

Aus dem
CharitéCentrum für Tumormedizin
Institut für Transfusionsmedizin
Direktoren: Professor Dr. Abdulgabar Salama
Professor Dr. Dr. Holger Kiesewetter

Habilitationsschrift

Die dendritische Zelle

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Transfusionsmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Anja Moldenhauer
geboren am 13.03.1969 in Taipei (Taiwan)

Eingereicht: September 2008

Dekanin: Prof. Dr. med. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Gramatzki

2. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Schrezenmeier

Letzte mündliche Prüfung; 14.12.2009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung.....	4
<i>I.1 Themenstellung</i>	4
<i>I.2 Grundlagen und Historie</i>	4
<i>I.3 Ontogenie</i>	6
<i>I.4 Klinische Vakzinierungsstrategien bei Krebserkrankungen</i>	7
<i>I.5 Qualitätsparameter funktionsfähiger DZ</i>	8
II. Ergebnisse.....	10
<i>II.1 Herstellung dendritischer Zellen</i>	10
II.1.1 Herstellung dendritischer Zelle aus Monozyten des peripheren Bluts	10
II.1.2 Herstellung dendritischer Zellen aus CD34(+) hämatopoetischen Vorläuferzellen	21
II.1.3. Herstellung dendritischer Zellen aus leukämischen Blasten.....	52
<i>II.2 Vergleich der ex vivo hergestellten DZ verschiedenen Ursprungs</i>	65
III. Diskussion	74
IV. Zusammenfassung.....	79
V. Ausblick.....	79
VI. Literatur	80
Danksagung	85

I. Einleitung

I.1 Themenstellung

Dendritische Zellen (DZ), die von Steinman als die ersten Wächter des Immunsystems bezeichnet wurden (Steinman and Nussenzweig 1980), spielen eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr. Ihr potentieller Einsatz als Zellvakzin gegen Tumorerkrankungen wie z.B. dem Malignen Melanom fußt auf ihrer ausgeprägten immunstimulatorischen Kapazität (Banchereau and Steinman 1998) und ihrer Fähigkeit, spezifische Epitope dem Immunsystem als Antigen zu präsentieren (Nouri-Shirazi, Banchereau et al. 2000). Für den klinischen Einsatz können DZ sowohl aus Monozyten (Zhou and Tedder 1996) als auch aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (Caux, Vanbervliet et al. 1996) bzw. aus leukämischen Blasten (Choudhury, Gajewski et al. 1997) differenziert werden. Dennoch hat sich diese neue Therapieform bisher im klinischen Alltag nicht etabliert. Die Gründe hierfür sind neben hohen Herstellungskosten die sehr unterschiedlichen Ergebnisse in klinischen Studien. Die Widersprüche der Studienergebnisse basieren zum Teil auf Unterschiede in der Herstellung und Anwendung der DZ. Es fehlen auf diesem Gebiet sowohl Standardmethoden als auch allgemein gültige Qualitätsparameter. Im Rahmen der hier vorgelegten Habilitationsschrift wurden Verfahren entwickelt, die die Ausbeute und Funktionalität von *ex vivo* hergestellten DZ verbessern. Mögliche Lösungen für die Probleme bei der Anwendung werden diskutiert.

I.2 Grundlagen und Historie

Der Freiburger Pathologe Paul Langerhans beschrieb 1868 als erster die im tiefen Striatum spinosum der Epidermis gelegenen Zellen, deren Größe und verzweigte

Fortsätze (= Dendriten) bereits lichtmikroskopisch auffallen. Erst mehr als hundert Jahre später wurden sie genauer charakterisiert (Steinman and Cohn 1973) und ihre Bedeutung als potente Stimulatoren des Immunsystems erkannt (Steinman 1981). Ihre Hauptaufgabe ist die Antigenpräsentation, d.h. sie sind in der Lage, Antigene zu erkennen, zu prozessieren und ruhenden T-Zellen zur Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort zu präsentieren (Abbildung 1).

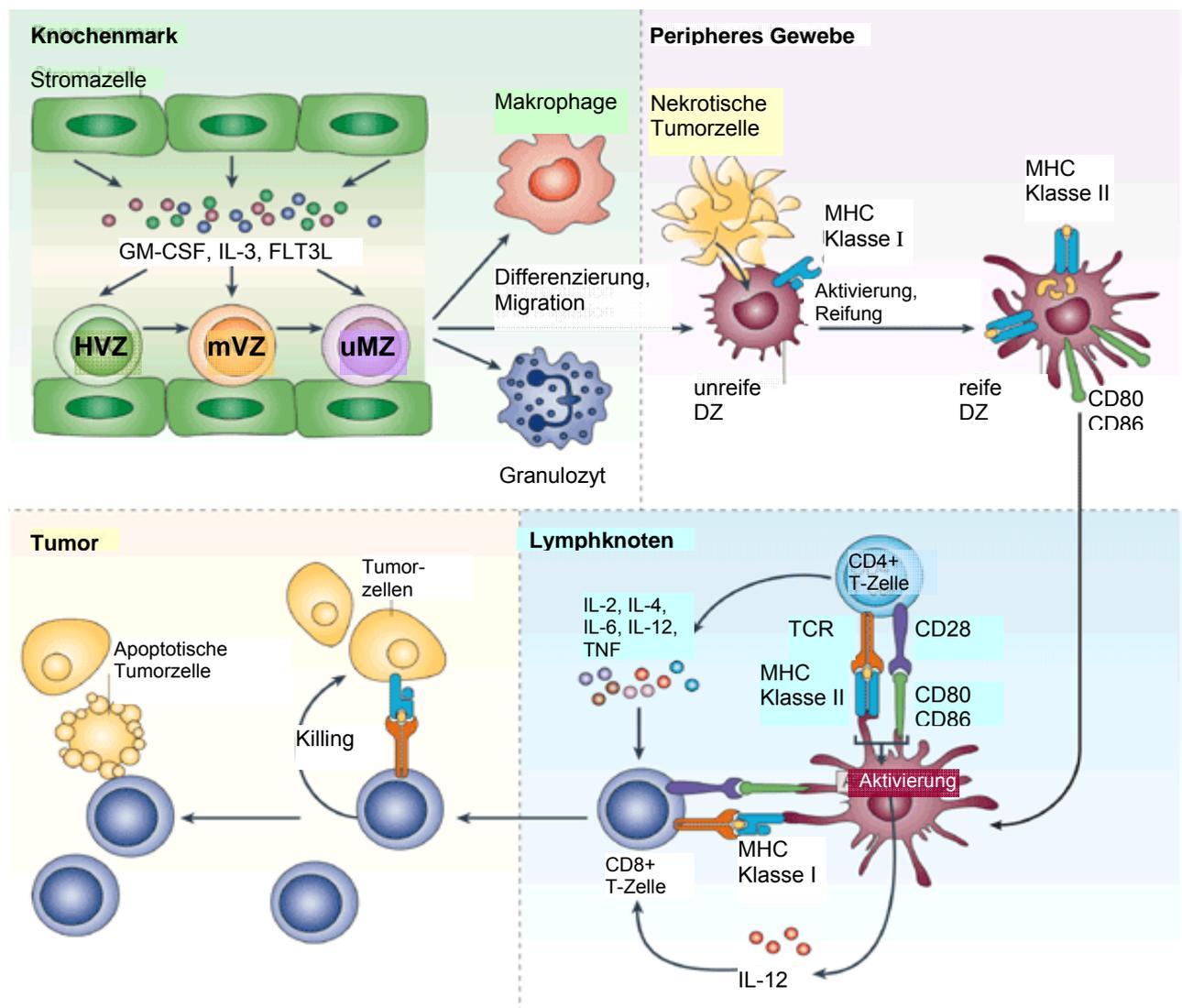


Abbildung 1: DZ-Differenzierung *in vivo* und ihre Rolle bei der Tumorabwehr.

Hämatopoetische Vorläuferzellen (HVZ) reifen im Knochenmark anhand löslicher Wachstumsfaktoren aus den Knochenmarkstromazellen wie Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Interleukin (IL) 3 und fms-related Tyrosinkinase 3 Ligand (FLT3L). Über die Stadien einer gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelle (mVZ) und einer unreifen myeloischen Zelle (uMZ) gelangen die noch unreifen DZ in die Blutbahn. Im Gewebe nehmen diese unreifen DZ z.B. nekrotische Tumorzellen auf und verarbeiten Tumor-assoziierte Antigene, so dass die entsprechenden Epitope CD4(+) T-Helferzellen und CD8(+) T-Killerzellen präsentiert werden können. Während dieses

Prozesses reifen die DZ, so dass MHC Klasse II-Moleküle und kostimulatorischen Moleküle wie CD80 und CD86 hochreguliert werden. Aktivierte DZ wandern zum nächstgelegenen Lymphknoten, in dem sie mit den genannten T-Zellen interagieren. CD4(+) T-Zellen regen die DZ zur Produktion von IL-12 an und/oder sorgen für das notwendige Zytokinmilieu zur Vermehrung von antigen-spezifischen CD8(+) zytotoxischen T-Zellen. Diese werden auch direkt von den DZ aktiviert. Zytotoxische T-Zellen erkennen daraufhin intakte Tumorzellen und können diese eliminieren. TCR, T-Zellrezeptor; TNF, Tumor-Nekrose-Faktor. Angelehnt an (Gabrilovich 2004).

1.3 Ontogenie

Im lebenden Organismus stammen DZ von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Man unterscheidet sie anhand ihrer entwicklungsbedingten Zwischenstufen (Abbildung 2). Demnach gibt es myeloische und lymphoide DZ, wobei man aus heutiger Sicht keine klare Grenzen zwischen diesen beiden Subtypen ziehen kann (Shortman and Naik 2007). Myeloische DZ stammen von myeloischen Vorläufern ab, einer Vorstufe, die sie sich mit Granulozyten und Monozyten teilen.

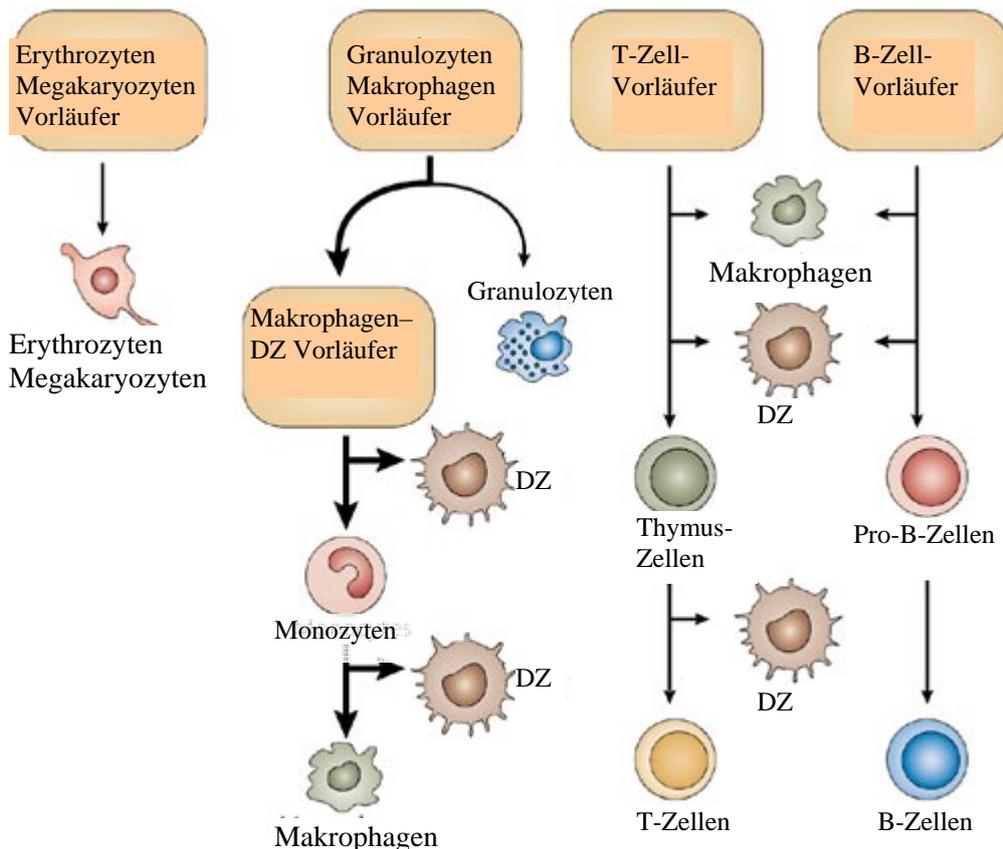


Abbildung 2: Die dendritischen Zelle in der Hämatopoese.

Die frühere Annahme einer starren, dendritischen Zellreifung entlang irreversibler Zwischenstufen wurde inzwischen durch das Modell einer graduellen Entwicklung ersetzt, deren Unumkehrbarkeit erst die Spätfolge einer Reihe von Prozessen ist. Die Entwicklung von Makrophagen und dendritischen

Zellen (DZ) ist eng miteinander verwoben. Beide können auch aus Vorläufern der T- und B-Zellreihe entstehen. Angelehnt an (Shortman and Naik 2007).

Myeloische DZ entwickeln sich zum einen direkt aus CD34(+) hämatopoetischen Vorläuferzellen (Caux, Vanbervliet et al. 1996). Im Gewebe differenzieren sie zu CD1a(+) Zellen, den sogenannten Langerhans-Zellen der Haut (Caux, Dezutter-Dambuyant et al. 1992), die nach Aufnahme des Antigens in das Lymphsystem wandern. Zum anderen reifen CD14(+) Monozyten in Gegenwart von Zytokinen wie GM-CSF und IL-4 zu CD14(-) DZ, die sich nach Zugabe von weiteren Stimulanzen wie $TNF\alpha$ oder Lipopolysacchariden zu CD83(+) DZ entwickeln (Zhou and Tedder 1996).

Lymphoide (follikuläre) DZ hingegen entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen. Diese können, genauso wie T-Helfer- und T-Killerzellen, positiv für CD4 bzw. CD8 sein. Im Gegensatz zu den myeloischen DZ residieren lymphoide DZ in den Lymphknoten und zeigen keine große migratorische Aktivität. Vielmehr sind sie für die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen zuständig (Wilson, El-Sukkari et al. 2003).

1.4 Klinische Vakzinierungsstrategien bei Krebserkrankungen

Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle in der Immunabwehr wurde bereits frühzeitig versucht, myeloische DZ im Rahmen zellulärer Immuntherapien bei Krebserkrankungen einzusetzen (Hsu, Benike et al. 1996; Nestle, Alijagic et al. 1998). Myeloische DZ werden aufgrund ihrer hohen Phagozytoseaktivität und guten Kultivierbarkeit meistens vorgezogen. Inzwischen gibt es kaum eine Krebserkrankung, die nicht schon mit myeloischen DZ behandelt wurde (Ridgway 2003). Gerade das Maligne Melanom erwies sich aufgrund seiner spezifischen Tumorantigene und Immunogenität als ein geeigneter Tumor (Lens 2008). Studien

an Patienten mit Nierenzellkarzinomen (Avigan, Vasir et al. 2007), Brustkrebs (Dees, McKinnon et al. 2004), Hirntumoren (Wheeler, Black et al. 2008) oder Prostatakrebs (Doehn, Bohmer et al. 2008) bewiesen die Fähigkeit der DZ, im klinischen Einsatz eine immunologische anti-Tumorantwort zu induzieren. Allerdings überzeugten die klinischen Ergebnisse hinsichtlich einer dauerhaften Remission bzw. Aufhalten der Tumorprogression bisher nicht. Dies kann zum einen daran liegen, dass dendritische Zelltherapien überwiegend erst im Endstadium eingesetzt wurden (Nencioni, Grunebach et al. 2008). Zum anderen haben Krebspatienten häufig weniger funktionsfähige DZ (Gottfried, Kreutz et al. 2008), die nicht in der Lage sind, eine adäquate anti-Tumor-Immunantwort in Gang zu setzen (Gabrilovich 2004). Neuere Empfehlungen postulieren daher eine Kombination aus dendritischen Zellen und Peptidantigenen (Carrasco, Van Pel et al. 2008), Immunadjuvantien oder antigen-spezifischen T-Zellen (Engell-Noerregaard, Hansen et al. 2008). Ein weiteres Problem ist das Fehlen von richtungsweisenden Standards, die ein effizientes DZ-Vakzin garantieren. So unterscheiden sich die bisherigen klinischen Studien nicht nur in den Herstellungsverfahren, der eingesetzten Zelldosis (10^6 - 10^9 Zellen), Applikationshäufigkeit und -art (subkutan, intravenös oder intranodal), sondern auch in der Qualität der DZ.

1.5 Qualitätsparameter funktionsfähiger DZ

Entscheidend für eine gute Qualität des dendritischen Zellvakzins sind eine hohe Ausbeute, eine hohe allogene T-Zell-stimulatorische Kapazität in der gemischten Lymphozytenkultur sowie die Fähigkeit der DZ, eine tumor-spezifische T-Zellantwort zu erzeugen. Je nachdem, ob die dendritische Zelle noch in der Lage sein muss, das zu präsentierende Antigen aufzunehmen, sollte sie über eine gute Phagozytoseaktivität verfügen. Darüber hinaus ist die Wanderungsfähigkeit der DZ

wichtig für ihren Applikationsmodus, da eine DZ, die nicht mehr zum Lymphsystem wandert, in der Regel in vivo auch keine gute Immunantwort produziert (Verdijk, Aarntzen et al. 2008). In solchen Fällen favorisieren einige Gruppen die intralymphatische Injektion (Jonuleit, Giesecke-Tuettenberg et al. 2001; Bedrosian, Mick et al. 2003). Ein erfolgreiches Trafficking hängt von den chemotaktischen Reaktionen der DZ auf Liganden des CCR-7 Rezeptors wie dem Makrophagen-inflammatorischen Protein (MIP) 3 β und dem Epstein-Barr virus-induced molecule 1 Liganden Chemokin (ELC) (Cella, Sallusto et al. 1997) ab.

In Tabelle 1 werden die Charakteristika reifer und unreifer DZ einander gegenübergestellt.

	Unreife DZ	Reife DZ
Immunphänotyp	CD1a ⁺ , CD14 ^{low} , MHC I und II ⁺ CD83 ⁻ , CD80 ^{low} , CD86 ^{low}	CD1a ⁺ , CD14 ⁻ , MHC I und II ⁺⁺ , CD83 ⁺ , CD80 ^{+/-} , CD86 ^{high}
Phagozytoseaktivität	hoch	niedrig
Allostimulation	niedrig	hoch
Chemotaxis	CCL1, MCP-1, MIP-1, RANTES	ELC, MIP-3, SDF-1
Zellkulturverhalten	Adhärent	Nicht adhärent

Tabelle 1: Unterschiede zwischen unreifen und reifen DZ. (Cella, Sallusto et al. 1997; Hart 1997; Hopken and Lipp 2004)

CCL: C-C Chemokin Ligand; MCP: Monocyte Chemotactic Protein; MIP: Macrophage Inflammatory Protein; RANTES: Regulated upon Activation in Normal T cells Expressed and Secreted; ELC: EB11 Ligand Chemokin; SDF: stroma-derived Faktor; -: negativ; +: positiv, +/-: teilweise positiv; low: geringe Expression; high: hohe Expression.

Für eine effiziente Immuntherapie ist die Herstellung einer optimal funktionierenden DZ Transfusionseinheit von essenzieller Bedeutung. Zielsetzung ist es daher, die Ausbeute und Funktionalität eines klinisch einsetzbaren dendritischen Zellvakzins zu optimieren. Unsere Ergebnisse zur Generierung von myeloischen, dendritischen Zellvakzinen werden im Folgenden dargestellt.

II. Ergebnisse

II.1 Herstellung dendritischer Zellen

Im peripheren Blut liegt die Anzahl an reifen dendritischen Zellen unter 1% der mononukleären Zellen (Mohty, Isnardon et al. 2002). Daher sind Strategien, die die Gewinnung hoher Zelldosen ermöglichen, von entscheidender Bedeutung für die klinische Anwendung. Entsprechend den Erkenntnissen der Ontogenie können DZ aus Monozyten des peripheren Bluts, hämatopoetischen Vorläuferzellen bzw. auch aus Tumorzellen direkt *ex vivo* differenziert werden. Für die Anwendung am Menschen sind alle drei Alternativen praktikabel.

II.1.1 Herstellung dendritischer Zelle aus Monozyten des peripheren Bluts

Eine Möglichkeit, DZ aus Monozyten herzustellen, ist die Differenzierung im geschlossenen Beutelsystem (Pullarkat, Lau et al. 2002) nach Gewinnung der Monozyten mittels Leukapherese (Turner, Roder et al. 1999). Dies setzt jedoch kostspielige Apheresesysteme sowie geschultes Personal voraus. Einfacher und günstiger ist das von uns entwickelte Verfahren zur Gewinnung von DZ aus Buffy Coats (Moldenhauer, Nociari et al. 2003). Die initiale Ausbeute an Monozyten wurde mittels eines sekundären Adhäsionsschritts optimiert. Dadurch konnten mehr als 3×10^7 dendritischer Zellen pro Buffy Coat gewonnen werden. Fötales Kälberserum (FKS) wurde durch autologes Plasma ersetzt, ohne dass es zu qualitativen Verlusten kam. Unterschiede ergaben sich lediglich im Immunprofil sowie in der Transmigrationsfähigkeit der DZ. In FKS entstandene DZ exprimierten CD1a und wanderten besser entlang eines MIP-3 β -Gradienten als in Plasma generierte DZ. Letztere waren überwiegend CD83 positiv und wiesen eine höhere Konzentration an Matrixmetalloproteinase 9 auf, was für eine bessere Gewebsgängigkeit spricht.

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118835244/HTMLSTART>

Seite 11-20

II.1.2 Herstellung dendritischer Zellen aus CD34(+) hämatopoetischen

Vorläuferzellen

Eine Alternative zu den Monozyten als Ausgangszellpopulation sind CD34(+) hämatopoetische Vorläuferzellen des Knochenmarks bzw. des peripheren Bluts (Bernhard, Disis et al. 1995). In der klinischen Anwendung bedeutet dies jedoch, dass das Knochenmark des Spenders oder Patienten entweder im Rahmen einer Operation punktiert wird, oder aber dass seine Vorläuferzellen mittels GM-CSF oder G-CSF zunächst mobilisiert und anschließend mittels Apherese gesammelt werden (Fruehauf, Witzens et al. 2002). Eine weitere allogene Quelle ist Nabelschnurblut, dessen Gewinnung ohne aufwendige Separationsverfahren möglich ist (Moldenhauer and Salama 2007). Hier ist die Konzentration an Vorläuferzellen ungefähr zehnmal höher als im peripheren Blut (Moise 2005). Falls die hämatopoetischen Vorläuferzellen nicht sofort aus dem Nabelschnurblut isoliert werden, sollte das Blut bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Wenn das Nabelschnurblut für zwei Tage bei Raumtemperatur gelagert wurde, entwickelten die Vorläuferzellen gemäß unseren Untersuchungen eine doppelt so hohe SDF-1 assoziierte Transmigrationskapazität wie die Ausgangszellen (Moldenhauer, Wolf et al. 2007). Dies ließ sich auf eine höhere Expression an CXCR-4, dem Rezeptor für SDF-1, zurückführen. CXCR-4 und SDF-1 sind entscheidend für das Gelangen der transplantierten hämatopoetischen Vorläuferzellen in das Knochenmark (= Homing). Interessanterweise stellten wir einen Wiederanstieg von mononukleären und CD34(+)-Zellen nach einer Lagerung von 48 Stunden fest, so dass die Werte zu diesem Zeitpunkt denen nach Abnahme glichen. Bei Raumtemperatur erhöhte sich der Gehalt an Vorläuferzellen auf das Dreifache und die Anzahl der erythrozytären Kolonien auf das Vierfache im Vergleich zu Proben, die bei 4°C gelagert wurden.

<http://www.nature.com/bmt/journal/v40/n9/full/1705831a.html>

Seite 22-26

Im Gegensatz zu DZ aus Monozyten, deren Kultivierung fünf bis sieben Tage beansprucht, können DZ aus CD34(+)-Zellen im Durchschnitt nach 14 Tagen geerntet werden. Anders als bei gängigen Protokollen der DZ Differenzierung aus Monozyten wird hier TNF α in der Regel von Beginn an dazu gegeben (Szabolcs, Moore et al. 1995; Ratta, Rondelli et al. 1998; Ohishi, Katayama et al. 2001). Neben Blockierung der Makrophagenentwicklung (Caux, Dezutter-Dambuyant et al. 1992) erhöht TNF α die Phagozytoseaktivität der hämatopoetischen Vorläuferzellen.

Wir entdeckten, dass TNF α auch die Aufnahme adenoviraler Vektoren in Vorläuferzellen unterstützt, was wiederum eine signifikant höhere Transduktionseffizienz zur Folge hat (Moldenhauer, Shieh et al. 2004). CD34(+)-Vorläuferzellen lassen sich in der Regel nur schwerlich mit Adenovektoren transduzieren. Eine 10minütige Inkubation der Vorläuferzellen mit TNF α (100ng/ml) führte hingegen zu einer Verdopplung an transduzierten, grünfluoreszierenden Zellen. Die Gründe hierfür waren zum einen eine teilweise höhere Expression an Coxsackie-Adenovirus Rezeptoren (CAR); zum anderen stellten wir nach TNF α eine kappenartige Konzentration der Rezeptoren an einer Stelle der Zellmembran fest. Dies weist auf eine phagozytäre Aufnahme der Vektoren hin. Retrovirale Gentransfers wurden durch eine TNF α -Vorinkubation der Vorläuferzellen nicht positiv beeinflusst. Die Kurzzeitinkubation mit TNF α hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate, sondern unterstützte vielmehr die transduzierten hämatopoetischen Vorläuferzellen dabei, Granulozyten- und Makrophagenkolonien zu bilden. Das von uns beschriebene Verfahren nutzten wir in einem weiter unten folgenden Ansatz zum Nachweis eines bilateralen Proteintransfers zwischen Vorläuferzellen und Endothelzellen.

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/121585988/HTMLSTART>

Seite 28-36.

Andere Zytokine, die in Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ eine dendritische Zelldifferenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen begünstigen, sind GM-CSF, Stammzellfaktor (SCF) und FLT3L. Diese werden ebenfalls von Endothelzellen der Nabelschnur produziert (Yamaguchi, Ishii et al. 1996; Jazwiec, Solanilla et al. 1998; Solanilla, Grosset et al. 2000). Unsere Kokultur aus $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten Endothelzellen mit hämatopoetischen Stammzellen ermöglichte die Gewinnung reifer DZ über einen Zeitraum von 43 Tagen (Moldenhauer, Nociari et al. 2004). Aus 1×10^5 hämatopoetischen Vorläuferzellen wurde somit eine kumulative Ausbeute von 2×10^5 DZ erzielt. Im Gegensatz dazu war die Zellausbeute in der isolierten Zytokinkombination bereits am Tag 15 erschöpft. Endothelzellen reduzierten die $\text{TNF}\alpha$ -abhängige Apoptose insbesondere dann, wenn die reifenden DZ und Endothelzellen in direktem Kontakt zu einander standen. Eine mögliche Erklärung dafür ist der bilaterale Proteintransfer zwischen beiden Zelltypen, der mittels des grünfluoreszierenden Proteins nach adenoviraler Transduktion in der Konfokalmikroskopie nachgewiesen wurde. Die noch unreifen, sich entwickelnden DZ krallten sich regelrecht an dem $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten Endothel fest und vergruben sich teilweise darin. Stimulierten wir die Endothelzellen mit Interleukinen anstatt mit $\text{TNF}\alpha$, entstanden keine DZ. Ersetzten wir die Endothelzellen durch $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Knochenmarkstromazellen, so erzielten wir zwar eine Proliferation der Vorläuferzellen. Eine Ausreifung zu dendritischen Zellen trat jedoch nicht ein. Anscheinend sind das endotheliale Zytokinmilieu und das Rezeptorrepertoire der Gefäßzellen entscheidend für eine optimale DZ Entwicklung.

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/121586013/HTMLSTART>

Seite 38-51

Nicht nur CD34(+) hämatopoetische Vorläuferzellen, sondern auch Blasten der akuten myeloischen Leukämiezelllinie Kasumi-1 zeigten eine ausgeprägte dendritische Differenzierung in Kokultur mit TNF α -stimuliertem Endothelzellen. Kasumi-1 Zellen sind positiv für die Translokation t(8;21), die das Fusionstranskript *AML1/ETO* kodiert. Dieses Fusionstranskript ist eines der leukämogenen Antigene, das mittels eines dendritischen Zellvakzins präsentiert werden könnte.

II.1.3. Herstellung dendritischer Zellen aus leukämischen Blasten

Im Vergleich zu Monozyten und CD34(+) hämatopoetischen Vorläuferzellen haben leukämische Blasten einen entscheidenden Vorteil: sie tragen das zu präsentierende Tumorantigen bereits in sich. Im Falle der beiden anderen Ursprungszellen müssen die differenzierten DZ vor dem klinischen Einsatz mit dem Zielepitop beladen werden, sei es mittels apoptotischer Tumorzellen (Schnurr, Scholz et al. 2002), Tumorzelllysaten (Hus, Rolinski et al. 2005) oder isolierter mRNA des Tumors (Pascolo 2008). Eine weitere Methode ist die Etablierung von DZ/Tumorzellhybriden (Trefzer, Herberth et al. 2004; Klammer, Waterfall et al. 2005; Shu, Zheng et al. 2007). Allen gemein ist eine zusätzliche Manipulation der DZ, was die Qualitätsparameter ungünstig beeinflussen kann.

Daher ist die direkte Differenzierung einer Tumorzelle zu einer dendritischen Zelle eine interessante Alternative. Gerade bei Erkrankungen des leukämischen Formenkreises ist es von Vorteil, dass leukämische Blasten und DZ einen gemeinsamen Vorläufer haben (Choudhury, Gajewski et al. 1997; Cignetti, Bryant et al. 1999). Man weiß inzwischen, dass Genfusionen, bei denen der Transkriptionsfaktor *AML1* betroffen ist, die Leukämogenese begünstigen. *AML1* ist ein wichtiger Faktor bei der Transkription bedeutender hämatopoetischer Gene, wie z.B. für eine Untereinheit des T-Zellrezeptors, IL-3, GM-CSF, den Rezeptor für den

kolonie-stimulierenden Faktor 1 sowie der Myeloperoxidase (Downing 1999). Kommt es im Rahmen einer genetischen Translokation zu einer Fusion zwischen *AML1* und *ETO* oder *TEL*, so wird ein nukleärer Corepressor-Komplex aktiviert, der wiederum Histondeacetylasen rekrutiert (Guidez, Oetrie et al. 2000; Kramer, Muller et al. 2007). Dadurch wird die Transkriptionsrate der Vorläuferzellen verringert; sie können nun nicht wie geplant ausdifferenzieren, sondern verbleiben in ihrem undifferenzierten Stadium und es kommt zur präleukämischen Blastenproliferation (Okuda, Cai et al. 1998; Hong, Gupta et al. 2008).

Die funktionelle Hemmung der Histondeacetylasen mittels Inhibitoren wie Trichostatin A hebt wiederum die Transkriptionsblockade auf, so dass die Blasten nun ausdifferenzieren können. So gelang uns nach Applikation von Trichostatin und Zugabe von $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF und Stammzellofaktor die Differenzierung leukämischer dendritischer Zellen (Moldenhauer, Frank et al. 2004). Dazu verwendeten wir drei unterschiedliche akute Leukämiezelllinien mit AML1-assoziierten Translokationen. Zytokine alleine führten zwar auch zu einer Differenzierung DZ, die teilweise eine sehr viel höhere allostimulatorische Kapazität aufwies als DZ nach Hemmung von Histondeacetylasen. DZ aus der reinen Zytokinkombination ohne Trichostatin führten allerdings nur zu einer unspezifischen Zytolyse. Eine blasten-spezifische, zytotoxische T-Zellantwort konnten wir nur bei den mit Trichostatin behandelten DZ nachweisen. Diese Immunantwort wurde sowohl durch blockierende Antikörper gegen MHC Klasse I als auch MHC Klasse II beeinträchtigt. Dies spricht dafür, dass nicht nur CD8(+) T-Killerzellen, sondern auch CD4(+) T-Helferzellen an der zytotoxischen Reaktion beteiligt waren.

<http://www.jleukbio.org/cgi/content/full/76/3/623>

Seite 54-64

II.2 Vergleich der ex vivo hergestellten DZ verschiedenen Ursprungs

Unsere vergleichenden Analysen der verschiedenen DZ aus Monozyten, Vorläuferzellen und Blasten ergaben, dass alle ähnliche Morphologien, Immunprofile und allostimulatorische Kapazität hatten (Moldenhauer, Moore et al. 2006). Unterschiede gab es lediglich in ihrer chemotaktischen Aktivität, d.h. in ihrer Fähigkeit, in Richtung bestimmter Chemokine zu wandern. Hier erwiesen sich DZ aus CD34(+) Vorläuferzellen als diejenigen mit der höchsten Transmigrationskapazität, während leukämische DZ nicht entlang eines chemotaktischen Gradienten wanderten.

Ersetzten wir fötales Kälberserum in den DZ Kulturbedingungen durch gepooltes Humanserum, so änderte sich insgesamt gesehen nichts an den migratorischen Fähigkeiten der verschiedenen DZ. Allerdings reduzierte sich die MIP-3 β -abhängige Chemotaxis der aus Vorläuferzellen gewonnenen DZ. Dafür reagierten die in humanem Serum gezüchteten DZ besser auf RANTES und MIP-3 α .

Die migratorischen Eigenschaften der DZ wurden hierbei in einer Boyden-Kammer untersucht (Abbildung 3).

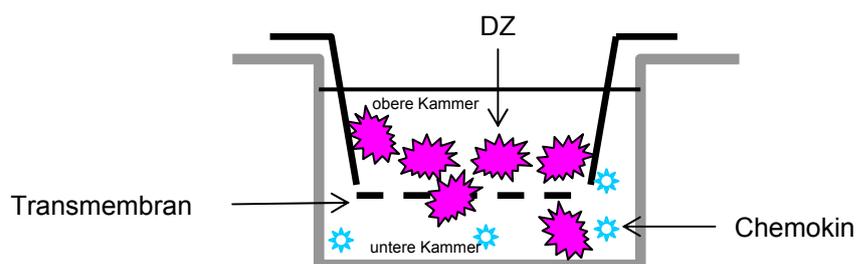


Abbildung 3. Boyden-Kammer

Unter serumfreien Bedingungen wurden die DZ in die obere Kammer gesetzt, in der unteren befindet sich das Chemokin. Nach vier Stunden im 37°C-Inkubator werden die Zellen, die die kammerntrennende Transmembran passierten, gezählt. Das Verhältnis von transmigrierten zu eingesetzten Zellen ergibt ein Maß für die Transmigrationskapazität.

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VP8-4K1F7X4-9&_user=1853498&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000055104&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1853498&md5=5449cdc17eaceb82290fcdbd53bdaf3c

Seite 66-73

III. Diskussion

Dendritische Zellen sind inzwischen ein unverzichtbarer Bestandteil immuntherapeutischer Ansätze. Bisherige klinische Studien unter Anwendung dendritischer Zellvakzine bei Krebspatienten fielen allerdings recht unterschiedlich aus (Nestle, Alijagic et al. 1998; Thurner, Haendle et al. 1999; Banchereau, Palucka et al. 2001) und legen nahe, dass hier der isolierte Einsatz von DZ nicht zu einer dauerhaften Remission führt (Nestle, Farkas et al. 2005; Doehn, Bohmer et al. 2008; Engell-Noerregaard, Hansen et al. 2008). Wiederholt korrelierte das immunologische Ansprechen auch nicht mit dem klinischen Verlauf (Takahashi, Tanaka et al. 2003; Redman, Chang et al. 2008). Ein Grund dafür kann eine inadäquate Beladung der DZ sein, die gerade bei der Herstellung von Tumor/DZ-Hybriden bzw. dem Einsatz von Lysaten nur in wenigen Studien dokumentiert wurde (Shu, Zheng et al. 2007). Des Weiteren wurden überwiegend immuninkompetente Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium behandelt, was einem Ansprechen der Therapie schon aufgrund der komplexen Wirkungsweise der DZ im Rahmen der zellulären Immunkaskade widerspricht. Hier könnte eine Vakzinierung zu einem früheren Zeitpunkt sinnvoll sein (Vulink, Radford et al. 2008).

Ein Hauptproblem bei der Gesamtevaluation von klinischen Studien sind die sehr variablen Herstellungs- und Anwendungsmodalitäten. Gerade im klinischen Einsatz der dendritischen Zellvakzine sind Herstellungsmethoden, die den Anforderungen einer guten klinischen Praxis entsprechen, von entscheidender Bedeutung. In der ersten hier vorgestellten Arbeit entwickelten wir ein einfaches und kostengünstiges Verfahren zur Herstellung allogener dendritischer Zellen aus Monozyten (Moldenhauer, Nociari et al. 2003), dass unter Reinraumbedingungen durchaus für die klinische Praxis geeignet ist. In den Kulturbedingungen ersetzen wir fötales

Kälberserum (FKS) durch Plasma desselben Spenders, ohne dass die Zellausbeute bzw. immunostimulatorische Kapazität der Zellen negativ beeinflusst wurde. Vielmehr kam es zu einer deutlichen Zunahme an CD83(+) Zellen, die eine höhere proteolytische Aktivität hatten, dafür aber eine geringere MIP-3 β abhängige Chemotaxis aufwiesen. Hingegen war die Anzahl an CD1a(+) Zellen in den auf FKS-basierenden Medien signifikant höher, was eine andere Arbeit bestätigte (Pietschmann, Stockl et al. 2000). Angesichts des Risikos einer Übertragung von Krankheitserregern aus Rindern verbietet sich die Anwendung von FKS. Dennoch favorisieren einige klinische Anwender seinen Einsatz, da die dendritische Zellreifung aus Monozyten durch FKS positiv beeinflusst wird (Triozi and Aldrich 1997). Ein anderes Problem sind Hemmstoffe der dendritischen Reifung, wie z.B. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF (Gabrilovich, Chen et al. 1996), der vermehrt von entarteten Zellen produziert wird (Gabrilovich 2004) und auch im Serum der Patienten vorkommt. Aber auch Tumorantigene selbst können die ex vivo Dendropoese negativ beeinflussen (Aalamian-Matheis, Chatta et al. 2007). Heutzutage werden in den meisten Studien die DZ entweder unter serumfreien Bedingungen (Houtenbos, Westers et al. 2003; Westermann, Kopp et al. 2007), in hitzeinaktiviertem autologen Plasma (Erdmann, Dorrie et al. 2007; Wheeler, Black et al. 2008) oder aber in gepooltem AB-Serum (Redman, Chang et al. 2008) kultiviert. In eigenen Experimenten zur dendritischen Zelldifferenzierung leukämischer Patientenblasten konnte FKS durch gepooltes, hitzeinaktiviertes Serum gesunder Blutspender ersetzt werden, was das Überleben der leukämischen DZ in der Kultur unterstützte (eingereichtes Manuskript).

Eine andere Kulturmethode haben wir am Beispiel von DZ aus hämatopoetischen Vorläuferzellen demonstriert (Moldenhauer, Nociari et al. 2004). In dem die sich entwickelnden DZ in Kokultur TNF α -stimulierten Endothelzellen gezüchtet wurden,

konnte man auf die Zugabe weiterer Zytokine wie SCF, FLT3L und GM-CSF verzichten. Gerade GM-CSF und SCF, beide bedeutsam in der dendritischen Zellreifung aus CD34(+) Zellen, werden nach einer Stimulation mit TNF α vermehrt von den Endothelzellen produziert (Ko, Totzke et al. 1999). Endothelzellen der Nabelschnur erwiesen sich in unserem Kokulturmodell gegenüber Knochenmarkstroma als vorteilhafter, obwohl eine andere Gruppe die Reifung dendritischer Zellen auf lymphozytären Stromazellen empfiehlt (O'Neill, Ni et al. 1999). Auch hinsichtlich der Gesamtausbeute war dieses Kulturverfahren der feederfreien Suspensionskultur überlegen. Wird anstatt TNF α Interleukin-1 β oder IL-3 eingesetzt, so entwickeln sich die hämatopoetischen Vorläuferzellen zu neutrophilen bzw. eosinophilen Granulozyten, während eine Stimulation mit IL-6 den hämatopoetischen Vorläuferstatus der Zellen erhält (Moldenhauer, Genter et al.).

Nicht nur CD34(+) Vorläuferzellen, sondern auch leukämische Blasten der akuten myeloischen Zelllinie Kasumi-1 reiften in Gegenwart TNF α -stimulierter Endothelzellen zu dendritischen Zellen. Leukämiezellen sind eine attraktive Quelle für DZ, da sie beide einen gemeinsamen Vorläufer aufweisen können (Choudhury, Gajewski et al. 1997). Daher bieten leukämische DZ einen idealen Ansatz zu einer unterstützenden Immuntherapie (Schmitt, Hus et al. 2007). In unseren Untersuchungen wurden Blasten aus drei akuten Leukämiezelllinien, zwei myeloischen und einer lymphoblastischen, zu leukämischen DZ differenziert (Moldenhauer, Frank et al. 2004). Alle drei Zelllinien waren positiv für Fusionen des Transkriptionsfaktor *AML1*, die über einen nukleären Corepressor-Komplex Histondeacetylasen aktivieren, was wiederum die Transkription wichtiger hämatopoetischer Gene verhindert (Downing 1999). Nach der Anwendung von Histondeacetylase-Inhibitoren wurde die dendritische Differenzierbarkeit der Blasten verbessert, was sich sowohl im Immunphänotyp als auch in ihrer Funktionalität

zeigte. So wurde eine doppelt so hohe Frequenz CD83(+)DR(+)- Zellen erreicht wie in anderen Arbeiten (Kohler, Plettig et al. 2000; Blair, Rowbottom et al. 2001; Harrison, Adams et al. 2001; Westers, Stam et al. 2003). Unsere leukämischen DZ konnten allogene HLA-gematchte T-Zellen gegen undifferenzierte Blasten sensibilisieren, so dass hier eine spezifisch anti-leukämische, zytotoxische Immunantwort mit einer bis zu 80%igen Lyse festgestellt wurde. Diese ausgeprägte Immunantwort war jedoch nur nachweisbar, wenn die DZ nach Hemmung von Histondeacetylasen mittels Trichostatin A entstanden waren. Untersuchungen an Blasten von Patienten mit *TEL/AML1*-positiver akuter lymphoblastischer Leukämien scheinen die Ergebnisse der Zellkultur zu bestätigen (eingereichtes Manuskript). Da die aus den Zelllinien gewonnenen leukämischen DZ allogene T-Zellen von gesunden Spendern mit einem passenden HLA-Muster zu einer spezifischen Immunantwort sensibilisieren konnten, könnte man theoretisch den Einsatz dieser DZ bei Patienten mit kompatiblen HLA-Typ in Erwägung ziehen. Eine „leichte“ Alloreaktivität unterstützt häufig auch die Antitumor-Antwort (Avigan, Vasir et al. 2007). Zu der gleichen Empfehlung kommen Santegoets und Kollegen, die aufgrund der Standardisierbarkeit etablierter Leukämiezelllinien deren klinische Anwendung als DZ Vakzin propagieren (Santegoets, van den Eertwegh et al. 2008). Jedoch wären die möglichen Risiken einer bei Patienten eingesetzten, immortalisierten Leukämiezelllinie wie z.B. die Induktion einer Zweiterkrankung nicht auszuschließen.

Vor der klinischen Anwendung empfiehlt sich ein Qualitätsvergleich der hergestellten DZ. In der Vergangenheit wurden wiederholt CD34(+)-DZ und monozytäre DZ miteinander verglichen (Meierhoff, Krause et al. 1998; Ferlazzo, Wesa et al. 1999; Chen, Stiff et al. 2001; Syme, Bajwa et al. 2005). Beide DZ besaßen ähnliche Immunprofile und allostimulatorische Kapazitäten, allerdings stellte eine

Arbeitsgruppe eine höhere antigen-spezifische CD8(+) Aktivierung durch DZ aus Vorläuferzellen fest (Ferlazzo, Wesa et al. 1999). In unseren Untersuchungen hatten alle DZ vergleichbare morphologische und immunphänotypische Eigenschaften; sie unterschieden sich auch nicht in ihren allostimulatorischen Fähigkeiten (Moldenhauer, Moore et al. 2006). Signifikante Differenzen gab es jedoch in ihrer Wanderungsfähigkeit entlang eines Chemokingradienten. Leukämische DZ zeigten im Gegensatz zu monozytären DZ und DZ aus hämatopoetischen Vorläuferzellen keine chemotaktische Aktivität. Dies widerspricht teilweise den Resultaten anderer Arbeitsgruppen (Cignetti, Vallario et al. 2004; Westers, Houtenbos et al. 2005). Im Unterschied zu anderen Arbeiten wurden unsere leukämischen DZ nach Zugabe von Trichostatin A differenziert, was die reduzierte Transmigrationsfähigkeit erklären kann. Demnach müssten diese Zellen im Rahmen von Vakzinierungen in den Lymphknoten injiziert werden.

IV. Zusammenfassung

In den hier zusammengefassten Publikationen werden Verfahren zur Herstellung dendritischer Zellen mit dem Ziel einer Verwendung als Krebsvakzin vorgestellt. Als Quelle dienten Monozyten des peripheren Bluts, CD34(+) hämatopoetische Vorläuferzellen sowie leukämische Blasten. DZ aller drei Typen waren von vergleichbarer Natur hinsichtlich der Morphologie, des Immunphänotyps und der allostimulatorischen Kapazität. Signifikante Unterschiede fanden sich jedoch in ihrer Fähigkeit, entlang eines Chemokingradienten zu wandern, die bei den leukämischen DZ nicht mehr vorhanden war. Demnach müssten DZ unterschiedlicher Herkunft verschieden appliziert werden. Monozytären DZ und DZ aus hämatopoetischen Vorläuferzellen können intravenös oder intratumorös angewendet werden, während leukämische DZ intralymphatisch appliziert werden sollten.

V. Ausblick

Die aktuelle Datenlage zu Vakzinierungen bei Krebspatienten verlangt standardisierte Verfahren der Herstellung und klinischen Anwendung von DZ. Nicht nur morphologische, immunphänotypische und allostimulatorische Eigenschaften, sondern auch die migratorischen Fähigkeiten der DZ sollten untersucht werden, um so den optimalen Applikationsmodus zu definieren. Strenge Qualitätsrichtlinien, die eine optimale Zellausbeute und –funktionalität garantieren, müssen formuliert und bindend eingehalten werden. Erst dann können Placebo-kontrollierte Studien eine sinnvolle Schlussfolgerung darüber zulassen, welche Patienten in welchem Stadium ihrer Erkrankung von einer Vakzinierungstherapie profitieren.

VI. Literatur

- Aalamian-Matheis, M., G. S. Chatta, et al. (2007). "Inhibition of dendritic cell generation and function by serum from prostate cancer patients: correlation with serum-free PSA." *Adv Exp Med Biol* **601**: 173-82.
- Avigan, D. E., B. Vasir, et al. (2007). "Phase I/II study of vaccination with electrofused allogeneic dendritic cells/autologous tumor-derived cells in patients with stage IV renal cell carcinoma." *J Immunother* **30**(7): 749-61.
- Banchereau, J., A. K. Palucka, et al. (2001). "Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine." *Cancer Res* **61**(17): 6451-8.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**: 245-252.
- Bedrosian, I., R. Mick, et al. (2003). "Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients." *J Clin Oncol* **21**(20): 3826-35.
- Bernhard, H., M. L. Disis, et al. (1995). "Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood." *Cancer Res* **55**(5): 1099-104.
- Blair, A., A. W. Rowbottom, 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**(10): 1596-603.
- Carrasco, J., A. Van Pel, et al. (2008). "Vaccination of a melanoma patient with mature dendritic cells pulsed with MAGE-3 peptides triggers the activity of nonvaccine anti-tumor cells." *J Immunol* **180**(5): 3585-93.
- Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, et al. (1992). "GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells." *Nature* **360**(6401): 258-61.
- Caux, C., B. Vanbervliet, et al. (1996). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF-alpha." *J Exp Med* **184**: 695-706.
- Cella, M., F. Sallusto, et al. (1997). "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." *Curr Opin Immunol* **9**(1): 10-6.
- Chen, B., P. Stiff, et al. (2001). "Replicative response, immunophenotype, and functional activity of monocyte-derived versus CD34(+)-derived dendritic cells following exposure to various expansion and maturational stimuli." *Clin Immunol* **98**(2): 280-92.
- Choudhury, A., J. L. Gajewski, et al. (1997). "Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia." *Blood* **89**(4): 1133-42.
- Cignetti, A., E. Bryant, et al. (1999). "CD34(+) acute myeloid and lymphoid leukemic blasts can be induced to differentiate into dendritic cells." *Blood* **94**(6): 2048-55.
- Cignetti, A., A. Vallario, et al. (2004). "Leukemia-derived immature dendritic cells differentiate into functionally competent mature dendritic cells that efficiently stimulate T cell responses." *J Immunol* **173**(4): 2855-65.
- Dees, E. C., K. P. McKinnon, et al. (2004). "Dendritic cells can be rapidly expanded ex vivo and safely administered in patients with metastatic breast cancer." *Cancer Immunol Immunother* **53**(9): 777-85.
- Doehn, C., T. Bohmer, et al. (2008). "Prostate cancer vaccines: current status and future potential." *BioDrugs* **22**(2): 71-84.

- Downing, J. R. (1999). "The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance." Brit J Haem **106**: 296-308.
- Engell-Noerregaard, L., T. H. Hansen, et al. (2008). "Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters." Cancer Immunol Immunother.
- Erdmann, M., J. Dorrie, et al. (2007). "Effective clinical-scale production of dendritic cell vaccines by monocyte elutriation directly in medium, subsequent culture in bags and final antigen loading using peptides or RNA transfection." J Immunother **30**(6): 663-74.
- Ferlazzo, G., A. Wesa, et al. (1999). "Dendritic cells generated either from CD34+ progenitor cells or from monocytes differ in their ability to activate antigen-specific CD8+ T cells." J Immunol **163**(7): 3597-604.
- Fruehauf, S., M. Witzens, et al. (2002). Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation. Onkologie. Zeller and z. Hausen. Heidelberg. **06**: 1-24.
- Gabrilovich, D. (2004). "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects." Nat Rev Immunol **4**(12): 941-52.
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, et al. (1996). "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." Nat Med **2**(10): 1096-103.
- Gottfried, E., M. Kreutz, et al. (2008). "Tumor-induced modulation of dendritic cell function." Cytokine Growth Factor Rev **19**(1): 65-77.
- Guidez, F., K. Oetrie, et al. (2000). "Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein." Blood **96**: 2557-61.
- Harrison, B. D., J. A. Adams, et al. (2001). "Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia." Blood **97**(9): 2764-2771.
- Hart, D. N. J. (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood **90**(9): 3245-87.
- Hong, D., R. Gupta, et al. (2008). "Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia." Science **319**(5861): 336-9.
- Hopken, U. E. and M. Lipp (2004). "All roads lead to Rome: triggering dendritic cell migration." Immunity **20**(3): 244-6.
- Houtenbos, I., T. M. Westers, et al. (2003). "Serum-free generation of antigen presenting cells from acute myeloid leukaemic blasts for active specific immunisation." Cancer Immunol Immunother **52**(7): 455-62.
- Hsu, F. J., C. Benike, et al. (1996). "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." Nature Medicine **2**(1): 52-58.
- Hus, I., J. Rolinski, 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.
- Jazwiec, B., A. Solanilla, et al. (1998). "Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL-1 and glucocorticoids." Leukemia **12**(8): 1210-20.
- Jonuleit, H., A. Giesecke-Tuettenberg, et al. (2001). "A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection." Int J Cancer **93**(2): 243-51.

- Klammer, M., M. Waterfall, et al. (2005). "Fusion hybrids of dendritic cells and autologous myeloid blasts as a potential cellular vaccine for acute myeloid leukaemia." Br J Haematol **129**(3): 340-9.
- Ko, Y., G. Totzke, et al. (1999). "Cytokine-inducible growth factor gene expression in human umbilical endothelial cells." Mol Cell Probes **13**(3): 203-11.
- Kohler, T., R. Plettig, et al. (2000). "Cytokine-driven differentiation of blasts from patients with acute myelogenous and lymphoblastic leukemia into dendritic cells." Stem Cells **18**(2): 139-47.
- Kramer, O. H., S. Muller, et al. (2007). "Mechanism for ubiquitylation of the leukemia fusion proteins AML1-ETO and PML-RAR{alpha}." Faseb J.
- Lens, M. (2008). "The role of vaccine therapy in the treatment of melanoma." Expert Opin Biol Ther **8**(3): 315-23.
- Meierhoff, G., S. W. Krause, et al. (1998). "Comparative analysis of dendritic cells derived from blood monocytes or CD34+ hematopoietic progenitor cells." Immunobiology **198**(5): 501-13.
- Mohty, M., D. Isnardon, et al. (2002). "Low blood dendritic cells in chronic myeloid leukaemia patients correlates with loss of CD34+/CD38- primitive haematopoietic progenitors." Br J Haematol **119**(1): 115-8.
- Moise, K. J., Jr. (2005). "Umbilical cord stem cells." Obstet Gynecol **106**(6): 1393-407.

Eigene Arbeiten:

- Moldenhauer, A.,** R. C. Frank, et al. (2004). "Histone deacetylase inhibition improves dendritic cell differentiation of leukemic blasts with AML1-containing fusion proteins." J Leukoc Biol **76**(3): 623-33.
- Moldenhauer, A.,** G. Genter, et al. "Hematopoietic progenitor cells and interleukin-stimulated endothelium: expansion and differentiation of myeloid precursors." BMC Immunology **Accepted**.
- Moldenhauer, A.,** M. A. Moore, et al. (2006). "Differences in the transmigration of different dendritic cells." Exp Hematol **34**(6): 745-52.
- Moldenhauer, A.,** M. Nociari, et al. (2004). "Tumor necrosis factor alpha-stimulated endothelium: an inducer of dendritic cell development from hematopoietic progenitors and myeloid leukemic cells." Stem Cells **22**(2): 144-57.
- Moldenhauer, A.,** M. M. Nociari, et al. (2003). "Optimized culture conditions for the generation of dendritic cells from peripheral blood monocytes." Vox Sang **84**(3): 228-236.
- Moldenhauer, A.** and A. Salama (2007). Stellenwert der Nabelschnurblutspende. Gynäkologie, Geburtsmedizin und Gynäkologische Endokrinologie. Berlin, Akademos. **1**: 26-39.
- Moldenhauer, A.,** J. H. Shieh, et al. (2004). "Tumor Necrosis Factor Alpha Enhances the Adenoviral Transduction of CD34(+) Hematopoietic Progenitor Cells." Stem Cells **22**(3): 283-91.
- Moldenhauer, A.,** J. Wolf, et al. (2007). "Optimum storage conditions for cord blood-derived hematopoietic progenitor cells prior to isolation." Bone Marrow Transplant **40**(9): 837-42.
- Nencioni, A., F. Grunebach, et al. (2008). "The use of dendritic cells in cancer immunotherapy." Crit Rev Oncol Hematol **65**(3): 191-9.
- Nestle, F. O., S. Alijagic, et al. (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." Nature Medicine **4**(3): 328-332.

- Nestle, F. O., A. Farkas, et al. (2005). "Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer." Curr Opin Immunol **17**(2): 163-9.
- Nouri-Shirazi, M., J. Banchereau, et al. (2000). "Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses." J Immunol **165**(7): 3797-803.
- O'Neill, H. C., K. Ni, et al. (1999). "Long-term stroma-dependent cultures are a consistent source of immunostimulatory dendritic cells." Immunol Cell Biol **77**(5): 434-41.
- Ohishi, K., N. Katayama, et al. (2001). "Efficient ex vivo generation of human dendritic cells from mobilized CD34+ peripheral blood progenitors." Int J Hematol **74**(3): 287-96.
- Okuda, T., Z. Cai, et al. (1998). "Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors." Blood **91**(9): 3134-43.
- Pascolo, S. (2008). "Vaccination with messenger RNA (mRNA)." Handb Exp Pharmacol(183): 221-35.
- Pietschmann, P., J. Stockl, et al. (2000). "Functional and phenotypic characteristics of dendritic cells generated in human plasma supplemented medium." Scand J Immunol **51**(4): 377-83.
- Pullarkat, V., R. Lau, et al. (2002). "Large-scale monocyte enrichment coupled with a closed culture system for the generation of human dendritic cells." J Immunol Methods **267**(2): 173-83.
- Ratta, M., D. Rondelli, et al. (1998). "Generation and functional characterization of human dendritic cells derived from CD34 cells mobilized into peripheral blood: comparison with bone marrow CD34+ cells." Br J Haematol **101**(4): 756-65.
- Redman, B. G., A. E. Chang, et al. (2008). "Phase Ib trial assessing autologous, tumor-pulsed dendritic cells as a vaccine administered with or without IL-2 in patients with metastatic melanoma." J Immunother **31**(6): 591-8.
- Ridgway, D. (2003). "The first 1000 dendritic cell vaccinees." Cancer Invest **21**(6): 873-86.
- Santegoets, S. J., A. J. van den Eertwegh, et al. (2008). "Human dendritic cell line models for DC differentiation and clinical DC vaccination studies." J Leukoc Biol.
- Schmitt, A., I. Hus, et al. (2007). "Dendritic cell vaccines for leukemia patients." Expert Rev Anticancer Ther **7**(3): 275-83.
- Schnurr, M., C. Scholz, et al. (2002). "Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells." Cancer Res **62**(8): 2347-52.
- Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.
- Shu, S., R. Zheng, et al. (2007). "Immunogenicity of dendritic-tumor fusion hybrids and their utility in cancer immunotherapy." Crit Rev Immunol **27**(5): 463-83.
- Solanilla, A., C. Grosset, et al. (2000). "Expression of Flt3-ligand by the endothelial cell." Leukemia **14**(1): 153-62.
- Steinman, R. M. (1981). "Dendritic cells." Transplantation **31**(3): 151-5.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig (1980). "Dendritic cells: features and functions." Immunol Rev **53**: 127-47.

- Syme, R., R. Bajwa, et al. (2005). "Comparison of CD34 and monocyte-derived dendritic cells from mobilized peripheral blood from cancer patients." Stem Cells **23**(1): 74-81.
- Szabolcs, P., M. A. S. Moore, et al. (1995). "Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, and TNF-alpha." The Journal of Immunology **154**: 5851-5861.
- Takahashi, T., Y. Tanaka, et al. (2003). "Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia." Leuk Res **27**(9): 795-802.
- Turner, B., I. Haendle, et al. (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." J Exp Med **190**(11): 1669-78.
- Turner, B., C. Roder, et al. (1999). "Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application." J Immunol Methods **223**(1): 1-15.
- Trefzer, U., G. Herberth, et al. (2004). "Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients." Int J Cancer **110**(5): 730-40.
- Triozi, P. L. and W. Aldrich (1997). "Phenotypic and functional differences between human dendritic cells derived in vitro from hematopoietic progenitors and from monocytes/macrophages." J Leukoc Biol **61**(5): 600-8.
- Verdijk, P., E. H. Aarntzen, et al. (2008). "Maximizing dendritic cell migration in cancer immunotherapy." Expert Opin Biol Ther **8**(7): 865-74.
- Vulink, A., K. J. Radford, et al. (2008). "Dendritic cells in cancer immunotherapy." Adv Cancer Res **99**: 363-407.
- Westermann, J., J. Kopp, et al. (2007). "Vaccination with autologous non-irradiated dendritic cells in patients with bcr/abl+ chronic myeloid leukaemia." Br J Haematol **137**(4): 297-306.
- Westers, T. M., I. Houtenbos, et al. (2005). "Leukemia-derived dendritic cells in acute myeloid leukemia exhibit potent migratory capacity." Leukemia **19**(7): 1270-2.
- Westers, T. M., A. G. Stam, et al. (2003). "Rapid generation of antigen-presenting cells from leukaemic blasts in acute myeloid leukaemia." Cancer Immunol Immunother **52**(1): 17-27.
- Wheeler, C. J., K. L. Black, et al. (2008). "Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients." Cancer Res **68**(14): 5955-64.
- Wilson, N. S., D. El-Sukkari, et al. (2003). "Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature." Blood **102**(6): 2187-94.
- Yamaguchi, H., E. Ishii, et al. (1996). "Umbilical vein endothelial cells are an important source of c-kit and stem cell factor which regulate the proliferation of haemopoietic progenitor cells." Br J Haematol **94**(4): 606-11.
- Zhou, L.-J. and T. F. Tedder (1996). "CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells." Proc Natl Acad Sci **93**: 2588-92.

Danksagung

An dieser Stelle danke ich in erster Linie meinen beiden Chefs, Prof. Salama und Prof. Kiesewetter, für die kritische Durchsicht der Habilitationsschrift, ihre stete organisatorische und finanzielle Unterstützung bei all meinen Forschungsvorhaben sowie in der akademischen Lehre.

Meinem amerikanischen Mentor, Prof. Malcolm Moore aus New York, der während meines Forschungsaufenthalts in seiner Abteilung die hier vorgestellten Projekte initiierte, sei an dieser Stelle gedankt. Nicht unerwähnt lassen möchte ich auch Dr. Richard Frank, Prof. Shahin Rafii und PD Dr. Dr. Karl Seeger, die bei drei Arbeiten Pate standen.

Für ihre Hilfe bei der Ausführung von Experimenten danke ich Kerstin Schmidt, Dr. Andreas Lun, Maureen Sullivan, Dr. Jae-Huang Shieh, Regina Kohlhaus, Lucia Badiali, Gudrun Holland, Juliane Wolf, Gudrun Habermann, Gesche Genter, Gürkan Bal und Manuela Köppen.

Der Deutschen Krebshilfe, dem Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung sowie dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, der Alexander von Humboldt-Stiftung und dem Rahel-Hirsch-Stipendium der Charité verdanke ich den Großteil an Finanzmitteln für die hier vorgestellten Arbeiten.

Ganz besonderen Dank verdient meine Familie: meine Mutter Dr. Shu-Miao Moldenhauer, die mich stets zu neuen Aufgaben motiviert; meine Schwester Dr. Sonja Moldenhauer, deren graphisches Talent mir sehr weiterhalf; und mein Ehemann, Thilo Gruber, für seine unablässige Unterstützung und seine Geduld.