nach zytokinvermittelter Differenzierung von ALL-Blasten zu DC erreichten auch andere Forschungsgruppen (*Blair et al.*, 2001; *Pospisilova et al.*, 2005). In einer Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe erreichten die 75 getesteten und für TEL-AML1 negativen Blasten nach Kultivierung in TNF α , GM-CSF, SCF, Flt-3L +/- IL-3 und IL-4 ebenfalls nach einer Woche Prozentzahlen in dieser Größenordnung (*Schmidt et al.*, 2009). Die TEL-AML1 positiven Blasten hingegen erreichten bei Kultivierung mit den oben genannten Zytokinen höhere mittlere Prozentzahlen bis zu 47,2% (*Schmidt et al.*, 2009). Diese zytogenetische Veränderung ist mit 20% bis 30% die häufigste bei der kindlichen ALL

und mit einer günstigen Prognose assoziiert (*Zelent et al.*, 2004). Die verbesserten Differenzierungsergebnisse könnten die bessere Prognose dieses ALL-Subtyps widerspiegeln. In der vorliegenden Studie wurden vorwiegend TEL-AML1 negative Blasten untersucht, lediglich die Blasten von zwei Patienten waren für TEL/AML1 positiv.

Wie auch bei den AML-Kulturen konnten nach einer Differenzierungszeit von einer Woche höhere Prozentzahlen (ca. zwei- bis zweieinhalbfach) als nach zwei Wochen erreicht werden. Eine mögliche Begründung dafür ist, dass die Zellen nach der Ausreifung in Apoptose gehen. Diese Annahme könnte durch die abnehmenden Gesamtzellzahlen in den ALL-Kulturen gestützt werden. Allerdings ist die Vitalität auch nach zwei Wochen gleichbleibend hoch (> 93% in allen Konditionen). Eine andere Erklärung bietet die Annahme, dass der Reifegrad der DC ein reversibler Zustand ist, d.h. dass die DC nur vorübergehend ausreifen und anschließend wieder einen unreifen Phänotyp erlangen. Ein entsprechendes Modell wurde bereits veröffentlicht (*Nelson et al.*, 1999). Insgesamt konnten also nach einer Woche die höchsten prozentualen Anteile an DC generiert werden. Die höchsten kumulativen DC-Zellzahlen hingegen wurden wie auch bei den AML-Kulturen nach zwei Wochen erreicht.

5.2.3.1.3 Vergleich der Expression von CD83 und HLA-DR durch AML- und ALL-DC

Nach einer Kultivierungszeit von einer Woche konnten in den ALL-Kulturen fast doppelt so hohe Prozentzahlen CD83-positiver Zellen (im Mittel 21,6% mit TNF α , GM-CSF, SCF und Flt-3L) wie in den AML-Kulturen (im Mittel 11%) erreicht werden. Dies könnte auf eine höhere Differenzierungsfähigkeit der ALL-Blasten hindeuten. Die bereits im immunphänotypischen Profil der unkultivierten Blasten höhere CD83-Expression der ALL- (5,1%) im Vergleich mit den AML-Blasten (1,4%) kann darauf zurückgeführt werden, dass CD83 auch einen Marker für B-Lymphozyten darstellt (*Janeway et al.*, 2005). Eine Differenzierung der ALL-Blasten in B-Lymphozyten während der Kultivierung ist allerdings angesichts der verwendeten Zytokine sowie der morphologischen Erscheinung der differenzierten Zellen äußerst unwahrscheinlich. Unterschiede in den Rahmenbedingungen der AML- und ALL-Kulturen finden sich hinsichtlich der Einfrierdauer der Blasten vor der Kultivierung sowie im Patientenalter. Die ALL-Blasten wurden nach einer mittleren Einfrierdauer von $3,2 \pm 0,44$ Monaten (Variationsbreite zwischen 0 und 8 Monaten) in Kultur gesetzt. Bei den AML-Blasten bestand eine längere Einfrierdauer von im Mittel $4,8 \pm 0,82$ Monaten (Variationsbreite zwischen 0 und 27 Monaten). Des Weiteren stammten die ALL-Blasten von jüngeren Patienten. Das mittlere Alter der ALL-Patienten betrug $8,4 \pm 1$ Jahr im Gegensatz zu $25,6 \pm 5,2$ Jahre bei den AML-Patienten. Beide Aspekte könnten die Differenzierungsfähigkeit der Blasten beeinflusst haben. Trotz der höheren CD83/HLA-DR-

Prozentzahlen in den ALL-Kulturen sind die absoluten wie auch die kumulativen DC-Zellzahlen in ALL- und AML-Kulturen ähnlich. Dies lässt sich auf die stärkere Proliferation der Zellen der AML-Kulturen zurückführen, welche im Anstieg der Gesamtzellzahl deutlich wird und die niedrigeren Prozentzahlen ausgleicht. Eine höhere Reinheit konnte in der vorliegenden Studie also bei Differenzierung von ALL-Blasten zu DC erreicht werden, die generierten DC-Zellzahlen der AML- und ALL-Kulturen waren hingegen vergleichbar.

5.2.3.2 Expression von CD86

Die Expression einer hohen Anzahl kostimulatorischer Moleküle wie beispielsweise CD80 und CD86 ist typisch für reife DC und bedeutend für ihre immunstimulatorischen Fähigkeiten (*Banchereau et al.*, 2000). Insbesondere die Expression von CD86 bei fehlender Expression von CD80 ist typisch für reife antigenpräsentierende Zellen (*Sansom et al.*, 2003).

5.2.3.2.1 Expression von CD86 durch AML-DC

Die aus den AML-Blasten differenzierten DC exprimieren das kostimulatorische Molekül CD86 im Mittel zu 27%. Die Zugabe von IL-3 und IL-4 zu der Kombination bestehend aus TNF α , GM-CSF, SCF und Flt-3L erbrachte keine erhöhte CD86-Expression. Die mittlere Expressionsrate von CD86 der AML-Blasten vor der Kultivierung beträgt 43% und liegt damit etwas höher als nach der Kultivierung. Dieser Unterschied ist allerdings aufgrund der Variabilität der Werte nicht signifikant. Das bedeutet, dass die differenzierten DC zwar CD86 exprimieren, es allerdings nicht in den Kulturkonditionen unter Verwendung von Zytokinen hochregulieren. Lee et al. ermittelten hingegen Expressionsraten von CD86 der aus AML-Patientenblasten differenzierten DC um 50%. Die Blasten wurden in dieser Studie mit RPMI 10% FBS unter Zugabe der Zytokine GM-CSF + IL-4 + TNF α , GM-CSF + IL-4 + CD40L sowie GM-CSF + IL-4 + TNF α + CD40L kultiviert und wiesen keine Unterschiede bezüglich der CD86-Expression zwischen diesen drei Zytokinkombinationen auf (*Lee et al.*, 2004b). Allerdings ist in diesem Fall zu bedenken, dass von den zehn getesteten Patientenblasten nur sieben zu reifen DC differenziert werden konnten und die ermittelte CD86-Expression sich lediglich auf diese sieben AML-Blasten bezieht. Dadurch kann sich die mittlere Expression erhöht haben. Auch in unserer Studie variieren die einzelnen Messwerte der verschiedenen Kulturkonditionen deutlich (0% bis 92%). Es blieben aber keine Ergebnisse bei der Berechnung des Mittelwertes unberücksichtigt. Houtenbos et al. verwendeten mit TNF α , GM-CSF, SCF, Flt-3L, IL-3 und IL-4 die gleichen Zytokine wie auch in der vorliegenden Arbeit für die Differenzierung von AML-Blasten und konnten eine geringe Hochregulation von CD86 von 5% auf lediglich ca. 13% ermitteln (*Houtenbos et al.*, 2003). Andere

Arbeitsgruppen stellten fest, dass eine Expressionssteigerung von CD86 nur in neun der untersuchten vierzehn (Oehler *et al.*, 2000) bzw. in fünf der untersuchten acht AML-Patientenblasten möglich ist (Cignetti *et al.*, 1999). Das Problem der ungenügenden Hochregulation kostimulatorischer Moleküle bei aus AML-Blasten differenzierten DC ist also keineswegs neu. Diese Tatsache könnte darauf beruhen, dass entartete Zellen wie leukämische Blasten kostimulatorische Moleküle häufig nur zu einem geringen Anteil präsentieren (Hirano *et al.*, 1996; Notter *et al.*, 2001). Dies ist ein möglicher Tumor-immun-escape-Mechanismus (Tabelle 10, S. 44), wodurch die malignen Zellen weniger immunogen sind (Buggins *et al.*, 1999; Janeway *et al.*, 2005). Diesbezüglich könnten weitere Forschungsanstrengungen unternommen werden, um die kostimulatorischen Eigenschaften der leukämischen DC zu verbessern. Mögliche Optionen könnten beispielsweise darin bestehen, die Gene von immunstimulatorischen Zytokinen den *ex vivo* generierten DC zu übertragen und damit die kostimulatorischen Eigenschaften zu verbessern (Ojima *et al.*, 2006). Auch die Injektion von DC gemeinsam mit das Immunsystem aktivierenden Adjuvantien wie beispielsweise IL-2 ist eine Möglichkeit (Claxton *et al.*, 2001).

5.2.3.2.2 Expression von CD86 durch ALL-DC

Die aus den ALL-Blasten gezüchteten DC exprimieren CD86 nach einer Woche im Mittel zu 32,3% und nach zwei Wochen zu 34,7%. Die Messwerte entsprechen damit in etwa jenen, die bei den AML-Kulturen erreicht wurden. Im Vergleich mit den naiven ALL-Blasten, welche CD86 zu 25,5% exprimieren, fand also nur eine sehr geringe Hochregulation statt. Sie war nicht signifikant. Die Zugabe von IL-4 und CD40L zu der Kombination aus TNF α , GM-CSF, SCF und Flt-3L erhöhte die CD86-Expression geringfügig um das 1,1fache nach einer und das 1,4fache nach zwei Wochen. Dies deckt sich mit der erhöhten DC-Ausbeute unter Zugabe von IL-4 und CD40L, welche anhand der CD83-Expression ermittelt wurde. Unsere Ergebnisse bezüglich der CD86-Expression entsprechen etwa jenen, die Pospisilova *et al.* veröffentlichten (Pospisilova *et al.*, 2005). In dieser Studie wurden geringe Expressionsraten für die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 nach Differenzierung von ALL-Blasten zu DC ermittelt. Die Expression von CD86 lag nach sieben Tagen der Kultivierung im Mittel um 19,5% und entsprach damit der prozentualen Expression dieses Oberflächenmoleküls der unkultivierten Blasten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Pospisilova *et al.*, 2005). Lee *et al.* testeten vier verschiedene Zytokinkombinationen und ermittelten in vier der fünf untersuchten ALL-Zelllinien eine signifikante Hochregulation von CD80 (bis ca. 50%) und CD86 (bis ca. 55%), welche mit den Zytokinen IL-1 β , IL-3, IL-7, TNF α , SCF und CD40L am stärksten war (Lee *et al.*, 2004a). Diese Hochregulation der

kostimulatorischen Moleküle konnte bei Kultivierung von drei verschiedenen Patientenblasten mit den oben genannten Zytokinen bestätigt werden (*Lee et al.*, 2004a). In der von Lee et al. verwendeten Zytokinkombination sind im Gegensatz zu unserer Studie IL-1 β und IL-7 enthalten. IL-1 β stellt die sezernierte Form des inflammatorischen Zytokins IL-1 dar und ist in vivo für die systemischen Effekte einer Entzündung wie Hypotonie, Fieber, Gewichtsverlust, Neutrophilie und die Produktion der Akute-Phase-Proteine verantwortlich (*Fitzgerald et al.*, 2001). IL-7 ist ein bedeutendes Zytokin für die Proliferation und Differenzierung von B- und T-Vorläuferzellen sowie von reifen T-Lymphozyten (*Fitzgerald et al.*, 2001). Auch Panoskaltsis et al. untersuchten IL-7 für die Differenzierung von ALL-Blasten zu DC, erhielten aber die besten Ergebnisse mit einer Zytokinkombination bestehend aus GM-CSF, SCF und Flt-3L ohne die Zugabe von IL-7 (*Panoskaltsis et al.*, 2002; *Lee et al.*, 2004a). Für die gering ausgeprägte Hochregulation von CD86 der aus ALL-Blasten differenzierten DC kann die gleiche Erklärung gelten wie bei den AML-DC, nämlich dass entartete Zellen kostimulatorische Moleküle nur zu einem geringen Anteil tragen (*Hirano et al.*, 1996). Da die leukämischen DC von entarteten Zellen abstammen, könnte die Expression kostimulatorischer Moleküle durch verschiedene Mechanismen verhindert werden. Vielversprechende Ergebnisse erzielte beispielsweise unsere Forschungsgruppe mit der Anwendung von Histondeacetylaseinhibitoren für die Differenzierung von ALL-Blasten zu DC, welche durch die Aufhebung der blockierenden Funktion AML1-abhängiger Fusionsproteine die Transkriptionsrate erhöhen und so die antigenpräsentierenden und kostimulatorischen Eigenschaften verbessern (*Schmidt et al.*, 2009). Dieser Ansatz ist vor allem für TEL/AML1-positive Blasten erfolgsversprechend, die ca. 20% bis 30% der kindlichen ALL-Fälle betreffen (*Zelent et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden vorwiegend TEL/AML1 negative Blasten untersucht. Diesbezüglich sind weitere Forschungsanstrengungen empfehlenswert, um beispielsweise ähnliche Ansätze für die Verbesserung der Kostimulation TEL/AML1-negativer Blasten zu erbringen.

5.2.3.3 Expression von CD1a

CD1a ist ein für DC charakteristisches Oberflächenmolekül, das strukturell den MHC-Klasse-I-Molekülen ähnlich und an der Präsentation lipidhaltiger Antigene beteiligt ist (*Delves et al.*, 2006). Einige Arbeitsgruppen nutzen es daher zur Identifikation von DC im Rahmen der Generierungsstudien (*Kohler et al.*, 2000; *Oehler et al.*, 2000; *Harrison et al.*, 2001). Allerdings wird CD1a hauptsächlich von unreifen DC vom Langerhanszell-Typ exprimiert und während der Reifung herunterreguliert (*Ratzinger et al.*, 2004; *Valladeau & Saeland,*

2005). Aus diesem Grund spricht die kaum vorhandene Expression von CD1a in allen Kulturen der AML- und ALL-Blasten unserer Studie dafür, dass keine unreifen DC vom Typ der Langerhanszellen generiert wurden.

5.2.3.4 Expression von CD14

CD14 ist ein Markermolekül für Monozyten (*Andreesen et al.*, 1990) und wurde durchflusszytometrisch bestimmt, um deren Anteil an der Gesamtpopulation der gezüchteten Zellen bestimmen zu können. Die naiven AML-Blasten exprimieren dieses Oberflächenmolekül im Mittel zu 39,8% und die ALL-Blasten zu 4,7%. Dieser Unterschied ist signifikant und könnte damit zusammenhängen, dass AML-Blasten ebenso wie Monozyten myeloischen Ursprungs sind. Insbesondere bei den AML-Subtypen der FAB-Klassifikation M4 und M5 sind es Monozyten bzw. monozytäre Vorläuferzellen, welche einer klonalen Proliferation unterliegen (*Smith et al.*, 2004). Von den vier AML-Patientenblasten, die vor der Kultivierung einen sehr hohen Anteil an für CD14 positiven Zellen aufwiesen (74,8% bis 98,8%), waren dementsprechend drei der FAB-Klassifikation M4 bzw. M5. Nach der Kultivierung exprimieren sowohl die AML- als auch die ALL-Kulturen wenig CD14 (im Mittel 7,2% in den AML- und 3,2% in den ALL-Kulturen). Das gilt ebenso für die vier AML-Kulturen, die vor der Kultivierung einen sehr hohen Anteil an für CD14 positiven Zellen aufwiesen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass keine Differenzierung zu Monozyten stattgefunden hat. Auch andere Forschungsgruppen konnten eine Abnahme der CD14-Expression nach der Kultivierung leukämischer Blasten mit Zytokinen feststellen (*Harrison et al.*, 2001; *Lee et al.*, 2004b). IL-4 soll einen hemmenden Einfluss auf monozytäre Vorläuferzellen haben und damit deren Differenzierung zu Monozyten verhindern (*Jansen et al.*, 1989; *Canque et al.*, 1998). Harrison et al. stellten eine Abnahme der CD14-Expression der AML-Blasten bei Zugabe von IL-4 im Vergleich mit der Kultivierung mit GM-CSF und/oder TNF α fest (*Harrison et al.*, 2001). In unserer Studie konnten keine Unterschiede in der CD14-Expression der AML-Blasten zwischen der Zytokinkombination bestehend aus TNF α , GM-CSF, SCF und Flt-3L und der zusätzlichen Zugabe von IL-3 und IL-4 ermittelt werden.

5.2.3.5 Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7

Die Chemokine SDF-1 α und MIP-3 β spielen *in vivo* eine wichtige Rolle für die Wanderung der aktivierten DC zu den Lymphknoten, wo die Interaktion mit den T-Zellen stattfindet (*Dieu-Nosjean et al.*, 1999). Um zu erfahren, ob die *in vitro* differenzierten leukämischen DC die entsprechenden Chemokinrezeptoren exprimieren und damit das Potential besitzen, auf

diese mit Chemotaxis zu reagieren, wurde eine durchflusszytometrische Bestimmung von CXCR4 (Rezeptor für SDF-1 α) und CCR7 (Rezeptor für MIP-3 β und 6Kine) der unkultivierten Blasten sowie der nach fünf bis sieben Tagen differenzierten DC vorgenommen. Die AML-Blasten exprimieren vor der Kultivierung CXCR4 im Mittel zu 61,4% und CCR7 zu 71%. Nach der Kultivierung zeigte sich eine Expressionsabnahme auf ca. ein Viertel für CXCR4 (im Mittel 16%) und ca. ein Achtel für CCR7 (im Mittel 9,3%). Es fand also eine deutliche Herunterregulation beider Chemokinrezeptoren während der Zellkultur statt, welche u.a. durch die ex vivo-Manipulation der Zellen oder deren Ausdifferenzierung bedingt sein könnte. CXCR4 gilt als prognostischer Marker für AML-Patienten, wobei eine hohe Expression mit einer schlechteren Prognose korreliert (*Spoos et al., 2007*). Die verminderte Expression von CXCR4 nach der Differenzierung der Blasten könnte daher als positiv bewertet werden. In der Studie von Cignetti et al. wurde die Expression von CCR7 durch aus AML-Blasten differenzierte DC untersucht und eine Expression der verschiedenen Zellkulturansätze zwischen 15% und 80% beobachtet. Diese war vergleichbar mit der Expression von aus Monozyten gesunder Spender differenzierter DC (*Cignetti et al., 2004*). Auch in unserer Studie zeigte sich eine große Variabilität in der CCR7-Expression der einzelnen AML-DC zwischen 0% und 57,5%.

Die ALL-Kulturen hingegen zeigten keine signifikante Expressionsabnahme der Chemokinrezeptoren, die Expression von CXCR4 betrug im Mittel 51,7% vor und 45% nach der Kultivierung und von CCR7 15,2% vor und 9,4% nach der Kultivierung. Beide Chemokinrezeptoren werden also sowohl von den ALL- und AML-Blasten als auch den ALL- und AML-DC exprimiert, womit die Voraussetzung für die chemotaktische Reaktion auf die Chemokine MIP-3 β und SDF-1 α erfüllt ist. Die Expression von CXCR4 durch die AML-Kulturen und von CCR7 durch die ALL-Kulturen ist jeweils in den Konditionen unter Verwendung von Humanserum zwei- bis viermal höher im Vergleich mit dem Grundmedium RPMI 20% FBS (*Abb. 12, S. 47 bzw. Abb. 18, S. 59*). Dies könnte zum einen darauf beruhen, dass in dem zugesetzten Humanserum Faktoren enthalten sind, welche die Expression beider Chemokinrezeptoren erhöhen. Zum anderen könnte das FBS hemmende Einflüsse auf die Chemokinrezeptorexpression beinhalten. Daraus könnte ein Vorteil bezüglich der Migrationsfähigkeit der differenzierten DC für Grundmedien mit dem Zusatz von Humanserum im Gegensatz zu FBS-haltigen Medien geschlossen werden.

5.2.4 Stimulationsfähigkeit allogener T-Zellen

Die immunstimulatorischen Fähigkeiten der gezüchteten DC wurden, wie bereits in anderen Veröffentlichungen beschrieben (*Cignetti et al.*, 2004; *Moldenhauer et al.*, 2006), anhand der Kokultivierung mit allogenen T-Lymphozyten in der MLC beurteilt. Es konnte eine von der Anzahl der eingesetzten DC abhängige Proliferationssteigerung der T-Zellen festgestellt werden, welche anhand der counts per minute (cpm)-Werte in Zahlen gefasst wurde. Die höchsten cpm-Werte konnten mit der Stimulator : Responder – Ration 1 : 15 erreicht werden. Bei den AML-DC wurden in den einzelnen Konditionen mittlere Werte bis 29300cpm und bei den ALL-DC bis 54000cpm ermittelt (*Abb. 13, S. 48 bzw. Abb. 19, S. 60*). Diese höheren Werte der ALL- im Vergleich mit den AML-Kulturen sind signifikant und decken sich mit der in den durchflusszytometrischen Messungen nachgewiesenen fast doppelt so hohen prozentualen CD83-Expression der ALL-Kulturen nach einer Woche. CD83 stellt ein Markermolekül für reife DC dar (*Banchereau et al.*, 2000). Daher lässt sich schlussfolgern, dass in den ALL-Kulturen ein höherer Prozentsatz reifer antigenpräsentierender Zellen vorhanden war. Da in den MLC-Ansätzen jeweils eine definierte Zellzahl eingesetzt wurde, konnte die stärkere Proliferation der AML-Kulturen diese höheren Prozentzahlen nicht ausgleichen.

Auch anderen Arbeitsgruppen war es möglich, die Allostimulationsfähigkeit der aus AML- (*Houtenbos et al.*, 2003; *Lee et al.*, 2004b) und ALL-Blasten (*Cignetti et al.*, 1999; *Mohty et al.*, 2002; *Schmidt et al.*, 2009) differenzierten DC zu belegen. Cignetti et al. erreichten nach Differenzierung von AML-Blasten zu DC in der Stimulator : Responder – Ratio 1 : 30 fast doppelt so hohe Werte wie wir (bis 40000cpm; bei uns in dieser Verdünnungsstufe im Mittel um 20000cpm) (*Cignetti et al.*, 2004). Im Gegensatz zu uns setzten sie zusätzlich zu GM-CSF, IL-4 und TNF α zur vollständigen Reifung der DC CD40L ein. Dieses in vivo vor allem durch aktivierte CD4⁺ T-Lymphozyten exprimierte (*Fitzgerald et al.*, 2001), aber auch in löslicher Form vorkommende Protein (*Graf et al.*, 1995) spielt eine wichtige Rolle für die Differenzierung von B-Lymphozyten (*van Kooten & Banchereau*, 2000) und kann die Reifung von DC induzieren (*Lee et al.*, 2004b). Die bessere Allostimulation der AML-DC der zitierten Studie (*Cignetti et al.*, 2004) könnte also mit einem erhöhten Reifegrad der DC erklärt werden. Zusätzlich ist aber auch zu bedenken, dass in der Arbeit von Cignetti et al. lediglich die Mittelwerte von drei MLC-Ansätzen dargestellt wurden, bei uns wurden fünf Ansätze in Triplets ausgewertet. Diese Tatsache kann den Mittelwert beeinflusst haben.

Die Stimulation allogener T-Zellen wird zum Hauptteil durch das Vorhandensein fremder MHC-Moleküle vermittelt. Für die klinische Anwendung der generierten DC ist allerdings die

Fähigkeit, autologe T-Lymphozyten antigenspezifisch aktivieren zu können, von entscheidender Bedeutung. Verschiedene Forschungsgruppen konnten die Fähigkeit leukämischer DC, autologe T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen (*Harrison et al.*, 2001; *Cignetti et al.*, 2004) und zum Lysieren von Zielzellen zu aktivieren (*Kufner et al.*, 2005b; *Schmidt et al.*, 2009) nachweisen. In unserer Studie wurden die Blasten hauptsächlich durch diagnostische Blutentnahmen in fremden Krankenhäusern, also nicht vor Ort, gewonnen. Aus diesem Grund war eine weitere Blutentnahme zur Gewinnung autologer T-Zellen für Experimente dieser Art nicht möglich. Die drei eingesetzten Grundmedien erwiesen sich bezüglich der Allostimulationsfähigkeit als gleichwertig. FBS kann als xenogener Stimulus die Differenzierung von DC unterstützen (*Triozi & Aldrich*, 1997) und bietet zudem zahlreiche Inhaltsstoffe wie zum Beispiel verschiedene Proteine und Wachstumsfaktoren für die Zellkulturen (*Lindl*, 2002). Dass der Ersatz des FBS mit Humanserum die allostimulatorischen Fähigkeiten der differenzierten DC nicht reduziert, konnte bereits in einer früheren Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (*Moldenhauer et al.*, 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die gleich gute Allostimulationsfähigkeit der in FBS-haltigen und humanserumhaltigen Medien differenzierten DC. Zusammengefasst sind die aus den leukämischen Blasten differenzierten DC fähig, allogene T-Lymphozyten zu stimulieren und der Ersatz des FBS mit Humanserum erbrachte keine Nachteile für die immunstimulatorischen Fähigkeiten der DC.

5.2.5 Migrationsfähigkeit

Für die spätere klinische Anwendung der generierten DC ist die Kenntnis des Migrationsverhaltens von Bedeutung. Beim Gesunden werden die DC in vivo durch inflammatorische Zytokine wie MCP-1 und MIP-1 α an den Ort der Entzündung gelockt (*Dieu-Nosjean et al.*, 1999). Dort findet die Antigenaufnahme und Aktivierung der DC statt (*Banchereau et al.*, 2000). Daraufhin werden sie durch homöostatische Chemokine wie SDF-1 α und MIP-3 β zu den anliegenden Lymphknoten geleitet (*Dieu-Nosjean et al.*, 1999). Dort geschieht die Interaktion der DC mit den T-Lymphozyten, wodurch die adaptive Immunantwort eingeleitet wird (*Janeway et al.*, 2005). Reagieren die *in vitro* differenzierten DC ebenso auf die chemotaktischen Signale, so ist eine venöse oder subkutane Gabe der differenzierten Zellen möglich. Andernfalls sollten die DC direkt an den Ort der Interaktion mit den T-Zellen, d.h. in die Lymphknoten appliziert werden (*Aarntzen et al.*, 2008).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, das Migrationsverhalten von *in vitro* differenzierten Zellen zu untersuchen. Im Gegensatz zu zeitintensiven Experimenten, die mittels Fluoreszenz-Marker-Systemen die Migration der Zellen im Tiermodell verfolgen (*Barratt-*

Boyes et al., 1997; *Martin-Fontecha et al.*, 2003), stellt der Transmigrations-Assay eine geeignete Möglichkeit dar, *ex vivo* das Wanderungsverhalten der differenzierten DC entlang eines Chemokingradienten zu prüfen (*Moldenhauer et al.*, 2003; *Moldenhauer et al.*, 2006). Es wurde die Migration entlang der inflammatorischen Chemokine MCP-1 und MIP-1 α sowie der homöostatischen Chemokine SDF-1 α und MIP-3 β getestet. Es zeigte sich, dass weder die undifferenzierten ALL- noch AML-Blasten eine vermehrte Migration auf die getesteten Chemokine im Vergleich mit der Kontrolle aufweisen. Allerdings migrieren die AML-Kulturen, welche ohne den Zusatz von Zytokinen nur in Grundmedium kultiviert wurden, als Reaktion auf MCP-1 und MIP-1 α . Beides sind Chemokine, welche Monozyten und Makrophagen anlocken (*Janeway et al.*, 2005). Da AML-Blasten Vorläuferzellen dieser Zelltypen darstellen, könnte eine beginnende Ausdifferenzierung durch die Kultivierung eingetreten sein. Auch eine Proliferation der Monozyten, welche in der Fraktion der mononukleären Zellen enthalten waren, wäre denkbar. Da Monozyten allerdings in Zellkulturen adhären werden, ist eine Migration dieser Zellfraktion im Rahmen der Transmigrationsexperimente sehr unwahrscheinlich. Die differenzierten DC hingegen migrieren nicht auf die Chemokine MCP-1 und MIP-1 α . Eine Wanderung auf diese Chemokine ist *in vivo* neben Monozyten und Makrophagen für ruhende, unreife DC charakteristisch und nimmt nach der Antigenaufnahme ab (*Dieu-Nosjean et al.*, 1999). Da die *ex vivo* differenzierten DC bereits die leukämischen Antigene tragen, ist eine Migration als Reaktion auf diese inflammatorischen Chemokine von untergeordneter Bedeutung.

Auf die Chemokine SDF-1 α und MIP-3 β zeigen die differenzierten DC eine mit im Mittel ca. 9% zwar geringe, dennoch aber z.T. signifikante Migration im Vergleich mit den Kontrollen ohne Chemokine (*Tabelle 11, S. 49 bzw. Tabelle 14, S. 61*). Beide Chemokine sind bedeutsam für die Wanderung der reifen DC zu den anliegenden Lymphknoten (*Dieu-Nosjean et al.*, 1999). In der Studie von *Cignetti et al.* wurde die Migration der aus AML-Blasten gezüchteten DC als Reaktion auf das Chemokin MIP-3 β mit Hilfe des Transmigrations-Assays untersucht (*Cignetti et al.*, 2004). Es konnte eine Migrationsrate von ca. 25% nachgewiesen werden, welche der jener DC entsprach, die aus Monozyten gesunder Spender differenziert wurden. Andere Ergebnisse ergab die Studie von *Moldenhauer et al.*, in der die leukämischen DC kaum auf die getesteten Chemokine RANTES, SDF-1 α , MIP-1 α , MIP-3 α und MIP-3 β migrierten (*Moldenhauer et al.*, 2006). Anders als in der vorliegenden Studie fanden dort allerdings für die Differenzierung der DC aus leukämischen Blasten neben Zytokinen auch Histondeacetylaseinhibitoren Verwendung, welche das Migrationsvermögen der DC verändert haben könnten. Einige Studien deuten darauf hin, dass die Zugabe von

Prostaglandin E2 die CCR7-Expression steigern und die Migration von DC als Reaktion auf MIP-3 β unterstützen könnte (Luft *et al.*, 2002; Scandella *et al.*, 2002; Kufner *et al.*, 2005a). Eine Verwendung dieses proinflammatorischen Mediators im Rahmen von Zellkulturmodellen könnte das Migrationsvermögen der leukämischen DC hinsichtlich MIP-3 β verbessern. Insgesamt wurden sowohl bei den naiven AML- als auch ALL-Blasten ca. 1,8fach höhere Migrationsraten im Vergleich mit den differenzierten Zellen nach der Kultivierung deutlich (Tabelle 11, S. 49 bzw. Tabelle 14, S. 61). Bei den AML-Blasten lässt sich dies durch die geringere Expression der Chemokinrezeptoren im Vergleich mit den Werten vor der Kultivierung erklären. Die ALL-Blasten hingegen zeigten nach der Kultivierung keine Abnahme der Rezeptorexpression. Auch der aus den durchflusszytometrischen Messungen der Chemokinrezeptorexpression anzunehmende Vorteil von humanserumhaltigen Medien gegenüber FBS-haltigen Medien hatte keinen Einfluss auf die Transmigrationskapazität. Doch die Migrationsfähigkeit der Zellen ist nicht nur von der Expression der Chemokinrezeptoren abhängig, sondern u.a. auch von der Affinität der Liganden zu den Rezeptoren, einer funktionstüchtigen intrazellulären Signalkaskade und entsprechenden Veränderungen des Zytoskeletts. Diese Parameter könnten sich durch die Zellkulturen verändert haben. Insgesamt ließen sich keine Unterschiede in der Migrationsfähigkeit zwischen den aus AML- und den aus ALL-Blasten differenzierten Zellen nachweisen. Aufgrund der relativ geringen Prozentzahlen migrierter Zellen wäre es im Rahmen einer klinischen Studie vorzuziehen, die leukämischen DC direkt in die Lymphknoten zu injizieren.

5.2.6 Produktion und Sekretion von Interleukin 12

IL-12 ist ein bedeutsames immunmodulatorisches Zytokin. Es wird *in vivo* u.a. von reifen DC produziert und beeinflusst die eingeleitete Immunantwort in Richtung zellulärer Abwehrmechanismen (Janeway *et al.*, 2005). Diese zellulär ausgerichtete Immunantwort, die auf der Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Lymphozyten beruht, spielt insbesondere bei onkologischen Erkrankungen eine wichtige Rolle (Janeway *et al.*, 2005). Um festzustellen, ob die *in vitro* differenzierten leukämischen DC dieses Zytokin produzieren, wurden jeweils zwei AML- und zwei ALL-Kulturen hinsichtlich ihrer Produktion und Sekretion von IL-12 mit Hilfe eines ELISA untersucht. Es wurden Blasten ausgewählt, welche in vorangegangenen Kulturen eine gute T-Zell-Stimulationsfähigkeit in der MLC aufwiesen. Es zeigte sich, dass keine der untersuchten Zellpopulationen IL-12 produzierte oder sezernierte. Die Stimulation der T-Lymphozyten in der MLC könnte also unabhängig von IL-12 stattgefunden haben. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die leukämischen

DC erst nach der Interaktion mit T-Lymphozyten IL-12 produzieren. Andere Arbeitsgruppen hingegen konnten eine Produktion von IL-12 durch die aus AML-Blasten differenzierten DC feststellen. Cignetti et al. differenzierten AML-Patientenblasten unter Verwendung von IL-4, GM-CSF, TNF α und CD40L zu DC und konnten eine Produktion dieses Zytokins um 350pg/ml detektieren, welche mit der produzierten Menge an IL-12 von aus Monozyten gesunder Spender gezüchteten DC vergleichbar war (Cignetti et al., 2004). Charbonnier et al. differenzierten die Blasten von AML-Patienten ebenfalls mit GM-CSF, TNF α und IL-4 sowie +/- CD40L zu DC und konnten bei sieben der untersuchten acht Kulturen eine Produktion von IL-12 ermitteln, welche von der Präsenz von CD40L abhängig war (Charbonnier et al., 1999). Die Anwesenheit von CD40L könnte also einen entscheidenden Faktor für die Produktion von IL-12 darstellen. In unserer Studie wurden die AML-Blasten ohne die Zugabe von CD40L zu DC differenziert. Möglicherweise produzieren die reifen, von AML-Blasten abstammenden DC dieses immunmodulatorische Zytokin erst nach Interaktion mit CD40L oder den MHC-Klasse-II-Molekülen der T-Lymphozyten. Ein Versuchsaufbau unter Verwendung einer solchen Stimulation bzw. Kokultivierung mit T-Zellen könnte für die genaue Beurteilung der Befähigung der AML-DC zur Produktion von IL-12 hilfreich sein.

Die in unserer Studie generierten ALL-DC hingegen wurden in Gegenwart von CD40L differenziert und zeigten keine Produktion dieses Zytokins. Auch Lee et al. untersuchten von ALL-Zellen abstammende DC hinsichtlich ihrer Produktion von IL-12 und ermittelten, dass kaum eine Produktion stattfand (Lee et al., 2004a). Lediglich die DC einer der vier getesteten Zelllinien (Z119) sowie die Blasten von einem der beiden untersuchten ALL-Patienten produzierten geringe Mengen (35,8pg/ml bzw. 17,8pg/ml) von IL-12 (Lee et al., 2004a). Möglicherweise lässt sich die reduzierte IL-12-Produktion der differenzierten DC durch ihre leukämische Abstammung erklären. Maligne Zellen sorgen nicht für ein immunstimulierendes, sondern eher für ein immunsupprimierendes Milieu (Tabelle 2, S. 10), wie zum Beispiel durch die Sekretion von Tumor-growth-factor beta (TGF β), welches T-Lymphozyten hemmt (Tada et al., 1991). Daher könnte die IL-12-Produktion zum Beispiel durch blockierende leukämische Proteine beeinträchtigt sein.

Zusammenfassend konnte keine Produktion von IL-12 durch die aus AML- und ALL-Blasten differenzierten DC nachgewiesen werden. Daraus könnte geschlussfolgert werden, dass die DC nicht reif waren, da die Produktion von IL-12 als Kennzeichen reifer DC gilt (Banchereau et al., 2000). Dagegen sprechen allerdings die in dieser Studie ermittelten morphologischen und immunphänotypischen Reifemerkmale der generierten DC sowie ihre Allostimulationsfähigkeit.

5.3 Grundmedien für die Kultivierung leukämischer Blasten

In der Literatur sind verschiedene Grundmedien für die Differenzierung leukämischer Blasten zu DC beschrieben. Das am häufigsten angewandte Medium ist RPMI 1640, welches mit 10% (*Charbonnier et al.*, 1999; *Panoskaltzis et al.*, 2002; *Lee et al.*, 2004b; *Pospisilova et al.*, 2005) oder 20% fetalem Kälberserum (*Woiciechowsky et al.*, 2001; *Houtenbos et al.*, 2003) als Proteinquelle und xenogenen Stimulus für die Differenzierung angereichert wird. In unserer Studie wurde das Standardmedium RPMI 1640 versetzt mit 20% fetalem Kälberserum mit RPMI 1640 versetzt mit 5% Humanserum verglichen. Außerdem wurde das Medium QBSF 60 untersucht, welches anders als RPMI 1640 verschiedene humane Proteine enthält, die insbesondere die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen unterstützen sollen. Es wurde unter Zusatz von 5% Humanserum verwendet. Das im Rahmen dieser Studie eingesetzte Humanserum stammte aus einem Pool mehrerer freiwilliger Blutspender. Der Ersatz des FBS mit Humanserum erwies sich für die Differenzierung von AML- und ALL-Blasten zu DC als gleichwertig. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei verwendeten Kulturmedien festgestellt werden. Die differenzierten Zellen zeigten einen vergleichbaren Immunphänotyp sowie vergleichbare Ergebnisse in den Funktionstests. Insbesondere konnten gleich gute allostimulatorische Fähigkeiten der differenzierten DC nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist die Kultivierung der leukämischen Blasten mit dem Ziel, diese im Rahmen von klinischen Studien zu applizieren, in humanserumhaltigen Medien dem Zusatz von tierischen Seren vorzuziehen. Artfremde Seren bergen das Risiko einer Xenosensibilisierung und allergischer Reaktionen (*Mackensen et al.*, 2000). Außerdem besteht bei FBS das Risiko einer Übertragung der Prionenerkrankung der bovinen spongiformen Enzephalopathie (*Asher*, 1999). Einen Nachteil in der Verwendung von Humanserum im Rahmen von Studien könnte man darin sehen, dass die Zusammensetzung der Seren der verschiedenen Spender variiert sowie noch unbekannte Inhibitoren einer dendritischen Zelldifferenzierung enthalten sind (*Eljaafari et al.*, 1998). Durch das Zusammenführen der Seren verschiedener Spender in einem Pool können diese Inhibitoren in ihrer Wirkung neutralisiert werden.

Des Weiteren konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass das Medium QBSF 60 dem Standardmedium RPMI 1640 für die Kultivierung leukämischer Blasten gleichwertig ist. RPMI 1640 ist ein chemisch definiertes Medium, welches in vielen Generierungsprotokollen und Studien, die sich mit DC beschäftigen, Verwendung findet (*Lee et al.*, 2004b; *Li et al.*, 2006). Da die klinische Anwendung humaner Zellen unter das Arzneimittelgesetz fällt, muss ihre Herstellung den Qualitätsrichtlinien der guten klinischen Praxis (*good manufacturing*

practice, GMP) folgen. Anders als QBSF 60 ist RPMI 1640 nicht für die klinische Anwendung zugelassen. Indem die vorliegende Studie zeigt, dass das aus rein humanen Komponenten bestehende QBSF 60 dem gängigen RPMI 1640 gleichwertig ist, konnte ein weiterer Schritt für die GMP-gemäße Generierung leukämischer DC getan werden. Ein Nachteil für die Verwendung von QBSF 60 besteht darin, dass es momentan in Deutschland nicht vertrieben wird. Eine Bestellung beispielsweise in den Vereinigten Staaten ist möglich. Neben dem logistischen Aufwand sind die im Vergleich zu RPMI 1640 größeren finanziellen Ausgaben zu bedenken (*Tabelle 16*).

Tabelle 16: Kosten der verwendeten Zellkulturmedien

Stand vom 04.05.2009, Umrechnungskurs: US-\$ = 0,7513€, Preise bezogen auf 500ml Medium

Produkt	Firma	Preis	Quelle
RPMI 1640	Biochrom AG	8.50 €	www.biochrom.de/produkte/medien/rpmi-1640
QBSF 60	Quality Biological Inc.	242,56 \$ = 182,2 €	www.qualitybiological.com/ptistore/control/product?product=160-204

5.4 Für die Differenzierung leukämischer Blasten benötigte Zeitspanne

Die Angaben über die benötigten Kulturzeiten zur Generierung leukämischer DC differieren in der Literatur. Die meisten Forschungsgruppen bevorzugen eine Zeitspanne zwischen sieben und vierzehn Tagen (*Charbonnier et al., 1999; Cignetti et al., 2004; Li et al., 2005; Pospisilova et al., 2005*). Kufner et al. kultivierten AML-Blasten für sieben bzw. vierzehn Tage und ermittelten eine größere DC-Ernte nach vierzehn Tagen der Kultivierung (*Kufner et al., 2005b*). Panoskaltsis et al. hingegen differenzierten Blasten von Patienten mit ALL, AML und CML in nur drei bis fünf Tagen zu DC (*Panoskaltsis et al., 2002*). Einige Arbeitsgruppen entschlossen sich, die Kulturzeit der einzelnen Blasten von ihrer morphologischen Erscheinung abhängig zu machen. Lee et al. ernteten ihre AML-DC zwischen acht und zwölf (*Lee et al., 2004b*), Oehler et al. zwischen vier und einundzwanzig Tagen der Kultivierung (*Oehler et al., 2000*). Um die optimale Zeitspanne für die Kultivierung zu ermitteln, wurden in unserer Studie die aus AML- und ALL-Blasten differenzierten Zellen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten morphologisch und immunphänotypisch evaluiert. Sowohl die AML- als auch die ALL-Kulturen zeigten nach einer Differenzierungszeit von einer Woche den höchsten prozentualen Anteil an den für reife DC typischen Oberflächenmolekülen CD83 und HLA-DR. Anders verhält es sich, wenn man die kumulativen Zellzahlen der für CD83 und HLA-DR positiven Zellen betrachtet. Hier finden sich die höchsten DC-Zellzahlen nach zwei Wochen der Kultivierung. Bezüglich der Morphologie der generierten Zellen, ihrer

Vitalität sowie den anderen durchflusszytometrisch bestimmten Oberflächenmolekülen ließen sich keine Unterschiede nachweisen. Aus diesem Grund ist die empfohlene Differenzierungszeit abhängig von der Zielsetzung. Soll eine hohe Reinheit der differenzierten Zellen erlangt werden so empfiehlt sich eine Kultivierungszeit von einer Woche, die höheren DC-Zellzahlen hingegen werden nach zwei Wochen erreicht.

5.5 Ausblick: Vakzinierungstherapien mit dendritischen Zellen

Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung onkologischer Erkrankungen stellen eine große Hoffnung für die moderne Medizin dar. Seit der ersten Veröffentlichung einer Vakzinierungsstudie mit DC im Jahre 1995 wurden bereits mehr als 1000 DC-Vakzinierungen durchgeführt (Ridgway, 2003). Gemeinsam ist diesen Studien, dass sich die klinische Anwendung der DC als gut verträglich zeigte. Die häufigsten auftretenden Nebenwirkungen bestehen aus Fieber, lokalen Irritationen am Ort der Injektion, Müdigkeit und Adenopathie (Ridgway, 2003; Ovali et al., 2007). Eine theoretische Befürchtung bezüglich der Verwendung von DC-Vakzinen betrifft das Auftreten von Autoimmunerkrankungen durch die Präsentation körpereigener Proteine. Bislang wurde nur von wenigen Fällen autoimmuner Reaktionen berichtet. Darunter fallen neben dem Vitiligo das Auftreten von neu positiven anti-nukleären Antikörpern, Rheumafaktoren, anti-Doppelstrang-DNA-Antikörpern sowie von Schilddrüsen-Antikörpern (Ridgway, 2003; Roddie et al., 2006). Neben der nachgewiesenen guten Verträglichkeit der DC-Vakzinierung konnten erste klinische Erfolge dokumentiert werden (Hus et al., 2005; Li et al., 2006; Aarntzen et al., 2008). Der Großteil dieser Studien betrifft solide Tumoren wie das maligne Melanom, das kolorektale Karzinom oder das Prostata-Karzinom (Ridgway, 2003; Ballestrero et al., 2008). Die meist aus Monozyten gezüchteten DC wurden dazu extern mittels Tumor DNA/RNA oder Tumorpeptiden beladen, mit Tumorzelllysaten inkubiert oder mit Tumorzellen fusioniert, um die spezifischen Antigene zu präsentieren (Ballestrero et al., 2008). Tabelle 17 gibt einen Überblick über die bislang bei Leukämien durchgeführten DC-Vakzinierungen. Die Mehrzahl dieser Studien betrifft die myeloischen Leukämien und wurde mit DC leukämischer Abstammung durchgeführt. Für die drei veröffentlichten Vakzinierungsstudien, die lymphoblastische Leukämien betreffen, wurden die DC aus autologen (Ovali et al., 2007; Hus et al., 2008) bzw. allogenen Monozyten (Hus et al., 2005) generiert und mittels Zelllysaten mit den spezifischen Leukämie-assoziierten Antigenen beladen. Die vorliegende Arbeit bietet durch die erfolgreiche Züchtung von DC direkt aus den ALL-Blasten eine weitere Möglichkeit für die klinische Anwendung leukämischer DC. Bisher wurde die überwiegende Mehrheit der DC-Vakzinierungsstudien mit Patienten durchgeführt, die an metastasierten

bzw. weit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen mit zahlreichen medizinischen Vorbehandlungen litten (*Ballestrero et al.*, 2008). Die klinische Wirksamkeit der Vakzinierungen zur Therapie onkologischer Erkrankungen in weniger fortgeschrittenen Fällen bleibt also abzuwarten. Trotz der Vielzahl veröffentlichter Studien bleiben viele Fragen unbeantwortet. So besteht bislang kein einheitlicher Konsens bezüglich der optimalen Präparation der DC, des Applikationsweges, der Anzahl benötigter DC sowie der optimalen Zeitintervalle für die Applikation. Auch werden sich die DC-Vakzinierungen mit anderen immuntherapeutischen Strategien messen müssen. Die Vakzinierung mit Leukämie-assoziierten Antigenen wie zum Beispiel Wilms-Tumor-Antigen (WT1), BCR-ABL oder dem Rezeptor für Hyaluronan-mediated-motility (RHAMM) bietet die Möglichkeit, spezifische zytotoxische T-Zellen, welche leukämische Blasten erkennen, zu induzieren (*Rojas et al.*, 2007; *Schmitt et al.*, 2008; *Keilholz et al.*, 2009). Nichtsdestotrotz haben DC-Vakzinierungen ihren Weg in die Medizin gefunden. Ihre Stellung und Wertigkeit für die Therapie onkologischer Erkrankungen wird die Zukunft erbringen.

Leukämieart	DC-Typ	Kulturmedien	Zytokine	Antigen-beladung	Applika-tionsart	Anzahl Patienten	Klinisches Ansprechen	Referenz
ALL	Autologe Mono-DC	n.b.	GM-CSF, IL-4 IL-1 β , PGE ₂ , TNF α	Zellysat	Intradermal	1/18	CR	(Ovali et al., 2007)
AML	Leukämische (PBMC/KMM C-) DC	RPMI + 5% Human-AB-serum	GM-CSF, IL-4, TNF α , Interferon gamma	-	Subkutan	5/22	2 CR	(Roddie et al., 2006)
	Leukämische (PBMC-) DC	RPMI + 10% Human-AB-Serum	GM-CSF, IL-4, TNF α	-	Subkutan	5	3 stabile Erkrankungen für 5.5 - 13 Monate, 2 partielle Remissionen	(Li et al., 2006)
B-Zell-CLL	Allogene Mono-DC	RPMI + 1% Humanalbumin	GM-CSF, IL-4, TNF α	Zellysat, apoptotische Zellen	Intradermal	9	5 stabile Erkrankungen, Reduktion der Leukozytenzahl bei den meisten Patienten	(Hus et al., 2005)
	Autologe Mono-DC	RPMI + 1% Humanalbumin	GM-CSF, IL-4, TNF α	Zellysat	Intradermal	12	3 stabile Erkrankungen, Reduktion der Leukozytenzahl bei 5 Patienten	(Hus et al., 2008)
CML	Leukämische (Mono-) DC	n.b.	n.b.	-	Intravenös (+ IL-2)	5	1/5 Verlust der Trisomie 8, 1/5 kontrollierte Leukozytose	(Claxton et al., 2001)
	Leukämische (PBSC-) DC	RPMI + 10% autologes Serum	GM-CSF, IL-4, TNF α	-	Intravenös	1	Partielle zytogenetische Antwort, hämatologische Antwort	(Fujii et al., 1999)
	Leukämische (PBMC-) DC	RPMI + 10% FCS	GM-CSF, IL-4, TNF α	-	Intradermal	3	IFN α resistente Proteine	(Ossenkoppele et al., 2003)
	Leukämische (Mono-) DC	n.b.	GM-CSF, IL-4, TNF α , PGE ₂ , IL-1 β , IL-6	-	Subkutan	6	-	(Dietz et al., 2001)
	Leukämische (Mono-) DC	n.b.	n.b.	-	Subkutan/ Intranodal	6	-	(Litzow et al., 2006)
	Leukämische (Mono-) DC	RPMI + 10% FCS	GM-CSF, IL-4, TNF α	-	Subkutan	10	Verbesserte zytogenetische/molekulare Eigenschaften	(Westermann et al., 2007)
Leukämie (Rezidiv nach allogener SZT)	Allogene PBSC-DC	RPMI + 10% autologes Serum	GM-CSF, IL-4, TNF α	Apoptotische Tumorzellen	Intravenös	4	2/4 reduzierte Leukämieast	(Fujii et al., 2001)

Tabelle 17: Übersicht über bei Leukämien durchgeführte DC-Vakzinierungsstudien

Angelehnt an die auf <http://www.mmri.mater.org.au> veröffentlichte Tabelle des Mater Medical Research Institutes, South Brisbane, Australien, Stand vom 27.06.2010. CR: komplette Remission, KMMC: mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark, leukämische DC: von Leukämiezellen abstammende DC, Mono-DC: von Monozyten abstammende DC, n.b.: nicht bekannt, PBMC: mononukleäre Zellen des peripheren Bluts, PBSC: hämatopoetische Stammzellen aus dem peripheren Blut, PGE₂: Prostaglandin E₂, SZT: Stammzelltransplantation.

6 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) können als fähigste antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems für eine Immuntherapie gegen onkologische Erkrankungen wie die Leukämien dienen. Sie lassen sich *in vitro* direkt aus leukämischen Blasten differenzieren und bieten damit die Möglichkeit, dem Immunsystem alle tumorassoziierten Antigene präsentieren zu können. Trotz der Vielzahl veröffentlichter Generierungsprotokolle bleiben Fragen zur optimalen Präparation der Zellen sowie der Applikationsart im Rahmen einer klinischen Studie unbeantwortet.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Verwendung von Humanserum und der Zusatz von fetalem Kälberserum äquivalent sind für die Differenzierung von DC aus leukämischen Blasten. Da tierische Seren die Risiken allergischer Reaktionen sowie der Übertragung von Infektionen wie der bovinen spongiformen Enzephalopathie bergen, ist die Verwendung rein humaner Komponenten für den klinischen Einsatz der differenzierten Zellen von Bedeutung. Des Weiteren erwies sich das aus rein humanen Komponenten bestehende Medium QBSF 60 als dem Standardmedium RPMI 1640 gleichwertig für die Differenzierung leukämischer Blasten zu DC. Anders als QBSF 60 ist RPMI 1640 nicht für die klinische Anwendung zugelassen, womit eine weitere Hürde für den klinischen Einsatz der DC genommen wurde.

Sowohl aus den Blasten der 16 verschiedenen AML- als auch der 21 verschiedenen ALL-Patienten konnten morphologisch reife und vitale DC differenziert werden, die die typischen zytoplasmatischen Zellfortsätze tragen. Es zeigte sich in allen getesteten Kulturkonditionen eine signifikante Expressionssteigerung der für reife DC typischen Oberflächenmoleküle CD83 und HLA-DR. In der gemischten Lymphozytenkultur konnte ihre Fähigkeit, allogene T-Lymphozyten zu aktivieren nachgewiesen werden. Die Zugabe von IL-3 und IL-4 zu der Zytokinkombination bestehend aus TNF α , GM-CSF, SCF und Flt-3L erbrachte keine Vorteile für die Differenzierung der AML-Blasten zu DC. Aus diesem Grund kann auf beide Interleukine verzichtet werden. Aufgrund der erhöhten Ausbeute reifer DC erwies sich für die Differenzierung der ALL-Blasten die Zytokinkombination bestehend aus TNF α , GM-CSF, SCF, Flt-3L, IL-4 und CD40L als überlegen im Vergleich mit der gleichen Kombination ohne die Zugabe von IL-4 und CD40L. Sowohl für die AML- als auch die ALL-Kulturen empfiehlt sich für eine höchstmögliche Reinheit der DC eine Differenzierungszeit von einer Woche. In diesem Zeitraum konnten die höchsten Prozentzahlen reifer DC gemessen werden. Die höchsten Zellzahlen reifer DC hingegen wurden nach einer Kultivierungszeit von zwei

Wochen erreicht. Im Transmigrations-Assay konnte nur eine gering ausgeprägte Migrationsfähigkeit der gezüchteten DC entlang der getesteten Chemokine nachgewiesen werden. Die Wanderung der DC zu den anliegenden Lymphknoten stellt aber eine wichtige Voraussetzung für die Einleitung der Immunantwort dar, da hier die Interaktion mit den T-Lymphozyten stattfindet. Aus diesem Grund sollten die differenzierten DC im Rahmen einer klinischen Studie direkt in die Lymphknoten injiziert werden.

7 Appendix

7.1 Literaturverzeichnis

Aarntzen EH, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJ & de Vries IJ. (2008). Dendritic cell vaccination and immune monitoring. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 1559-1568.

Andreesen R, Brugger W, Scheibenbogen C, et al. (1990). Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* **47**, 490-497.

Arrighi J-F, Hauser C, Chapuis B, Zubler RH & Kindler V. (1999). Long-Term Culture of Human CD34+ Progenitors With FLT3-Ligand, Thrombopoietin, and Stem Cell Factor Induces Extensive Amplification of a CD34-CD14- and a CD34-CD14+ Dendritic Cell Precursor. *Blood* **93**, 2244-2252.

Asher DM. (1999). Bovine sera used in the manufacture of biologicals: current concerns and policies of the U.S. Food and Drug Administration regarding the transmissible spongiform encephalopathies. *Dev Biol Stand* **99**, 41-44.

Baenkler H-W, Fritze D, Fueßl HS, et al. (2001). Innere Medizin. *Georg Thieme Verlag (Duale Reihe) Sonderausgabe.*

Ballestrero A, Boy D, Moran E, et al. (2008). Immunotherapy with dendritic cells for cancer. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 173-183.

Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811.

Banchereau J & Steinman RM. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.

Barchet W, Cella M & Colonna M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Seminars in Immunology* **17**, 253-261.

Barratt-Boyes SM, Watkins SC & Finn OJ. (1997). In vivo migration of dendritic cells differentiated in vitro: a chimpanzee model. *J Immunol* **158**, 4543-4547.

Belardelli F & Ferrantini M. (2002). Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol* **23**, 201-208.

Blair A, Rowbottom AW, Browne SJ, et al. (2001). An optimised biphasic culture system for the generation of functional dendritic cells from patients with acute lymphoblastic leukaemia at presentation and in clinical remission. *Leukemia* **15**, 1596-1603.

Buggins AG, Lea N, Gaken J, et al. (1999). Effect of costimulation and the microenvironment on antigen presentation by leukemic cells. *Blood* **94**, 3479-3490.

Burmester GR & Pezzutto A. (2003). Color Atlas of Immunology. *Georg Thieme Verlag.*

- Canque B, Camus S, Yagello M & Gluckman JC.** (1998). IL-4 and CD40 ligation affect differently the differentiation, maturation, and function of human CD34+ cell-derived CD1a+CD14- and CD1a-CD14+ dendritic cell precursors in vitro. *J Leukoc Biol* **64**, 235-244.
- Cardoso AA, Seamon MJ, Afonso HM, et al.** (1997). Ex Vivo Generation of Human Anti-Pre-B Leukemia-Specific Autologous Cytolytic T Cells. *Blood* **90**, 549-561.
- Carreno BM & Collins M.** (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* **20**, 29-53.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al.** (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 3666-3670.
- Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D & Banchereau J.** (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360**, 258-261.
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al.** (1997). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* **90**, 1458-1470.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Durand I & Banchereau J.** (1996). Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* **87**, 2376-2385.
- Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J & Lanzavecchia A.** (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782-787.
- Chamuleau ME, Souwer Y, Van Ham SM, et al.** (2004). Class II-associated invariant chain peptide expression on myeloid leukemic blasts predicts poor clinical outcome. *Cancer Res* **64**, 5546-5550.
- Chang C-C, Ogino T, Mullins DW, et al.** (2006). Defective Human Leukocyte Antigen Class I-associated Antigen Presentation Caused by a Novel beta2-Microglobulin Loss-of-function in Melanoma Cells. *J Biol Chem* **281**, 18763-18773.
- Chang J & Girgis L.** (2007). Clinical use of anti-TNF-alpha biological agents-a guide for GPs. *Aust Fam Physician* **36**, 1035-1038.
- Charbonnier A, Gaugler B, Sainty D, Lafage-Pochitaloff M & Olive D.** (1999). Human acute myeloblastic leukemia cells differentiate in vitro into mature dendritic cells and induce the differentiation of cytotoxic T cells against autologous leukemias. *European Journal of Immunology* **29**, 2567-2578.
- Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, et al.** (2008). Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med* **205**, 2235-2249.
- Cignetti A, Bryant E, Allione B, et al.** (1999). CD34+ Acute Myeloid and Lymphoid Leukemic Blasts Can Be Induced to Differentiate Into Dendritic Cells. *Blood* **94**, 2048-2055.

- Cignetti A, Vallario A, Roato I, et al.** (2004). Leukemia-derived immature dendritic cells differentiate into functionally competent mature dendritic cells that efficiently stimulate T cell responses. *J Immunol* **173**, 2855-2865.
- Clark GJ, Angel N, Kato M, et al.** (2000). The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes Infect* **2**, 257-272.
- Claxton DF, McMannis J, Champlin R & Choudhury A.** (2001). Therapeutic potential of leukemia-derived dendritic cells: preclinical and clinical progress. *Crit Rev Immunol* **21**, 147-155.
- Coebergh JWW, Reedijk AMJ, de Vries E, et al.** (2006). Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer* **42**, 2019-2036.
- Conley ME, Larché M, Bonagura VR, et al.** (1994). Hyper IgM syndrome associated with defective CD40-mediated B cell activation. *J Clin Invest* **94**, 1404-1409.
- D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P & Sinigaglia F.** (2003). Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J Immunol Methods* **273**, 3-13.
- Dauer M, Obermaier B, Herten J, et al.** (2003). Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* **170**, 4069-4076.
- Delves PJ, Martin SJ, Burton DR & Roitt IM.** (2006). Roitt's Essential Immunology. *Blackwell Publishing* **11. Edition**.
- Dietz AB, Litzow MR, Gastineau DA & Vuk-Pavlovic S.** (2001). Engineering dendritic cell grafts for clinical trials in cellular immunotherapy of cancer: example of chronic myelogenous leukemia. *Croat Med J* **42**, 428-435.
- Dieu-Nosjean MC, Vicari A, Lebecque S & Caux C.** (1999). Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* **66**, 252-262.
- Ding D, Mehta H, McCune WJ & Kaplan MJ.** (2006). Aberrant Phenotype and Function of Myeloid Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* **177**, 5878-5889.
- Dong R, Cwynarski K, Entwistle A, et al.** (2003). Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood* **101**, 3560-3567.
- Drexler HG.** (1996). Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* **10**, 588-599.
- Eisendle K, Wolf D, Gastl G & Kircher-Eibl B.** (2005). Dendritic cells from patients with chronic myeloid leukemia: functional and phenotypic features. *Leuk Lymphoma* **46**, 663-670.

- Eljaafari A, Duperrier K, Mazet S, et al.** (1998). Generation of stable monocyte-derived dendritic cells in the presence of high concentrations of homologous or autologous serum: influence of extra-cellular pH. *Hum Immunol* **59**, 625-634.
- Encabo A, Solves P, Mateu E, et al.** (2004). Selective Generation of Different Dendritic Cell Precursors from CD34+ Cells by Interleukin-6 and Interleukin-3. *Stem Cells* **22**, 725-740.
- Fadilah SAW, Vuckovic S, Khalil D & Hart DNJ.** (2007). Cord Blood CD34+ Cells Cultured with FLT3L, Stem Cell Factor, Interleukin-6, and IL-3 Produce CD11c+CD1a/c Myeloid Dendritic Cells. *Stem Cells and Development* **16**, 849-856.
- Fitzgerald KA, O'Neill LAJ, Gearing AJH & Callard RE.** (2001). The Cytokine Factsbook. *Academic Press Second Edition*.
- Fujii S, Shimizu K, Fujimoto K, et al.** (1999). Analysis of a chronic myelogenous leukemia patient vaccinated with leukemic dendritic cells following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Jpn J Cancer Res* **90**, 1117-1129.
- Fujii S, Shimizu K, Fujimoto K, et al.** (2001). Treatment of post-transplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogeneic-dendritic cells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells. *Leuk Lymphoma* **42**, 357-369.
- Gabrilovich DI, Ishida T, Nadaf S, Ohm JE & Carbone DP.** (1999). Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin Cancer Res* **5**, 2963-2970.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA & Kuby J.** (2003). Immunology. *WH Freeman and Company, NY 5th Edition*.
- Graf D, Müller S, Korthäuer U, et al.** (1995). A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* **25**, 1749-1754.
- Grunig G, Banz A & de Waal Malefyt R.** (2005). Molecular regulation of Th2 immunity by dendritic cells. *Pharmacology & Therapeutics* **106**, 75-96.
- Hammad H & Lambrecht BN.** (2006). Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 331-336.
- Harrison BD, Adams JA, Briggs M, Brereton ML & Yin JA.** (2001). Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood* **97**, 2764-2771.
- Hart DN.** (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**, 3245-3287.
- Herbst B, Kohler G, Mackensen A, et al.** (1997). CD34+ peripheral blood progenitor cell and monocyte derived dendritic cells: a comparative analysis. *Br J Haematol* **99**, 490-499.

- Hirano N, Takahashi T, Takahashi T, et al.** (1996). Expression of costimulatory molecules in human leukemias. *Leukemia* **10**, 1168-1176.
- Holt PG, Stumbles PA & McWilliam AS.** (1999). Functional studies on dendritic cells in the respiratory tract and related mucosal tissues. *J Leukoc Biol* **66**, 272-275.
- Houtenbos I, Westers TM, de Gruijl TD, et al.** (2004). TNF-alpha receptor 1 expression on acute myeloid leukemic blasts predicts differentiation into leukemic dendritic cells. *Leukemia* **18**, 1149-1153.
- Houtenbos I, Westers TM, Ossenkoppele GJ & van de Loosdrecht AA.** (2006). Leukemia-derived dendritic cells: towards clinical vaccination protocols in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **91**, 348-355.
- Houtenbos I, Westers TM, Stam AG, et al.** (2003). Serum-free generation of antigen presenting cells from acute myeloid leukaemic blasts for active specific immunisation. *Cancer Immunol Immunother* **52**, 455-462.
- Huber V, Fais S, Iero M, et al.** (2005). Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* **128**, 1796-1804.
- Hunter CA.** (2005). New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* **5**, 521-531.
- Hus I, Rolinski J, Tabarkiewicz J, et al.** (2005). Allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates or apoptotic bodies as immunotherapy for patients with early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **19**, 1621-1627.
- Hus I, Schmitt M, Tabarkiewicz J, et al.** (2008). Vaccination of B-CLL patients with autologous dendritic cells can change the frequency of leukemia antigen-specific CD8+ T cells as well as CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells toward an antileukemia response. *Leukemia* **22**, 1007-1017.
- Inoue H, Shiraki K, Yamanaka T, et al.** (2002). Functional expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human colonic adenocarcinoma cells. *Lab Invest* **82**, 1111-1119.
- Janeway CAJ, Travers P, Walport M & Shlomchik M.** (2005). Immunobiology: the immune system in health and disease. *Garland Science Publishing* **6th ed.**
- Jansen JH, Wientjens GJ, Fibbe WE, Willemze R & Kluin-Nelemans HC.** (1989). Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. *J Exp Med* **170**, 577-582.
- Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F & Lanzavecchia A.** (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**, 3388-3393.
- Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL & Manz MG.** (2003). Flt3 Ligand Regulates Dendritic Cell Development from Flt3+ Lymphoid and Myeloid-committed Progenitors to Flt3+ Dendritic Cells In Vivo. *J Exp Med* **198**, 305-313.

Katz SI, Tamaki K & Sachs DH. (1979). Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* **282**, 324-326.

Keilholz U, Letsch A, Busse A, et al. (2009). A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* **113**, 6541-6548.

Kern W, Voskova D, Schoch C, et al. (2004). Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **104**, 3078-3085.

Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, et al. (2005). Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* **11**, 1010-1020.

Kita K, Nishii K, Ohishi K, et al. (1993). Frequent gene expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor in CD7+ surface CD3- acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* **7**, 1184-1190.

Kohler T, Plettig R, Wetzstein W, et al. (2000). Cytokine-Driven Differentiation of Blasts from Patients with Acute Myelogenous and Lymphoblastic Leukemia into Dendritic Cells. *Stem Cells* **18**, 139-147.

Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ & Fleuren GJ. (2000). Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* **191**, 961-976.

Korbling M. (1999). Collection of allogeneic peripheral blood stem cells. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* **12**, 41-55.

Kufner S, Fleischer RP, Kroell T, et al. (2005a). Serum-free generation and quantification of functionally active Leukemia-derived DC is possible from malignant blasts in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 953-970.

Kufner S, Zitzelsberger H, Kroell T, et al. (2005b). Leukemia-derived dendritic cells can be generated from blood or bone marrow cells from patients with acute myeloid leukaemia: a methodological approach under serum-free culture conditions. *Scand J Immunol* **62**, 86-98.

Langerhans P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie, und für Klinische Medicin Berlin* **44**, 325-337.

Lebre MC, Burwell T, Vieira PL, et al. (2005). Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation. *Immunol Cell Biol* **83**, 525-535.

Lechmann M, Zinser E, Golka A & Steinkasserer A. (2002). Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* **129**, 113-118.

- Lee J, Sait SN & Wetzler M.** (2004a). Characterization of dendritic-like cells derived from t(9;22) acute lymphoblastic leukemia blasts. *Int Immunol* **16**, 1377-1389.
- Lee JJ, Choi BH, Nam JH, et al.** (2004b). The generation of leukemic dendritic cells from acute myeloid leukemia cells is potentiated by the addition of CD40L at the terminal maturation stage. *J Clin Apher* **19**, 130-136.
- Li L, Giannopoulos K, Reinhardt P, et al.** (2006). Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts. *Int J Oncol* **28**, 855-861.
- Li L, Reinhardt P, Schmitt A, et al.** (2005). Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 685-693.
- Lindl T.** (2002). Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. *Heidelberg; Berlin : Spektrum, Akad Verl* **5. Auflage**.
- Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, et al.** (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* **3**, 822-829.
- Litzow MR, Dietz AB, Bulur PA, et al.** (2006). Testing the safety of clinical-grade mature autologous myeloid DC in a phase I clinical immunotherapy trial of CML. *Cytotherapy* **8**, 290-298.
- Liu K, Iyoda T, Saternus M, et al.** (2002). Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med* **196**, 1091-1097.
- Luczynski W, Kowalczyk O, Stasiak-Barmuta A, et al.** (2009). Acute lymphoblastic leukemia-derived dendritic cells express tumor associated antigens: PNPT1, PMPCB, RHAMM, BSG and ERCC1. *Neoplasma* **56**, 428-434.
- Luczynski W, Stasiak-Barmuta A, Ilendo E, et al.** (2006). CD40 stimulation induces differentiation of acute lymphoblastic leukemia cells into dendritic cells. *Acta Biochim Pol* **53**, 377-382.
- Luft T, Jefford M, Luetjens P, et al.** (2002). Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E2 regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* **100**, 1362-1372.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M & Myrtek D.** (2006). Der Experimentator Immunologie. *Elsevier Spektrum Akademischer Verlag* **2. Auflage**.
- Lyman SD & Jacobsen SEW.** (1998). c-kit Ligand and Flt3 Ligand: Stem/Progenitor Cell Factors With Overlapping Yet Distinct Activities. *Blood* **91**, 1101-1134.
- Mackensen A, Dräger R, Schlesier M, Mertelsmann R & Lindemann A.** (2000). Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* **49**, 152-156.

- Maecker B, Mougiakakos D, Zimmermann M, et al.** (2006). Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia* **20**, 645-649.
- Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH & Jonuleit H.** (2002). Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **80**, 477-483.
- Malec M, van der Velden VHJ, Bjorklund E, et al.** (2004). Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia* **18**, 1630-1636.
- Maraskovsky E, Daro E, Roux E, et al.** (2000). In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* **96**, 878-884.
- Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, et al.** (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* **198**, 615-621.
- McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, et al.** (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**, 3489-3497.
- Mocellin S & Nitti D.** (2008). TNF and cancer: the two sides of the coin. *Front Biosci* **13**, 2774-2783.
- Mohty M, Isnardon D, Charbonnier A, et al.** (2002). Generation of potent Th1 responses from patients with lymphoid malignancies after differentiation of B lymphocytes into dendritic-like cells. *Int Immunol* **14**, 741-750.
- Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, et al.** (2001). Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood* **98**, 3750-3756.
- Moldenhauer, Moore, Schmidt, Kiesewetter & Salama.** (2006). Differences in the transmigration of different dendritic cells. *Experimental Hematology* **34**, 745-752.
- Moldenhauer A, Frank RC, Pinilla-Ibarz J, et al.** (2004). Histone deacetylase inhibition improves dendritic cell differentiation of leukemic blasts with AML1-containing fusion proteins. *J Leukoc Biol* **76**, 623-633.
- Moldenhauer A, Nociari MM, Dias S, Lalezari P & Moore MA.** (2003). Optimized culture conditions for the generation of dendritic cells from peripheral blood monocytes. *Vox Sang* **84**, 228-236.
- Moldenhauer A, Wolf J, Habermann G, et al.** (2007). Optimum storage conditions for cord blood-derived hematopoietic progenitor cells prior to isolation. *Bone Marrow Transplant* **40**, 837-842.
- Mukherji B, Chakraborty NG, Yamasaki S, et al.** (1995). Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8078-8082.

Nelson EL, Strobl S, Subleski J, et al. (1999). Cycling of human dendritic cell effector phenotypes in response to TNF-alpha: modification of the current 'maturation' paradigm and implications for in vivo immunoregulation. *Faseb J* **13**, 2021-2030.

Niess JH & Reinecker HC. (2006). Dendritic cells: the commanders-in-chief of mucosal immune defenses. *Curr Opin Gastroenterol* **22**, 354-360.

Notter M, Willinger T, Erben U & Thiel E. (2001). Targeting of a B7-1 (CD80) immunoglobulin G fusion protein to acute myeloid leukemia blasts increases their costimulatory activity for autologous remission T cells. *Blood* **97**, 3138-3145.

Oehler L, Berer A, Kollars M, et al. (2000). Culture requirements for induction of dendritic cell differentiation in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* **79**, 355-362.

Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, et al. (2004). CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* **21**, 279-288.

Ojima T, Iwahashi M, Nakamura M, et al. (2006). The boosting effect of co-transduction with cytokine genes on cancer vaccine therapy using genetically modified dendritic cells expressing tumor-associated antigen. *Int J Oncol* **28**, 947-953.

Ossenkoppele GJ, Stam AG, Westers TM, et al. (2003). Vaccination of chronic myeloid leukemia patients with autologous in vitro cultured leukemic dendritic cells. *Leukemia* **17**, 1424-1426.

Ovali E, Dikmen T, Sonmez M, et al. (2007). Active immunotherapy for cancer patients using tumor lysate pulsed dendritic cell vaccine: a safety study. *J Exp Clin Cancer Res* **26**, 209-214.

Panoskaltzis N, Belanger TJ, Liesveld JL & Abboud CN. (2002). Optimal cytokine stimulation for the enhanced generation of leukemic dendritic cells in short-term culture. *Leukemia Research* **26**, 191-201.

Pospisilova D, Borovickova J, Rozkova D, et al. (2005). Methods of dendritic cell preparation for acute lymphoblastic leukemia immunotherapy in children. *Med Oncol* **22**, 79-88.

Pui C-H, Campana D & Evans WE. (2001). Childhood acute lymphoblastic leukaemia - current status and future perspectives. *The Lancet Oncology* **2**, 597-607.

Ratzinger G, Baggers J, de Cos MA, et al. (2004). Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **173**, 2780-2791.

Reis e Sousa C. (2001). Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* **14**, 495-498.

Ridgway D. (2003). The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest* **21**, 873-886.

- Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al.** (2008). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. *National Cancer Institute Bethesda, MD*, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/, Stand 30.05.2008.
- Roddie H, Klammer M, Thomas C, et al.** (2006). Phase I/II study of vaccination with dendritic-like leukaemia cells for the immunotherapy of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **133**, 152-157.
- Rojas JM, Knight K, Wang L & Clark RE.** (2007). Clinical evaluation of BCR-ABL peptide immunisation in chronic myeloid leukaemia: results of the EPIC study. *Leukemia* **21**, 2287-2295.
- Rossi D & Zlotnik A.** (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**, 217-242.
- Rossi M & Young JW.** (2005). Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* **175**, 1373-1381.
- Rusten LS, Jacobsen FW, Lesslauer W, et al.** (1994). Bifunctional effects of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) on the growth of mature and primitive human hematopoietic progenitor cells: involvement of p55 and p75 TNF receptors. *Blood* **83**, 3152-3159.
- Sallusto F & Lanzavecchia A.** (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-1118.
- Sallusto F, Mackay CR & Lanzavecchia A.** (2000). The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* **18**, 593-620.
- Sansom DM, Manzotti CN & Zheng Y.** (2003). What's the difference between CD80 and CD86? *Trends in Immunology* **24**, 313-318.
- Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R & Groettrup M.** (2002). Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **100**, 1354-1361.
- Schmidt K, Seeger K, Scheibenbogen C, et al.** (2009). Histone deacetylase inhibition improves differentiation of dendritic cells from leukemic blasts of patients with TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Leukoc Biol* **85**, 563-573.
- Schmitt M, Schmitt A, Rojewski MT, et al.** (2008). RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses. *Blood* **111**, 1357-1365.
- Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, et al.** (2002). Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol* **168**, 2599-2602.
- Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Hellstrom KE, Hellstrom I & Ledbetter JA.** (2001). CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cells. *J Immunol* **166**, 3865-3872.

Shortman K & Liu Y-J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**, 151-161.

Smith M, Barnett M, Bassan R, et al. (2004). Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**, 197-222.

Smith M, Bittner Iv JG, White S, Smith D & Horuzsko A. (2008). HLA-G-Treated Tolerogenic Dendritic Cells Induce Tolerogenic Potential by Increasing Expression of B7-1 (CD80) Molecules. *Transplantation Proceedings* **40**, 1598-1603.

Smith MA, Court EL & Smith JG. (2001). Stem cell factor: laboratory and clinical aspects. *Blood Reviews* **15**, 191-197.

Spinelli O, Peruta B, Tosi M, et al. (2007). Clearance of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation and the prediction of the clinical outcome of adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **92**, 612-618.

Spoo AC, Lubbert M, Wierda WG & Burger JA. (2007). CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood* **109**, 786-791.

Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, et al. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* **93**, 1634-1642.

Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271-296.

Steinman RM & Banchereau J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419-426.

Steinman RM & Cohn ZA. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**, 1142-1162.

Steinman RM, Hawiger D & Nussenzweig MC. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 685-711.

Strobl H, Bello-Fernandez C, Riedl E, et al. (1997). flt3 Ligand in Cooperation With Transforming Growth Factor-beta 1 Potentiates In Vitro Development of Langerhans-Type Dendritic Cells and Allows Single-Cell Dendritic Cell Cluster Formation Under Serum-Free Conditions. *Blood* **90**, 1425-1434.

Suzuki H, Katayama N, Ikuta Y, et al. (2004). Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on monocytes. *American Journal of Hematology* **75**, 179-189.

Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, et al. (1991). Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol* **146**, 1077-1082.

- Tew JG, Wu J, Fakher M, Szakal AK & Qin D.** (2001). Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. *Trends Immunol* **22**, 361-367.
- Triozzi PL & Aldrich W.** (1997). Phenotypic and functional differences between human dendritic cells derived in vitro from hematopoietic progenitors and from monocytes/macrophages. *J Leukoc Biol* **61**, 600-608.
- Valladeau J & Saeland S.** (2005). Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* **17**, 273-283.
- van Kooten C & Banchereau J.** (2000). CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* **67**, 2-17.
- Villunger A, Egle A, Marschitz I, et al.** (1997). Constitutive expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand on multiple myeloma cells: a potential mechanism of tumor-induced suppression of immune surveillance. *Blood* **90**, 12-20.
- Vuckovic S, Fearnley DB, Gunningham S, et al.** (1999). Dendritic cells in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* **105**, 974-985.
- Waller EK.** (2007). The Role of Sargramostim (rhGM-CSF) as Immunotherapy. *Oncologist* **12**, 22-26.
- Westermann J, Kopp J, van Lessen A, et al.** (2007). Vaccination with autologous non-irradiated dendritic cells in patients with bcr/abl+ chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* **137**, 297-306.
- Wilson NS, Villadangos JA & Frederick WA.** (2005). Regulation of Antigen Presentation and Cross-Presentation in the Dendritic Cell Network: Facts, Hypothesis, and Immunological Implications. In *Advances in Immunology*, pp. 241-305. Academic Press.
- Woiciechowsky A, Regn S, Kolb HJ & Roskrow M.** (2001). Leukemic dendritic cells generated in the presence of FLT3 ligand have the capacity to stimulate an autologous leukemia-specific cytotoxic T cell response from patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* **15**, 246-255.
- Wykes M & MacPherson G.** (2000). Dendritic cell-B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals. *Immunology* **100**, 1-3.
- Xanthoulea S, Pasparakis M, Kousteni S, et al.** (2004). Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor Shedding Controls Thresholds of Innate Immune Activation That Balance Opposing TNF Functions in Infectious and Inflammatory Diseases. *J Exp Med* **200**, 367-376.
- Yanagihara S, Komura E, Nagafune J, Watarai H & Yamaguchi Y.** (1998). EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol* **161**, 3096-3102.
- Zelent A, Greaves M & Enver T.** (2004). Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* **23**, 4275-4283.

Zhou LJ & Tedder TF. (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* **154**, 3821-3835.

Zhou Y, Bosch ML & Salgaller ML. (2002). Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of antitumor immunity. *J Immunother* **25**, 289-303.

Zlotnik A & Yoshie O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121-127.

7.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Herkunft der DC-Subtypen</i>	2
<i>Abb. 2: Lebenszyklus der DC</i>	4
<i>Abb. 3: Zusammenfassender Vergleich zwischen unreifen und reifen DC</i>	8
<i>Abb. 4: Dot Plots zur Auswertung der Durchflusszytometrie</i>	32
<i>Abb. 5: Schematische Darstellung des Transmigrations-Assays</i>	34
<i>Abb. 6: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA</i>	35
<i>Abb. 7: Fotografien von Ausstrichpräparaten aus AML-Blasten differenzierter DC</i>	37
<i>Abb. 8: Gesamtzellzahlen der AML-Kulturen nach zwei Wochen (n = 14 - 16)</i>	38
<i>Abb. 9: Vitalität der kultivierten AML-Blasten nach zwei Wochen in Prozent (n = 14 - 16)</i> ..	39
<i>Abb. 10: Immunprofil der eingesetzten AML-Blasten vor der Kultivierung</i>	40
<i>Abb. 11: Kumulative CD83⁺/HLA-DR⁺ Zellzahl aus AML-Blasten differenzierter DC</i>	43
<i>Abb. 12: Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 in den AML-Kulturen (n = 12 – 13)</i>	47
<i>Abb. 13: Zusammenfassende Darstellung der MLCs aus AML-Blasten differenzierter DC</i> ...	48
<i>Abb. 14: Fotografien von Ausstrichpräparaten aus ALL-Blasten differenzierter DC</i>	51
<i>Abb. 15: Gesamtzellzahlen der ALL-Kulturen nach A) einer Woche und B) zwei Wochen der Kultivierung (n = 18 - 19)</i>	52
<i>Abb. 16: Immunprofil der eingesetzten ALL-Blasten vor der Kultivierung</i>	53
<i>Abb. 17: Kumulative CD83⁺/HLA-DR⁺ Zellzahl aus ALL-Blasten differenzierter DC</i>	56
<i>Abb. 18: Expression des Chemokinrezeptors CCR7 in den ALL-Kulturen (n = 12 – 13)</i>	59
<i>Abb. 19: Zusammenfassende Darstellung der MLCs aus ALL-Blasten differenzierter DC</i>	60

7.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Chemokine und Chemokinrezeptoren</i>	7
<i>Tabelle 2: Mechanismen, durch die maligne Zellen einer Immunantwort entgehen</i>	10
<i>Tabelle 3: Übersicht der epidemiologischen Daten der verschiedenen Leukämien</i>	11
<i>Tabelle 4: FAB-Klassifikation der AML nach morphologischen Kriterien</i>	11
<i>Tabelle 5: Einteilung der ALL nach B- oder T-Zell-Linie</i>	11
<i>Tabelle 6: Patienten mit akuter myeloischer Leukämie</i>	20
<i>Tabelle 7: Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie</i>	21
<i>Tabelle 8: Für die durchflusszytometrischen Messungen verwendete Antikörper</i>	24
<i>Tabelle 9: CD83 und HLA-DR Koexpression der AML-Kulturen (n = 13 - 15)</i>	41

<i>Tabelle 10: CD86-Expression der AML-Kulturen (n = 13 - 15)</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse der Transmigration der AML-Blasten.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 12: CD83 und HLA-DR -Koexpression der ALL-Kulturen (n = 12-14)</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 13: CD86-Expression der ALL-Kulturen (n = 12 - 14)</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Transmigration der ALL-Blasten.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 15: Gesamtzellzahlen der Zellkulturansätze von AML- und ALL-Blasten.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 16: Kosten der verwendeten Zellkulturmedien.....</i>	<i>86</i>
<i>Tabelle 17: Übersicht über bei Leukämien durchgeführte DC-Vakzinierungsstudien.....</i>	<i>89</i>

7.4 Formelverzeichnis

<i>Formel 1: Berechnung der Gesamtzellzahl.....</i>	<i>28</i>
<i>Formel 2: Berechnung der Vitalität</i>	<i>28</i>
<i>Formel 3: Berechnung der absoluten Zellzahl.....</i>	<i>32</i>
<i>Formel 4: Berechnung der kumulativen Zellzahl.....</i>	<i>33</i>
<i>Formel 5: Berechnung der Transmigrationsrate in %.....</i>	<i>35</i>

7.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. A. Salama**, Leiter des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin, für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Ganz herzlich danke ich **PD Dr. med. Anja Moldenhauer** für die Überlassung dieses interessanten Themas und die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Ich bedanke mich für die sehr gute Anleitung während der experimentellen Phase und wertvollen Ratschläge bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere **Kerstin Schmidt** für die kompetente Einarbeitung in die Experimente und ihre ständige Hilfsbereitschaft bei allen Fragen bezüglich der Zellkulturen. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Forschungshauses und des Instituts für Transfusionsmedizin, die mir in der Ausführung meiner Arbeit geholfen haben, herzlich bedanken.

Ebenfalls ganz herzlich möchte ich mich bei **PD Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger**, Oberarzt und Laborleiter der Klinik für Pädiatrie m. S. Hämatologie und Onkologie, Charité Campus Virchow Klinikum, für das zur Verfügungstellen von Patientenblasten und die tatkräftige Hilfe bei der Durchsicht der Patientenakten bedanken.

Außerdem sei **PD Dr. med. P. le Coutre** und anderen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Charité Campus Virchow Klinikum, sowie **Prof. Dr. med. L. Uharek** und seinen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Charité Campus Benjamin Franklin, für die Unterstützung dieser Arbeit durch die Bereitstellung von Patientenblasten gedankt.

Desweiteren bedanke ich mich bei der **Akademischen Verwaltung der Charité Universitätsmedizin Berlin** für die überaus hilfreiche finanzielle Unterstützung durch die Gewährung eines Forschungsstipendiums.

Außerdem möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich während der Arbeit unterstützt und immer wieder neu motiviert haben. Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter **Bärbel Süßmilch**, ohne die mein Medizinstudium kaum möglich gewesen wäre sowie meinem Lebenspartner **Michèl Schmidt** für seine stetige, liebevolle Unterstützung, seine Geduld und Aufmunterungen.

7.6 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

7.7 Publikationsliste

Schmidt K, Seeger K, Scheibenbogen C, Bender R, Abdulla M, Süßmilch S, Salama A, Moldenhauer A (2009). Histone deacetylase inhibition improves differentiation of dendritic cells from leukemic blasts of patients with TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Leukoc Biol* 85, 563-573.

7.8 Erklärung

Ich, Sina Süßmilch, erkläre, dass die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Vergleich verschiedener Kulturbedingungen für die Differenzierung leukämischer Blasten zu dendritischen Zellen“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben wurden.

Berlin den 07.02.2011

Sina Süßmilch